

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Diversidade bacteriana ruminal de novilhos Nelore em pasto,
suplementados com diferentes fontes proteicas no período seco**

Elisabeth Victória Alves Machado

Jaboticabal - SP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL DE NOVILHOS NELORE EM
PASTO, SUPLEMENTADOS COM DIFERENTES FONTES PROTEICAS NO
PERÍODO SECO**

Elisabeth Victória Alves Machado

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Duarte Messana
Co-orientadora: Dr.^a Yury Tatiana Granja-Salcedo

Trabalho de Conclusão de Curso (Iniciação Científica) apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para graduação em Zootecnia.

Jaboticabal - SP
2º semestre/2023

| | |
|-------|---|
| A474d | <p>Alves, Elisabeth Victória Machado</p> <p>Diversidade bacteriana ruminal de novilhos Nelore em pasto, suplementados com diferentes fontes proteicas no período seco / Elisabeth Victória Machado Alves. -- Jaboticabal, 2023</p> <p>40 p.</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientadora: Juliana Duarte Messana</p> <p>Coorientadora: Yury Tatiana Granja-Salcedo</p> <p>1. Nutrição Animal. 2. Rúmen Microbiologia. 3. Metabolismo. 4. Suplementos dietéticos. 5. Proteína. I. Título.</p> |
|-------|---|

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO:

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: Diversidade bacteriana ruminal de novilhos Nelore em pasto, suplementados com diferentes fontes proteicas no período seco

ACADÊMICO: Elisabeth Victória Machado Alves

CURSO: Zootecnia

ORIENTADOR (ES): Prof.^a Dr.^a Juliana Duarte Messana

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

Presidente Prof.^a Dr.^a Juliana Duarte Messana



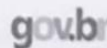
Documento assinado digitalmente
JULIANA DUARTE MESSANA
Data: 19/10/2023 17:10:46-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro Me^a Fernanda Bernardi Scheeren



Documento assinado digitalmente
FERNANDA BERNARDI SCHEEREN
Data: 19/10/2023 20:45:35-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro Me^a Natalia Vilas Boas Fonseca



Documento assinado digitalmente
NATALIA VILAS BOAS FONSECA
Data: 19/10/2023 10:37:43-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal 18 / 10 / 2023

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 10 / 11 / 2023

Chefe do Departamento

OFERECIMENTO

Dedico e ofereço este Trabalho de Conclusão de Curso aos meus avôs Pedro Machado (*in memoriam*) e Benedito Vicente Alves (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar aos meus pais, Marlene Machado e Renato Alves, e a esposa do pai Maria de Lourdes Silva por serem o meu suporte e base em todo este período.

As minhas avós Maria de Lourdes Machado e Eva da Fonseca Alves por serem meu maior exemplo de coragem.

Aos meu irmão Henrique Bortolato, e minhas irmãs Eloá Alves e Amanda Silva, a minha cunhada Liliane Bortolato e meu sobrinho Rafael Henrique Bortolato por estarem presentes em todos os momentos.

A minha família, e em especial a minha tia Marli Machado, meus primos Ariane Almeida e Filipe Martinez, e meus padrinhos Neusa e Antônio Carlos por estarem presentes durante toda essa jornada.

Aos meus amigos e companheiros, em especial Nívea Maria Carneiro e Maria Júlia Ganga que me deram forças em continuar e concluir este trabalho, e ao Vinícius Strabelli, Andrei Itajahy e Juliana Lemes por serem meus maiores incentivadores quando precisei.

A minha amiga, exemplo de profissional e que me apresentou a Zootecnia e a UNESP Prof^a Caroline Cardoso de Oliveira.

As minhas orientadoras e coorientadoras durante todo o desenvolvimento deste trabalho Prof.^a Dr.^a Juliana Duarte Messana, Dr.^a Yury Tatiana Granja-Salcedo e Prof.^a Dr.^a Telma Teresinha Berchielli. E a Prof.^a Dr.^a Silvana Martinez Baraldi Artoni pela primeira oportunidade no mundo científico-acadêmico.

Ao grupo de estudos Genru por todo o companheirismo, suporte e conhecimento adquirido durante os anos de experimentos.

Ao grupo docente do curso de Graduação em Zootecnia da UNESP – campus de Jaboticabal por todos os ensinamentos acadêmicos e experiências.

A LX turma do curso de Graduação em Zootecnia por todos os anos de convívio, companheirismos e momentos compartilhados.

A Batuka, seus componentes e diretoria por terem sido o meu porto seguro por diversas vezes.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (Processo nº 2018/22294-0)

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 2.1 Fontes de proteína utilizadas na dieta de bovinos de corte e degradação proteica | 4 |
| 2.2 Diversidade microbiana e a degradação proteica..... | 8 |
| 3. OBJETIVO | 10 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 10 |
| 4.1 Animais, dietas e período experimental | 10 |
| 4.2 Análises laboratoriais | 13 |
| 4.2.1 Preparo dos pellets bacterianos..... | 13 |
| 4.2.2 Extração do DNA | 14 |
| 4.2.3 Quantificação e rendimento do DNA..... | 14 |
| 4.2.4 Diluições..... | 15 |
| 4.2.5 Integridade do DNA – Gel de Agarose..... | 15 |
| 4.2.6 Sequenciamento do DNA..... | 16 |
| 4.2.7 Análise Estatística..... | 17 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 18 |
| 6. CONCLUSÃO | 24 |
| 7. RESUMO | 25 |
| 8. SUMMARY | 26 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 28 |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é responsável por exportar cerca de 3,2 milhões de toneladas carcaça equivalente (TEC) (ABIEC, 2023), sendo consolidado há vários anos como o maior exportador mundial deste tipo de produto. Dos animais abatidos, cerca de 81,98% são mantidos em sistemas de pastagem (ABIEC, 2023).

Este sistema de criação dos animais é amplamente utilizado devido, principalmente, ao seu baixo custo. Entretanto, é conhecido que neste sistema há o entrave da estacionalidade da produção de forragens, gerando mudanças na quantidade e qualidade. (Reis et al., 2009). Além disso, pastagens tropicais raramente são disponíveis de forma que o seu consumo seja balanceado para atender as exigências nutricionais, devido às características de sua composição que limitam o seu consumo e sua digestibilidade (Detmann et al., 2014).

Em períodos de seca, as forragens apresentam menores valores de proteína bruta e digestibilidade de nutrientes, em contrapartida aumentam-se os teores de parede celular, como lignina, na massa da forragem disponível (Reis et al., 2013). Estas modificações, resultantes das mudanças na estrutura da planta, acarreta perdas de peso aos animais, constituindo o principal fator limitante à produção (Leng, 1983). Um menor desempenho de bovinos mantidos em pastagens neste período do ano pode ser explicado pela redução da ingestão de forragens sob estas condições (Paulino et al., 2008), em que, mesmo com a diminuição do consumo, o aumento da quantidade de lignina na célula vegetal resulta na diminuição da taxa de passagem de alimentos e no aumento do enchimento.

A suplementação é uma estratégia para evitar essas limitações e ajustar o desbalanço de nutrientes das pastagens tropicais (Lazzarini et al., 2009). O uso de suplementação proteica com fontes de proteína degradável no rumen (PDR) otimizaria a utilização das pastagens no período da seca devido ao fornecimento de N prontamente disponível para o crescimento das bactérias fibrolíticas no ambiente ruminal (Detmann et al., 2011). Além disso, o suprimento adicional de fontes de proteína não degradável no rúmen (PNDR) pode influenciar na partição dos nutrientes, por meio da modulação no suprimento e metabolismo da glicose, em que a síntese líquida de glicose aumenta, levando ao aumento da oxidação do acetato produzido no rúmen (Waterman et al., 2006). Alimentos que fornecem proteína se tornaram foco de estudos pretendendo uma melhor compreensão da utilização no metabolismo do animal (Valadares Filho et al., 2010), tendo em vista que animais com maior eficiência conseguem aproveitar melhor os nutrientes fornecidos nas dietas (Guan et al., 2008, Calsamiglia et al., 2010, Ribeiro et al., 2017).

A baixa eficiência da utilização de N nos ruminantes, que em bovinos é, em média 25% (Calsamiglia et al., 2010), tem como uma das causas a complexidade em sincronizar o fornecimento de energia com a degradação da fonte de proteína, e assim fornecer ao mesmo tempo energia e N para a microbiota (Hall e Huntington, 2008; Santos e Pedroso, 2011). Além da degradação das fontes proteicas da dieta, outra forma de fornecimento de N para os microrganismos é através da reciclagem de ureia que ocorre para o ambiente ruminal. Outro fator que pode afetar a eficiência de utilização de N no rúmen é a modificação da população microbiana ruminal, a qual até o momento há estudos

que mostram que a oferta de dietas com baixo teor de proteína tendem a modificar as populações bacterianas do rúmen, em que há o maior crescimento de bactérias que não dependem de amônia para sobrevivência (Marini e Van Amburgh, 2003; Belanche et al., 2012). Ademais, há estudos que relatam que a maior retenção de N no rúmen aconteceu por bactérias pouco abundantes no rúmen, como os filos Proteobacteria, Elusimicrobia, Spirochaetes e Lentisphaerae, enquanto filos com maior abundância no rúmen, como os filos Bacteroidetes e Firmicutes, foram relacionados a menor retenção de N (Alves et al., 2021). A alteração da microbiota pode resultar na regulação positiva da reciclagem de N do fígado para o rúmen, buscando fornecer N em quantidade suficiente para o crescimento microbiano com concentração limitada de amônia ruminal (NH₃-N) (Reynolds e Kristensen, 2008).

A microbiologia do rúmen é extremamente complexa, devido ao grande número de microrganismos presentes, suas diferentes naturezas e as mudanças da população, que resultam da mudança da dieta do animal hospedeiro (Teixeira, 1997). Mesmo com a possibilidade de manipulação da microbiota ruminal, através da alteração de ingredientes presentes na dieta, ainda não há trabalhos que descrevam as mudanças que ocorreram com a utilização de diferentes fontes de proteínas suplementar ao pasto de baixa qualidade (período seco).

Entretanto, há conhecimentos limitados sobre o comportamento da microbiota ruminal quando novilhos de corte em pastos de baixa qualidade são suplementados com ureia (NNP-PDR) ou com PNDR. Diante do exposto, este estudo foi realizado para encontrar quais microrganismos ruminais estão

presentes nos animais quando submetidos a diferentes dietas, tendo como hipótese que a suplementação com NNP favoreça a população de bactérias que degradam fibra e que fontes de proteínas não degradáveis no rúmen no período das secas favoreça o desenvolvimento de microrganismos da família *Bacteroidacea* na microbiota ruminal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fontes de proteína utilizadas na dieta de bovinos de corte e degradação proteica

Durante a estação seca, inicia-se a senescência da forragem, resultando em uma maior proporção de caule e material morto. As forrageiras decrescem rapidamente em digestibilidade e, principalmente, em conteúdo total de compostos nitrogenados, o que acarreta perdas de peso aos animais, constituindo o principal fator limitante à produção (Leng, 1983).

Enquanto no período das águas o teor proteico médio das forragens está em torno de 16% de proteína bruta (Reis et al., 2015), nas secas estes teor pode estar abaixo de 7% (Reis et al., 2005)

O ganho médio diário durante a estação seca é geralmente menor devido ao valor nutricional baixo da forragem durante esta época do ano (Murillo et al., 2016). Em pastagens senescentes a proteína é frequentemente um nutriente limitante (Obeidat et al., 2002). Nestes casos a suplementação proteica pode aumentar a ingestão de forragem e melhorar o desempenho dos bovinos de corte (Murillo et al., 2013).

No Brasil a fase de recria de bovinos é exclusivamente realizada a pasto. Nesta fase, em que os animais estão em crescimento acentuado, eles requererem altos níveis de proteína na dieta para dar o aporte necessário ao crescimento muscular. Assim, torna-se necessária a suplementação proteica adicional para atender às demandas nutricionais associadas ao crescimento quando mantidos sob condições de pastagem no período das secas (Murillo et al. 2016).

De acordo com NRC (2001), a proteína bruta (PB) ingerida pelos ruminantes, podem ser divididas em duas frações, sendo elas, proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR).

Segundo Detmann et al. (2011) a suplementação proteica com fontes de proteínas degradáveis no rúmen (PDR) otimizaria a utilização das pastagens no período da seca devido ao fornecimento de N prontamente disponível para o crescimento das bactérias fibrolíticas no ambiente ruminal, como a *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus spp.*

Suplementação com fontes de proteína verdadeira também permite corrigir a deficiência de energia, pois promove aumento na proporção de microrganismos no rúmen e, conseqüentemente, eleva a digestibilidade da forragem de menor qualidade e os consumos de MS e energia digestível, resultando em melhor desempenho dos animais (Reis et al., 1997).

A proteína presente nas fontes consideradas PNDR passam inertes pelas ações da microbiota ruminal. Alimentos que são fontes de PNDR na dieta normalmente sofreram modificações na sua estrutura por processamento industrial, onde o grupo alfa-carbonílico de um açúcar redutor e a amina das

proteínas, troca seus elétrons formando produtos estáveis (Shibao e Bastos, 2011). No entanto, a PNDR também pode não sofrer ação microbiana devido outros fatores como taxa de passagem rápida tornando o tempo de permanência no rúmen insuficiente para que ocorra a sua degradação; ou o grão possuir barreira física que não possibilite a ação dos microrganismos. As farinhas ou farelos apresentam maiores proporções de PNDR do que os alimentos sem processamento, pois, durante o processo de fabricação ocorre aumento da reação de Maillard que influencia nas ligações de dissulfeto, e tornam assim essas moléculas menos susceptíveis a ação microbiana no ambiente ruminal (Santos e Pedroso, 2011).

Um das fontes de PNDR pode ser o glúten de milho 60, que possui em sua composição bromatológica 60% de PB. Em um estudo realizado por Cabral et al. (2011), o glúten apresentou somente 18% de degradação no rúmen, ou seja 82% de PNDR. O glúten de milho 60 é um resíduo seco do processamento do milho, obtido após a remoção do amido, gérmen e da separação do farelo, através do processamento realizado por via úmida, o qual é utilizado para a fabricação do amido de milho ou xarope de milho, e pelo tratamento enzimático do endosperma (Tardin, 1991).

É conhecido que a PNDR fornece ao corpo animal diferentes usos de AA (aminoácidos) e retenção de nitrogênio (Souza et al., 2020), tendo papel importante no perfil de AA da proteína metabolizável. Os ingredientes que a contém são utilizados na dieta como forma de modificar o suprimento de aminoácidos pós-ruminal (Merchen e Titgemeyer, 1992), e que o seu uso como suplemento alimentar durante a estação seca também pode reduzir a quantidade

de N no rúmen, ocasionando a necessidade da reciclagem de N, promovendo o aporte ideal de N no rúmen para a manutenção da microbiota (Detmann et al., 2010). O uso de PNDR como fonte de suplementação na estação seca buscando a reciclagem de N faz-se necessário porque neste período a quantidade de proteína na forragem é baixa, influenciando na quantidade deste alimento que o animal consome e em uma degradação mais lenta da forragem pelos microrganismos do rúmen (Reis et al., 2005; Detmann et al., 2004).

Desta forma, a proteína metabolizável que chega ao intestino para ser absorvida e transformada em proteína líquida, é oriunda de proteínas microbianas, proteínas endógenas e PNDR (Acuri et al., 2011; Sinclair et al., 2014). Suplementações a base de proteína de baixa degradação ruminal permite a absorção de aminoácidos no intestino, resultando em efeito positivo sobre o consumo de forragem e o desempenho animal (Siebert e Hunter, 1982), desde que haja quantidades adequadas de N no rúmen para manter nível de amônia suficiente para a eficiente degradação da fração fibrosa.

O aproveitamento de amônia e degradação da fibra por ruminantes ocorre graças à presença do ecossistema ruminal, o qual é influenciado pelo tipo de dieta ingerida, sendo o teor proteico da dieta, bem como a PDR, um fator limitante para o crescimento microbiano (Alves, 2019). Neste sentido estudos que estão sendo conduzidos para elevar à eficiência da produção animal, por meio da máxima utilização pelos ruminantes dos nutrientes fornecidos nas dietas (Huws et al., 2018), tem se preocupado com a microbiota ruminal, logo que a maior eficiência também é consequência desta.

Uma das causas de baixa eficiência de utilização de N nos ruminantes é a complexidade em sincronizar o fornecimento de energia através de carboidratos com a degradação da fonte proteica da dieta e assim proporcionar simultaneamente energia e N para o crescimento microbiano (Hall e Huntington, 2008; Acuri et al., 2011; Santos e Pedroso, 2011). Logo que, além do N disponível para microbiota ser originário da degradação das fontes proteicas da dieta, ou da reciclagem de ureia que ocorre para o ambiente ruminal.

2.2. Diversidade microbiana e a degradação proteica

As bactérias são consideradas de maior importância dentre os microrganismos que compõem a microbiota do rúmen, devido a sua maior participação na degradação de fontes proteicas com dez vezes mais eficiência que os demais microrganismos presentes no ambiente ruminal (Bach et al., 2005).

Em estudo realizado por De Jesus et al. (2019), foram identificados 27 filos, dos quais os mais predominantes foram Firmicutes (23%), Bacteroidetes (14%), Proteobacteria (10%), Spirochaetes (9%), Fibrobacteres (7%), Tenericutes (5%) e Actinobacteria (2%), em novilhos Nelore em pastejo. Os filos identificados neste trabalho podem representar até 70% dos dos filos presentes no rúmen bovinos. Em estudo realizado por Jesus (2014) caracterizou como classes mais abundantes no rúmen *Actinobacteria*, *Mollicutes*, *Fibrobacteria*, *Spirochaetia*, *Clostridia*, *Bacteroidia* e *Deltaproteobacteria*. A nível de gêneros os quais pode-se identificar como predominantes no rúmen são *Prevotella*, *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Succinomonas*, *Methanobacterium*, *Butyrivibrio*,

Selenomonas, Succinivibrio, Streptococcus, Eubacterium e Lactobacillus, (Atlas e Bartha, 1998).

As bactérias responsáveis pela degradação proteica são chamadas proteolíticas, sendo os principais gêneros *Prevotella* e *Bacteroides* (Acuri et al., 2011; Kozloski, 2011).

Os microrganismos do rúmen são compostos por Eubacteria (bactéria), Archaea (Metanogênicas) e Eukarya (Protozoários e Fungos) (Nagaraja, 2016). Entre as bactérias, apenas 10% das espécies presentes no rúmen foram identificadas (Nagaraja 2016), assim, 90% das espécies de bactérias, além das espécies ainda não identificadas de Archeas e Eukarya, que desempenham funções no ambiente ruminal ainda não foram descritos, de modo que ainda são necessários estudos deste ecossistema, além do que já foi elucidado.

Entendendo as limitações da área de microbiologia ruminal e que as variações que ocorrem nesse ambiente ruminal normalmente são atribuídas aos fatores externos como genética, manejo e dieta, autores começaram a relacionar o efeito de diferentes populações microbianas nos hospedeiros com a eficiência alimentar.

Assim, a caracterização do perfil da microbiota ruminal possibilita escolher a suplementação em pastos de baixa qualidade, que modula, de melhor forma, o crescimento microbiano ruminal para melhorar a eficiência de utilização da dieta.

3. OBJETIVO

Este estudo foi realizado com objetivo de caracterizar a diversidade bacteriana ruminal de novilhos Nelore suplementados com proteína não degradável no rúmen (glúten de milho) ou nitrogênio não proteico (Ureia) como fonte de PDR, em pastagens de baixa qualidade, durante o período das secas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais, dietas e período experimental

O experimento foi conduzido em área pertencente ao Departamento de Zootecnia da FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal, seguindo princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Campus de Jaboticabal/SP (protocolo 16.688/16). Ocorreu entre os meses de agosto a outubro de 2018.

A área experimental consistiu em 8 piquetes de aproximadamente 1,8 hectares, formados com *Brachiaria brizantha* cv. Xaraés, manejado para a manutenção da oferta de forragem estabelecida entre 30 e 35 cm, com média de 28,4 cm.

Foram utilizados 8 novilhos da raça Nelore, castrados, canulados no rúmen e duodeno (Figura 1), dispostos em quatro quadrados latinos (2x2, 2

tratamentos e 2 períodos) simultâneos para a avaliação da diversidade bacteriana ruminal. Sendo mantido um animal em cada piquete experimental.



Figura 1. Novilhos Nelore canulados no rúmen utilizados no experimento

Os períodos experimentais foram de 27 dias cada (26 dias de adaptação do animal ao tratamento e 1 dia de coleta) na época das secas. Os tratamentos consistiram em SMU: fonte de proteína degradável no rúmen – PDR - (ureia – SMU) e GLU: fonte de proteína não degradável no rúmen – PNDR - (glúten de milho 60 - GLU) (Tabela 1).

No tratamento SMU os animais em pastagem foram suplementados com ureia e sal (fornecida para atender a 50% da PDR requerida) e no tratamento GLU os animais foram suplementados com 0,3% do peso vivo com glúten de milho 60 e sal mineral, ambos os tratamentos foram ofertados com o objetivo de um ganho médio diário (GMD) de 0,350 kg (Exigências (kg / dia): MS = 4,58 kg, NDT = 2,82 kg/MS, PB = 0,56 kg/MS, PDR = 67,86 % da PB, de acordo com Valadares Filho et al. (2016). Os suplementos foram ofertados aos animais todos os dias do período experimental, as 9 horas da manhã no cocho de alimentação, com a retirada de sobras, se houvesse, no dia seguinte.

Tabela 1. Composição química do suplemento durante o período experimental.

| | Suplemento | |
|----------|------------|-------|
| | SMU | GLU |
| MS, %MN | 59,00 | 91,21 |
| MM, %MS | 0,33 | 2,62 |
| MO, %MS | 99,67 | 97,38 |
| PB, %MS | 222,75 | 58,75 |
| %PDR/PB | 100 | 30,30 |
| %PNDR/PB | - | 69,70 |
| EE, % MS | - | 1,71 |
| FDN, %MS | - | 2,22 |

SMU= Sal mineral com ureia; GLU = Suplementação proteica com glúten de milho 60 e sal mineral; MS = matéria seca, MM = matéria mineral, MO = matéria orgânica; PB = Proteína Bruta; EE= extrato etéreo. Composição Sal Mineral sal mineral: Ca: 160g; P: 40g; Mg: 5g; S: 40g; Na: 160g; Cu: 945mg; Mn: 730mg; Zn: 3500mg; I: 70mg; Co: 56mg; Se: 18mg; F(máx): 400mg)

As coletas de diversidade bacteriana do ambiente ruminal foram realizadas no 27º dia de cada período experimental, através da cânula ruminal (Figura 2). Foram coletadas aproximadamente 50 g de conteúdo da região ventral da fração sólida + fração líquida da digesta, antes da suplementação dos animais (Saro et al., 2012). Esse material foi armazenado em tubos Falcon livres de DNA e RNA, e imediatamente transportado para o laboratório em caixas de isopor com gelo.



Figura 2. Coleta de conteúdo ruminal

4.2. Análises laboratoriais

4.2.1. Preparo dos pellets bacterianos

No laboratório foram adicionados 50mL da solução de PBS - solução tampão fosfato-salina - (pH 7,4 - 8,00 gramas de cloreto de sódio, 0,20 gramas de cloreto de potássio, 1,44 gramas fosfato de sódio e 0,24 gramas de fosfato de potássio, para o preparo de 1 litro de solução, sendo o volume total completado com água destilada) a 4°C, em seguida, homogeneizou-se a amostra mediante agitação manual por três minutos. Após esse procedimento o material foi filtrado em pano estéril com porosidade de 100 micras, e o filtrado foi utilizado para formação de um pellet bacteriano. Os pellets bacterianos foram formados de acordo com a metodologia utilizada pela equipe de microbiologia do rúmen da FCAV e descrita por Granja-Salcedo et al., (2017). Imediatamente após a formação do pellet, parte deste foi utilizado para fazer extração de DNA e o restante armazenado a -80°C.

4.2.2. Extração do DNA

Na extração do DNA utilizou-se 200 mg do pellet bacteriano e o Kit de extração Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep. Kit recomendado por Henderson et al., (2013), seguindo as instruções do fabricante e utilizando o FastPrep para a etapa de lise celular. Os eppendorfs com o DNA puro foram armazenados no freezer para as análises seguintes.

4.2.3. Quantificação e rendimento do DNA

Após a extração do material genômico, o rendimento do DNA extraído (puro) foi avaliado por espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e fluorimetria (Qubit® 3.0, kit Qubit® dsDNA Broad Range Assay Kit, Life Technologies) (Figura 3). A pureza do DNA metagenômico extraído foi avaliada por espectrofotometria a partir das relações de absorvância $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ e $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ para indicar possíveis contaminações do DNA com sais tampão e compostos orgânicos, conforme as curvas representadas na Figura 4.



Figura 3. Qubit® 3.0 utilizado para avaliação da concentração de DNA

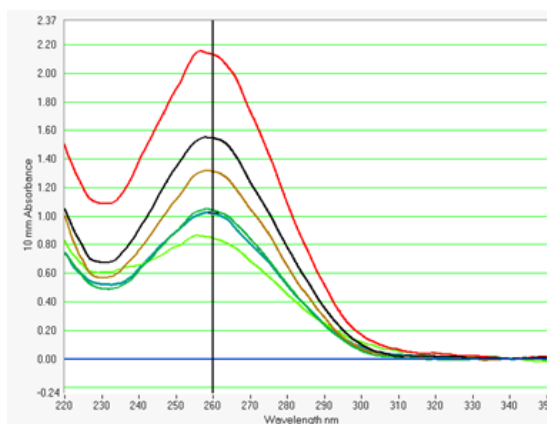


Figura 4. Curvas de absorvância do NanoDrop® para avaliação da qualidade do DNA.

4.2.4. Diluições

A fim de padronizar as concentrações dos DNAs extraídos em 30 ng/μL, estes foram diluídos em água ultrapura. O procedimento foi realizado na bancada de fluxo laminar, com as ponteiros livres de DNA e RNA e todos os materiais e a bancada de fluxo laminar foram submetidos a luz UV durante 20 minutos, e armazenados em tubos eppendorfs de 0,6 ml. A concentração dos DNAs diluídos foram conferidas por espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e a pureza foi avaliada por espectrofotometria a partir das relações $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ e $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ para indicar possíveis contaminações da solução com sais tampão e compostos orgânicos.

4.2.5. Integridade do DNA – Gel de Agarose

A integridade do DNA foi verificada através do gel de agarose 0,8% corado com 1ul de *Syber gold*. O aparelho utilizado para correr o gel foi o Electrophoresis Power Supply/Loccus Biotecnologia programado para 42 minutos, e as amostras foram coradas com 4ul de solução DYE. Após o gel correr foi utilizado o aparelho Trans Illuminator/Loccus Biotecnologia para poder obter as imagens dos géis.

4.2.6. Sequenciamento do DNA

O sequenciamento da região V4/V5 do gene *16S rRNA* bacteriano foi realizado, para a identificação e quantificação da diversidade bacteriana ruminal. A amplificação da região hipervariável V4 /V5 do gene *16S rRNA* bacteriano foi realizada mediante uma reação de PCR utilizando-se o primer forward 515F (5'-GTGNCAGCMGCCGCGGTAA-3') e o reverse 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') utilizando-se 20 ng de DNA total de cada amostra, e 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 conduziu-se nas seguintes condições: 95°C por 3 minutos, 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, pareamento a 53,8°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações de PCR foram realizadas em duplicata e reunidas equimolarmente para minimizar o viés durante a reação.

A pureza dos produtos da PCR, foi verificada em gel de agarose 1% e o tamanho dos fragmentos foram estimados por comparação com marcador 1 kb

plus DNA ladder (Invitrogen). Em seguida, os fragmentos de PCR foram purificados utilizando o Kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery, seguindo as instruções do fabricante.

Sendo realizado o sequenciamento na *facility* do departamento de tecnologia da FCAV/UNESP no equipamento Illumina Miseq utilizando o Kit MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycles) de 15 milhões de *reads*.

Os dados obtidos no sequenciamento foram processados por meio do QIIME software package (Caporaso et al., 2010). Para a leitura selecionou-se *reads* acima de 250 pb e com média > 25 na qualidade Phred e assim agrupando-os em OTUs (operational taxonomic units) com mais de 97% de semelhança das sequências. Esses dados foram utilizados para análise rarefação e apresentando em gráficos o número de OTUs agrupado a 97% de semelhança em relação ao número de leituras para os diferentes níveis taxonômicos. Além destes dados calculou-se também estimadores de riqueza e os índices de alpha e beta diversidade.

4.2.7. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com ajuda do Software R (versão 3.6.3). Os dados de riqueza, diversidade e abundância ruminal de bactérias e Archaeas, foram comparados entre os tratamentos SMU e GLU pelo teste de Wilcoxon de amostras emparelhadas. Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos para o gráfico 1, enquanto para a tabela 1 e gráfico 2 foram considerados significativos os valor de $P \leq 0,10$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos dados obtidos do sequenciamento e processados por meio do QIIME software package foram processadas, em média, 32.298 sequencias por amostras. A suplementação com GLU não influenciou os estimadores de diversidade, índices de riqueza e composição total de bactérias e *Archaeas*, ($P > 0,10$) (Tabela 1). Isso pode ter acontecido porque a maior porção de PB presente no glúten seja PNDR (Cabral et al., 2011), ficando indisponível para a ação dos microrganismos.

Tabela 1. Mediana \pm rango interquartil dos estimadores de diversidade e índices de riqueza nas dietas experimentais com diferentes fontes de PNDR.

| | TRATAMENTOS | | P-valor |
|---------------|-------------------|-------------------|---------|
| | GLU ¹ | SMU ² | |
| Riqueza | | | |
| ACE | 98,18 \pm 12,83 | 98,99 \pm 11,30 | 0,8125 |
| Chao1 | 96,00 \pm 13,00 | 96,00 \pm 11,00 | 0,7995 |
| Diversidade | | | |
| Shannon-Wener | 5,54 \pm 0,11 | 3,57 \pm 0,15 | 0,9375 |
| Simpson | 9,45 \pm 0,04 | 9,51 \pm 0,12 | 0,6875 |
| Fisher | 12,96 \pm 1,29 | 12,52 \pm 1,11 | 0,8125 |
| Composição, % | | | |
| Archeas | 3,02 \pm 1,73 | 3,18 \pm 1,90 | 0,8125 |
| Bactérias | 81,96 \pm 1,69 | 81,74 \pm 3,11 | 0,8125 |
| Unassigned | 14,13 \pm 1,69 | 13,04 \pm 3,11 | 0,5781 |

¹GLU: gluten de milho 60 (MS: 92,2%; MO: 98,1%; PB: 60%MS; FDN: 36,9%MS; EE: 2,87 %MS; PDR: 30,3%MS; PNDR: 69,7%MS) e sal mineral.

²SMU: ureia e sal mineral (Ca: 160g; P: 40g; Mg: 5g; S: 40g; Na: 160g; Cu: 945mg; Mn: 730mg; Zn: 3500mg; I: 70mg; Co: 56mg; Se: 18mg; F(máx): 400mg)

Foi possível a identificação de 17 filios bacterianos e 1 filio de *Archaeas* (Gráfico 1). Apenas o filio *Firmicutes* apresentou diferença ($p= 0,0188$) entre os tratamentos SMU e GLU, sendo mais abundante no rúmen de animais suplementados com SMU. Isso pode ter acontecido porque o SMU forneceu o suprimento necessário de N para o crescimento das bactérias, principalmente as fibrolíticas (Detmann et al., 2011), como as do filio *Firmicutes* que já foram relacionados com a degradação de fibra no rúmen de bovinos em partejo (De Jesus et al., 2019).

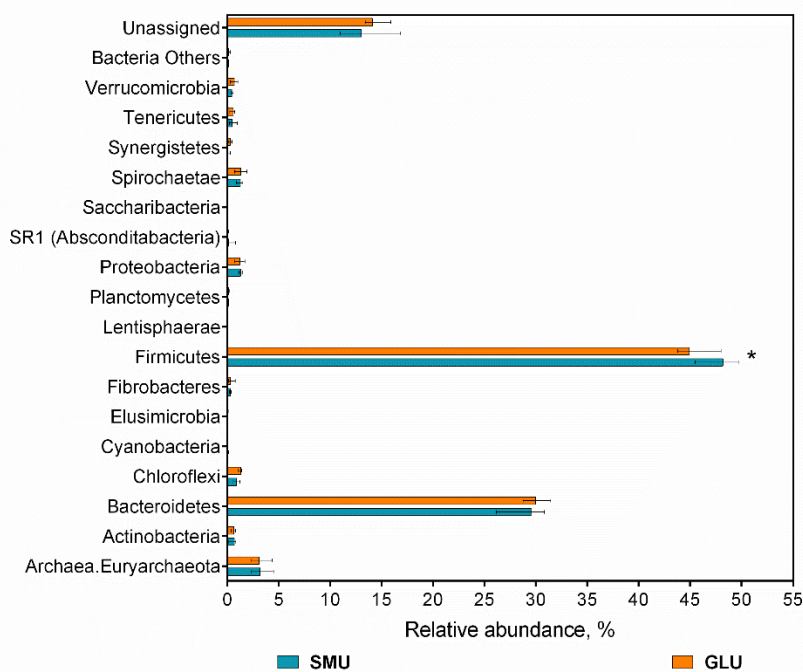


Gráfico 1. Abundância dos filios bacterianos nas dietas experimentais com diferentes fontes de PNDR.

Os filios que foram encontrados em maior abundância em ambos tipos de suplementação foram o *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (gráfico 1), conhecidos como filios dominante e variável dentro do rumen (Parra et al., 2022). Nagata et al.,

(2018) aponta que isso acontece porque estes filos não são sensíveis a mudanças no ambiente ocasionadas pela dieta fornecida.

O filo *Firmicutes*, o qual foi mais abundante em animais do tratamento SMU, é constituído principalmente por bactérias gram-positivas que quebram as proteínas, e este filo incluem a classe de bactéria Clostridia, por exemplo: *Clostridium sticklandii*, *C. coccoides*, *C. aminovalerinum*, *Selenomonas ruminantium*, *Eubacterium ruminantium*, *Butyvirbio fibrosolvens* família Lachnospiraceae (por exemplo: *Coproccoccus spp.*), e *Succiniclasticum spp*, este filo também incluem as espécies *Ruminococcus flavefaciens* ou *Butyvirbio fibrisolvens*, que quebram celulose, xilano e pectina. Enquanto as espécies *Anaerovibrio lipolytica* realiza a lipólise de triglicerídeos e a *Megasphaera elsdenii* utiliza ácidos graxos ou ácidos produzidos pela atividade de outros microrganismos – bem como *Pelotomaculum thermopropionicum* que oxida o propionato (Cholewińska *et al*, 2020).

Embora mudanças na composição bacteriana sejam esperadas, a maior abundância do filo Firmicutes na microbiota de animais suplementados com SMU provavelmente tenha ocorrido devido maior abundância de Ruminococcaceae e Eubacterium. Bactérias ruminais, especialmente as celulolíticas, incluindo *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, e *Fibrobacter succinogenes*, sintetizam enzimas (como glutamato desidrogenase e glutamina sintetase) e podem incorporar amônia e esqueleto de carbono e sintetizar seu próprio aminoácido para crescimento bacteriano (Antonopoulos *et al.*, 2003; Atasoglu *et al.*, 1999).

Também foi possível a identificação de 137 gêneros e 407 espécies de bactérias. No gráfico 2 é possível verificar as que apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p < 0,10$).

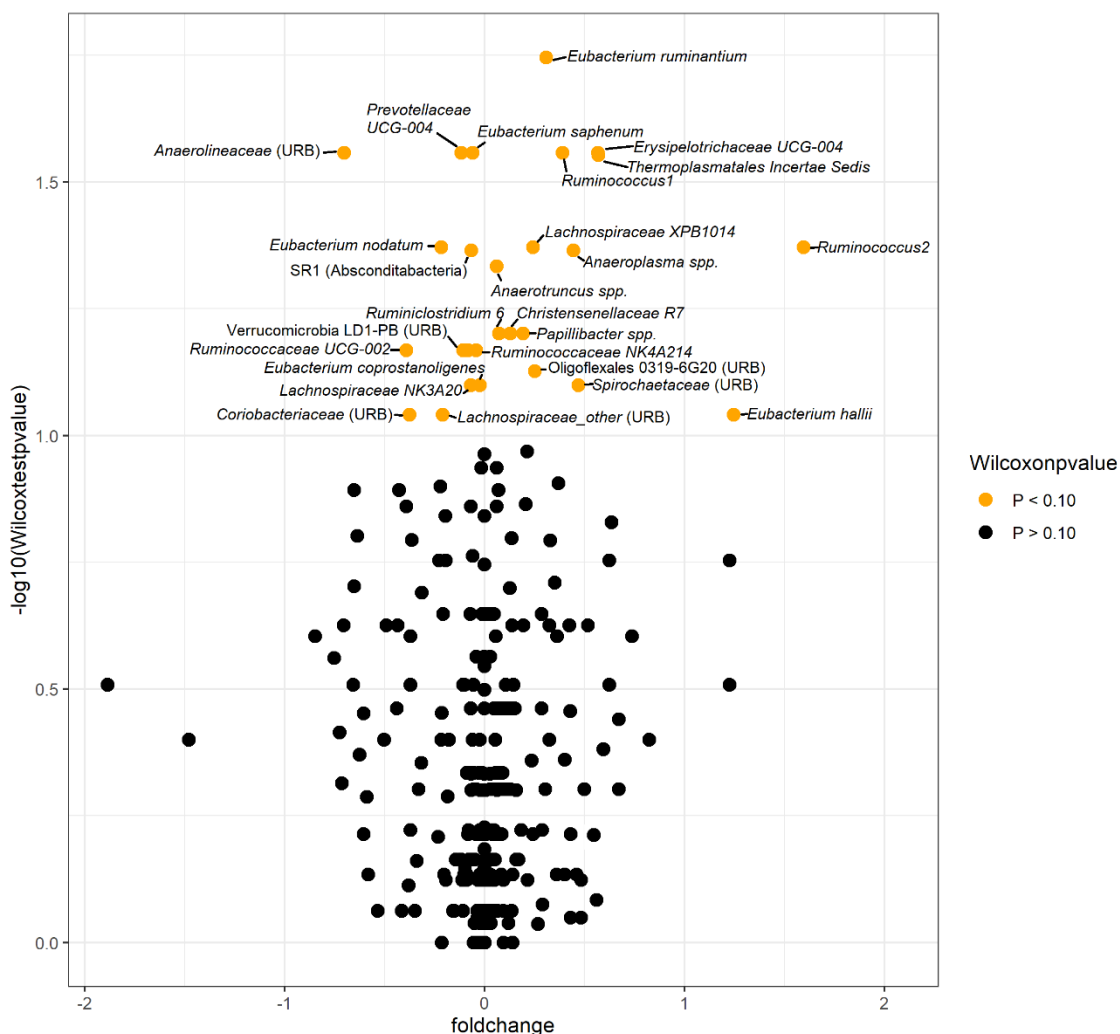


Gráfico 2: Abundância de espécies bacterianas em animais suplementados com diferentes fontes proteicas (GLU = Suplementação proteica com glúten de milho 60 (PNDR) e sal mineral; SMU = Suplementação com ureia (PDR) e sal mineral)

O GLU reduziu a abundância no rúmen dos gêneros *Eubacterium*, *Prevotellaceae*, *Anaerolineaceae*, *Absconditabacteria*, *Ruminococcaceae*, *Verrucomicrobia*, *Lachnospiraceae*, *Coriobacteriaceae*. As bactérias

identificadas foram *Eubacterium saphenum* (P = 0,028, foldchange: -0,059), *Prevotellaceae UCG-004* (p-valor: 0,028, foldchange: -0,117), *Anaerolineaceae (URB)* (p-valor: 0,028, foldchange: -0,703), *Eubacterium nodatum* (p-valor: 0,042, foldchange: -0,216), *SR1 (Absconditabacteria)* (p-valor: 0,043, foldchange: -0,066) *Ruminococcaceae NK4A214* (p-valor: 0,067, foldchange: -0,083) *Verrucomicrobia LD1-PB (URB)* (p-valor: 0,067, foldchange: -0,390), *Ruminococcaceae UCG-002* (p-valor: 0,067, foldchange: -0,390), *Eubacterium coprostanoligenes* (p-valor: 0,079, foldchange: -0,023), *Lachnospiraceae NK3A20* (p-valor: 0,079, foldchange: -0,023) *Coriobacteriaceae (URB)* (p-valor: 0,090, foldchange: -0,375), *Lachnospiraceae_other (URB)* (p-valor: 0,090, foldchange: -0,209).

Quando os animais foram suplementados com GLU houve aumento na abundância dos gêneros bacterianos *Ruminococcus*, *Erysipelotrichaceae*, *Thermoplasmatales*, *Lachnospiraceae*, *Anaeroplasma*, *Ruminiclostridium*, *Christensenellaceae*, *Papillibacter*, *Oligoflexales*, *Spirochaetaceae*, *Eubacterium* e *Anaerotruncus*. Neste tratamento, as bactérias identificadas foram *Ruminococcus 1* (p-valor: 0,027, foldchange: 0,390) *Erysipelotrichaceae UCG-004* (p-valor: 0,027, foldchange: 0,567), *Thermoplasmatales Incertae Sedis* (p-valor: 0,027, foldchange: 0,569), *Lachnospiraceae XPB1014* (p-valor: 0,042, foldchange: 0,242), *Anaeroplasma spp.* (p-valor: 0,043, foldchange: 0,445), *Ruminococcus 2* (p-valor: 0,042, foldchange: 1.595.343.982), *Ruminiclostridium 6* (p-valor: 0,062, foldchange: 0,071), *Christensenellaceae* (p-valor: 0,062, foldchange: 0,128), *Papillibacter spp.* (p-valor: 0,062, foldchange: 0,192), *Oligoflexales 0319-6G20 (URB)* (p-

valor: 0,074, foldchange: 0,250) *Spirochaetaceae (URB)* (p-valor: 0,079, foldchange: 0,47), *Eubacterium hallii* (p-valor: 0,090, foldchange: 12.467), *Anaerotruncus spp.* (p-valor: 0,046, foldchange: 0,061), *Eubacterium ruminantium* (p-valor: 0,017, foldchange: 0,308).

Em relação aos gêneros e espécie das bactérias em que houve variação na abundância, pode-se destacar dois em que a abundância foi maior do que os demais, sendo eles a espécie *Eubacterium hallii* (p-valor: 0,090, foldchange: 12.467) e o gênero *Ruminococcus 2* (p-valor: 0,042, foldchange: 1.595.343.982), ambos na dieta GLU. Ambas as espécies foram encontradas em maior abundância no rúmen dos animais suplementados com GLU, provavelmente este fato se deve a preferência destes microrganismos por peptídeos e aminoácidos para seu crescimento, pois embora a GLU tenha em sua composição maior parte de PNDR (70%), esta fonte é capaz de fornecer 30% de proteína verdadeira degradada no rúmen, a qual estimulou o crescimento destes gêneros.

O gênero *Ruminococcus 2*, o qual teve uma abundância mais elevada quando houve na suplementação com GLU, quando comparado aos outros gêneros encontrados, pertencente ao filo Firmicutes (Kim et al., 2011), os quais são degradadores de carboidratos e fibras, como a celulose e hemicelulose (Krause et al., 2013). Este gênero foi avaliado como distribuído na grande maioria dos ruminantes existentes, sendo cerca de 3,6% da população presente no rúmen, de forma que há evidências de que sua atuação no rúmen seja alta, em relação a quantidade populacional (Henderson et al., 2015; Gaffney et al., 2021).

Uma das espécies conhecidas e descritas deste gênero é a *Ruminococcus bromii*, já foi isolada em animais ruminantes e seres humanos sendo uma bactéria que digere amido e tem papel importante no rúmen (Stewart e Bryant 1988). A *Eubacterium halli*, outra espécie de bactéria que também pertence ao filo *Firmicutes* (Kim et al., 2011), é altamente encontrada no intestino, sendo um dos responsáveis pela produção de ácidos graxos de cadeia curta e o metabolismo de produção (Clarissa et al., 2017). Este gênero pode aumentar as concentrações de butirato no conteúdo fecal e modificar o conteúdo de ácidos biliares (Li et al., 2020).

Um estudo de Parra et al. (2022), que comparou dietas com baixa (8,8%) e alta (13,5%) quantidades de proteínas brutas para avaliar a diversidade e composição de bactérias no rúmen de bovinos, apresentou maior quantidade de *Firmicutes* na dieta de baixa proteína quando comparado com alta proteína, assim como no nosso trabalho. Segundo o mesmo autor, os achados de ambos os estudos confirmam que a variabilidade bacteriana encontrada em dietas com menor quantidade de proteína pode ser embasada em mecanismos alternativos para suprir o crescimento de bactérias e a adaptação dos microrganismos a dietas com pouca proteína. Ademais, a diversidade de bactérias encontradas demonstra que as populações de bactérias ruminais pode mudar entre animais, aumentando ainda mais a quantidade de formas de adaptação a baixa quantidade de proteína (Parra et al., 2022).

6. CONCLUSÃO

Animais suplementados com ureia (SMU) apresentaram maior abundância do filo Firmicutes. No entanto, animais que receberam GLU apresentou maior abundância da espécie *Eubacterium hallii* e do gênero *Ruminococcus 2*, sugerindo que o crescimento destes microrganismos é dependente de AAs disponíveis.

7. RESUMO

Uma importante estratégia para suprir as deficiências nutricionais da forragem no período da seca, para animais na fase de recria, é suplementá-los com fontes proteicas, uma vez que este nutriente é escasso em forrageiras tropicais neste período. Com o presente estudo objetivou-se caracterizar a diversidade bacteriana de novilhos Nelore suplementados com proteína não degradável no rúmen (PNDR - glúten de milho) ou proteína degradável no rúmen (PDR -ureia), em pastagens, durante o período das secas. Foram utilizados 8 novilhos da raça Nelore, castrados, canulados no rúmen e duodeno, dispostos em quatro quadrado latino (2x2, 2 tratamentos e 2 períodos) simultâneos, mantidos um animal em cada piquete experimental. O experimento consistiu em dois tratamentos, e dois períodos experimentais de 27 dias cada (26 dias de adaptação do animal ao tratamento e 1 dias de coleta), sendo SMU (PDR): animais em pastagem que receberam ureia e sal mineral; GLU (PNDR): animais suplementados com 0,3% do peso vivo com glúten de milho 60 e sal mineral. As

coletas para diversidade bacteriana do ambiente ruminal ocorreram antes da suplementação dos animais, através da cânula ruminal, no sétimo dia de cada período de coleta (27º dia de cada período experimental). A extração do DNA foi realizada utilizando 200 mg do pellet microbiano e o Kit de extração Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit. O método utilizado para a identificação e quantificação da diversidade bacteriana ruminal foi o sequenciamento da região V4/V5 do gene 16S rRNA bacteriano, os dados obtidos foram processados por meio do QIIME software package. Os resultados foram analisados em delineamento quadrado latino (2x2) quadruplicado. O modelo para análise estatística incluiu o efeito fixo de tratamento, e como efeitos aleatórios corrigir como anterior. A PNDR não influenciou a riqueza e diversidade e composição bacteriana no rúmen. O filo Firmicutes foi mais abundante no rúmen dos animais quando receberam SMU ($p=0,018$). A suplementação proteica com PNDR (glútem de milho) ou PDR (ureia) modificou o ambiente ruminal a nível de filo.

Palavras chaves: Nutrição animal, microbiologia rúmen, metabolismo, suplementos dietéticos, proteína, digestibilidade.

8. SUMMARY

Important strategy to overcome nutritional deficiencies of forage in the dry period, for animals in the rearing phase, is supplement with protein sources, because this nutrient is scarce in tropical forages in this period. The present study aimed to characterize the bacterial diversity of Nelore steers supplemented with rumen

undegradable protein (RUP - corn gluten) or rumen degradable protein (RDP - urea), in pastures, during the dry period. Eight castrated Nelore steers, cannulated in the rumen and duodenum, were used, arranged in four simultaneous latin squares (2x2, 2 treatments and 2 periods), with one animal in each experimental plot. The experiment consisted of two treatments, and two experimental periods of 27 days each (26 days of animal adaptation to treatment and 1 day of collection), being SMU (RDP): animals in pasture that received urea and mineral salt; GLU (RUP): animals supplemented with 0.3% of live weight with corn gluten 60 and mineral salt. The collections for bacterial diversity of the ruminal environment occurred before supplementation of the animals, through the ruminal cannula, on the seventh day of each collection period (27th day of each experimental period). DNA extraction was performed using 200 mg of the microbial pellet and the Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Extraction Kit. The method used for the identification and quantification of rumen bacterial diversity was sequencing of the V4/V5 region of the bacterial 16S rRNA gene, the data obtained were processed using the QIIME software package. The results were analyzed in a quadruplicate (2x2) Latin square design. The model for statistical analysis included the fixed effect of treatment, and as random effects the effect of animal, and period. RUP PNDR did not influence bacterial richness, diversity and composition in the rumen. The phylum Firmicutes showed significant difference between treatments ($p=0.018$), being more abundant in the rumen of animals when receiving SMU. Protein supplementation with RUP (corn gluten) or RDP (urea) modified the rumen environment at the phylum level.

Keywords: Animal nutrition, rumen microbiology, metabolism, dietary supplements, protein, digestibility

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil**. 2023. Disponível em <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-02/>

ACURI, PB; LOPES, FCF, CARNEIRO, JC; Microbiologia do rumen . In: Berchielli, TT; Pires, AV; Oliveira, SG; (Eds). **Nutrição de Ruminantes**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, p.115-160. 2011

ALVES, KLGC. **Diversidade bacteriana ruminal e eficiência de utilização de nitrogênio em novilhos nelore alimentados com diferentes teores e fontes de proteína na dieta**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 2019.

ALVES, KLGC; et al. **Rumen bacterial diversity in relation to nitrogen retention in beef cattle**. *Anaerobe*, v. 67, p. 102316, 2021.

ANTONOUPOULOS, DA; et al. **Characterization of the gene encoding glutamate dehydrogenase (gdhA) from the ruminal bacterium Ruminococcus flavefaciens FD-1**. *Arch Microbiol* 179, 184–190. 2003. doi.org/10.1007/s00203-002-0513-4

ATASOGLU, C; et al. **Influence of peptides and amino acids on fermentation rate and de novo synthesis of amino acids by mixed micro-organisms from the sheep rumen**. *British Journal of Nutrition*, 81(4), 307-314. 1999. doi:10.1017/S0007114599000550

ATLAS, RM; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. Pearson Education India. 1999.

BACH, A; CALSAMIGLIA, S; STERN, MD. **Nitrogen metabolism in the rumen**. *Journal of Dairy Science*, 88, 9-21, 2005.

BELANCHE A, et al. **Shifts in the rumen microbiota due to the type of carbohydrate and level of protein ingested by dairy cattle are associated with changes in rumen fermentation**. *The Journal of Nutrition* 142, 1684–1692, 2012. doi:10.3945/jn.112.159574

CABRAL, LS; et al. **Estimação da digestibilidade intestinal da proteína de alimentos por intermédio da técnica de três estádios**. *Revista Brasileira Zootecnia*, v. 30, n. 2, p. 546-552, 2011.

CALSAMIGLIA, S; et al. **Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants.** *Animal*, v. 4, n. 7, p. 1184-1196, 2010.

CHOLEWIŃSKA P; et al. **The microbiome of the digestive system of ruminants – a review.** *Animal Health Research Reviews*, 1–12, 2020. <https://doi.org/10.1017/>

CLARISSA, S; et al. **Trophic Interactions of Infant Bifidobacteria and Eubacterium hallii during L-Fucose and Fucosyllactose Degradation.** *Front. Microbiol.* 8, 95, 2017

DE JESUS, RB; et al. **Characterization of ruminal bacteria in grazing Nellore steers.** *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 32(4), 248-260. 2019. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v32n4a01>

DE SOUZA, VC; et al. **Assessing amino acid utilization in young Nellore steers fed high-concentrate diets with different sources and levels of nitrogen.** *Animal Feed Science and Technology*, v. 269, p. 114642, 2020.

DETMANN E; et al. **Níveis de proteína bruta em suplementos múltiplos para terminação de novilhos mestiço em pastejo durante época seca: desempenho produtivo e característica de carcaça.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.33, n.1, p.169-180. 2004.

DETMANN E, et al. **Otimização do uso de recursos forrageiros basais. Simpósio de Produção de Gado de Corte.** *Anais... Simpósio de Produção de Gado de Corte*, 7, 191-240. 2010.

DETMANN, E; et al. **Degradação in vitro da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função da suplementação com proteína verdadeira e/ou nitrogênio não-protéico.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, n. 6, p. 1272-1279, 2011.

DETMANN E; et al. **An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation.** *Livestock Science*, v. 162, p. 141-153, 2014.

GRANJA-SALCEDO YT; et al. **Effects of partial replacement of maize in the diet with crude glycerin and/or soyabean oil on ruminal fermentation and microbial population in Nellore steers.** *British Journal of Nutrition*, 118(9), 651-660, 2017.

GRANJA-SALCEDO, YT; et al. **Effect of different levels of concentrate on ruminal microorganisms and rumen fermentation in Nellore steers.** *Archives of animal nutrition*, Abingdon v.70, n.1, p.17-32, 2016.

GUAN LL; et al. **Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency.** *FEMS microbiology letters*, v. 288, n. 1, p. 85-91, 2008.

HALL, MB; HUNTINGTON, GB. **Nutrient synchrony: Sound in theory, elusive in practice.** Journal of Animal Science, 86(14_suppl), E287-E292, 2008.

HENDERSON, G; et al. **Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range.** Sci Rep, 5:14567, 2015. doi: 10.1038/srep14567

HENDERSON, G; et al. **Effect of DNA Extraction Methods and Sampling Techniques on the Apparent Structure of Cow and Sheep Rumen Microbial Communities.** PLoS ONE, v. 8, n.9. p. e74787, 2013.

HUWS, AS; et al. **Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: Past, present, and future.** Frontiers in Microbiology, v 9, 2019.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **Censo Agro 2017.** Disponível em: <
https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html

JESUS, RBD; et al. **Bacterial diversity in bovine rumen by metagenomic 16S rDNA sequencing and scanning electron microscopy.** Acta Scientiarum. Animal Sciences, 37, 251-257. 2015.

KIM, M; et al. **Phylogenetic diversity of bacterial communities in bovine rumen as affected by diets and microenvironments.** Folia Microbiol 56, 453, 2011. doi.org/10.1007/s12223-011-0066-5,

KOZLOSKI, GV. **Bioquímica dos ruminantes.** Editora Universidade Federal de Santa Maria, 3ª edição. Santa Maria, pp. 124-125, 2011.

KRAUSE, DO; et al. **Board-invited review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology.** Journal of Animal Science, 91, 1, 2013, doi.org/10.2527/jas.2012-5567

LAZZARINI, I; et al. **Dinâmicas de trânsito e degradação da fibra em detergente neutro em bovinos alimentados com forragem tropical de baixa qualidade e compostos nitrogenados.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.61, p.635-647, 2009.

LENG, RA. **Supplementation of tropical and subtropical pastures for ruminant production.** Herbivore Nutrition in the Subtropics and Tropics. p, v. 129, 1983.

LI, H; et al. **Rumen Microbiome and Metabolome of Tibetan Sheep (*Ovis aries*).** Reflect Animal Age and Nutritional Requirement. Front. Vet. Sci. 7:609. 2020. doi: 10.3389/fvets.2020.00609

MARINI JC; VAN AMBURGH ME. **Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers.** *Journal of Animal Science* 81, 545–552. 2003. doi:10.2527/2003.812545x

MERCHEN, NR; TITGEMEYER, EC. **Manipulation of amino acid supply to the growing ruminant.** *Journal of Animal Science*, v. 70, n. 10, p. 3238-3247, 1992.

NAGARAJA, T. G. Microbiology of the rumen. In: **Rumenology**, p. 39-61, 2016.

NAGATA, R; et al. **Effects of repeated subacute ruminal acidosis challenges on the adaptation of the rumen bacterial community in Holstein bulls.** *Journal of dairy science*, 101(5), 4424-4436. 2018.

NRC - National Research Council. **Nutrients requirements of dairy cattle.** 7. ed. Washington: National Academy Press. 380p. 2001.

OBEIDAT, BS; et al. **Metabolic characteristics of multiparous Angus and Brahman cows grazing in the Chihuahuan Desert,** *Journal of Animal Science*, 80, 9, 2002, doi.org/10.1093/ansci/80.9.2223

PARRA, MC; et al. **Rumen bacteria and feed efficiency of beef cattle fed diets with different protein content.** *Animal Production Science*, 62(10–11), 1029–1039, 2022. doi:10.1071/AN21508

PAULINO, MF; et al. **Nutrição de bovinos em pastejo.** In: Proceedings of the 4th Symposium on Strategic Management of Pasture, Viçosa, Brazil. pp.131–169, 2008.

REYNOLDS, CK; KRISTENSEN, NB. **Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis.** *Journal of Animal Science*, 86, E293–E305, 2008. doi:10.2527/jas.2007-0475

REIS, RA; et al. **A suplementação como estratégia de manejo da pastagem.** In: Simpósio Sobre Manejo Da Pastagem, Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, p.123-150, 1997.

REIS, RA; et al, **Otimização da utilização da forragem disponível através da suplementação estratégica.** In: *Volumos Na Produção De Ruminantes*, 2., 2005, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: FUNEP, p.25-60. 2005.

Reis RA, et al. **Suplementação como estratégia do manejo das pastagens.** *Brazilian journal of animal Science*, 38 Suppl: 147-159, 2009. doi/10.1590/S1516-35982009001300016

REIS, RA; et al. **Performance of Young Nellore bulls grazing marandu grass pasture at different heights.** *Tropical Grasslands – Forrajes Tropicales*, v.1, p.114-115, 2013.

RIBEIRO, GO; et al. **Repeated inoculation of cattle rumen with bison rumen contents alters the rumen microbiome and improves nitrogen digestibility in cattle.** Scientific Reports, v. 7, n. 1, p 1276. 2017.

SANTOS, FAP; PEDROSO, AM; **Metabolismo de proteínas.** In: Berchielli, T.T.; Pires, A.V.; Oliveira, S.G. **Nutrição de Ruminantes.** 2.ed. Jaboticabal: Funep. p.265-297. 2011.

SARO, C; et al. **Postprandial changes of fiber-degrading microbes in the rumen of sheep fed diets varying in type of forage as monitored by real-time PCR and automated ribosomal intergenic spacer analysis.** Journal of Animal Science, Savoy, v.90, p.4487–4494, 2012.

SHIBAO, J; et al. **Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde.** Revista de Nutrição, v. 24, n. 6, p. 895-904, 2011.

SIEBERT, BD; HUNTER, RA. **Supplementary feeding of grazing animals.** In: HACKER, J.B. (Ed). **Nutritional limits to animal production from pasture.** Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureau, p.409-425, 1982.

SINCLAIR, KD; et al. **Reducing dietary protein in dairy cow diets: implications for nitrogen utilization, milk production, welfare and fertility.** Animal, 8(02), 262-274, 2014.

STEWART, CS; BRYANT, MP. **The rumen bacteria.** In: Hobson, P.N., **The Rumen Microbial Ecosystem,** Elsevier, London, pp. 21-76. 1988.

TARDIN, AC. **Produção de rações na granja: programa mínimo de qualidade.** Simpósio Técnico de Produção de Ovos, v. 1, p. 50-72, 1991.

TEIXEIRA, JC. **Nutrição dos Ruminantes,** Lavras, MG: UFLA/ FAEPE, p14. 1997

VALADARES FILHO, SC; et al. Eds. **Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados BR-CORTE.** Viçosa: DZO-UFV, p.113-133, 2010.

VAN SOEST, PJ. **Nutritional Ecology of the Ruminant.** 2nd ed. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY. 1994.

WATERMAN, RC; et al. **Effects of supplements that contain increasing amounts of metabolizable protein with or without Ca-propionate salt on postpartum interval and nutrients partitioning in young beef cows.** Journal of Animal Science, v.84, p.433-446, 2006.