

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

**PROSPECÇÃO DE GENES NA MICROBIOTA DO RÚMEN
BOVINO COM PROPRIEDADES DEGRADADORAS DA
BIOMASSA VEGETAL**

Lucas Daniel Ribeiro
Tecnólogo em biocombustíveis

2015

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

**PROSPECÇÃO DE GENES NA MICROBIOTA DO RÚMEN
BOVINO COM PROPRIEDADES DEGRADADORAS DA
BIOMASSA VEGETAL**

Lucas Daniel Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

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 Microbiologia Agropecuária.

2015

Ribeiro, Lucas Daniel
R484p Prospecção de genes na microbiota do rúmen bovino com
propriedades degradadoras da biomassa vegetal / Lucas Daniel
Ribeiro. -- Jaboticabal, 2015
iii, 27 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Jackson Antônio Marcondes de Souza
Banca examinadora: Amanda Azarias Guimarães, Manoel Victor
Franco Lemos
Bibliografia

1. Metagenômica 2. Rúmen. 3. MG-RAST. 4. Enzimas
celulolíticas. 5. Whole Genome Sequencing. I. Título. II. Jaboticabal -
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS DANIEL RIBEIRO – Filho de José Eneri Ribeiro e Ivone Maria Bachega, nascido em 27 de novembro de 1990, na cidade de La Plata, província de Buenos Aires, Argentina. Ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis, na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, em fevereiro de 2010, recebendo o título de tecnólogo em biocombustíveis em março de 2013. Durante a graduação foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Iniciou o curso de Mestrado Microbiologia Agropecuária em março de 2013 sob orientação do Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. Durante o Mestrado foi membro representante discente do conselho do programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária.

“Filho, há mais uma coisa que eu quero dizer: Os livros sempre continuarão a ser escritos; e estudar demais cansa a mente. De tudo o que foi dito, a conclusão é esta: tema a Deus e obedeça aos seus mandamentos porque foi para isso que fomos criados. Nós teremos de prestar contas a Deus de tudo o que fizermos e até daquilo que fizermos em segredo, seja o bem ou o mal” (Eclesiastes 12. 12-14 – Bíblia Sagrada NTLH).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem sua ajuda eu com certeza não teria chegado até aqui.

A minha querida esposa Sany, pela compreensão e pelo carinho dedicado a mim todos os dias.

A minha família, em especial a minha mãe, que sempre me incentivou muito a estudar.

Ao Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza, por ter me aceitado como orientado, mesmo sem me conhecer, e pela oportunidade que ele me proporcionou.

Ao Programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, por ter aberto as portas da universidade para que eu pudesse obter este título.

A Prof. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, que cedeu gentilmente o Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas – LBMP, para a execução dos experimentos deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Genética Aplicada – LGA e do Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos e Plantas – LBMP, vocês tornaram os meus dias muito mais felizes.

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos e a Dra. Amanda Azarias Guimarães, por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

CAPITULO 1 – Considerações Gerais	1
1. REFERÊNCIAS.....	7
CAPITULO 2 - Prospecção de genes do microbioma ruminal bovino com propriedades degradadoras da biomassa vegetal.....	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 Animal e dieta	11
2.2 Amostragem do DNA total	12
2.3 Construção da biblioteca e sequenciamento	13
2.4 Análise dos dados.....	13
3. RESULTADOS	14
3.1 Sequenciamento	14
3.2 Perfil do microbioma ruminal	14
3.3 Genes relacionados com a degradação de biomassa	16
4. DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÕES	23
6. REFERÊNCIAS	24

PROSPECÇÃO DE GENES NA MICROBIOTA DO RÚMEN BOVINO COM PROPRIEDADES DEGRADADORAS DA BIOMASSA VEGETAL

RESUMO - Desde a expansão da indústria, a partir da revolução industrial, a população mundial tem crescido de forma exponencial. Este aumento populacional aliado aos avanços tecnológicos constantes alavancou o consumo mundial de energia. Este cenário tem incentivado países do mundo todo a buscar alternativas para aumentar a produção de energia. Uma das alternativas adotadas são os biocombustíveis, onde o etanol tem lugar de destaque. Para tanto, a degradação de biomassa vegetal, para a liberação dos açúcares estruturais da fibra vegetal para fermentação, tem se intensificado. O etanol é o principal biocombustível brasileiro e o uso de biomassa vegetal é uma alternativa para o aumento de sua produção. No entanto, a ação enzimática ineficiente na degradação de polissacarídeos estruturais impede a produção industrial. Uma solução é a prospecção de enzimas degradantes de biomassa e um ambiente para esta busca pode ser o rúmen. O qual é um ambiente rico em micro-organismos que degradam a lignocelulose. Considerando que cerca de 99% dos micro-organismos não são passíveis ao cultivo tradicional, a fim de romper com estas limitações foi usada a abordagem metagenômica neste estudo para caracterização de genes com potencial para degradar biomassa e também para avaliação da diversidade taxonômica do ambiente ruminal bovino. Foram coletadas amostras de rúmen de um gado Nelore para a obtenção de DNA, que posteriormente foi sequenciado pelo sequenciador HiScan SQ (Illumina). Foram obtidas 65 milhões de sequências, cada uma com 100 pb, que foram analisadas no servidor MG-RAST. Para montar o perfil taxonômico deste metagenoma foram usados três bancos de dados na análise das sequências: Ribossomal database Project (RDP), que encontrou 18 filos na amostra; Greengenes, que encontrou 16 filos; e SILVA Small SubUnit (SSU) onde foram encontrados 22 filos. Dentre todos os filos encontrados o Firmicutes foi o mais abundante, seguido de Bacteroidetes e Proteobacteria nas três bases de dados. Para a análise funcional foram utilizados cinco bancos de dados para prospecção de Glycoside Hydrolases (GHs): Genbank, Integrated Microbial Genomes (IMG), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), SEED, e SwissProt. Foram encontradas sete famílias de GHs e quatro de CBM (Carbohydrate Binding Module). Apesar de algumas divergências os bancos de dados mantiveram um mesmo padrão nos resultados, tanto do perfil taxonômico quanto no funcional. O metagenoma ruminal mostrou boa diversidade de enzimas degradadoras de biomassa vegetal, inclusive enzimas não catalogadas, demonstrando o seu potencial como fonte de enzimas com potencial biotecnológico.

Palavras-chaves: metagenômica, rúmen, MG-RAST, enzimas celulolíticas, Whole Genome Sequencing

PROSPECTING FOR GENES FROM BOVINE RUMINAL MICROBIOTA WITH PLANT BIOMASS DEGRADING PROPERTIES

ABSTRACT – Since the expansion of industry through the Industrial Revolution, the world population has increased unprecedented. This rise together the constant technological advances leveraged the world's energy consumption. This scenario has encouraged countries around the world to seek alternatives to higher energy production, being the biofuels one of the adopted alternatives, which ethanol has excelled. Therefore, the plant biomass degradation for the release of structural sugars from plant fiber fermentation has intensified. Ethanol is the main Brazilian biofuel and the use of plant biomass is an alternative for increasing its production. However, inefficient enzymatic action in the degradation of structural polysaccharides prevents industrial production. One solution is the prospect of biomass degrading enzymes and an environment for this search may be the rumen, which is an environment rich in microorganisms that degrade lignocellulose. Whereas about 99% of the microorganisms are not amenable to traditional growth, in order to break these limitations was used a metagenomics approach in this study to characterize genes with potential to degrade biomass and to evaluate the taxonomic diversity of bovine rumen environment. Rumen samples were collected from Nelore cattle for obtaining total DNA, which was subsequently sequenced by SQ HiScan (Illumina) sequencer. Sixty-five million sequences were obtained, each with a 100 bp, which were analyzed by MG-RAST server. In order to mount the taxonomic profile of this metagenomic we used three databases on the analysis of sequences: Ribosomal Database Project (RDP), which found 18 phyla in the sample; GreenGenes, which found 16 phyla; and SILVA Small subunit (SSU) which found 22 phyla. Among all the phyla, Firmicutes was the most abundant, followed by Bacteroidetes and Proteobacteria by the three databases. For the functional analysis were used five databases for prospecting glycoside Hydrolases (GHs): GenBank, Integrated Microbial Genomes (IMG), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), SEED, and SwissProt. Seven families were found to GHs and four to CBM (Carbohydrate Binding Module). Despite some disagreements, all databases maintained the same pattern in the results for both the taxonomic profile as the functional. The rumen metagenome showed good diversity of plant biomass degrading enzymes, including not cataloged enzymes, showing its potential as a source of enzymes with biotechnological potential.

Key words: metagenomics, rumen, MG-RAST, cellulolytic enzymes, Whole Genome Sequencing

CAPITULO 1 – Considerações Gerais

Desde a expansão da indústria na segunda revolução industrial, a população mundial tem crescido de forma exponencial. Alguns dos principais fatores que contribuíram para este crescimento foram, o desenvolvimento industrial, a modernização da agricultura e o aumento da capacidade de consumo da população. Este aumento da população e o avanço da tecnologia acarretam em um maior consumo *per capita* de energia (FERREIRA et al., 2006; GOLDEMBERG e LUCON, 2007; ZEN et al., 2008; SCHLESINGER, 2009). Energia é algo essencial para a vida humana, no passado ela era obtida a baixo custo, pois era extraída da lenha de florestas em sua maioria, mas com o crescimento da demanda, outras fontes de energia se tornaram necessárias, e atualmente grande parte do que é consumido no mundo é obtido através de fontes não renováveis, como o petróleo e o carvão mineral, que juntos somam aproximadamente 63% da matriz energética mundial (GOLDEMBERG e LUCON, 2007; SRWE, 2015). Em 1970 com o petróleo em crise iniciaram-se as preocupações com as questões energéticas, aflorando a necessidade de revisão do modelo energético mundial.

Considerando esta situação, países importadores de energia despertaram para a necessidade de buscar a geração de energia a partir de fontes alternativas que pudessem suprir a demanda interna (FERREIRA et al., 2006). Embora o petróleo tenha se recuperado da crise, hoje existe a necessidade de reduzir a dependência pelos combustíveis fósseis para diminuir as emissões dos gases de efeito estufa e os impactos ambientais (SACHS, 2005). Existem várias formas de energia renovável (bioenergia), dentre elas se destacam: biocombustíveis, biomassa vegetal, eólica, hidroelétrica e solar. Os biocombustíveis são combustíveis produzidos a partir de produtos vegetais ou compostos de origem animal. As principais fontes no mundo são cana-de-açúcar-de-açúcar, milho, soja, colza. O etanol e o biodiesel são os dois biocombustíveis de maior destaque na matriz energética mundial e no mercado internacional de combustíveis. Os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais de etanol, e utilizam o milho em sua produção, o Brasil é o segundo colocado e utiliza a cana-de-açúcar como matéria prima. A união europeia são os maiores

produtores de biodiesel no mundo, e utilizam a colza como maior parte da matéria prima para a produção.

Os Estados Unidos e o Brasil também se destacam na produção de biodiesel, utilizando a soja como matéria prima principal (MME, 2007; SRWE, 2015). Desde a antiguidade a biomassa já era usada como fonte de energia (lenha), embora não fosse um consumo sustentável. Por esse motivo, durante muito tempo, o termo biomassa foi associado ao desmatamento. A biomassa é matéria vegetal que armazenou a energia do Sol na forma de energia química, a qual é utilizada. Há dois tipos de biomassa: Biomassa Tradicional – Combustão direta de madeira, lenha ou carvão vegetal e Resíduos urbanos e de animais. Biomassa Moderna – Tecnologias avançadas para a produção de energia elétrica e biocombustível (GUARDABASSI, 2006; MME, 2007). A energia eólica vem sendo utilizada pela humanidade há mais de 3000 anos. Os moinhos de vento utilizados para moagem de grãos e bombeamento de água em atividades agrícolas foram as primeiras aplicações da energia eólica. Esta aplicação vem se tornando mais importante a cada dia como fonte alternativa de energia para produção de eletricidade. Ela consiste em converter a energia cinética dos ventos em energia mecânica (movimento das pás), que alimenta um gerador que a transforma em energia elétrica (MARTINS, GUARNIERI, PEREIRA; 2007).

Embora atualmente nosso país esteja vivendo uma crise hídrica muito forte, a energia hidroelétrica ainda é considerada um recurso renovável, comercial importante e o mais econômico no mundo e, além disso, o que mais rápido pode ser utilizado. Desempenha importante papel no fornecimento elétrico da maioria das regiões. Usinas hidrelétricas produzem mais de 90% da energia elétrica consumida no Brasil. Este tipo de energia é gerado a partir das águas dos rios em níveis adequados em suas represas (LAPEÑA, 1999; ANEEL, 2015). Energia solar é o nome dado à energia proveniente da luz e do calor do Sol. Diferentes tecnologias que estão em constante evolução, como o aquecimento solar e a energia solar fotovoltaica, permitem a utilização deste tipo de energia para diversos fins (NUNES, 2007). De todos os tipos de energia os combustíveis são parte muito importante de toda demanda, e não há dúvida de que os biocombustíveis, como forma de energia, podem contribuir para alcançar as metas de energias renováveis destinadas a substituir os combustíveis fósseis. No entanto, essa situação deve ser acompanhada de um esforço para

aprendermos a produzir mais com menos insumos e energia (SACHS, 2005; CHAVES e GOMES, 2014).

Os combustíveis representam boa parte da matriz energética mundial, por isso tanto esforço em encontrar fontes alternativas para sua produção. Atualmente, outra preocupação com relação aos biocombustíveis é o aumento da produtividade por área de cultivo, e o uso da biomassa pode suprir essa necessidade. Em uma área de plantio de cana-de-açúcar, por exemplo, usa-se a cana-de-açúcar no processo tradicional de produção e o bagaço poderia ser a matéria prima para a produção do etanol de segunda geração, através da desconstrução das fibras vegetais, por meio químico ou enzimático, para liberação de açúcares fermentáveis. Mas este processo ainda encontra um grande problema, que é a falta de tecnologia, pois a degradação química não é específica e a enzimática apesar de alta especificidade ao substrato, ainda se apresenta ineficiente em escala industrial. Uma das maneiras de superar estes problemas é prospectar micro-organismos produtores de enzimas especializadas na degradação de biomassa (MACEDO, 2007; KOHLHEPP, 2010; MAICHE & HUBER, 2010; HESS et al., 2011; SRWE, 2015).

Os eucariotos por muitos anos foram considerados o grupo de maior diversidade no planeta, levando em conta suas formas multicelulares, enquanto que os procaríotos eram considerados simples em suas características (HUGENHOLTZ et al., 1996). Mas este conceito começou a mudar, quando através de um trabalho que analisou o RNA da subunidade menor do ribossomo, sugeriu-se que os organismos fossem classificados em 3 domínios: Archaea, Bacteria e Eukarya, todos eles partindo de um mesmo ancestral comum (WOESE, 1987). Desde então, vários estudos foram realizados, demonstrando a imensidão do mundo bacteriano e a sua importância nos mais diversos ambientes.

Um desses ambientes a ser considerado é o rúmen, compartimento que faz parte do sistema digestivo dos ruminantes, onde a ação bacteriana é fundamental. Os ruminantes são mamíferos herbívoros e não sintetizam enzimas que hidrolisam matéria vegetal (celulose, hemicelulose e lignina) da dieta. No entanto, eles estabelecem uma relação simbiótica com micro-organismos anaeróbios, que são capazes de fermentar alimentos de diferentes origens, como carboidratos solúveis e insolúveis, proteínas e lipídeos. A relação simbiótica se dá da seguinte forma, o animal

fornece um ambiente propício para o desenvolvimento dos micro-organismos anaeróbios, que por sua vez, suprem o animal com ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), proteína microbiana, amônia, aminoácidos e vitaminas para o hospedeiro (JESUS, 2014; LOPES, 2014). 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 de bovinos (JESUS, 2014).

O ecossistema do rúmen consiste, principalmente, de bactérias (10^{10} - 10^{11} células/ml), arqueias (10^7 - 10^9 células/ml), protozoários (10^4 - 10^6 /ml), fungos anaeróbios (10^3 - 10^5 zoósporos/ml) e bacteriófagos (10^8 - 10^9 /ml) (KAMRA, 2005). Considerando a complexidade de populações bacterianas, diversas interações acontecem no rúmen, envolvendo diferentes grupos de micro-organismos. Estas interações resultam na bioconversão do alimento, em compostos utilizados por outros micro-organismos e também pelo próprio animal. A qualidade e a quantidade dos compostos produzidos na fermentação dependem do tipo e da atividade dos micro-organismos presentes no rúmen (TOWNE *et al.*, 1990; RUSSEL *et al.*, 1992). Estudos das vias metabólicas de algumas bactérias do rúmen, isoladas em laboratório, demonstraram que várias espécies produzem produtos finais que não podem ser detectados no líquido ruminal (ATLAS *et al.*, 1998). Os ácidos orgânicos voláteis resultantes da fermentação ruminal representam a principal fonte de energia para os animais ruminantes (LOPES, 2014).

O rúmen apresenta grande diversidade de espécies bacterianas, sendo que os gêneros bacterianos predominantes são *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Succinomonas*, *Butyvirio*, *Selenomonas*, *Succinivibrio*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, entre outros (ATLAS *et al.*, 1998). Estas bactérias podem ser encontradas da seguinte maneira, dispersas na fase líquida, associadas com partículas de alimentos, associadas ao epitélio, e associadas à superfície de protozoários (YU e FORSTER, 2005). As bactérias que estão aderidas a partículas de alimento são consideradas o grupo mais importante por conterem grande número de bactérias com atividade de Endoglucanase. A composição da

comunidade microbiana do rúmen é influenciada tanto pela dieta quanto pela idade do animal. A diversidade e homogeneidade da comunidade microbiana ruminal aumentam com a idade (JAMI et al., 2013). Entretanto, o ecossistema ruminal é considerado estável, já que os micro-organismos atuam de forma integrada e balanceada para o desempenho de suas funções durante a bioconversão dos componentes da dieta do animal (KAMRA, 2005; WU et al., 2012).

A fermentação ruminal está relacionada com o desenvolvimento do rúmen e com a eficiência alimentar, influenciando diretamente a produtividade dos animais. O estabelecimento das atividades digestivas no rúmen depende da colonização de micro-organismos, os quais utilizam os componentes da dieta como substrato para fermentação (LI *et al.*, 2012). O estudo e compreensão das comunidades microbianas complexas presentes no rúmen são ainda pouco conhecidas (JAMI; MIZRAHI, 2012). O estudo destes micro-organismos presentes no rúmen e o sequenciamento dos seus respectivos genomas para a prospecção de genes envolvidos na degradação de fibra vegetal são promissores do ponto de vista biotecnológico, pois a diversidade microbiana do rúmen contém um vasto conteúdo genético, que pode ser explorado para a descoberta de novas enzimas (GHAZANFAR & AZIM, 2009).

Enzimas são proteínas produzidas por seres vivos que catalisam reações químicas, diminuindo a energia de ativação dos processos celulares. Sua estrutura é normalmente formada por cadeias de 62 a 2.500 aminoácidos. Essas moléculas funcionais evoluem em resposta ao ambiente onde se desenvolvem os organismos responsáveis pela sua síntese e, por isso, têm mais eficiência em condições específicas. Enzimas têm alta especificidade e sua eficiência é medida em quantidade de substrato convertido em produtos por unidade de tempo, em determinada concentração, que é o fator mais influente da atividade enzimática. Porém, outras variáveis influenciam sua taxa de reação, tais como temperatura, acidez, coenzimas e cofatores (WERNER, 2013). Em termos gerais enzimas são proteínas que agem como catalisadores altamente eficientes das reações químicas que ocorrem nos organismos vivos podendo acelerar a velocidade das reações químicas em até 10^{17} vezes (Mendonça, 2009).

As enzimas são importantes ferramentas para alavancar produtividade da fabricação de diversos produtos. Pode-se considerar que elas são utilizadas pela

humanidade de forma indireta há milhares de anos, através de preparações brutas de origem animal, vegetal ou microbiana (Mendonça, 2009). Enzimas lignocelulolíticas sintetizadas por micro-organismos são capazes de degradar celulose, hemicelulose e lignina, através da disponibilização e quebra das cadeias poliméricas constituintes. A degradação enzimática possibilita a bioconversão das moléculas em materiais de interesse biotecnológico e econômico (FITZPATRICK et al., 2010), como, por exemplo, álcool de segunda geração a partir do bagaço de cana-de-açúcar.

Como comentado as Glicosídeo Hidrolases (GH) (EC 3.2.1.X) correspondem ao grupo mais representativo e numeroso das CAZymes (Carbohydrate Active enZymes) (Mendonça, 2009). O sistema enzimático de conversão da celulose para glicose compreende em endo (1-4) β -glucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.91) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21) (COUTO, 2008). A endoglucanase (EC 3.2.1.4) quebra ligações glicosídicas internas da celulose, liberando sacarídeos de diversos comprimentos, com novas cadeias finais. Adicionalmente, catalisa a reação de endohidrólise de ligações (1-4) β -D-glicosídicas em celulose. Já a exoglucanase (EC 3.2.1.91) atua nas extremidades da cadeia de celulose, redutoras ou não, produzindo glicose, celotriose e, principalmente, celobiose (OYEKOLA et al., 2007). A reação catalisada é a hidrólise de ligações (1-4) β -D-glucosídicas em celulose e celotetraose, liberando celobiose somente de terminais não redutores das cadeias. A celobiose é um forte inibidor competitivo que não pode ser hidrolisado pelas endoglucanases e exoglucanases (SIPOS, 2010). A β -glucosidase (EC 3.2.1.21) aumenta a eficiência da hidrólise da celulose, pois desdobra e remove a celobiose. A reação catalisada é de hidrólise de terminal, exceto resíduos de β -D-glucosil, com liberação de β -D-glicose. A xilanase (EC 3.2.1.8) atua sobre a porção hemicelulósica, por isso é importante na degradação de material lignocelulósico, uma vez que a xilana é o principal polissacarídeo presente na interface celulose/lignina (COLLINS et al., 2005). Essa hemicelulase catalisa a endohidrólise de ligações (1-4) β -D-xilosídicas em xilanas.

A prospecção de genes funcionais em diferentes ambientes tem sido de fundamental importância na busca de novos recursos biológicos com potencial biotecnológico. Baseado nesta premissa, a investigação de glicosidases no microbioma ruminal foi o foco de estudo deste trabalho.

1. REFERÊNCIAS

ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica. **Sistema de Informação sobre o Potencial Hidráulico**. Disponível em: aneel.gov.br/area.cfm?idArea=45. Acesso em: Jul de 2015.

ATLAS, R. M.; R. BARTHA. **Microbial ecology: Fundamentals and applications**. 1998.

CHAVES, M. C. C.; GOMES, C. F. S. Avaliação de biocombustíveis utilizando o apoio multicritério à decisão. **Production**, v. 24, n. 3, p. 495-507, 2014.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005.

COUTO, F. M. M. **Leveduras produtoras de β -glicosidase e pectinase**. Dissertação (Mestrado) – Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

FERREIRA, F. Y.; LEÃO, K. P.; CASSANO, F. A.; OLIVEIRA, L. H. Biodiesel: potencializador da performance brasileira no mercado energético internacional. **Jovens Pesquisadores**, ano 3, n. 5, 2006.

FITZPATRICK, M.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F.; WHITNEY, R. A. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**, v.101, p.8915-8922, 2010.

GHAZANFAR, S.; AZIM, A. Metagenomics and its Application in Rumen Ecosystem: Potential Biotechnological Prospects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.8, p. 1309-1315, 2009.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. Energia e meio ambiente no Brasil. **Estudos Avançados**, v.21, n.59, 2007.

GUARDABASSI, P. M. **Sustentabilidade da biomassa como fonte de energia perspectivas para países em desenvolvimento**. Dissertação Mestrado – Programa Interunidades de Pós Graduação em Energia Interunidades (Instituto de Eletrotécnica e Energia / Escola Politécnica / Instituto de Física / Faculdade de Economia e Administração). Universidade de São Paulo – USP, 2006.

HESS, M.; et al. Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading Genes and Genomes from Cow Rumen. **Science**. 331, p. 463–467, 2011.

HUGENHOLTZ, P.; N. R. PACE. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, v.14, n.6, Jun, p.190-7. 1996.

JAMI, E.; ISRAEL, A.; KOTSER, A.; MIZRAHI, I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. **The ISME journal**, v. 6, p. 1069–1079, 2013.

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

JESUS, R. B. **Diversidade bacteriana ruminal em bovinos nelore**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v.89, n.1, p.124-134. 2005.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados [online]**, v.24, n.68, p. 223-253, 2010.

LAPEÑA, Jorge E. Energia hidroelétrica: cooperação e integração entre o Brasil e a Argentina. In: SEMINÁRIO Brasil-Argentina, jun. 1999, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa de Relações Internacionais, 1999. 32 p.

LI, R.W.; CONNOR, E. E.; LI, C.; BALDWIN, V. R. L.; SPARKS, M. E. Characterization of the rumen microbiota of preruminant calves using metagenomic tools. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 129–139, 2012.

LOPES, D. R. G. **Caracterização de parâmetros bioquímicos e histológicos do rumen de bezerros holandeses mestiços pré e pós-desmame**. Dissertação (Mestrado Microbiologia agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos avançados [online]**, v.21, n.59, p.157-165, 2007.

MAICHE, R.; HUBER, C. Desenvolvimento da produção e pesquisa de bioetanol nos Estados Unidos: um enfoque nas rotas bioquímicas. **Revista Thema**. v. 7, n. 2, 2010.

MARTINS, F. R.; GUARNIERI, R. A.; PEREIRA, E. B. O aproveitamento da energia eólica. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 30, n. 1, p. 1304, 2008.

MENDONÇA, L. M. F. **Bases moleculares da especificidade pelo substrato em uma β -glicosidase**. Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica). 2009.

MME – MIINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Biocombustíveis 50 perguntas e respostas sobre este novo mercado**. Comunicação Institucional do Abastecimento – PETROBRAS, 2007.

NUNES, P. C. R. **Energia solar - uma alternativa viável**. Monografia – Especialização - departamento de Engenharia, Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2007.

OYEKOLA, O. O.; NGESI, N.; WHITELEY, C. G. Isolation, purification and characterization of endoglucanase and β -glucosidase from an anaerobic sulphidogenic bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, p. 873-878, 2007.

RUSSEL, J. B., J. D. CONNOR, et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal Fermentation. **Journal Animal Science**, v.70, p.3553-3561. 1992.

SACHS, I. Os biocombustíveis estão chegando à maturidade. **Democracia Viva**. n. 29, 2005.

SIPOS, B. **Conversion of lignocelluloses to fermentable sugars production for ethanol**. Thesis (PhD in Food Science) – Department of Applied Biotechnology and Food Science, University of Technology and Economics - Budapest, 2010.

SRWE - STATISTICAL REVIEW OF WORLD ENERGY (British Petroleum). 64^a Edição, junho 2015. Disponível em: bp.com/statisticalreview. Acesso em: jul de 2015.

TOWNE, G.; T. G. NAGAJARA. Omasal ciliated protozoa in cattle, bison and sheep. **Applied Environment Microbiology**, v.56, p.409-412. 1990.

WERNER, M. J. **Avaliação da distribuição ambiental de genes de relevância biotecnológica por meio de dados metagenômicos públicos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Vale do Itajaí, 2013.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiol Rev**, v.51, n.2, Jun, p.221-71. 1987.

WU, S.; 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.

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**, p. 81-104, 2005.

CAPITULO 2 - Prospecção de genes do microbioma ruminal bovino com propriedades degradadoras da biomassa vegetal

1. INTRODUÇÃO

A população mundial vem crescendo a cada ano e, com isso, tem aumentado a demanda por energia e alimentos. Isto tem alavancado a produção de bovinos nas últimas décadas (SCHLESINGER, 2009; ZEN et al., 2008) e também a busca por novas fontes de matéria-prima para a produção de combustíveis. Estima-se que no ano de 2040, a demanda por combustíveis terá um aumento de até 75% (Exxon Mobil, 2014). O Brasil é considerado um dos líderes internacionais em produção de biocombustíveis, onde o principal deles é o Etanol (KOHLHEPP, 2010), e uma boa forma de aumentar a produção de etanol, sem ser necessário aumento das áreas de plantio, é a utilização racional e eficiente da biomassa vegetal (MACEDO, 2007).

Apesar dos biocombustíveis derivados de matéria lignocelulósica serem uma importante alternativa de energia, o grande desafio da produção industrial está na ação enzimática ineficiente de sacarificação da celulose presente na parede celular vegetal (MAICHE & HUBER, 2010). Uma das maneiras de superar estes problemas é a prospecção de enzimas especializadas na degradação de biomassa, e um ambiente para essa procura pode ser o rúmen (HESS et al., 2011). O rúmen é fundamental para os animais que utilizam biomassa vegetal como fonte de energia, pois nele está contida uma gama de micro-organismos que atuando em conjunto tornam-se especialistas em degradar este tipo de composto, disponibilizando para o animal um complexo de substâncias necessárias para o seu desenvolvimento (SUEN et al., 2011). O estudo destes micro-organismos presentes no rúmen e o sequenciamento dos seus respectivos genomas para a prospecção de genes envolvidos na degradação de fibra vegetal são promissores, do ponto de vista biotecnológico. A diversidade microbiana do rúmen contém um vasto conteúdo genético, que pode ser explorado para a descoberta de novos genes (GHAZANFAR & AZIM, 2009).

O fato de grande parte destes micro-organismos serem de difícil cultivo por métodos tradicionais é um empecilho á pesquisa (HESS et al., 2011). Para romper

esta barreira, atualmente é muito usada a abordagem metagenômica, por ser uma importante ferramenta de acesso aos micro-organismos de um determinado ambiente, visto que nos permite obter informações genéticas de organismos sem ser necessário o seu cultivo (HANDELSMAN et al., 1998).

Um catálogo de genes funcionais com potencial biotecnológico é um recurso genético fundamental para a compreensão do microbioma ruminal. Assim, o principal objetivo foi à análise da diversidade taxonômica presente na amostra metagenômica de rúmen, além de caracterizar genes de micro-organismos ruminais focando em enzimas com potencial para degradar biomassa vegetal.

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).

Para a realização deste trabalho foram utilizados 3 animais da raça nelore, sendo eles, machos, castrados, com fistula instalada no rúmen, com idade aproximada de 24 meses e peso médio de 350 kg. Estes animais eram alimentados uma vez ao dia com uma dieta constituída de feno moído Tifton 85 (*Cynodon spp.*) (70%) e concentrado (30%) constituído por soja (13,1%), milho (15,7%) e ureia (1,2%). A ingestão do alimento por dia era equivalente a cerca de 1,7% do peso vivo do animal e a água era oferecida *ad libitum*. O período de adaptação à dieta foi de 31 dias e as coletas de amostras do conteúdo ruminal foram feitas 1 hora antes da alimentação dos animais (SARO, et al., 2014).

2.2 Amostragem do DNA total

A extração de DNA total dos micro-organismos do conteúdo ruminal foi dividida em duas partes, uma da fração líquida e outra da fração sólida, amostras que foram coletadas na região medial do rúmen. Os micro-organismos que estavam aderidos à fração sólida foram extraídos da seguinte maneira: 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). Feito isso realizou-se a homogeneização vigorosa durante 1 min., seguido por uma centrifugação de 10 min. a 1000 x g, a 4°C. O sobrenadante desta solução foi transferido para um novo tubo e reservado em gelo, enquanto o sedimento foi novamente ressuspensão com a solução descrita anteriormente, acrescido de pérolas de vidro, homogeneizado vigorosamente e centrifugado nas condições anteriores. O sobrenadante foi recuperado e armazenado junto aos anteriormente transferidos. Essa mistura foi centrifugada a 27.000 x g por 30 min., a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante ressuspensão em 3 ml de NaCl 0,85%.

Para obtenção dos micro-organismos presentes na fração líquida foram seguidos tais procedimentos: 500 ml de líquido ruminal foram centrifugados a 27.000 x g por 30 min., 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, com 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 quantificação e avaliação de pureza.

2.3 Construção da biblioteca e sequenciamento

A construção da biblioteca do conteúdo ruminal foi preparada de acordo com o protocolo Truseq DNA sample Preparation Kit v2, de acordo com as recomendações de fábrica. O sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma Illumina HiScan SQ, para isso foram utilizados os kits paired – end cluster generation v3 e Truseq SBS v3 (200 ciclos). Ao final do sequenciamento, foi utilizado o software CASAVA 1.8.2 (Illumina) para converter os arquivos .BCL gerados, arquivos de imagem em FASTQ. Foi utilizado ½ lane para a corrida da biblioteca, gerando um número aproximado de 65 milhões de reads.

2.4 Análise dos dados

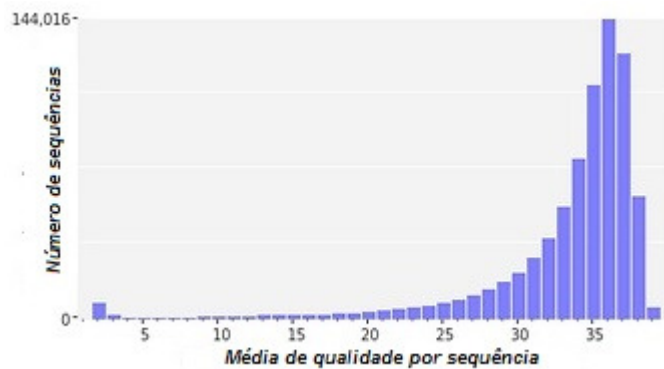
O arquivo de saída do software CASAVA foi utilizado como arquivo de entrada para as análises realizadas na plataforma de análises metagenômicas MG-RAST. Através da plataforma MG-RAST (MEYER et al., 2008) foram feitas todas as análises apresentadas neste trabalho. Para determinação de quais eram os micro-organismos presentes na amostra, utilizou-se a comparação com três bancos de dados de genes *16S rDNA* de múltiplas espécies, para a classificação taxonômica, RDP (WANG et al., 2007), Greengenes (DESANTIS et al., 2006) e SILVA SSU (QUAST et al., 2013). Para a anotação de genes envolvidos no processo de desconstrução da matéria vegetal, usaram-se 5 bancos de dados para análise, sendo eles: GenBank (BENSON et al., 2004), IMG (MARKOWITZ et al., 2014), KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000), SEED (OVERBEEK et al., 2014) e SwissProt (BOECKMANN et al., 2005). Nestes bancos de dados foram mensurados a abundância de genes e sequências únicas.

3. RESULTADOS

3.1 Sequenciamento

A partir do sequenciamento foram obtidas 65 milhões de sequências nucleotídicas com 100 pb, selecionadas com corte na qualidade Phred acima de 30 (FIGURA 1). As sequências obtidas foram usadas como material de análise para o MG-RAST.

FIGURA 1: Qualidade Phred das sequências.

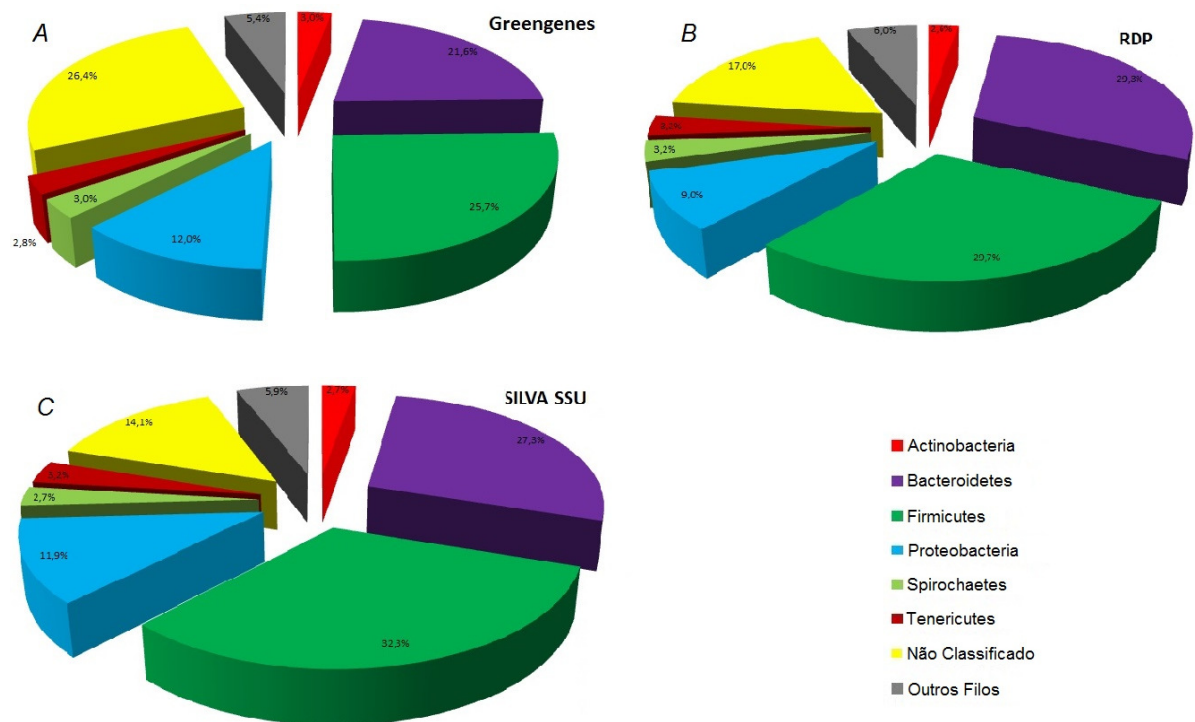


3.2 Perfil do microbioma ruminal

Um dos bancos de dados utilizados para análise taxonômica foi o Ribossomal database Project (RDP). Na análise pelo RDP, foram encontrados 18 filos (FIGURA 2), dos quais os mais abundantes foram: Firmicutes (29,7%), Bacteroidetes (29,3%), Proteobacteria (9%), Spirochaetes (3,2%), Tenericutes (3,2%) e Actinobacteria (2,6%). Os outros filos juntos representam 6% do total, enquanto 17% não alcançaram classificação. A análise pelo banco de dados Greengenes demonstrou a presença de 16 filos (FIGURA 2), dos quais os mais abundantes foram: Firmicutes (25,7%), Bacteroidetes (21,6%), Proteobacteria (12%), Spirochaetes (3%), Actinobacteria (3%) e Tenericutes (2,8%). Os outros filos representam 5,4% do total, restando 26,4% sem classificação. Após análise pelo banco de dados SILVA SSU, foram encontrados 22

filos (FIGURA 2), dos quais os mais abundantes são: Firmicutes (32,3%), Bacteroidetes (27,3%), Proteobacteria (11,9%), Tenericutes (3,2%), Actinobacteria (2,7%) e Spirochaetes (2,7%). Os outros filos juntos representam 5,9% do total, e para 14,1% não há classificação. No banco de dados SILVA SSU foi obtido o maior número de sequências classificadas em todos os filos (FIGURA 2), com exceção do filo Spirochaetes que alcançou melhor classificação no banco de dados RDP. Já para sequências que não foram classificadas o banco de dados Greengenes foi o com maior número de representantes.

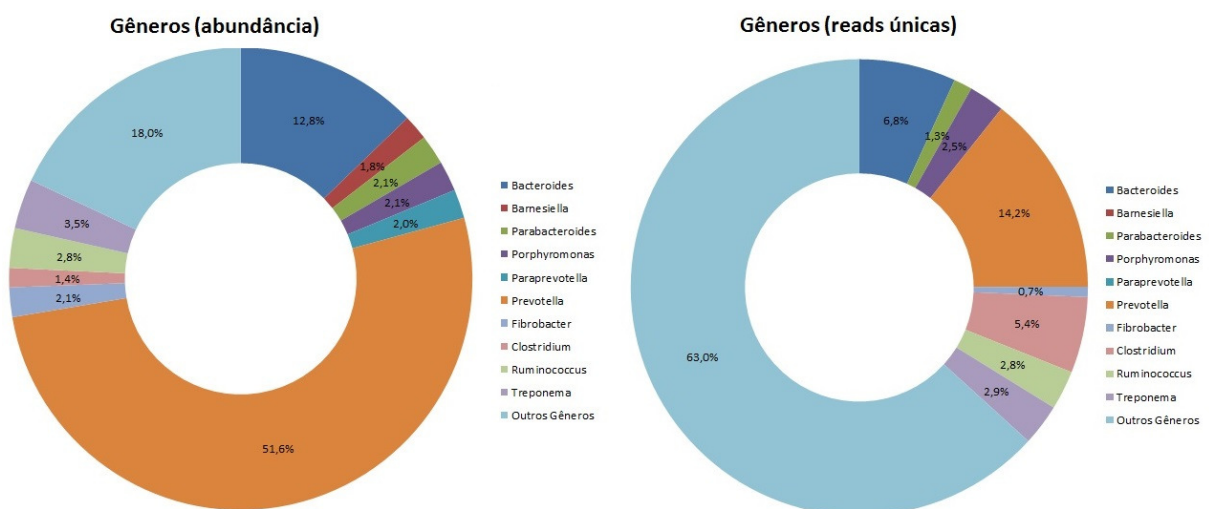
FIGURA 2: Distribuição dos filos representativos do microbioma ruminal em diferentes bancos de dados. **A.**Greengenes, **B.**RDP e **C.**SILVA SSU.



Além disso, para a análise dos gêneros de micro-organismos utilizou-se o banco de dados RDP, determinando quais eram os mais abundantes (FIGURA 3). Esse banco demonstrou que existem 270 gêneros classificados, dos quais os 10 mais abundantes foram representados graficamente, sendo o restante referido como outros gêneros, devido ao baixo número de indivíduos em cada um deles. Deste modo, é possível verificar que o gênero *Prevotella* foi o que apresentou maior número de

representantes, levando em conta tanto a abundância de sequências (repetidas), quanto à sequências únicas (retiradas as repetições). O gênero *Bacteroides* foi o segundo mais abundante nos dois casos, enquanto o terceiro gênero mais abundante, considerando sequências redundantes, foi o *Treponema*. O gênero *Clostridium* foi o décimo mais abundante, apesar de que com relação ao parâmetro sequências únicas, este gênero passa a ser o terceiro mais abundante.

FIGURA 3: Distribuição de gêneros representativos do microbioma ruminal utilizando o banco de dados RDP através do servidor do MG-RAST.



3.3 Genes relacionados com a degradação de biomassa

A abundância corresponde ao número de sequências caracterizadas com determinado táxon (FIGURA 4), enquanto cada resultado (sequências únicas) corresponde ao número de acertos únicos nos bancos de dados de proteínas ou RNA (FIGURA 5).

Em termos de abundância o maior número de sequências de genes envolvidos na degradação da biomassa foi identificado usando o banco de dados GenBank, seguido de perto pelo IMG, KEGG, SEED e SwissProt. Já em relação a sequências únicas a ordem é a mesma com exceção dos bancos de dados KEGG e SEED que invertem as posições (TABELA 1). Considerando os genes codificadores de enzimas degradadoras de lignocelulose, os quais foram identificados pelos cinco bancos de dados utilizados, fez-se a seleção de enzimas diretamente relacionadas com a

degradação de material vegetal, como a: celulose, hemicelulose e lignina. Entre os genes encontrados na busca nos bancos (FIGURAS 4 e 5), estavam enzimas pertencentes às famílias GH3, GH5, GH6, GH9, GH11, GH18, GH43 (Glycoside Hydrolases), onde GH5 foi o que apresentou o maior número de representantes, seguido de GH3, e também CBM1, CBM3, CBM6 e CBM10 (Carbohydrate Binding Module), sem contar as sequências gênicas codificadoras putativas, hipotéticas ou preditas, cuja classificação ainda é incerta.

FIGURA 4: Abundância de sequências de genes representativos do microbioma ruminal envolvidos no processo de degradação de matéria vegetal através do servidor do MG-RAST.

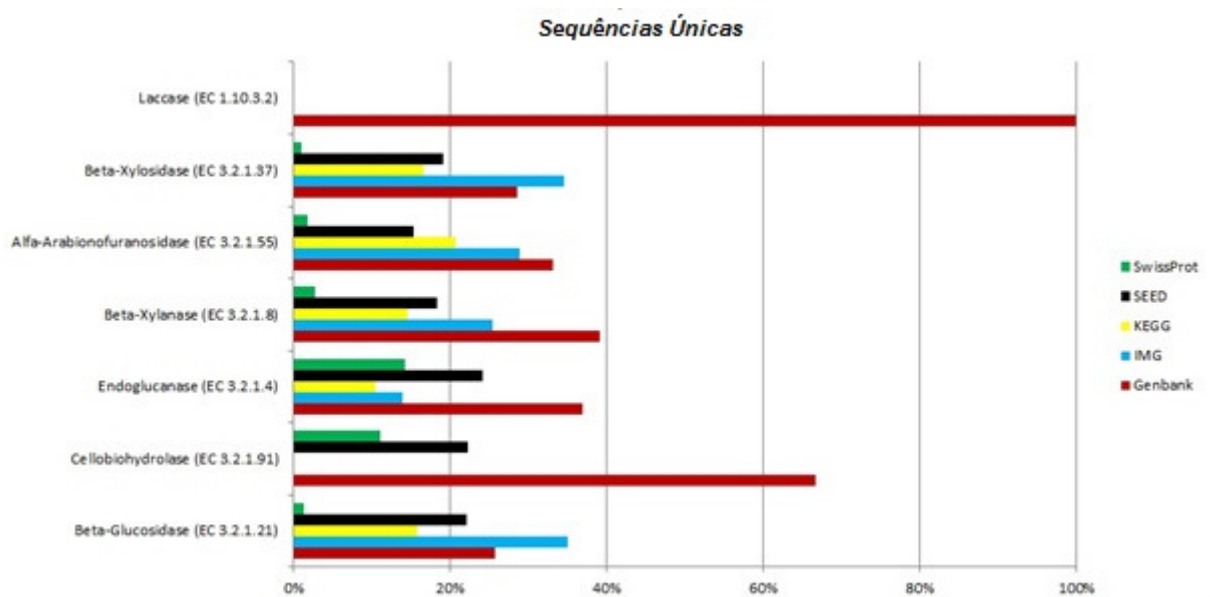
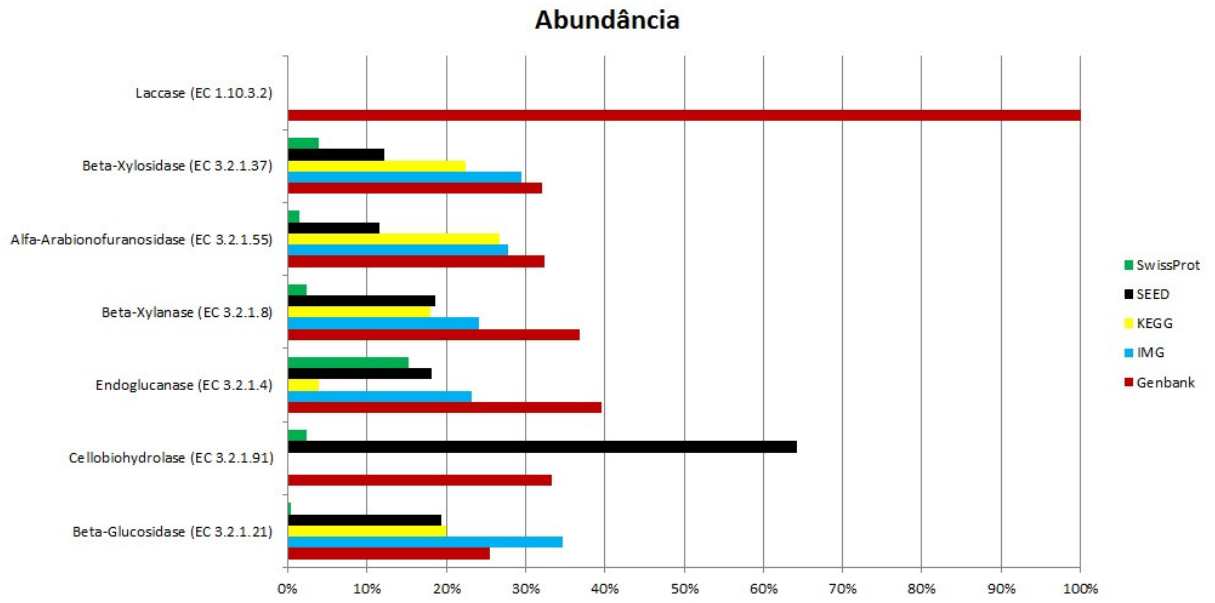


FIGURA 5: Sequências únicas de genes representativos do microbioma ruminal envolvidos no processo de degradação de matéria vegetal através do servidor do MG-RAST.



4. DISCUSSÃO

A quantidade de dados gerados no sequenciamento (65 milhões) foi satisfatória para a análise proposta e as sequências selecionadas foram as que apresentaram qualidade Phred acima de 30 (FIGURA 1). Ross et al. (2012), realizaram um sequenciamento metagenômico utilizando um sequenciador GAIIx (Illumina) para acessar a microbiota de um rúmen bovino, o que resultou em 6 milhões de sequências, com corte na qualidade Phred acima de 20.

Como observado na figura 2, que apresenta os principais filos bacterianos nos três bancos de dados utilizados, é possível perceber a dominância do filo Firmicutes seguido pelo filo Bacteroidetes e Proteobacteria, além de outros filos com menos representantes, como Tenericutes, Spirochaetes, Actinobacteria. Muitos trabalhos têm sido realizados visando a caracterização do microbioma ruminal, entre eles está Brulc et al. (2009), que estudou 3 animais da raça Angus Simmental Cross, obtendo perfil taxonômico semelhante ao do presente trabalho. Nas amostras estudadas por estes autores, com micro-organismos aderidos as fibras e no líquido ruminal, obtiveram Firmicutes como o filo mais abundante, Bacteroidetes como o segundo e Proteobacteria como terceiro. Apesar da similaridade no perfil microbiológico, a dieta a qual estes animais foram submetidos foi constituída de feno de alfafa, o qual em sua composição química tem menor teor de fibras (NASCIMENTO et. al., 2000) do que a dieta a qual foram submetidos os animais deste trabalho.

Oliveira et al. (2013), caracterizaram metagênomas de diferentes partes de um bovino Nelore, incluindo o alimento fornecido, todo o trato gastrointestinal e até as fezes. O animal estudado por eles foi alimentado em pasto, e 40 dias antes do abate foi alimentado com silagem de milho. Os resultados encontrados por estes autores, provenientes da amostra de rúmen apresentam os dois primeiros filos em ordem invertida comparado com os do presente trabalho, sendo que o filo predominante foi Bacteroidetes, seguido de Firmicutes, e a grande diferença está no terceiro filo mais abundante que no trabalho citado é Spirochaetes. Em outro trabalho, Lopes (2013) fez uma análise de um metagenoma ruminal de ovinos da raça Santa Inês, alimentados com concentrado 60% (Milho e Soja), e 40% volumoso (Feno Tifton 85),

os resultados por ele obtidos mostraram dominância do filo Bacteroidetes, seguido de Firmicutes e Proteobacteria.

Os ruminantes têm nos ácidos graxos voláteis (AGV) sua principal fonte de energia (GOULARTE et al., 2011), sabe-se que a proporção de AGV é grandemente influenciada pela dieta (ISHLER et al., 1998). O filo *Bacteroidetes* que foi o segundo mais abundante neste trabalho, está diretamente relacionado com a produção de AGV (BELENGUER et al., 2013), em dietas ricas em concentrado este filo torna-se o mais abundante (SADET-BOURGETEAU et al., 2010), isto explica o fato de que no trabalho Lopes (2013), o filo Bacteroidetes ser o mais abundante, pois uma alimentação com maior proporção de volumoso (carboidratos estruturais) frente ao concentrado (carboidratos não estruturais), gera uma maior produção de AGV (ISHLER et al., 1998). Em dietas ricas em alimentos fibrosos como ocorreu no presente estudo (Tifton 85), o filo mais abundante tende a ser o Firmicutes, visto que este filo apresenta gêneros especializados na degradação de fibra vegetal, tal como o *Ruminococcus* que é um dos principais degradadores de carboidratos estruturais, pois têm a capacidade de se aderir rapidamente à superfície dos vegetais ingeridos pelo hospedeiro para digerir a celulose (KOIKE et al., 2003).

Em outro trabalho, usando metagênomas de rúmen, solo, troncos apodrecidos e esterco de elefante, Wang et al. (2009) encontrou sequências de celulases das famílias GH3, GH5 e GH9, todas encontradas neste trabalho. O já citado trabalho de Brulc et al. (2009) encontrou muitas famílias de GHs e vários CBMs, porém em contraste com este trabalho, não encontraram a GH6, CBM1 e CBM10, estas encontradas no metagenoma estudado aqui. Patel et al. (2014) fez um metagenoma de rúmen de búfalo e obteve como resultado várias famílias de GHs e CBM, entretanto, não encontrou nenhum representante da família GH6 e também não encontrou CBM1, CBM3 e CBM10, todos estes encontrados no presente trabalho. Em uma revisão Morgavi et al, 2013, citando vários autores, descreveu 11 famílias de GHs encontradas no rúmen (Boi, Bufalo, laque), contudo, entre as citadas não está a Família GH6.

De acordo com o banco de dados Carbohydrate-Active enZymes - CAZy (LOMBARD et al., 2014), a família 3 das Glicosil Hidrolases atualmente agrupa as seguintes enzimas: β - glucosidases, α - arabinofuranosidases, β - xylopyranosidases e

β - glucosaminidases. Destas, as duas primeiras foram encontradas neste trabalho, sendo esta família de GHs amplamente encontrada em bactérias, fungos e plantas, e realiza uma série de funções, entre elas, a degradação de biomassa celulósica. Em relação à família 5, o CAZy a descreve como sendo a maior família de GHs. Estão inclusas nesta família as enzimas: Endoglucanase, exoglucanases (cellobiohidrolase), β -glucosidase, xylanase, Endomannanase, exomannanases, β -mannosidase, 1,6-galactanase, 1,3-mannanase, endoglycoceramidase e xyloglucanases, as quatro primeiras também encontradas neste trabalho. A GH5 é também muito encontrada em bactérias, fungos e plantas e tem diversas funções, das quais se destaca a degradação de biomassa celulósica.

Já para a GH6 a qual foi encontrada neste trabalho, fazem parte desta família: Endoglucanases e Cellobiohidrolases (KOECK et al, 2014). As duas contidas neste estudo também estão intimamente ligadas a degradação da parede celular vegetal. Uma grande quantidade de enzimas lignocelulolítica já era esperada, visto que, a dieta dos animais estudados era rica em matéria fibrosa, que para ser digerida pelo animal, necessitava da presença de enzimas destas famílias de GHs para fazê-la.

Finalmente, fica clara a especificidade da determinação de cada microbioma ruminal em função da espécie e raça do animal, dieta associada durante a coevolução, adicionalmente aos fatores ambientais que comprometem a diversidade dos micro-organismos que colonizam o rumem bovino. Comparando os resultados obtidos com outros já publicados, o microbioma estudado apresenta potencial para encontrar enzimas ainda não descritas em outros metagênomas ruminais. A caracterização dessas enzimas permitirá explorar a efetividade e aplicação do potencial biotecnológico aqui apresentado.

5. CONCLUSÕES

O metagenoma ruminal mostrou uma diversidade de genes de enzimas relacionadas à degradação da biomassa vegetal, inclusive enzimas não catalogadas, demonstrando o seu potencial como fonte de enzimas com potencial biotecnológico.

Apesar de algumas discrepâncias os bancos de dados apresentaram os mesmos resultados em relação aos filos mais abundantes.

O filo Firmicutes apresentou o maior número de representantes em todos os bancos de dados

6. REFERÊNCIAS

- BELENGUER, A.; FRUTOS, P.; BERNARD, L.; HERVÁS, G.; CHILLIARD, Y.; TORAL, P. G. **Comparación de la fermentación y la comunidad bacteriana del rumen en vacas y cabras alimentadas con la misma dieta.** AINDA - XV Jornadas sobre Producción Animal, Tomo II, p. 860-862, 2013.
- BENSON, D. A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D. J., OSTELL, J.; WHEELER, D. L. GenBank: update. **Nucleic Acids Research**, 32 (Database issue), D23–D26, 2004.
- BOECKMANN, B.; BLATTER, M. C.; FAMIGLIETTI, L.; HINZ, U.; LANE, L.; ROECHERT, B.; BAIROCH, A. Protein variety and functional diversity: Swiss-Prot annotation in its biological context. **Comptes Rendus Biologies**, v. 328, n. 10, p. 882-899, 2005.
- BRULC, J.M.; ANTONOPOULOS, D.A.; MILLER, M.E.B.; WILSON, M.K.; YANNARELL, A.C.; DINSDALE, E.A.; EDWARDS, R.E.; FRANK, E.D.; EMERSON, J.B.; WACKLIN, P.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B.; NELSON, K.E.; WHITE, B.A. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.106, n.6, p. 1948-1953, 2009.
- DeSANTIS, T. Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU, P.; ANDERSEN, G. L. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. **Applied Environmental Microbiology**, v.72, p. 5069-5072, 2006.
- EXXON MOBIL **Panorama Energético: Perspectivas para 2040 – Destaques.** Relatório de estimativas futuras, 2014.
- GHAZANFAR, S.; AZIM, A. Metagenomics and its Application in Rumen Ecosystem: Potential Biotechnological Prospects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.8, p. 1309-1315, 2009.
- GOULARTE, S.R.; ÍTAVO, L. C. V.; SANTOS, G. T.; ÍTAVO, C. C. B. F.; OLIVEIRA, L. C. S.; FAVARO, S. P.; Dias, A. M.; TORRES JÚNIOR, R. A. A.; BITTAR, C. M. M. Ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas alimentadas com diferentes teores de concentrado na dieta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]**. v.63, n.6, p. 1479-1486, 2011.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry Biology**. v.5, n.10, p. 245-249, 1998.
- HESS, M.; et al. Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading Genes and Genomes from Cow Rumen. **Science**. 331, p. 463–467, 2011.

ISHLER, V.; HEINRICHS, J.; VARGA, G. **From feed to milk: understanding rumen functions**. 1998. 72p.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 27-30, 2000.

KOECK, D. E.; PECHTL, A.; ZVERLOV, V. V.; SCHWARZ, W. H. Genomics of cellulolytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 29, p. 171–183, 2014.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados [online]**, v.24, n.68, p. 223-253, 2010.

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.

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

LOPES, L. D. **Sequenciamento do microbioma do rúmen de ovinos utilizando a plataforma Ion Torrent (PGM)**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo – USP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ, Piracicaba, 2013.

MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos avançados [online]**, v.21, n.59, p.157-165, 2007.

MAICHE, R.; HUBER, C. Desenvolvimento da produção e pesquisa de bioetanol nos Estados Unidos: um enfoque nas rotas bioquímicas. **Revista Thema**. v. 7, n. 2, 2010.

MARKOWITZ, V. M.; CHEN, I. M. A.; CHU, K.; SZETO, E.; PALANIAPPAN, K.; PILLAY, M.; RATNER, A.; HUANG, J.; PAGANI, I.; TRINGE, S.; HUNTEMANN, M.; BILLIS, K.; VARGHESE, N.; TENNESSEN, K.; MAVROMATIS, K.; PATI, A.; IVANOVA, N. N.; KYRPIDES, N. C. IMG/M 4 version of the integrated metagenome comparative analysis system. **Nucleic Acids Research**, 42, D568-D573, 2014.

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.

NASCIMENTO, J. M.; COSTA, C.; SILVEIRA, A. C.; ARRIGONI, M. B. Influência do método de fenação e tempo de armazenamento sobre a composição bromatológica e ocorrência de fungos no feno de alfafa (*Medicago sativa*, L. cv. Flórida 77). **Revista Brasileira de Zootecnia [online]**, v.29, n.3, p. 669-677, 2000.

OLIVEIRA, M. N.; JEWELL, K. A.; FREITAS, F. S.; BENJAMIN, L. A.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C.; MORAES, C. A.; SUEN, G. Characterizing the microbiota across the

gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. **Veterinary Microbiology**. 164(3-4), p.307-314, 2013.

OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G. D.; OLSEN, G. J.; DAVIS, J. J.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A. R.; XIA, F.; STEVENS, R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, 42(Database issue): D206–D214, 2014.

PATEL, D. D.; PATEL, A. K.; PARMAR, N. R.; SHAH, T. M.; PATEL, J. B.; PANDYA, P. R.; JOSHI, C. G. Microbial and Carbohydrate Active Enzyme profile of buffalo rumen metagenome and their alteration in response to variation in the diet. **Gene**, v. 545, p. 88-94, 2014.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**. v. 41, p. 590 – 596, 2013.

ROSS, E. M.; MOATE, P. J.; BATH, C. R.; DAVIDSON, S. E.; SAWBRIDGE, T. I.; GUTHRIDGE, K. M.; COCKS, B. G.; HAYES, B. J. High throughput whole rumen metagenome profiling using untargeted massively parallel sequencing. **BMC Genetics**. v. 13, 2012.

SADET-BOURGETEAU, S.; MARTIN, C.; MORGAVI, D. P. Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets. **Veterinary Microbiology**. v. 146, p. 98-104, 2010.

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.

SCHLESINGER, S. **O gado bovino no Brasil**. Texto disponível em: http://www.boell-latinoamerica.org/downloads/Texto_Gado_Boll_2009-4.pdf. Acesso em: 20/01/2015.

SUEN, G.; et al. The complete genome sequence of fibrobacter succinogenes S85 reveals a cellulolytic and metabolic specialist. **PLoS One**, San Francisco, v.6, n. 4, p. 1-15, 2011.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5261-5267, 2007.

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

ZEN, S.; MENEZES, S. M.; CARVALHO, T. B. ***Perspectivas de consumo de carne bovina no Brasil.*** XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Rio Branco – Acre, 2008.