

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL E EFICIÊNCIA DE
UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO EM NOVILHOS NELORE
ALIMENTADOS COM DIFERENTES TEORES E FONTES DE
PROTEÍNA NA DIETA**

Kênia Larissa Gomes Carvalho Alves
Zootecnista

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIA
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL E EFICIÊNCIA DE
UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO EM NOVILHOS NELORE
ALIMENTADOS COM DIFERENTES TEORES E FONTES DE
PROTEÍNA NA DIETA**

Kênia Larissa Gomes Carvalho Alves

Orientadora: Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli

Co-orientadoras: Dra. Juliana Duarte Messana

Dra. Yury Tatiana Granja-Salcedo

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia (Nutrição e Alimentação Animal).

2019

A474d

Alves, Kênia Larissa Gomes Carvalho

Diversidade bacteriana ruminal e eficiência de utilização de nitrogênio em novilhos Nelore alimentados com diferentes teores e fontes de proteína na dieta / Kênia Larissa Gomes Carvalho Alves. -- Jaboticabal, 2019

76 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Telma Teresinha Berchielli

Coorientadora: Juliana Duarte Messana

1. Nutrição animal. 2. Nitrogênio na nutrição animal. 3. Rúmen Microbiologia.

I. Título.

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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL E EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO EM NOVILHOS NELORE ALIMENTADOS COM DIFERENTES TEORES E FONTES DE PROTEÍNA NA DIETA

AUTORA: KÊNIA LARISSA GOMES CARVALHO ALVES
ORIENTADORA: TELMA TERESINHA BERCHIELLI
COORDENADORA: YURY TATIANA GRANJA SALCEDO
COORDENADORA: JULIANA DUARTE MESSANA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. TELMA TERESINHA BERCHIELLI
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. RAUL FRANZOLIN NETO
Departamento de Zootecnia-FZEA/USP / Pirassununga/SP

Pesquisadora Dra. MÁRCIA HELENA MACHADO DA ROCHA FERNANDES
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 01 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Kênia Larissa Gomes Carvalho Alves – Nascida na cidade de Araçatuba-SP, em 09 de maio de 1988, filha de Vera Lúcia Gomes Carvalho Alves e Cláudio Carvalho Alves. De 2012 a 2016 desenvolveu o curso de graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia e Zootecnia da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá, sendo foi bolsista de iniciação científica do CNPq sobre a orientação da professora Dra. Rosemary Laís Galati. Em março de 2017 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, área de nutrição e alimentação animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal, sob a orientação da Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli e bolsista CNPq e FAPESP

MENSAGEM

Nada te perturbe,

Nada te amedronte.

Tudo passa,

A paciência tudo alcança.

A quem tem Deus nada falta.

Só Deus basta!

Oração Santa Teresa D'Ávila

Dedico

Aos meus pais Cláudio Carvalho Alves

e Vera Lúcia Gomes Carvalho Alves,

Aos meus irmãos Karine e Rodrigo

e a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me deu força e sabedoria para continuar e concluir mais esta etapa de minha vida.

À minha família, meus pais Cláudio e Vera, meus irmãos Karine e Rodrigo, meus sobrinhos que amo muito Bernardo, Kal e Cecília, as minhas tias e madrinha que sempre faziam coisas gostosas para eu comer quando estava em Araçatuba e para trazer para Jaboticabal.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A outorgante, processo número 2017/11571-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao CNPq, pela bolsa concedida.

As minhas orientadoras Prof. Dr^a. Telma Teresinha Berchielli, Dr^a Juliana Duarte Messana e Dr^a Yury Tatiana Granja-Salcedo pela paciência e ensinamentos durante todo este período de execução do trabalho.

Aos professores Jane Maria Bertocco Ezequiel e Raul Franzolin Neto, Dr^a Roberta Carrilho Canesin e Dr^a Márcia Helena Machado da Rocha Fernandes que contribuíram com este trabalho em forma de discussão de dados no exame de defesa de projeto, qualificação e defesa de dissertação.

Ao Vinicius Carneiro de Souza pelos ensinamentos, pela paciência, pelas caronas e pelos Toddinhos e principalmente pelas conversas durante esse período de mestrado. Agradeço aos estagiários que vieram fazer estagio obrigatório, Leticia Faria e Júnior Lima que contribuíram com a execução a campo desse experimento. Agradeço aos estagiários do grupo GENRU pela dedicação e esforço ao nosso trabalho e acabaram se tornando amigos: Laís, Maria Júlia (Maju), Paulo, Carlos, Bruna, Raquel, Yasmin, Letícia, Ana Veronica, Guilherme e Alfafa.

Aos amigos conquistados pelas conversas, pelos ensinamentos, pelas risadas, pelas comidas, pelas parcerias na minha trajetória até aqui Rayanne Viana, Juliana Torrecilhas, Érika Nayara, Edivilson (Vivi), Karine Dalla Vecchia, Thais Ribeiro, Geovany Carvalho, Ronyatta Teobaldo, Mauricio Rosa e Maria Carolina Gonçalves. Ao Rodrigo Torres que sempre esteve disposto em me ajudar não importando com os horários e os prazos sempre justos (kkkk). Posso ter me esquecido de alguém, mas quero deixar meu muito obrigado de coração.

Quero agradecer em especial ao Sérgio Pereira Júnior que sempre esteve comigo me aconselhando, ajudando nos momentos que eu surtava, sendo compreensivo e me apoiando sempre.

Agradeço também aos amigos de Cuiabá que mesmo distantes foram presentes nesse momento, aconselhando, direcionando e me ouvindo.

A todos muito obrigada!

Sumário

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DOS ANIMAIS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1- Considerações gerais.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Metabolismo proteico e a eficiência de utilização da proteína em Ruminantes	2
1.2.1. Fontes e teores de proteína utilizadas na nutrição de bovinos de corte.....	6
1.2.2. Eficiência de utilização de nutrientes associados ao perfil microbiano ruminal.....	9
1.3. Estudo da Microbiota ruminal.....	12
1.3.1. Uso das técnicas moleculares no estudo da microbiota ruminal	13
2. Objetivo	15
3. Referências	15
CAPÍTULO 2- Diversidade bacteriana ruminal associada a eficiência de utilização de nitrogênio em novilhos nelore alimentados com diferentes teores e fontes de proteína em dietas com alto teor de concentrado.....	22
1. Introdução	24
2. Material e Métodos.....	25
2.1. Local, animais, duração do experimento	25
2.2. Dietas experimentais	26
2.3. Consumo	27
2.4. Excreção de nitrogênio nas fezes	28
2.5. Estimativa da matéria orgânica degradada no rúmen	29
2.6. Excreção de nitrogênio na urina e estimação de nitrogênio microbiano	29
2.7. Nitrogênio amoniacal ruminal e ph	30
2.8. Diversidade bacteriana ruminal	31
2.9. Análise estatística.....	32
2.9.1 Efeito do teor e fonte proteica na microbiota ruminal.....	33

2.9.2. Retenção de nitrogênio associada à composição microbiana ruminal	33
2.9.3 Diversidade bacteriana ruminal associada ao balanço de nitrogênio em bovinos de corte	34
3. Resultados	34
3.1. Efeito do teor e fonte proteica na microbiota ruminal	34
3.2. Retenção de nitrogênio associada à composição microbiana ruminal ...	37
3.3. Diversidade bacteriana ruminal associada ao balanço de nitrogênio em bovinos de corte	41
4. Discussão	42
5. Conclusão	49
6. Referencias	50



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



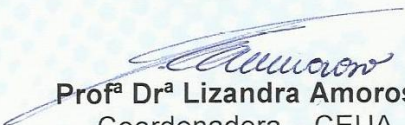
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Impacto da proteína metabolizável na produção de bovinos de corte e emissão de gases do efeito estufa**”, protocolo nº 16.688/16, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Telma Teresinha Berchielli, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de novembro de 2016.

Vigência do Projeto	01/03/2017 a 01/03/2022
Espécie / Linhagem	<i>Bos indicus</i> (Bovino Nelore)
Nº de animais	112
Peso / Idade	200 kg
Sexo	Machos
Origem	Fazenda

Jaboticabal, 04 de novembro de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

DIVERSIDADE BACTERIANA RUMINAL E EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO EM NOVILHOS NELORE ALIMENTADOS COM DIFERENTES TEORES E FONTES DE PROTEÍNA NA DIETA

RESUMO: Objetivou-se a caracterização da comunidade bacteriana ruminal em novilhos Nelore alimentados com diferentes teores e fontes proteicas em dietas de alto concentrado, e a identificação de possíveis associações entre o perfil microbiano ruminal e as variações na eficiência de utilização de nitrogênio animal. Foram utilizados seis novilhos Nelore, castrados, canulados no rúmen e duodeno, distribuídos em um modelo de blocos incompletos, com seis dietas e quatro períodos experimentais. O volumoso usado foi à cana de açúcar e os concentrados possuíam dois teores de inclusão de proteína bruta 10 e 13 % e três fontes proteicas: farelo de soja+ureia (FS), glúten de milho 60 (GLU) e grãos secos por destilação oriundo do processamento do milho (DDG). A fonte proteica DDG foi significativa na avaliação dos índices de diversidade Shannon Wiener e Simpson ($P < 0,010$). Avaliou-se a riqueza pelo índice Chao1 e os resultados demonstram um ambiente ruminal mais rico com o teor de 10% ($P < 0,010$) e a fonte FS ($P < 0,010$). Animais alimentados com 13% de PB apresentaram maior abundância dos filos Elusimicrobia e Spirochaetes ($P > 0,01$) e menor abundância de Bacteroidetes e Synergistetes ($P > 0,01$). A retenção de nitrogênio não foi influenciada pelo teor e a fonte utilizada, assim, os dados de retenção de nitrogênio foram distribuídos em três clusters: alta, média e baixa utilizando o NbClust package versão 2.0. *Endomicrobium_Other_other* ($P = 0,043$) e *Eubacterium* ($P = 0,023$) estiveram associados com a alta retenção de N. A baixa retenção de N esteve associada a *Prevotella* ($P = 0,029$), *Weissella* ($P = 0,024$), e *Mogibacterium* ($P = 0,089$). Ao correlacionarmos os dados do balanço de N com o perfil microbiano os gêneros *Butyrivibrio* ($r = -0,434$ $P = 0,034$), *Hespelia* ($r = -0,060$ $P = 0,002$) e *Coprococcus* ($r = -0,404$ $P = 0,050$) se correlacionaram negativamente com a retenção de N. A excreção urinária de N se correlacionou positivamente com o gênero *Lactonifactor* ($r = 0,545$ $P = 0,06$) e *Lachnospiraceae_other* ($r = 0,721$ e $0,007$). Já microrganismos que se correlacionaram negativamente com essa mesma

variável foram os gêneros *Elusimicrobia* ($r = -0,415$ $P = 0,044$), *Victivallis* ($r = -0,486$ $P = 0,016$). Os teores e fontes proteicas alteram a diversidade microbiana ruminal, mas não influenciaram a retenção de N. Microrganismos que estão associados com a fixação de N, produção de aminoácidos e apresentam uma correlação com a excreção de N via urina, estiveram associados com alta retenção de N. Por outro lado, microrganismos com baixa atividade proteolítica, hiperprodutores de amônia foram associados com baixa retenção de N.

PALAVRAS CHAVE: alto concentrado, microbiota ruminal, proteína não degradável no rúmen, retenção de nitrogênio.

RUMEN BACTERIAL DIVERSITY AND EFFICIENCY OF NITROGEN USE IN NELLORE STEERS FED WITH DIFFERENT LEVELS AND SOURCES OF PROTEIN IN THE DIET

ABSTRACT: The objective of this study was to characterize the ruminal bacterial community in Nellore steers fed different levels and protein sources in high concentrate diets and to identify possible associations between the ruminal microbial profile and the variations in the efficiency of animal nitrogen utilization. Six Nellore steers were used, cannulated in the rumen and duodenum, distributed in a model of incomplete blocks, with six diets and four experimental periods. The soybean meal + urea (FS), corn gluten 60 (GLU) and dry grains were obtained by distillation from the sugar cane and the concentrates had two inclusion levels of crude protein 10 and 13% and three protein sources: of corn processing (DDG). The DDG protein source was significant in the evaluation of diversity indexes Shannon Wiener and Simpson ($P < 0.010$). The richness was evaluated by the Chao1 index and the results showed a richer ruminal environment with 10% content ($P < 0.010$) and FS source ($P < 0.010$). Animals fed with 13% CP showed greater abundance of *Elusimicrobia* and *Spirochaetes* ($P > 0.01$) and lower abundance of *Bacteroidetes* and *Synergistetes* ($P > 0.01$). Nitrogen retention was not influenced by the content and the source used, so the nitrogen retention data were distributed in three clusters: high, medium and low using the NbClust package version 2.0. The low N retention was associated with *Prevotella* ($P = 0.029$), *Weissella* ($P = 0.024$), and *Mogibacterium* ($P = .089$) and *Eubacterium*. ($P = 0.043$). When we correlated N balance data with the microbial profile, the genera *Butyrivibrio* ($r = -0.434$ $P = 0.034$), *Hespelia* ($r = -0.060$ $P = 0.002$) and *Coprococcus* ($r = -0.404$ $P = 0.050$) correlated negatively with the retention of N. Urinary excretion of N correlated positively with the genus *Lactonifactor* ($r = 0.545$ $P = 0.06$) and *Lachnospiraceae* ($R = 0.721$ and 0.007). Microorganisms that negatively correlated with this same variable were *Elusimicrobia* ($r = -0.415$ $P = 0.044$), *Victivallis* ($r = -0.486$ $P = 0.016$). Protein contents and sources alter ruminal microbial diversity, but did not influence N retention. Microorganisms that are associated with N fixation, amino acid production and correlate with N excretion via urine were associated with high retention of N. On the other hand,

microorganisms with low proteolytic activity, ammonia hyperproducers were associated with low N retention.

KEY WORDS: high concentrate, ruminal microbiota, rumen non-degradable protein, nitrogen retention.

CAPÍTULO 1- Considerações gerais

1.1. Introdução

A bovinocultura de corte é um dos principais segmentos do agronegócio brasileiro. No primeiro semestre de 2018, a exportação de carne bovina aumentou em 11,1% gerando US\$ 3,5 bilhões, sendo vendidas 884 mil toneladas desta, representando um aumento de 8,3% na exportação de carne brasileira (MAPA, 2018). Esses dados corroboram com publicações da OECD/FAO (2016), que demonstraram um crescimento de 1,3% no consumo de carne em países industrializados nos últimos 10 anos.

Na produção de ruminantes, os gastos com a nutrição correspondem aproximadamente 60 a 70% do custo total (HERD et al., 2003, ARTHUR et al., 2004, KARISA et al., 2014). Consequentemente, torna-se necessário à busca por melhorias na eficiência alimentar, pois, animais mais eficientes conseguem aproveitar melhor os nutrientes fornecidos nas dietas (GUAN et al., 2008, CALSAMIGLIA et al., 2010, RIBEIRO et al., 2017). Além disso, o uso de animais mais eficientes ajudaria a diminuir o impacto ambiental causado pela produção de ruminantes (HUWS et al., 2018).

Mediante o cenário atual da pecuária de corte, os estudos têm sido realizados visando aumentar a produção dos animais com a redução de impactos ambientais. Dos ingredientes utilizados na alimentação de bovinos, o proteico se tornou foco de estudos pretendendo uma melhor compreensão da utilização no metabolismo do animal (VALADARES FILHO et al., 2010).

As modificações e utilização dos alimentos no rúmen pela microbiota são benéficas e ocorre por meio de uma simbiose entre microbiota e hospedeiros a qual possibilita à microbiota seu crescimento e ao animal atender em até 80% das suas exigências energéticas oriunda dos produtos finais da fermentação microbiana, além dos microrganismos serem fonte de nitrogênio no duodeno (DOI e KOSUGI, 2004). No entanto, a atuação da microbiota é afetada por fatores extrínsecos e intrínsecos

ao animal, sendo a compreensão de todo este sistema ainda obscuro. Portanto, a eficiência de utilização dos nutrientes, está sendo associada com os microrganismos, e variáveis como produção de metano, consumo residual e uso de nitrogênio são medidas para analisar possíveis respostas.

Com o desígnio de melhorar a compreensão do ambiente ruminal, estudos associando a produção de metano e eficiência alimentar correlacionando com microrganismos estão sendo realizados. A eficiência alimentar foi associada em bovinos de corte com a microbiota ruminal e animais eficientes apresentam 91% de similaridade entre os componentes do ecossistema microbiano, enquanto animais ineficientes apresentam 71% de similaridade (GUAN et al., 2008).

Entender como a população microbiana ruminal se comporta em relação ao uso do nitrogênio é essencial, pois, a proteólise e o catabolismo de aminoácidos no rúmen têm a capacidade de influenciar cerca de 80% do perfil de aminoácidos que chegam ao duodeno para absorção (SCHWAB e BRODERICK, 2017). Pode-se, verificar que a associação da eficiência de proteína microbiana com a eficiência do uso de N, descreveria melhor o uso do N pelos microrganismos auxiliando na caracterização dos microrganismos envolvidos no metabolismo de N (BACH et al., 2005).

Diante do exposto, estudos sobre o uso de nitrogênio pelos ruminantes são fundamentais para aumentar a eficiência de utilização proteica. A microbiologia ruminal vem auxiliar como uma pesquisa estratégica, uma vez que o conhecimento minucioso da microbiota ruminal e dos fatores que a afetam está intimamente relacionado ao potencial de crescimento da produtividade pecuária. Hipotetizou-se que dietas de alto grão e fontes proteicas com maior teor de proteína e alta degradabilidade ruminal, promovam variações na microbiota ruminal, com maior eficiência de utilização de nitrogênio.

1.2. Metabolismo proteico e eficiência de utilização da proteína em ruminantes

As proteínas são compostas por aminoácidos, que por meio de ligações peptídicas formam sua estrutura, podendo ocorrer ligações mais complexas, com outras moléculas como nas lipoproteínas e glicoproteínas (SANTOS e PEDROSO, 2011). Os aminoácidos são formados por um grupo carboxila, um grupo amino e uma cadeia lateral (utilizado para classificar os aminoácidos) ligado ao átomo de carbono alfa. Apesar de se ter uma descrição de mais de 300 aminoácidos na natureza, somente 20 deles usualmente se encontram nas proteínas (HARVEY e FERRIER, 2012).

Na nutrição animal os aminoácidos são classificados como aminoácidos essenciais e não essenciais. Aminoácidos essenciais precisam ser fornecidos nas dietas, pois, estes podem ser produzidos em quantidades que não supram a exigência animal ou não são produzidos pelo organismo animal (SCHWAB et al., 2005, SCHWAB e BRODERICK, 2017).

No caso dos ruminantes, os aminoácidos sofrem alterações devido ao complexo sistema digestivo, que possui característica fermentativa pelos microrganismos do rúmen (bactérias, protozoários, fungos e vírus), exercendo importante papel na degradação dos alimentos (ARCURI et al., 2011).

A evolução nos conceitos de nutrição proteica em ruminantes passou a dividir a proteína bruta ingerida pelo animal de acordo com seu teor de degradação no ambiente ruminal, em proteína degradada no rúmen e proteína não degradada no rúmen (NRC, 2001, SCHWAB e BRODERICK, 2017). A degradabilidade da proteína pode ser diferenciada pela presença de ligações de dissulfeto, formando assim complexos da proteína e carbono (SANTOS e PEDROSO, 2011). O processo de degradação proteica no ambiente ruminal envolve etapas como solubilização, hidrólise extracelular, transporte, desaminação, e por fim os produtos provenientes desta fermentação, como amônia e os ácidos graxos de cadeia curta (BACH et al., 2005, CALSAMIGLIA et al., 2010).

Dos microrganismos que compõem o ecossistema ruminal as bactérias são consideradas o grupo de maior importância, devido sua maior participação em degradar fontes proteicas com eficiência dez vezes maiores (BACH et al., 2005). As bactérias responsáveis pela degradação da proteína são denominadas proteolíticas,

com os principais gêneros *Prevotella* e *Bacteroides* (ARCURI et al., 2011, KOZLOSKI, 2011).

A proteína degradada no rúmen (PDR) é proveniente de fontes de N não proteico (como a ureia), e fontes de proteína verdadeira da dieta. As bactérias se aderem às partículas de alimentos e pela ação das enzimas proteolíticas microbianas (proteases, peptidases e deaminases) (WALKER et al., 2005), são transformadas em peptídeos menores e aminoácidos.

A incorporação pelos microrganismos dos compostos nitrogenados livres no ambiente ruminal é variável. Cerca de 50 a 70 % da proteína microbiana é oriunda da incorporação de amônia, sendo o restante provenientes da incorporação de aminoácidos e peptídeos, portanto a amônia presente no ambiente ruminal é a principal fonte utilizada para síntese de novos aminoácidos (SILVA de OLIVEIRA et al., 2007). E devido ao fluxo da digesta no trato gastrointestinal os microrganismos que estão aderidos às partículas de alimentos e as estrutura dos que sofreram lise acabam se tornando fonte de perfil aminoácido para os ruminantes (BACH et al., 2005, WALKER et al., 2005, SCHWAB e BRODERICK, 2017).

Além da degradação das fontes proteicas da dieta, outra forma de fornecimento de N para os microrganismos ruminais por meio da reciclagem de ureia, que ocorre para o ambiente ruminal. Quando há excesso de N no ambiente ruminal, este pode ser absorvido pelo epitélio do rúmen como amônia, a qual é transportada pela circulação sanguínea até o fígado, onde é transformada em ureia e pode seguir duas rotas: a excreção na urina e/ou leite, ou seu retorno para o ambiente ruminal pela a saliva ou via transepitelial (RUSSEL et al., 1992, SCHWAB e BRODERICK, 2017). A reciclagem do N representa vantagem para os ruminantes alimentados com dietas de baixa qualidade, também é uma das grandes dificuldades para a predição de exigência de N em ruminantes (PEREIRA et al., 2007).

Já a proteína não degradada no rúmen (PNDR), representa a fração proteica de fontes que conseguem passar pelo ambiente ruminal sem sofrer ações da microbiota. Alimentos ricos em PNDR sofrem modificações na sua estrutura, onde o grupo alfa-carbonílico de um açúcar redutor, no caso das proteínas é a amina, troca seus elétrons formando produtos estáveis (SHIBAO e BASTOS, 2011). Por exemplo, 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).

A proteína metabolizável que chega ao intestino para ser absorvida é o produto da somatória entre as proteínas microbianas (55 a 80%), proteínas endógenas (5%) e PNDR (15 a 40%) (SINCLAIR et al., 2014). Ao chegar no duodeno para digestão, os compostos nitrogenados sofrem ações semelhantes à de animais não ruminantes. A presença de proteína no duodeno estimula o pâncreas a secretar enzimas inativas como a tripsina, que é ativada ao passar pela membrana dos enterócitos, e esta desencadeia a ativação das outras enzimas proteolíticas (aminopeptidase e dipeptidase), resultando em aminoácidos e oligopeptídeos que são absorvidos no intestino delgado (KOZLOSKIZ, 2011).

Embora ocorram diferentes fontes de aminoácidos que chegam para serem aproveitadas pelos ruminantes, a eficiência de utilização de N é baixa, em torno de 25% (CALSAMIGLIA et al., 2010). Esta baixa eficiência na utilização de N é atribuída às transformações oriundas da fermentação ruminal.

As transformações da proteína que ocorrem no rúmen devido ao ecossistema ruminal, pode atender o perfil de aminoácido de animais com baixa exigência proteica. Essa característica de transformação da proteína no ambiente ruminal limita negativamente a formulação de dietas, principalmente quando se pensa em uma nutrição baseada no fornecimento de aminoácidos essenciais, para atender animais mais exigentes (REYNOLDS et al., 2013).

Mesmo com os avanços nos estudos de fermentação ruminal, pouco se conseguiu mudar na utilização do N. Estudos com vacas leiteiras na década de 60, nos EUA, encontraram uma eficiência de utilização de N de 23,7%, e após 48 anos mesmo com esforços dos estudiosos essa eficiência passou apenas 24% (CALSAMIGLIA et al., 2010).

A baixa eficiência de utilização do N contribui para maior excreção de N nos sistemas de produção de ruminantes. A proporção de N excretada na urina e nas fezes aumenta conforme o consumo de nitrogênio na dieta (CASTILLO et al., 2000, SINCLAIR et al., 2014, MENEZES et al., 2016). Novilhas confinadas recebendo

grãos de destilaria (DDG) em relação ao milho, nas proporções de 0, 20 e 40 %, sendo que o tratamento de 40% foi dividido em dois sendo com e sem adição de extrato de tanino, a excreção total não apresentou diferença na excreção de N total entre as dietas. Ocorreu uma mudança na rota de excreção dos animais que receberam o extrato, devido ao fato do tanino tornar a proteína menos digestível, aumentando a excreção fecal de nitrogênio 48% (KOENIG e BEACHEMIN et al., 2018).

Segundo Tamminga, (1992), os principais contribuintes para a incorporação de N ao ambiente, oriundos de processo de produção animal, são os fertilizantes e os dejetos de animais. As modificações que o nitrogênio excretado sofre, causam danos na camada de ozônio e ao se fixar no solo e sofrer o processo de nitrificação. Além disso, tem-se a formação do nitrato, composto móvel no solo, o qual pode sofrer lixiviação contaminando águas superficiais e subterrâneas, modificando sua composição tornando-as impróprias para o consumo humano (GOMES et al., 2008; GARCIA e CARDOSO, 2013). Estudos europeus constataram que a agricultura contribui com aproximadamente 40% de emissões de óxido nítrico (MATTHEWS et al., 2018).

A fim de aumentar a eficiência de utilização do N pelo animal e diminuir sua excreção ao meio ambiente, estratégias estão sendo adotadas para alcançar maior eficiência como, igualar os fornecimentos de PDR e PNDR atendendo assim as exigências dos microrganismos e do animal, ou fornecer uma dieta balanceada em função de aminoácidos essenciais para os animais (SCHWAB et al., 2005). O estudo da microbiota ruminal se faz imprescindível, visto que a modificação que ocorre no ambiente ruminal influencia muito o uso desse nutriente na nutrição de ruminantes.

1.2.1. Fontes e teores de proteína utilizadas na nutrição de bovinos de corte

O ecossistema ruminal é influenciado pelo tipo de substrato que é ingerido pelo animal hospedeiro, pois, é por intermédio desses nutrientes que os microrganismos se desenvolvem, sendo o teor proteico da dieta, bem como sua fração degradável no rúmen (PDR) (NRC 2001), um fator limitante para o

crescimento microbiano. Portanto, estudos são conduzidos para elevar à eficiência da produção animal, por meio da máxima utilização dos nutrientes das rações pelos ruminantes (HUWS et al., 2018).

No Brasil, as fontes proteicas mais utilizadas em formulação de dietas para ruminantes são os farelos de soja e algodão, ureia (como fonte de nitrogênio não proteico) e caroço de algodão, conforme dados das tabelas brasileiras (VALADARES FILHO et al., 2018). O uso de fontes alternativas, como farelos de amendoim, girassol e glúten de milho, também é empregado tanto na suplementação a pasto como em confinamentos (GUIMARÃES, 2018). Os teores de PDR e PNDR dessas fontes variam devido a composição bromatológica e aos processos de fabricação. Ao analisarem algumas fontes proteicas utilizadas no Brasil, autores concluíram que o glúten de milho tem alta proporção de PNDR (82%) (CABRAL et al., 2001). Em estudos que analisaram a inclusão de resíduo seco de destilaria com solúveis (DDGS) com 40,5% de PNDR em substituição ao farelo de soja com 19,8% de PNDR (ENGEL et al., 2008). Os valores encontrados nesses estudos assemelham com valores encontrados nas tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos (VALADARES FILHO et al., 2018).

Em um levantamento realizado por, Oliveira et al. (2014), com nutricionistas brasileiros e suas práticas em formulações de dietas para bovinos de corte confinados, concluíram que a inclusão média da proteína bruta nas dietas foi de 13,4%. As principais fontes proteicas utilizadas pelos entrevistados foram farelo de algodão por mais da metade dos nutricionistas, seguida por farelo de amendoim (21,9%) e caroço de algodão após extração vegetal (6,2%). Alguns alimentos proteicos foram citados somente uma vez como farelo de soja, resíduos de soja, caroço de algodão integral e farelo de girassol. Mostrando assim que os nutricionistas estão em busca de fontes alternativas para inclusão nas dietas.

O estudo de diferentes teores de fornecimento proteico nas dietas tem ocorrido visando encontrar alternativas de redução da inclusão de proteína nas dietas, através da potencialização do metabolismo do hospedeiro.

Mediante a uma metaanálise, Schuba et al.(2017), ressaltaram que independente da espécie ou categoria de ruminantes, os teores de excreção de nitrogênio (fezes e urina) sofrem variações devido a ingestão do mesmo, para todas

as espécies estudadas (caprinos, ovinos, bovinos leiteiros e bovinos de corte). A excreção de N fecal e a excreção urinária de compostos nitrogenados são influenciadas parcialmente pela ingestão de nitrogênio, sendo a excreção fecal influenciada pela porcentagem de proteína na dieta e a digestibilidade da fonte fornecida.

Quando, Watson et al. (2017), compararam os modelos utilizados para cálculos de exigência de proteína microbiana NRC (1996) e BCNRM (Beef Cattle Nutrient Requirements Model, National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine [NASEM], 2016), com diversos estudos com variadas fontes proteicas (ureia, farinha de sangue, farelo de glúten de milho, grãos de destilarias, farelo de soja, farinha de carne e ossos),concluíram que a relação entre proteína microbiana e eficiência de síntese microbiana são de extrema importância. Ao realizarem os cálculos pelo BCNRM a exigência de proteína microbiana verdadeira digestível ficou 23% menor em comparação com NRC.

Ao avaliar o desempenho a pasto de novilhas Nelore suplementadas ou não com farelo e/ou grão de soja, Almeida et al.(2018), concluíram que os animais suplementados apresentaram valores superiores de ganho médio diário e peso final. Os resultados mostraram que as duas formas de utilização de fontes proteicas, provenientes da soja não influenciaram no desempenho dos animais, mas sim a quantidade ofertada. Animais que recebiam 0,5 kg de suplemento tinham ganhos menores em comparação dos animais que foram suplementados, com 1 kg. Ao final do experimento os animais que foram suplementados com 1 kg, obtiveram ganho de 7 kg a mais independentemente da fontes proteica.

Diversos estudos foram conduzidos avaliando os efeitos dos teores e fontes de proteína na dieta de bovinos de corte, com intuito de compreender melhor o metabolismo proteico de ruminantes e alternativas de fontes proteicas fornecidas. Entretanto, são poucos estudos avaliando como estas mudanças podem influenciar a microbiota ruminal e a retenção de N no animal. Ao avaliar dieta para búfalos, com teores de proteína bruta crescentes (92, 124, 181 e 219 g/kg de PB), Chanthakhoun et al.(2012), verificaram que a digestibilidade aparente dos nutrientes foi significativamente maior com o aumento dos teores de PB na dieta, associado ao aumento das bactérias totais, *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus albus*.

Comportamento semelhante ocorreu para a absorção e retenção de N, que foram crescentes com maiores teores de proteína. Os mesmos autores observaram maior digestibilidade aparente da PB (69,4% e 74,1%) para os teores intermediários (12,4% e 18,1% PB na dieta). Adicionalmente, foi verificado que o pH ruminal diminuiu conforme o teor de PB aumentava e o nitrogênio amoniacal apresentou valores maiores quanto maior o teor de PB.

Para avaliar a eficiência de utilização do N em bovinos no sistema a pasto suplementados com proteína bruta, Detmann et al.(2014), em uma metanálise constataram que a quantidade de suplemento fornecida e a porcentagem de proteína bruta na formulação se associam com a eficiência em retenção de N. E que quando a disponibilidade de nitrogênio e energia é deficiente, o animal aumenta sua mobilização de proteína oriunda dos músculos.

Em estudos com novilhas Nelore, Batista et al.(2016), analisaram os efeitos metabólicos da suplementação com PDR, verificaram que o N retido (g/dia) aumentou conforme o aumento de PDR na dieta, concluindo que a suplementação proteica melhorou a utilização de nitrogênio em animais alimentados com fontes volumosas de baixa qualidade de proteína.

1.2.2. Eficiência de utilização de nutrientes associados ao perfil microbiano ruminal

Estudos associando os animais mais eficientes e a microbiota ruminal começam a contribuir para o avanço na nutrição de ruminantes. A identificação de animais mais eficientes é vantajosa para a bovinocultura, pois a diminuição do consumo de MS minimiza os custos com a nutrição maximizando o lucro dos produtores (ELOLIMY et al., 2018). Uma maneira de avaliar a eficiência alimentar é a utilização do consumo alimentar residual. Com o objetivo de analisarem a eficiência alimentar pelo consumo alimentar residual em bovinos taurinos a pasto, McCann et al., (2014), evidenciaram que no geral 67,5 e 22,9 % das sequencias geradas pertenciam aos filos Bacteroidetes e Firmicutes, respectivamente. Os animais menos eficientes apresentaram maiores proporções dos microrganismos do

gênero *Prevotella*. Por outro lado, animais que apresentavam um consumo alimentar residual negativo sendo mais eficientes, tiveram maiores proporções (26,7%) de uma família de *Bacteroidales* não identificada, enquanto os menos eficientes apresentaram uma proporção desse mesmo grupo de 19,1%.

Com o objetivo de caracterizar os microrganismos ruminais correlacionados a eficiência de energia em novilhos, mediante técnicas de sequenciamento de última geração, Myer et al. (2015), realizaram um estudo e apesar de não identificar alterações significativas nos índices de diversidade e riqueza bacteriana, quando foi mensurado as unidades taxonômicas operacionais (OTUS), constatou-se mudanças que ocorreram no teor de filo dos microrganismos dos animais que apresentaram maior eficiência alimentar. No estudo, os filos em maiores proporções foram Bacteroidetes e Firmicutes. Os microrganismos do filo Firmicutes apresentaram mudanças nas famílias *Lachnospiraceae* e *Veillonellaceae* sendo os gêneros *Acidaminococcus* e *Dialister* em maiores proporções nos animais que obtiveram maior ganho de peso diário. Essas observações levaram os autores a concluir que modificações nas proporções no microbioma ruminal se relacionou com animais que apresentaram maior eficiência alimentar.

Um dos fatores que pode diferenciar o ecossistema ruminal são as raças, McGrovenn et al. (2018), realizaram um ensaio com novilhos das raças Charolês e Holandesa e constataram que a diversidade populacional das bactérias e Archaeas são diferentes entre os novilhos Charolês, sendo os animais mais eficientes com maiores proporções de bactérias. Ocorreu também correlação entre os filos encontrados e as raças, os filos *SR1* e *TM7* se correlacionaram negativamente com a eficiência alimentar nos novilhos Charolês. Para os novilhos Holandeses essa correlação aconteceu com outros filos sendo negativa com a Euryarchaeota e positivamente com Cyanobacteria e Proteobacterias em relação à eficiência alimentar. Apenas o gênero *Moryella* foi correlacionado com a eficiência alimentar em ambas as raças, só que de maneira distinta, sendo positiva com os novilhos holandeses e negativos com os novilhos charoleses. Os autores concluíram que o ecossistema ruminal é influenciado pelo fenótipo de eficiência alimentar e genética dos hospedeiros.

Estudos com diferentes dietas correlacionando a microbiota ruminal com eficiência alimentar associaram os microrganismos *Fibrobacter succinogenes*, *Eubacterium ruminantium* e *Succinivibrio sp.* em animais com maior eficiência alimentar. No caso dos animais menos eficientes essa correlação ocorreu com *Prevotella sp.* e *Robinsoniella sp.* (CARBERRY et al.,2012, HERNANDEZ-SANABRIA et al., 2011, ELOIMY et al., 2018). A eficiência alimentar está relacionada com a microbiota ruminal e futuros estudos são necessários para melhor compreensão desta correlação.

Os estudos sobre a classificação dos microrganismos são relativamente recentes devidos o avanço das tecnologias aplicadas que permitiram maiores conhecimentos para nutricionistas e microbiologistas. Esses estudos têm sido mais direcionados para os microrganismos fibrolíticos e metanogênicos, atualmente são poucas informações existentes que relacionam à eficiência de utilização de nitrogênio com microrganismos ruminais.

Estudando a inclusão de diferentes teores de proteínas (92, 124, 181 e 219 g/kg de PB) nas dietas de búfalos e analisando por reação em cadeia da polimerase (PCR), Chanthakhoun et al.(2012), concluíram que as bactérias celulolíticas, não apresentaram diferença na população geral, ou seja, o microbioma ruminal não foi diferente entre as dietas. Entretanto observaram que os índices de diversidade e riqueza de *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus albus* apresentaram maiores proporções em animais com maior peso corporal.

O efeito da suplementação de PDR em novilhos mestiços tem uma correlação positiva entre a atividade desaminação (33%) e aumento de concentração de nitrogênio amoniacal (76%) (Bento et al.,2016). Esses autores ao comparar os índices de Shannon- Wiener e riqueza de espécies entre os animais suplementados e não suplementados observaram que a riqueza de espécies no filo Bacteroidetes foi menor nos novilhos que foram suplementados, atribuindo este fato a mudanças que ocorreram na fermentação ruminal, pois, a suplementação estimularam as atividades metabólicas.

Em estudos recentes Ribeiro et al. (2017), ao avaliar a digestibilidade da fibra em vacas que foram inoculadas com conteúdo ruminal de bisões, observaram que os animais inoculados apresentaram maior utilização de nitrogênio e síntese

microbiana, verificando-se uma maior ingestão de nitrogênio; que passou de 151 a 179 g/dia. Essa maior ingestão refletiu-se também no aumento da excreção de N fecal em 5 g/dia, porém a retenção de nitrogênio nesses animais aumentou 7,9 g/dia. Os autores atribuíram esse aumento a na retenção de nitrogênio às mudanças no perfil microbiano, principalmente na população de protozoários e bactérias da família *Christensenellaceae* que foram correlacionadas positivamente com a digestibilidade do N. Este estudo corrobora com o fato da microbiota ruminal estar correlacionada a excreção e retenção de N em ruminantes, e como a manipulação da microbiota ruminal pode resultar em aumentos significativos na eficiência de utilização deste composto em ruminantes.

Entretanto, ainda é incipiente o conhecimento sobre os efeitos das diferentes fontes de proteína na população bacteriana ruminal e possíveis correlações com a eficiência de utilização do N em ruminantes. Ensaios *in vitro*, a inclusão de N na dieta tem uma alteração diminuindo a degradação da celulose, isso decorrente da diminuição da abundância de *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens* e *B. fibrosolvens*, microrganismos que auxiliam na degradação da fibra (WANG et al., 2018, WITZIG et al., 2018).

Em recente estudo, Hartinger et al.(2018), ao realizarem uma revisão sobre a degradação dos compostos nitrogenados no ambiente ruminal concluíram que alimentos proteicos sofrem alterações no ambiente ruminal por todos os microrganismos presentes principalmente por bactérias. Estudos associando a microbiota ruminal e a eficiência de nitrogênio são escassos, e os poucos existentes são com animais alimentados com dietas a base de forragem de baixa qualidade e suplementados com fontes PDR e PNDR, mostrando assim, uma lacuna para animais que recebem dietas com alto teor de concentrados.

1.3. Estudo da Microbiota ruminal

Na década de 40, com o desenvolvimento da técnica anaeróbia para o cultivo de microrganismos pelo pesquisador Robert Hungate (BALDWIN e ALLISON, 1983), deu-se início nos estudos com população microbiana ruminal. Entretanto, avanços

significativos foram obtidos anteriormente como Blanden et al.(1961), que ao verificar a capacidade das bactérias ruminais em desaminar proteínas hidrolisadas perceberam que a maioria dos microrganismos presentes produzira baixa quantidade de amônia, este estudo acabou concluindo que a *Prevotella ruminicola* era o microrganismo responsável pela produção da amônia.

Com estudos posteriores, Russell, (1996), verificou que o feito relatado por Bladen et al. (1961), na técnica *in vitro* não se repetiam *in vivo*, ou seja, a *Prevotella ruminicola* não seria o microrganismo responsável pelo acúmulo de amônia no ambiente ruminal.

Os métodos de sequenciamento empregados nos estudos da microbiota ruminal e o uso da bioinformática para auxiliar na coleta dos dados gerados estão se tornando ferramentas fundamentais nos avanços em pesquisas de microbiologia ruminal (MATTHEWES et al., 2018). Pois, os métodos antigos de cultivo anaeróbico apresentavam o entrave, que ao realizar a transferência do conteúdo ruminal para as câmaras anaeróbicas ocorria à seleção de microrganismos menos sensíveis ao oxigênio, além da dificuldade para cultivar todas as espécies de microrganismos ruminais, em função das características do ambiente que precisavam serem simuladas.

1.3.1. Uso das técnicas moleculares no estudo da microbiota ruminal

As técnicas moleculares foram se aperfeiçoando e revolucionando ao longo do século XX, a descoberta da estrutura tridimensional do DNA com sua dupla hélice, como conhecemos atualmente só ocorreu em 1953, e para que o primeiro fragmento pudesse ser clonado, avanços tecnológicos foram necessários para tal feito que só ocorreu em 1972 (FRITSCHÉ-NETO BORÉM, 2013). As técnicas empregadas para identificação dos microrganismos por intermédio do DNA são os métodos de reação em cadeia da polimerase no tempo real (qPCR), eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e sequenciamento do gene 16S rRNA.

O PCR é uma técnica de reação em cadeia da polimerase onde através do seu uso consegue-se obter milhões de cópias de sequência de ácidos nucleicos por

reações enzimática que ocorrem no termociclador, o aparelho mediante aumentos de temperatura promove a desnaturação da fita de DNA, depois os primers das regiões alvos fazem o anelamento com a fita aberta do DNA, por fim tem a extensão e replicação da fita de DNA (OLIVEIRA et al., 2007), formando assim cópias idênticas do DNA alvo. A fim de melhorar a técnica se desenvolveu o PCR em tempo real (qPCR), que proporciona acompanhar a síntese das regiões amplificadas durante o processo de PCR, diferente da técnica anterior que somente no final da técnica se tem o resultado e não permite a quantificação das cópias (AVILA GANDRA et al., 2008). Tal técnica vem sendo eficientemente utilizada em diversos estudos, relacionando mudanças na dieta com a microbiota ruminal em novilhos Nelore, identificação e quantificando de alguns gêneros e espécies de bactérias amilolíticas (*Prevotella sp.*, *Succinivibrio sp.*, *Selenomonas ruminatrium*), celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus*), assim como o total de Archaeas metanogénicas (GRANJA-SALCEDO et al., 2016, RIBEIRO JUNIOR et al., 2016, GRANJA-SALCEDO et al., 2017, CASTAGNINO et al., 2018).

A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) ocorre da seguinte maneira, os fragmentos de DNA que tenham o mesmo tamanho, mas com pares de bases diferentes, ao serem colocados no gel composto por formida e ureia se locomovem de formas diferentes, e assim acaba permitindo o estudo do DNA encontrado, mediante diferenças no posicionamento dos fragmentos (MUYZER et al., 1993). Por se tratar de uma técnica rápida e permitir que a análise de várias amostras para identificar as regiões do DNA está sendo empregada nos estudos moleculares para estimar a diversidade bacteriana no ambiente ruminal.

Atualmente, o sequenciamento do gene 16S RNA ribossomal (RNAr) é uma ferramenta bastante empregada, pois, os ribossomos procariotos apresentam subunidades identificadas de 50s e 30s. A primeira subunidade contém 34 proteínas estando presente os RNAr 5s e 23 RNAr. A subunidade 30s inclui 21 proteínas e a molécula de RNAr 16S, sendo essa molécula escolhida para estudos de filogenia dos procariotos (BLAUT et al., 2002). Dentro do gene têm-se as regiões constantes que estão presentes em todas as bactérias, e regiões de variabilidade que são específicas para grupos e espécies. Assim, a amplificação e sequenciamento de

regiões variáveis como a V5-V6, vem sendo utilizada em estudos para caracterização da diversidade bacteriana ruminal associado a mudanças da dieta (GRANJA-SALCEDO et al., 2016, GRANJA-SALCEDO et al.,2017).

Após o sequenciamento se definem a abordagem ao quais os dados serão submetidos, geralmente são mais utilizados a OTU (unidade taxinômica operacional), que fornece os índices de diversidade e riqueza além da identificação e classificação taxonômica da população estudada.

2. Objetivo

Objetivou-se a caracterização da comunidade bacteriana ruminal em novilhos Nelore alimentados com diferentes teores e fontes proteicas em dietas de alto teor de concentrado, e identificação de possíveis associações entre o perfil da microbiota ruminal e as variações na eficiência de utilização de nitrogênio animal.

3. Referências

Almeida DM, Marcondes MI., Rennó LN., Martins LS., Villadiego FAC, Paulino MF(2018) Soybean grain is a suitable replacement with soybean meal in multiple supplements for Nelore heifers grazing tropical pastures. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, n. 8, p. 1843-1849.

Arcuri PB, Lopes FCF, Carneiro JC (2011) Microbiologia do rúmen . In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de Ruminantes**. 2.ed. Jaboticabal: Funep p.115-160

Arthur PF, Archer JA, Herd RM (2004) Feed intake and efficiency in beef cattle: overview of recent Australian research and challenges for future. **Australian Journal of Experimental Agriculture** v. 44, n. 5, p. 361-369.

Ávila Gandra E, Valente Gandra, TK, de Mello WS,da Silva Godoi H (2008), Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 30, n. 1.

Bach A, Calsamiglia S, Stern M D (2005) Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal. Dairy Science**. v. 88, p. E9-E21.

Baldwin RL, e Allison MJ (1983) Rumen metabolism. **Journal of Animal Science**, v 57 n. suppl_2, p. 461-477.

Batista ED, Detmann E, Titgemeyer EC, Valadares Filho SC, Valadares, RFD, Prates, LL, Paulino, M F (2016). Effects of varying ruminally undegradable protein supplementation on forage digestion, nitrogen metabolism, and urea kinetics in Nelore cattle fed low-quality tropical forage. **Journal of Animal Science** v. 94, n. 1, p. 201-216.

Bladen HA, Bryan TMP. e Doetsch RN (1961) A study of bacterial species from the rumen which produce ammonia from protein hydrolysate. **Applied Microbiology**. v. 9, n. 2, p. 175.

Blaut M, Collins MD, Welling GW, Doré J, Van Loo J, De Vos W (2002) Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. S2, p. S203-S211.

Calsamiglia S, Ferret A, Reynolds CK, Kristensen NB, Van Vuuren, AM (2010) Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal**, v.4, p.1184-1196.

Cabral LS, Valadares Filho SDC, Muniz PA, Malafaia RDPL, da Silva JFC, Augusto, R, Pereira ES (2001) 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.

Carberry CA, Kenny DA, Han S, McCabe MS, Waters SM (2012) The effect of phenotypic residual feed intake (RFI) and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 14, p. 4949-4958.

Castagnino PS, Dallantonia EE, Fiorentini G, San Vito E, Messina JD, Lima L O, Simioni TA, Berchielli TT (2018) Changes in ruminal fermentation and microbial population of feedlot Nelore cattle fed crude glycerin and virginiamycin. **Animal Feed Science and Technology**, v. 242, p. 69-76,

Castillo AR, Kebreab E, Beever DE; France J (2000) Review of efficiency of nitrogen utilization in dairy cows and its relationship with the environmental pollution. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1-32 .

Chanthakhoun V, Wanapat M, Berg J (2012) Level of crude protein in concentrate supplements influenced rumen characteristics, microbial protein synthesis and digestibility in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Livestock Science**, v. 144, n. 3, p. 197-204.

Detmann E, Valente EE, Batista ED, Huhtanen P (2014) 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.

Doi RH e Kosugi A (2004) Cellulosomes: plant-cell-wall- degrading enzyme complexes. **Nature Reviews Microbiology**, v 2, p 541– 551.

Elolimy AA, Abdelmegeid MK, McCann JC, Shike DW, Loor JJ (2018) Residual feed intake in beef cattle and its association with carcass traits, ruminal solid-fraction bacteria, and epithelium gene expression. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 67.

Engel CL, Patterson HH, Perry GA (2008) Effect of dried corn distillers grains plus solubles compared with soybean hulls, in late gestation heifer diets, on animal and reproductive performance. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 7, p. 1697-1708 .

Fritsche-Neto R e Borém A (2013) Ômicas: abrindo a “caixa preta” do fenótipo, In: Fritsche-Neto R, Borém A (eds) **Ômicas 360°—Aplicações e Estratégias para o Melhoramento de Plantas** [360° Omics—applications and strategies for plant improvement, 1st edn.], 1a. ed., Viçosa: Suprema Gráfica e Editora Ltda, pp 9-22.

Garcia G, Cardoso AA, Santos A,(2013) Da escassez ao estresse do planeta: um século de mudanças no ciclo do nitrogênio, **Quimica. Nova**, Vol. 36, No. 9, 1468-1476.

Gomes, MAF, Souza MD, Boeira RC, Toledo LG (2017) **Nutrientes Vegetais no Meio Ambiente: ciclos bioquímicos, fertilizantes e corretivos**. Embrapa Meio Ambiente. Disponível em: http://www.cnpma.embrapa.br/download/documentos_66.pdf Acesso:05/05/2017.

Guan LL, Nkrumah JD, Basarab JA, Moore SS (2008). 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.

Guimarães, TP (2018), Exigências Proteicas para bovinos de corte. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 1, p. 90-99.

Granja-Salcedo YT, Ribeiro Júnior CS, de Jesus RB, Gomez-Insuasti AS, Rivera A. R, Messana JD, Canesin RC, Berchielli TT (2016) Effect of different levels of concentrate on ruminal microorganisms and rumen fermentation in Nellore steers. **Archives of Animal Nutrition**, v. 70, n. 1, p. 17-32.

Granja-Salcedo YT, Messana JD, Souza VC, Dias AVL, Kishi LT, Rebelo LR, Berchielli TT (2017) 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**, v. 118, n. 9, p. 651-660.

Hartinger T, Gresner N, Sudekum KH (2018) Does intra-ruminal nitrogen recycling waste valuable resources? A review of major players and their manipulation. **Journal of Animal Science and Biotechnonology**, v. 9, n. 1, p. 33

Herd RM, Archer JA, Arthur PF (2003) Reducing the cost of beef production through genetic improvement of feed intake: opportunity and challenges to application. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 13_suppl_1, p. E9-E17.

Harvey RA, Ferrier DR (2012) **Bioquímica Ilustrada**, 5ª ed., Artmed.

Hernandez-Sanabria E, Goonewardene LA, Wang Z, Durunna ON, Moore SS (2012) Impact of feed efficiency and diet on adaptive variations in the bacterial community in the rumen fluid of cattle. **Applied Environment Microbiology** v. 78, n. 4, p. 1203-1214.

Huws SA., Creevey CJ et al. (2018) Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: Past, present, and future. **Frontiers in Microbiology**,v 9.

Karisa B, Moore S, Plastow G (2014). Analysis of biological networks and biological pathways associated with residual feed intake in beef cattle. **Animal. Science Journal** v. 85,p 374–387.

Koenig KM e Beauchemin KA (2018) Effect of feeding condensed tannins in high protein finishing diets containing corn distillers grains on ruminal fermentation, nutrient digestibility, and route of nitrogen excretion in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 10, p. 4398-4413 .

Kozloski, G.V (2011) **Bioquímica dos ruminantes**. Editora Universidade Federal de Santa Maria, 3ª edição. Santa Maria, pp. 124-125.

Kohn RA, Dinneen MM e Russek-Cohen E (2005) Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. **Journal of Animal Science**. v. 83, n. 4, p. 879-889,

McCann JC, Wiley LM, Forbes TD, Rouquette Jr FM, e Tedeschi LO,(2014) Relationship between the rumen microbiome and residual feed intake-efficiency of Brahman bulls stocked on bermudagrass pastures. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91864.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2018) **AGROSTAT - Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro**, Disponível em < <http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>> Acesso em : 20/10/2018

Matthews C, Crispie F, Lewis E, Reid M, O'Toole PW, Cotter PD (2018) The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. **Gut microbes**, p1-18.

Menezes ACB, Valadares Filho SC, Costa E Silva LF, Pacheco MVC,Pereira JMV, Rotta PP, Zanetti D, Detmann E, Silva FAS, Godoi LA, Rennó LN (2016) Does a reduction in dietary crude protein content affect performance, nutrient requirements, nitrogen losses, and methane emissions in finishing Nelore bulls? **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.223, p. 239-249.

McGovern E, McGee M, Fitzsimons C, Smith P, Coyle S, Kenny D, Kelly A, Waters S (2018) Characterisation of the rumen archaeal and bacterial populations in Charolais and Holstein Friesian steers offered a pasture based diet phenotypically divergent for residual feed intake, In: **10th International Symposium on the Nutrition of Herbivores**, 2 to 6 September 2018, Clermont-Ferrand, France, Anais (on line), disponível: < <https://symposium.inra.fr/isnh2018>> acesso: 22/09/2018

Muyzer G, De Waal EC e Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700.

Myer PR, Smith TP, Wells JE, Kuehn LA, e Freetly, HC (2015). Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129174.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC (2001) **Nutrients requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington: National Academy Press 381p.

OECD/FAO, OECD-FAO-Agricultural Outlook 2016-2025, Disponível em < <http://www.fao.org/3/a-i5778e.pdf>> Acesso em : 20/10/2018

Oliveira CA, Millen DD (2014) Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. **Animal Feed Science and Technology**, v.197, p.64-75.

Pereira KP, Vêras ASC, Ferreira M, Batista AMV, Marques KA, Anna Fotius ACA (2007) Balanço de nitrogênio e perdas endógenas em bovinos e bubalinos alimentados com níveis crescentes de concentrado. **Acta Sci. Anim. Sci.** Maringá, v. 29, n. 4, p. 433-440

Reynolds CK, Crompton LA, Mills JAN., Barratt CES., Barber DG (2013) Improving the Efficiency of Feed Nitrogen Utilization, In: **International Dairy Nutrition Symposium, Wageningen, The Netherlands**, 21 November. Anais (on line), disponível: < <https://www.wur.nl/en/show/International-Dairy-Nutrition-Symposium-2013-Feed-efficiency-in-dairy-cattle.htm>> acesso: 22/09/2018.

Ribeiro Júnior CS, Messana, JD, Granja-Salcedo, YT, Canesin RC, Fiorentini G., San Vito E, Furlan LR, Reis RA, Berchielli TT (2016). Parameters of fermentation and rumen microbiota of Nellore steers fed with different proportions of concentrate in fresh sugarcane containing diets. **Archives of Animal Nutrition**, v. 70, n. 5, p. 402-415 .

Ribeiro GO, Oss DB, He Z, Gruninger RJ, Elekwachi C, Forster RJ, Yang W.; Beauchemin KA, McAllister TA (2017) 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.

Russell JB, O'Connor JD, Fox DG, Van Soest PJ, Sniffen CJ (1992) A Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating Cattle Diets: I. Ruminant Fermentation. **Journal Animal Science**. v. 70, p 3551-3561.

Russell, JB (1996) Inhibition of hyperactive amino acid-degrading ruminal bacteria and the potential for decreasing wasteful ammonia production. **US Dairy Forage Research Center**. p. 61-64.

Santos FAP, Pedroso AM (2011) Metabolismo de proteínas . In: BERCHIELLI, T.T.; Pires, A.V.; Oliveira, S.G. (Eds). **Nutrição de Ruminantes**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, p.265-297

Silva de Oliveira J, de Moura Zanine A, Santos EM (2007) Processo fermentativo, digestivo e fatores antinutricionais de nutrientes para ruminantes. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v.8, n.2.

Sinclair KD, Garnsworthy PC, Mann GE, Sinclair LA (2014). Reducing dietary protein in dairy cow diets: implications for nitrogen utilization, milk production, welfare and fertility. **Animal**, 8(02), 262-274.

Schuba J, Südekum KH, Pfeffer E, Jayanegara A (2017) Excretion of faecal, urinary urea and urinary non-urea nitrogen by four ruminant species as influenced by dietary nitrogen intake: A meta-analysis, **Livestock Science**, v. 198, p. 82-88,

Shibao J e Bastos DHM (2011) Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, 24(6), 895-904

Swchab CG, Huhtanen P, Hunt CW (2005) Nitrogen Requirements of Cattle. In: Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle: Reducing the environmental impact of cattle operations. Washington: **Cabi Publishing**, p.187-193.

Schwab CG e Broderick GA (2017). A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. **Journal of dairy science**, 100(12), 10094-10112

Tamminga S (1992) Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 345-357.

Valadares Filho SC, Marcondes MI, Chizzotti ML, Paulino PVR (2010)(Eds.) **Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados BR-CORTE**. Viçosa: DZO-UFV, p.113-133.

Valadares Filho SC, Machado PAS, Chizzotti ML et al.(2018) **CQBAL 3.0. Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Bovinos**. Disponível em <www.ufv.br/cqbal> Acesso em 20/10/2018

Walker ND, Newbold CJ e Wallace RJ (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. Pages 71–115 in **Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle and the environment**. E. Pfeffer and A. N. Hristov, ed. CAB Int., Wallingford, UK.

Wang P, Zhao S, Nan X, Jin D, Wang J (2018) Influence of hydrolysis rate of urea on ruminal bacterial diversity level and cellulolytic bacteria abundance in vitro. **PeerJ**, 6, e5475

Watson AK, Klopfenstein TJ, Erickson GE, MacDonald JC, Wilkerson VA(2017) Impact of microbial efficiency to predict MP supply when estimating protein requirements of growing beef cattle from performance. **Journal of animal science**, v95, n 7, p 3184-3191.

Witzig M, Lengowski MB, Zuber KH, Möhring J, Rodehutsord M. (2018). Effects of supplementing corn silage with different nitrogen sources on ruminal fermentation and microbial populations in vitro. **Anaerobe**, v 51, p 99-109.

CAPÍTULO 2- Diversidade bacteriana ruminal associada a eficiência de utilização de nitrogênio em novilhos Nelore alimentados com diferentes teores e fontes de proteína em dietas com alto teor de concentrado

RESUMO: Objetivou-se a caracterização da comunidade bacteriana ruminal em novilhos Nelore alimentados com diferentes teores e fontes proteicas em dietas de alto concentrado, e a identificação de possíveis associações entre o perfil microbiano ruminal e as variações na eficiência de utilização de nitrogênio animal. Foram utilizados seis novilhos Nelore, castrados, canulados no rúmen e duodeno, distribuídos em um modelo de blocos incompletos, com seis dietas e quatro períodos experimentais. O volumoso usado foi à cana de açúcar e os concentrados possuíam dois teores de inclusão de proteína bruta 10 e 13 % e três fontes proteicas: farelo de soja+ureia (FS), glúten de milho 60 (GLU) e grãos secos por destilação oriundo do processamento do milho (DDG). A fonte proteica DDG foi significativa na avaliação dos índices de diversidade Shannon Wiener e Simpson ($P < 0,010$). Avaliou-se a riqueza pelo índice Chao1 e os resultados demonstram um ambiente ruminal mais rico com o teor de 10% ($P < 0,010$) e a fonte FS ($P < 0,010$). Animais alimentados com 13% de PB apresentaram maior abundância dos filos Elusimicrobia e Spirochaetes ($P > 0,01$) e menor abundância de Bacteroidetes e Synergistetes ($P > 0,01$). A retenção de nitrogênio não foi influenciada pelo teor e a fonte utilizada, assim, os dados de retenção de nitrogênio foram distribuídos em três clusters: alta, média e baixa utilizando o NbClust package versão 2.0. *Endomicrobium_Other_other* ($P = 0,043$) e *Eubacterium* ($P = 0,023$) estiveram associados com a alta retenção de N. A baixa retenção de N esteve associada a *Prevotella* ($P = 0,029$), *Weissella* ($P = 0,024$), e *Mogibacterium* ($P = 0,089$). Ao correlacionarmos os dados do balanço de N com o perfil microbiano os gêneros *Butyrivibrio* ($r = -0,434$ $P = 0,034$), *Hespelia* ($r = -0,060$ $P = 0,002$) e *Coprococcus* ($r = -0,404$ $P = 0,050$) se correlacionaram negativamente com a retenção de N. A excreção urinária de N se correlacionou positivamente com o gênero *Lactonifactor* ($r = 0,545$ $P = 0,06$) e *Lachnospiraceae_other* ($r = 0,721$ e $0,007$). E negativamente com gêneros *Elusimicrobia* ($r = -0,415$ $P = 0,044$), *Victivallis*

($r = -0,486$ $P = 0,016$). Os teores e fontes proteicas alteram a diversidade microbiana ruminal, mas não influenciaram a retenção de N. Microrganismos que estão associados com a fixação de N, produção de aminoácidos e apresentam uma correlação com a excreção de N via urina, estiveram associados com alta retenção de N. Por outro lado, microrganismos com baixa atividade proteolítica, hiperprodutores de amônia foram associados com baixa retenção de N.

PALAVRAS CHAVE: microbiota ruminal, proteína não degradável no rúmen, retenção de nitrogênio, *Prevotella*.

1. Introdução

Os microrganismos ruminais oferecem ao ruminante a capacidade de aproveitar a maioria dos complexos polissacarídeos vegetais e fontes de nitrogênio (N) não proteico, obtendo energia e proteína via produção de ácidos graxos de cadeia curta e síntese de proteína microbiana (VAN SOEST, 1994). Entretanto, os ruminantes possuem uma baixa eficiência de utilização de N (CALSAMIGLIA et al., 2010), resultante da ação dos microrganismos ruminais, que ocasiona perda de N do rúmen via excreção fecal e urinária (TAMMINGA, 1992, SCHWAB e BRODERICK, 2017). Este fato têm implicações no desempenho produtivo e na emissão de contaminantes no meio ambiente (CALSAMIGLIA et al., 2010); e contribuí para que maiores teores de proteína sejam fornecidos na dieta.

As modificações que a proteína sofre dentro do rúmen dependem da composição química do alimento, principalmente das frações da proteína degradada no rúmen (PDR) e proteína não degradada no rúmen (PNDR) (NRC 2001, Walker et al., 2005), e como este pode influenciar o ambiente ruminal (BACH et al., 2005, HARTINGER et al., 2018). Estas modificações são benéficas para o hospedeiro, já que os microrganismos ruminais se tornam fonte proteica ao chegarem no duodeno para serem absorvidos como proteína microbiana (SINCLAIR et al., 2014, SCHWAB e BRODERICK, 2017), sendo essa responsável por atender de 70 a 100% do requerimento de aminoácidos dos ruminantes (AFRC, 1992).

A manipulação nas frações PDR e PNDR na dieta é uma estratégia para reduzir as perdas de N no rúmen, reduzindo a produção de amônia, sem limitar o fornecimento de aminoácidos aos microrganismos ruminais e ao hospedeiro (TAMMINGA et al., 1996, CALSAMIGLIA et al., 2010). Entretanto, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos das diferentes fontes e teores de proteína utilizados nas formulações das dietas sobre a diversidade bacteriana ruminal, principalmente em animais alimentados com alto teor de concentrado e variações em PDR e PNDR na dieta. A maior parte do conhecimento sobre a resposta das bactérias ruminais a diferentes fontes de N é baseada em culturas puras ou experimentos *in vitro* (STEWART et al., 1997, WITZIG et al., 2018).

Por outro lado, há um grande interesse em entender o impacto da microbiota ruminal na utilização de nutrientes da dieta pelo hospedeiro (HUWS et al., 2018). Em estudos associando a eficiência de utilização dos nutrientes com o perfil da microbiota, identificaram variações no ecossistema ruminal de animais com maior eficiência no uso dos nutrientes (GUAN et al., 2008, McCANN et al., 2014). Tem sido verificado que diferentes teores de proteína na dieta não influenciaram a população de bactérias celulolíticas ruminais, contudo, maior abundância de *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus albus* foi associada a animais com maior ganho de peso (CHANTHAKHOUN et al., 2012). A retenção de N em vacas aumentou com transferência de conteúdo ruminal de bisões, fato atribuído às mudanças no perfil microbiano ruminal, principalmente da população de protozoários e ao aumento na abundância de bactérias da família *Christensenellaceae* (RIBERIO et al., 2017).

Hipotetizou-se que dietas de alto grão e fontes proteicas com maior teor de proteína e alta degradabilidade ruminal, resultam em variações na microbiota ruminal, a qual resultará em maior eficiência de utilização de nitrogênio. Objetivou-se caracterizar a comunidade bacteriana ruminal em novilhos Nelore alimentados com diferentes teores e fontes proteicas, além da identificação de microrganismos ruminais associados às variações na eficiência de utilização de nitrogênio no animal.

2. Material e Métodos

2.1. Local, animais, duração do experimento

O estudo foi conduzido no setor de Avaliação de Alimentos e Digestibilidade do Departamento de Zootecnia da FCAV-UNESP, Campus Jaboticabal. Seis novilhos, Nelore, castrados, canulados no rúmen e duodeno (peso corporal médio de $354 \pm 24,1$ kg e idade média de 18 meses) foram distribuídos em um modelo de blocos incompletos, com seis dietas e quatro períodos experimentais. Os animais utilizados foram alocados em baias individuais (12 m^2), cobertas, com piso cimentado, e cocho e bebedouro individual. O experimento teve duração total de 80 dias, sendo quatro períodos experimentais de 20 dias cada (14 dias para adaptação

às dietas e instalações e 6 dias para as coletas). O experimento foi aprovado pelo Conselho de Ética de Uso de Animais da Universidade, cujo número do processo é 16.668/16.

2.2. Dietas experimentais

As dietas experimentais possuíam uma relação volumoso: concentrado aproximada 20:80 na MS e foram formuladas para serem isoenergéticas de acordo com o BR CORTE (VALADARES FILHO et al., 2010). Sendo utilizada cana de açúcar *in natura*, moída diariamente como fonte de volumoso.

Os diferentes concentrados foram compostos por milho moído, e diferentes fontes de proteína: farelo de soja+ ureia, glúten de milho 60 ou grão seco de destilaria (DDG) (Tabela 1). Cada fonte proteica foi avaliada em dois teores na dieta (10 e 13%) e foi utilizado suplemento mineral para bovinos (Núcleo Confinamento 150, Premix) (Tabela 2).

Tabela 1. Composição bromatológica dos ingredientes

	%MS/%MN	%MM/%MS	%MO/%MS	%PB/%MS	%PDR/PB*	%PNDR/PB*	%FDN/%MS	%EE/%MS
Cana	93,80	2,69	97,31	3,73	3,01	0,72	50,04	1,27
Milho	88,51	1,54	98,46	9,51	2,85	6,66	18,38	5,26
Farelo Soja	89,59	7,01	92,99	51,14	26,01	25,13	28,55	2,25
DDG	91,35	2,03	97,97	37,57	22,35	15,21	53,88	6,28
Glúten	92,74	1,60	98,40	60,03	10,81	49,22	36,90	2,95
Ureia	93,91	0,09	99,91	275,26	275,26	--	--	--

MS = matéria seca, MN = matéria natural, MO = matéria orgânica, MM = matéria mineral, PB = proteína bruta, PDR= proteína degradada no rúmen, PNDR = proteína não degradada no rúmen, FDN = fibra em detergente neutro, EE= extrato etéreo.

* valores das tabelas do CQBAL 4.0 (Valadares Filho et al., 2018), para o DDG usou-se valores encontrado por Engel et al., 2008.

Tabela 2. Proporção dos ingredientes nas dietas experimentais e composição bromatológica das dietas (% matéria seca)

Ingredientes (%)	Teores de PB (%)					
	10			13		
	FS	GLU	DDG	FS	GLU	DDG
Cana	21,98	18,90	18,90	17,41	16,63	15,02
Milho	73,45	73,28	67,60	71,82	68,79	56,13
Farelo de Soja	1,03	--	--	7,05	--	--
Ureia	0,91	--	--	1,23	--	--
DDG	--	--	11,1	--	--	22,67
Glúten	--	5,57	--	--	12,22	--
Núcleo*	2,64	2,25	2,44	2,5	2,36	2,43
Composição bromatológica (%MS)						
MS	75,34	77,43	77,6	77,64	78,93	78,02
MO	95,41	96,02	95,8	95,43	95,94	95,78
PB	10,86	11,07	10,90	14,59	14,42	13,66
PDR**%PB	5,50	3,32	4,44	7,53	3,27	7,49
PNDR** %PB	5,50	7,68	6,56	6,47	10,73	7,51
FDN	24,12	24,66	28,00	24,71	25,23	32,34
EE	4,32	4,43	4,86	4,36	4,25	4,89

MS = matéria seca, MO = matéria orgânica, MM = matéria mineral, PB = proteína bruta, PDR= proteína degradada no rúmen, PNDR = proteína não degradada no rúmen, FDN = fibra em detergente neutro, EE= extrato etéreo.

* Composição (por kg): Ca 240g, P 20g, Mg 10g, S 25g, Na 60g, K 35g, Mn 1,500 mg, Zn 1.500 mg, Cu 500 mg, F 200 mg, Co 100 mg, I 50 mg, Se 9 mg, Colina 60 mg, Vitamina A 100.000 UI, Tamponante 50 g

** valores das tabelas do CQBAL 4.0 (Valadares Filho et al., 2018), para o DDG usou valores encontrado por Engel et al., 2008.

2.3. Consumo

As dietas totais foram ofertadas duas vezes ao dia, 50% às 6:00h e 50% às 16:00h. As mesmas eram ajustadas diariamente para que as sobras corresponde-se 5% do total fornecido.

Antes de começar o período experimental, foram feitas coletas dos ingredientes da dieta. Nos dias 16° ao 20° dia de cada período experimental era feita a coleta das sobras o ajuste de consumo e amostras parciais de aproximadamente 10% das sobras eram armazenadas a -20°C. E uma composta dessas amostras por período foi formada a partir desses cinco dias de coleta, isso, foi feita para cada animal, e no final se tinha a amostra laboratorial.

As amostras de alimentos e sobras foram secas em estufas de circulação de ar forçada a 55°C durante 72h. Depois de secas, moídas individualmente em moinho tipo Willey (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, EUA) com um crivo de 1 mm para ser analisados os teores de matéria seca (MS método 934.01); matéria mineral (MM método 924.05) de acordo com os métodos descritos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990). A mensuração de N presente nas amostras foi obtida por condutividade térmica utilizando-se o equipamento Leco®, modelo FP-528 (LECO Corp., St. Joseph, MI). Além das amostras de sobras, tais análises químicas foram realizadas nas amostras de fezes, urina e duodeno. Porém nas amostras de duodeno não foram realizadas análise de nitrogênio.

2.4. Excreção de nitrogênio nas fezes

A produção fecal total com a finalidade de avaliar a excreção de N fecal, foi determinada por meio da coleta total de fezes, as amostras de fezes foram coletadas logo após defecação espontânea diariamente durante o 16° ao 20° dia de cada período experimental. As amostras foram acondicionadas em freezer para evitar a perda de N e a cada 24 horas, as fezes eram pesadas, homogeneizadas e retiradas uma amostra representativa de aproximadamente 10 % do peso total. Essas sub-amostras foram armazenadas congeladas a -20°C e no final da fase experimental foram secas em estufa de circulação de ar forçada a 55°C durante 72h, para determinar o teor de fibra indigestível em detergente neutro (FDNi), as amostras fecais moídas com crivo de 2 mm foram incubadas *in situ*, durante 288 horas segundo o método proposto por Valente et al.(2011).Após a incubação a fibra em detergente neutro (FDN), foi determinada segundo Van Soest et al., (1991), e

adaptado para o ANKOM 200 Fiber Analyzer (ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EUA). Tal procedimento foi realizado com as amostras do duodeno. O FDNi foi utilizado como marcador para calcular o fluxo no rúmen e assim estimar a matéria orgânica degradada no rúmen (MODR).

2.5. Estimativa da matéria orgânica degradada no rúmen

Para a determinação da matéria orgânica degradada no rúmen (MODR) amostras duodenais de 250 mL foram coletadas via cânula duodenal, em intervalos de 9h durante o 15° e 18° dia de cada período experimental.

No dia 15° as coletas de digesta duodenal foram realizadas às 10h30 e 19h30. No dia 16° às 4h30, 13h30 e 22h30. No dia 17° às 7h30, 16h30 e no dia 18° às 1h30 foi realizada a última coleta de digesta duodenal para representação do fluxo diário (ALLEN e LINTON, 2007). Logo após as amostras duodenais foram congeladas e liofilizadas, e ao final do processo confeccionaram-se amostras compostas para cada animal. Esse processo aconteceu em cada período experimental.

O fluxo de MS duodenal (FMSD) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{FMSDO g/d} = [\text{MS fecal} \times (\text{g / kg FDN indigestível na MS fecal})] / (\text{g / kg FDN indigestível em MS duodenal}).$$

2.6. Excreção de nitrogênio na urina e estimativa de nitrogênio microbiano

Para avaliar a excreção de N urinário, a coleta total de urina foi realizada do 16° ao 20° as 7:00h da manhã de cada período experimental amostras de urina foram coletadas nas seguintes proporções: uma amostra de urina (50 mL) para determinação de N total e creatinina e adicionalmente, uma alíquota de urina de 10 mL foi diluída em 40 mL de ácido sulfúrico 0,036 N. Após homogeneização, com o intuito de evitar perda de N no processo de descongelamento durante a realização

das análises laboratoriais, subamostras de 2 mL foram estocadas em eppendorfs e armazenadas a -20 ° C para análise de ácido úrico, alantoína, N total e creatinina.

A produção total do volume urinário foi estimada por meio da excreção diária de creatinina (CE), utilizando a equação para novilhos Nelore proposta por Silva et al. (2012):

$$CE \text{ (g/d)} = 0,0345 \times (PC)^{0,9491}$$

Em que CE é a excreção diária de creatinina (g / dia) e PC = peso corporal em jejum.

O N total foi determinado pelo o método de Kjeldahl. A excreção de alantoína foi analisada pelo o método colorimétrico descrito por Chen e Gomes, (1992), e a concentração de ácido úrico foi determinada pelo kit comercial Ácido Úrico Liquiform: nº de cat. 140 segundos as recomendações do fabricante. As purinas microbianas absorvidas (X, mmol/dia) foram calculadas pela excreção de derivados de purinas na urina (Y, mmol/dia), a equação utilizada foi:

$$Y = 0,85X + 0,385 PC^{0,75},$$

Em que, 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados urinários de purinas e 0,385 PV^{0,75}, a contribuição endógena para a excreção de purinas (VERBIC et al., 1990).

O cálculo de síntese de nitrogênio microbiano (Nmic) foi em função das purinas absorvidas (X mmol/dia), pela a equação de Chen e Gomes,(1992):

$$Y=70X / 0,83 \times 0,134 \times 1000,$$

Onde, 70 é o conteúdo de N de purinas (mgN/mmol), 0,134 a relação N purina:N total nas bactérias (Valadares et al.,1999) e 0,83 a digestibilidade das purinas microbianas. A eficiência de síntese de nitrogênio microbiano foi expressa em g de Nmic / kg de MODR.

Para o cálculo de balanço de nitrogênio (BN) a equação utilizada foi:

$$BN= CNT(\text{g/dia}) - [ENF(\text{g/dia}) + ENU (\text{g/dia})],$$

Em que CNT= consumo de nitrogênio total, ENF= excreção de nitrogênio fecal e ENU= excreção de nitrogênio urinário.

2.7. Nitrogênio amoniacal ruminal e pH

No 20º dia de cada período experimental foram coletadas amostras de 50 mL de líquido ruminal antes da alimentação matinal dos animais (0h) e 2, 4, 6, 8 e 10 horas após a alimentação dos animais, para a determinação de N amoniacal ruminal e pH mensurado com auxílio do pHmetro digital.

As coletas foram realizadas manualmente por meio da cânula ruminal, onde a digesta ruminal coletada foi filtrada em dupla camada de pano de algodão para obtenção da amostra líquida que foi congelada a -20°C e posteriormente se realizou a análise de N amoniacal em duplicatas segundo o método de Fenner (1965).

2.8. Diversidade bacteriana ruminal

As coletas para diversidade bacteriana do ambiente ruminal foram realizadas no 20º dia de cada período experimental, através da cânula ruminal, se coletou a fração sólida + fração líquida da digesta antes da alimentação matinal dos animais, sendo aproximadamente 50 g de conteúdo da região medial e ventral do rúmen. Após a extração da fração líquida, do conteúdo sólido presente no pano de algodão selecionou as partículas menores que ficaram no tecido e colocadas em recipientes plásticos de 250 mL onde já se encontravam 50 mL de solução de PBS (pH 7,4) a 4°C. Esse material foi acomodado em isopores com gelo e imediatamente transportados para o laboratório.

No laboratório estas amostras foram processadas para a obtenção do pellet bacteriano conforme descrito por Granja-Salcedo et al. (2016). A extração do DNA foi realizada utilizando 200 mg do pellet obtido 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®-24 Classic Instrument (MP biomedical, FR) para a etapa de lise celular. Logo após extração do material genômico, o rendimento do DNA extraído 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). A pureza do DNA metagenômico foi avaliado por espectrofotometria

a partir das relações A260nm/A280nm e A260nm/A230nm. Finalmente, a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% corado com SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

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 foi conduzida nas seguintes condições: 95°C por 3 minutos, 30 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 foi estimado 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.

O sequenciamento foi realizado no equipamento Illumina MiSeq utilizando o kit MiSeq Reagent v2 (2x250pb).

Os dados obtidos do sequenciamento foram processados por meio do QIIME software package (Caporaso et al., 2010). Foram selecionadas para a leitura reads acima de 250 pb e com média > 25 na qualidade Phred, sendo agrupados em OTUs (operational taxonomic units) com mais de 99% de semelhança das sequências. Esses dados foram utilizados para análise rarefação, índices de riqueza, índices de alpha e beta diversidade.

2.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R versão 3.5.1 (R Core Team, 2015). Inicialmente, os pressupostos matemáticos dos dados foram testados (testes de Shapiro-Wilk e Bartlett).

2.9.1 Efeito do teor e fonte proteica na microbiota ruminal

Os dados de riqueza, diversidade e abundância ruminal de bactérias e Archaeas foram comparados entre os teores e fontes de proteína na dieta pelo teste de Friedman pos-teste de Dunns. Os dados de balanço de N foram comparados mediante o teste de ANOVA, utilizando um modelo de blocos incompletos balanceados, com fatorial A x B, onde se avaliaram os efeitos do teor (Fator A, fixo, GL 1), a fonte de proteína (Fator B, fixo, GL 2), interação (Fator A xB), animais (aleatório, GL 5), períodos (fixo, GL 3) e os resíduos (aleatório, GL 13).

2.9.2. Retenção de nitrogênio associada à composição microbiana ruminal

Como os fatores teor e fonte não influenciaram a retenção de nitrogênio (N) do animal, os dados de retenção de N os animais foram distribuídos em três clusters: alta, média e baixa retenção de N utilizando o NbClust package versão 2.0.4 (CHARRAD et al., 2014). As 24 amostras estudadas foram distribuídas da seguinte maneira: oito foram enquadrados no grupo com baixa retenção, seis animais correspondiam ao grupo com média retenção e dez animais pertenciam ao grupo de alta retenção.

Os dados de consumo de matéria seca (CMS), consumo de nitrogênio (CN), N amoniacal, excreção de nitrogênio urinaria (ENU), excreção de nitrogênio fecal (ENF) e retenção de nitrogênio (RN)EUN, EFN e RN foram comparados mediante o teste de ANOVA, utilizando um modelo de blocos incompletos balanceados, onde avaliaram-se os efeitos dos clusters (fixo, GL 2), animais (aleatório, GL 5), períodos (fixo, GL 3) e os resíduos (aleatório, GL 13). Quando a ANOVA foi significativa as medias foram comparadas pelo teste de Duncan.

2.9.3 Diversidade bacteriana ruminal associada ao balanço de nitrogênio em bovinos de corte

Os dados de abundância ruminal de bactérias e Archaeas foram submetidos à análise de componentes principais tendo como fator a retenção de N. A relação entre a abundância dos gêneros bacterianos e Archaeas e o balanço de nitrogênio foi estudada pela correlação de Spearman. A significância estatística foi definida como $P \leq 0,05$ e uma tendência de diferença foi declarada em $P \leq 0,10$.

3. Resultados

3.1. Efeito do teor e fonte proteica na microbiota ruminal

As 24 amostras analisadas geraram em total de 3.319.968 sequências (média 13.832). Em média foram identificadas 656,42 unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com uma confiabilidade de 0,99%.

As dietas não influenciaram ($P > 0,10$; Tabela 3) o índice de riqueza ACE. O índice Chao 1, foi maior quando os animais foram alimentados com dietas contendo 10% de PB ($P < 0,001$), o mesmo aconteceu quando a fonte proteica utilizada na dieta foi o farelo de soja ($P < 0,001$) (Tabela 3).

A diversidade medida pelos índices de Shannon Wiener e Simpson foi afetada pela fonte proteica utilizada, sendo que animais alimentados com DDG apresentaram valores maiores que o grupo alimentado com glúten e aproximado do farelo de soja (Tabela 3).

O teor ou fonte de proteína bruta (PB) na dieta não influenciou ($P > 0,10$; Tabela S1) o filo Euryarchaeota, sendo este o único identificado dentro do domínio Archaea. Dentro do domínio Bactéria foram identificados 13 filios bacterianos, o filo SR1 foi removido dos dados uma vez identificado apenas em uma amostra com abundância $< 0,01$. Os filios Bacteroidetes e Firmicutes foram os mais abundantes

em todas as amostras, representando em média 25,73% e 26,28%, respectivamente (Figura 1). O teor e a fonte proteica utilizada, não influenciaram os filos Fibrobacteres, Proteobacteria, Tenericutes, Bacteria_Other, assim como o grupo de OTUs Unassigned (Tabela S1). No entanto, animais alimentados com 13% de PB apresentaram maior abundância de Elusimicrobia e Spirochaetes, e menor abundância de Bacteroidetes e Synergistetes (Figure 1; Friedman $P < 0,01$).

O farelo e soja ao ser fornecido como fonte proteica contribuíram para maior abundância dos Actinobacteria e Bacteroidetes, observando-se menor a abundância destes filos no grupo alimentado com glúten (Figura 1, Tabela S1; Friedman $P < 0,001$). Já o filo Synergistetes esteve em maior abundância quando os animais foram alimentados com DDG como fonte proteica, e menor abundância quando os animais receberam glúten (Figura 1, Tabela S1; Friedman $P < 0,001$). Quando a fonte de PB na dieta foi o farelo de soja observou-se uma tendência de menor abundância ruminal dos filos Firmicutes e Lentisphaerae (Tabela S1; Friedman $P < 0,10$). Efeito similar foi observado nos filos Verrumicrobia e Elusimicrobia quando a dieta continha glúten.

Tabela 3. Mediana e rango interquartil dos índices de riqueza (Chao1 e ACE) e diversidade estimadores (Shannon Wiener e Simpson) nas dietas experimentais com diferentes teores (13 e 10%) e fontes (farelo de soja (FS), glúten (GLU) e grãos secos de destilaria (DDG)) de proteína bruta.

	Teores PB (%)						P-valor	
	10			13			Teor	Fonte
	FS	GLU	DDG	FS	GLU	DDG		
ACE	887,79 ± 225,50	675,48 ± 254,91	874,01 ± 114,72	836,03 ± 257,78	719,00 ± 347,28	454,73 ± 712,33	0,627	0,722
Chao1	886,00 ± 66,47 ^{Aa}	773,00 ± 165,98 ^{Ab}	732,00 ± 332,36 ^{Ac}	859,00 ± 248,46 ^{Ba}	700 ± 351,03 ^{Bb}	446,00 ± 739,21 ^{Bc}	<0,010	<0,010
Shannon-Wiener	6,66 ± 0,65 ^{ab}	6,43 ± 0,52 ^b	6,91 ± 0,75 ^a	6,91 ± 0,31 ^{ab}	6,47 ± 1,85 ^b	7,03 ± 1,89 ^a	0,627	0,080
Simpson	0,97 ± 0,02 ^{ab}	0,97 ± 0,01 ^b	0,98 ± 0,02 ^a	0,98 ± 0,01 ^{ab}	0,97 ± 0,03 ^b	0,98 ± 0,01 ^a	0,627	<0,010

*valores seguidos com letras maiúsculas sobrescritas diferenças estatísticas (P <0,10) com base no teste de Friedman para teores de proteína bruta;

**valores seguidos com letras minúsculas sobrescritas diferenças estatísticas (P <0,10) com base no teste de Friedman para fontes de proteína;

***não ocorreu interação entre o teor e a fonte P(>0,05);

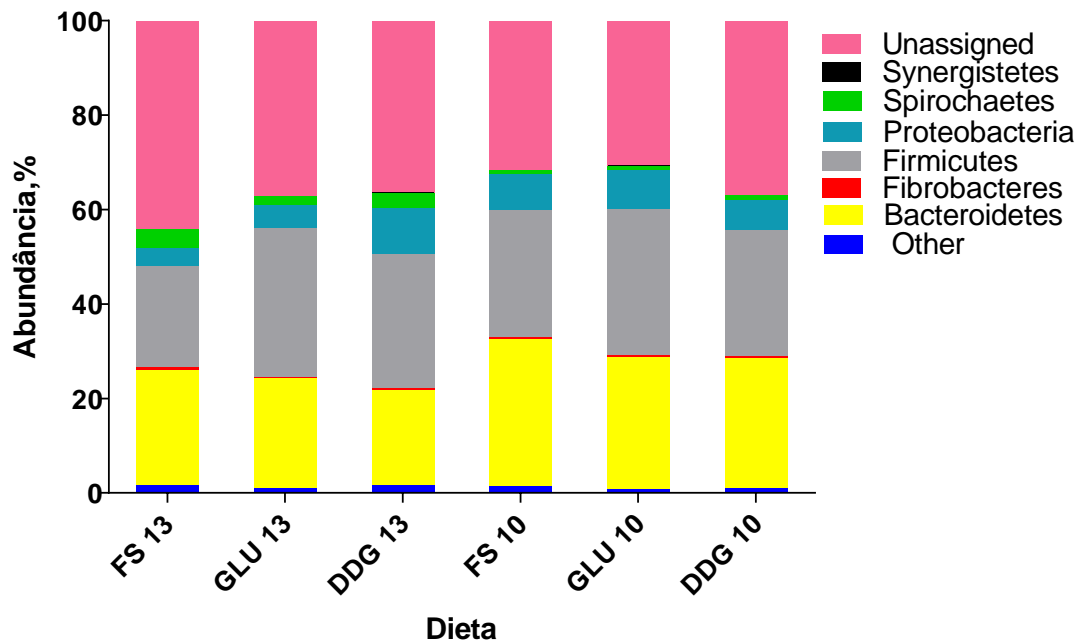


Figura 1. Abundância das unidades operacionais classificadas no nível de filo (%) em novilhos Nelore alimentados com diferentes teores e fontes de proteína na dieta. Other= somatória de Actinobacteria, Lentisphaera, Tenericutes, Verrucomicrobia e bactéria_Other

3.2. Retenção de nitrogênio associada à composição microbiana ruminal

Os teores e fontes de PB na dieta não influenciaram a retenção de nitrogênio, média (56,62 g/dia, 53,13 % do N ingerido, $P= 0.05$). Conforme apresentado na tabela suplementar S2, houve interação apenas entre o teor e a fonte fornecida para o N amoniacal

O consumo de matéria seca (CMS), consumo de nitrogênio (CN), a produção de proteína microbiana (PBmic) no rúmen, a eficiência de síntese de PBmic (EPBmic), a concentração de N amoniacal ruminal, assim como a excreção de nitrogênio fecal e urinário expresso em g/dia, foram similares entre animais com alta, média e baixa retenção de nitrogênio (Tabela 4; $P > 0,05$).

A baixa retenção de nitrogênio esteve relacionada com a maior excreção de nitrogênio fecal ($P = <0,001$) e urinário ($P = 0,02$), quando expressos como porcentagem de nitrogênio ingerido e quando comparados com o grupo de alta retenção (Tabela 4).

A análise de componentes principais (PCA) das populações bacterianas ruminais em animais com diferente retenção de nitrogênio explica 67% da variação dos dados (Figura 2). No componente principal 1 (PC1) ficaram agrupados os microrganismos que estão associados com alta retenção de nitrogênio, sendo o gênero *Victivallis*, a família *Spirochateacea*, o filo Elusimicrobia e classe *Endomicrobium_other*, assim como o grupo de OTUs Unassigned (Figura 2). No PC2 foram agrupados microrganismos que relacionados com a baixa retenção de nitrogênio, estes foram as famílias *Prevotellaceae*, e *Lachanospiroceae*, assim como os gêneros *Anaeroplasma*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*.

Tabela 4. Valores médios de consumo de matéria seca (CMS) e balanço de nitrogênio em novilhos Nelore com alta, média e baixa retenção de nitrogênio.

	Retenção de N			EPM	P-valor
	Alta	Média	Baixa		
CMS, kg	5,43	5,09	5,19	0,722	0,300
CN, g	111,02	110,19	97,03	14,189	0,387
EPBmic, g de PBmic/kg MODR	90,75	160,39	114,49	22,160	0,943
PBmic, g/d	314,80	491,72	382,63	85,897	0,575
N amoniacal, mg/dL	16,48	15,75	11,15	3,403	0,235
pH ruminal	6,55	6,28	6,42	0,084	0,523
ENF % do CN	25,70 ^b	31,87 ^{ab}	36,75 ^a	1,916	<0,001
ENU % do CN	13,16 ^b	16,83 ^{ab}	18,76 ^a	1,675	0,018
RN % do CN	61,15 ^a	51,30 ^b	44,49 ^c	1,957	< 0,001

* valores seguidos com letras minúsculas sobrescritas indicam diferenças estatísticas ($P < 0,01$) pelo teste de Duncan; EPM = erro padrão da média, CN = consumo de nitrogênio, PBmic = proteína microbiana ruminal, MODR = matéria orgânica degradada no rumen, ENF = excreção de nitrogênio fecal, ENU = excreção de nitrogênio urinário, RN = retenção de nitrogênio.

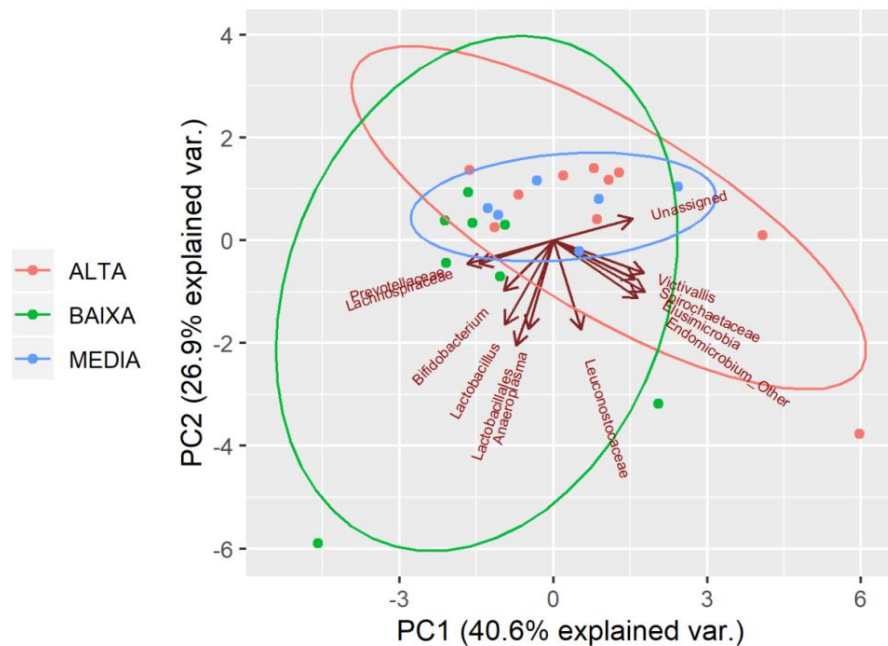


Figura 2. Análise de componentes principais (PCA), para explorar as diferenças na composição microbiana entre novilhos Nelore com retenção de nitrogênio alta (vermelho), baixa (verde) e média (azul).

O filo Firmicutes tendeu ser mais abundante na baixa retenção de N, quando comparado à alta retenção (Tabela 5; $P = 0,07$), enquanto que, o grupo de OTUs Unassigned foi menos abundante no rúmen de animais com baixa retenção de N ($P = 0,01$).

Foram identificados 88 gêneros, sendo 82 de bactérias e 6 de Archaeas, mas apenas 21 dos gêneros bacterianos apresentaram abundâncias diferentes em relação aos grupos com diferente retenção de N (Tabela 5). Sendo que alta retenção de N esteve associada em maior abundância ruminal dos gêneros *Anaerohabdus* ($P = 0,05$), *Endomicrobium Other_ Other* ($P = 0,04$), *Eubacterium* ($P = 0,02$) e *Succinimonas* ($P = 0,03$), e menor abundância de *Roseburia* ($P = 0,02$) quando comparados com animais de baixa e média retenção de nitrogênio

A baixa retenção foi associada com maiores proporções nos gêneros *Prevotella* ($P = 0,03$), *Weissella* ($P = 0,02$) *Peptotryptococcaceae_ Other* ($P = 0,02$), e tendeu a ter maior abundância de *Mogibacterium* ($P = 0,10$), *Butyrivibrio* ($P = 0,08$) e *Clostridium XI* ($P = 0,05$) quando comparada com o grupo de média e alta retenção de N.

Tabela 5. Mediana e rango interquartil da abundância bacteriana ruminal no nível de filo (%) e gênero (%) em novilhos Nelore com alta, média e baixa retenção de nitrogênio.

	Retenção de N			P-valor
	Alta	Média	Baixa	
Actinobacteria	0,63 ± 1,18	0,60 ± 0,29	0,25 ± 0,40	0,218
<i>Corynebacterium</i> *	217,00 ± 0,04 ^a	0,01 ± 0,02 ^b	145,00 ± 0,00 ^a	0,041
Bacteroidetes	19,97 ± 11,44 ^b	29,11 ± 10,340 ^a	18,34 ± 6,89 ^b	0,029
<i>Anaerohabdus</i> *	3,50 ± 0,03 ^a	NI ^b	NI ^b	0,046
<i>Prevotella</i>	19,95 ± 11,44 ^b	18,34 ± 6,89 ^b	29,10 ± 10,34 ^a	0,029
Elusumicrobia	0,14 ± 0,16	0,04 ± 0,11	0,19 ± 0,28	0,367
<i>Endomicrobium Other_ Other</i>	0,07 ± 0,09 ^a	0,04 ± 0,08 ^a	NI ^b	0,043
Fibrobacteres	0,32 ± 0,42	0,31 ± 0,32	0,41 ± 0,33	0,508
Firmicutes	24,72 ± 7,37 ^b	29,23 ± 3,13 ^{ab}	28,55 ± 3,13 ^a	0,056
<i>Lactobacillus</i> *	44,10 ± 5,42 ^b	217,00 ± 0,02 ^a	181,00 ± 0,03 ^a	0,053
<i>Weissella</i> *	36,87 ± 0,01 ^b	1,20 ± 0,01 ^b	145 ± 0,02 ^a	0,024
<i>Anaerovorax</i> *	470 ± 0,04 ^a	145 ± 0,02 ^b	361 ± 0,02 ^a	0,014
<i>Mogibacterium</i>	0,17 ± 0,10 ^b	0,17 ± 0,08 ^b	0,34 ± 0,12 ^a	0,089
<i>Eubacterium</i> *	0,37 ± 0,28 ^a	0,18 ± 0,15 ^b	7,00 ± 0,15 ^b	0,023
<i>Butyrivibrio</i>	0,32 ± 0,17 ^b	0,36 ± 0,36 ^b	0,72 ± 0,35 ^a	0,078
<i>Lachnospiraceae_ Other</i>	3,25 ± 2,04 ^b	6,26 ± 5,14 ^{ab}	8,75 ± 5,49 ^a	0,015
<i>Roseburia</i>	0,16 ± 0,13 ^b	1,00 ± 1,58 ^a	0,49 ± 0,81 ^a	0,021
<i>Clostridium XI</i> *	1,45 ± 0,02 ^b	0,63 ± 0,01 ^b	7,00 ± 0,00 ^a	0,051
<i>Peptostreptococcaceae_ Other</i> *	NI ^b	1,56 ± 0,02 ^b	7,00 ± 0,00 ^a	0,017
<i>Ruminococcaceae_ Other</i>	3,81 ± 1,51 ^b	5,58 ± 3,51 ^{ab}	5,08 ± 1,47 ^a	0,063
<i>Acidaminoccus</i> *	1,22 ± 0,01 ^b	7,23 ± 0,05 ^{ab}	193,75 ± 0,19 ^a	0,077
<i>Megasphaera</i> *	0,63 ± 0,01 ^b	7,23 ± 0,05 ^{ab}	76,00 ± 0,06 ^a	0,085
<i>Mitsuokella</i> *	3,50 ± 0,00 ^b	7,00 ± 0,09 ^{ab}	361,00 ± 0,45 ^a	0,082
Lentisphaere	0,04 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,131
Bacteria Other	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,836
Proteobacteria	4,99 ± 5,60	2,56 ± 4,15	6,95 ± 10,34	0,492
<i>Methylobacterium</i> *	NI ^b	76,00 ± 0,05 ^a	NI ^b	0,044
<i>Desulfobulbus</i> *	7,00 ± 0,01 ^{ab}	0,09 ± 0,05 ^b	7,00 ± 0,15 ^a	0,068
<i>Succinimonas</i> *	0,09 ± 0,30 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^b	0,025
Spirochaetes	1,33 ± 1,58	1,10 ± 0,74	0,75 ± 0,63	0,212
Synergistetes	0,11 ± 0,16	0,08 ± 0,09	0,11 ± 0,07	0,634

Tenericutes	0,05 ± 00,7	0,14 ± 0,14	0,09 ± 0,04	0,457
Verrucomicrobia	0,03 ± 0,04	0,01 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,806
Unassigned	39,02 ± 16,39 ^a	38,50 ± 22,73 ^a	21,46 ± 3,63 ^b	0,014

* valores expressos em exponencial x 10⁻⁴

** valores seguidos com letras minúsculas sobrescritas indicam diferenças estatísticas (P <0,01) pelo teste de Friedman;

NI: não identificado;

3.3. Diversidade bacteriana ruminal associada ao balanço de nitrogênio em bovinos de corte

A retenção de nitrogênio foi correlacionada negativamente com os gêneros *Mogibacterium*, *Anaerofustis*, *Butyrivibrio*, *Coprococcus*, *Hespellia*, *Lactonifactor* e *Lachnospiraceae_other* ($r \leq -0,61$; $P \leq 0,05$) (Figura 3; Tabela S3).

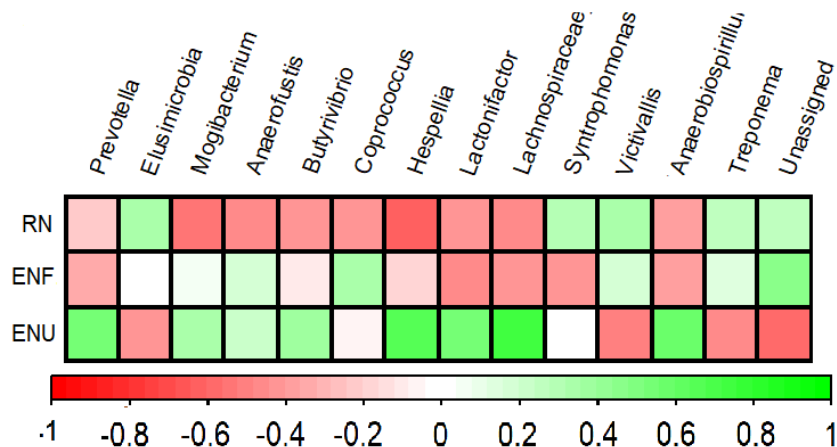


Figura 3. Correlações de Spearman entre o balanço de nitrogênio e abundância microbiana ruminal no teor de gênero. Apenas correlações significativas ($P < 0,05$) para pelo menos uma das variáveis analisadas é mostrada.

A excreção fecal correlacionou-se negativamente com os gêneros *Lactonifactor*, *Syntrophomonas* e *Lachnospiraceae_other* ($r \leq -0,40$; $P \leq 0,05$), e positivamente com grupo de OTUs *Unassigned* ($r = 0,47$; $P = 0,02$). Observou-se uma correlação positiva entre os gêneros *Prevotella*, *Hespellia* *Lactonifactor*,

Lachnospiraceae_other e *Anaerobiospirillum* e a EUN ($r > 0,55$; $P < 0,01$). Já o grupo de OTUs *Unassigned*, assim como os gêneros *Elusimicrobia*, *Victivallis* e *Treponema* correlacionaram-se negativamente com esta variável ($r < -0,41$; $P < 0,05$).

4. Discussão

Obter animais mais eficientes durante o processo de produção tem sido objetivo de diversos estudos, entretanto ainda são escassos os estudos que visam compreender a eficiência de utilização de nitrogênio (N) associado ao perfil microbiano ruminal. A nossa hipótese de que maior teor de proteína e alta degradabilidade ruminal provoca variações na microbiota ruminal que resultaria em maior eficiência em utilização de N foi negada, uma vez que nossos resultados demonstraram que o teor de inclusão de proteína na dieta e as fontes com degradabilidade ruminal distintas influenciaram o perfil do ecossistema bacteriano presente no rúmen, mas sem modificar a eficiência de utilização de nitrogênio. Porém constatou-se que uma alta variação na eficiência de utilização de N variou em função da interação x dieta, assim os dados foram clusterizados em baixa, média e alta retenção de N, e o perfil microbiano associado a estes clusters.

Quando os animais receberam 10% PB na dieta e a fonte proteica foi o glúten, ocorreu um aumento do N amoniacal, a reciclagem de N já que observou-se uma tendência de diminuição de excreção fecal e urinária. O fornecimento de pouca proteína na dieta favorece a reciclagem da ureia para atender principalmente a demanda dos microrganismos (SCHWAB e BRODERICK, 2017; HARTINGER et al., 2018), isto foi mais evidente quando a fonte proteica foi glúten uma vez que este ingrediente apresenta baixa proporção de PDR.

Ao se fornecer proteína na dieta de ruminantes os primeiros a serem atendidos são os microrganismos, por isso um dos mecanismos utilizados para a obtenção de N em caso de escassez é a reciclagem da ureia em dietas com limitação de N (SCHWAB e BRODERICK, 2017). A sincronização da energia e nitrogênio disponibilizados na dieta afetam a população de microrganismos que

degradam os compostos nitrogenados no ambiente ruminal (HARTINGER et al., 2018), por exemplo, dietas de alto grão diminuem o pH ruminal influenciando a diversidade bacteriana do rúmen (KIM et al., 2018).

Ao verificar a diversidade bacteriana em vacas, Neubauer et al. (2018), observaram que a inclusão do concentrado na dieta modificou a diversidade do ecossistema ruminal diminuindo o índice Shannon. Em nosso estudo, a fonte proteica que foi inserida na dieta é que alterou a diversidade, diferente do estudo citado, a quantidade de concentrado não afetou a diversidade do ecossistema ruminal.

Apesar do DDG apresentar menor fração proteica solúvel (MAXIN et al., 2013) em comparação ao farelo de soja, o ambiente ruminal ficou mais diverso quando este foi fornecido como fonte proteica, possivelmente devido a fatores que não são diretamente relacionados com a degradação proteica, como queda do pH e rápida digestão do amido. Leupp et al. (2009), verificaram que novilhos alimentados com DDGS apresentaram um aumento linear do pH. Outro fator é que a substituição do milho pelo DDGS faz com que os animais tenham menores ingestões de amido (KHIAOSA-ARD et al., 2015), contribuindo assim para um melhor ambiente ruminal. Em nosso estudo as dietas com DDG tiveram menores inclusões de milho.

Dietas com menor teor de proteína apresentaram valores maiores de riqueza índice Chao 1, podendo estar associado com possível aumento na eficiência de captura do N reciclado pela microbiota ruminal (BRAKE et al., 2010). Por outro lado, o índice de Chao1 também foi maior nas dietas com farelo de soja, pois, juntamente da proteína verdadeira do alimento foi fornecida ureia como fonte de nitrogênio não proteico, e por ser uma fonte de PDR, pode ter contribuído para um ecossistema rico. Portanto, além do teor de concentrado que pode afetar o ambiente ruminal os teores proteicos das dietas também possuem essa característica de modificação desse ecossistema.

Segundo Zhang et al. (2018), ao estudar a comunidade Archaeas presente no solo, constatou-se que o filo dominante Euyarchaeota em ambiente anaeróbico participa de funções como degradação da MO, fixação de nitrogênio, redução do nitrato, metabolismo de enxofre e ferro, além da oxidação do metano. Apesar de todas essas características, em nosso estudo este filo não foi associado com

nenhuma característica de utilização do N, sendo dominante em todas as amostras analisadas, mas sem alteração em sua abundância em função do teor e fonte proteica utilizada na dieta. Diferentemente, Zhou et al. (2017), ao analisar o efeito da suplementação com ureia em bovinos na fase de terminação, constataram que o filo Euryarchaeota era dominante nas Archaeas, e que o gênero *Methanobrevibacter* aumentou com a suplementação de ureia diminuindo a eficiência alimentar.

Os filios Bacteroidetes e Firmicutes, são os mais abundantes no ambiente ruminal em bovinos Nelore (OLIVEIRA et al., 2013; GRANJA-SALCEDO et al., 2017). A justificativa para tal característica é que ambos filios são menos sensíveis a mudanças na dieta fornecida e mais resistentes em ambientes ácidos (NAGATA et al., 2018). Em dietas de alto grão geralmente o milho é fornecido como fonte de carboidratos energéticos, e o tipo de processamento desse grão (quebrado, moído, floculado) influencia quão rapidamente esse será fermentado no rúmen (OWENS et al., 1998). O filo Firmicutes possui espécies que consomem rapidamente os carboidratos recém disponíveis (KIM et al., 2018), essa função pode ter contribuído para maior abundância deste em nosso estudo, uma vez que todas as dietas continham alto teor de concentrado. Além disso, maiores proporções de Firmicutes são encontradas em dietas de alto grão, devido a maior sensibilidade do filo Bacteroidetes composto por microrganismos a alterações de pH (KAMPANN et al., 2012; JIN et al., 2017).

A maior disponibilidade de proteína na dieta pode ter favorecido o metabolismo dos filios Elusimicrobia e Spirochates, que apresentaram maiores abundância nas dietas com 13% de PB. Camparo et al. (2017), ao investigarem os efeitos dos componentes dietéticos de amido e proteínas *in vitro*, não conseguiram elucidar a atividade desses dois filios, mas constataram que ambos possuem genes envolvidos no metabolismo proteico.

Em contrapartida os filios Bacteroidetes e Synergistetes foram menos abundantes quando a dieta continha maior teor proteico, apesar do filo Synergistetes estar envolvido no processo de fermentação de aminoácidos devido ao gene COGE (HUGENHOLTZ et al., 2009). É possível que dieta de alto grão os afetem sendo ambos mais sensíveis, e o aumento na abundância de outros filios podem ter estimulado a competição pelo o substrato fornecido.

Um fator que também contribuiu para a diversificação do ambiente ruminal entre os filos presentes é a degradabilidade das fontes proteicas fornecidas. O farelo de soja possui uma taxa de degradação 14,7%/h enquanto o glúten tem a taxa de 6%/h (CALSAMIGLIA et al., 1995). Kim et al. (2010), evidenciaram que o fluxo de N duodenal foi maior e a digestibilidade de PB foi negativa em dietas com fonte proteica contendo glúten de milho. Os filos Bacteroidetes e Actinobactereria foram mais abundantes nas dietas com farelo de soja, em comparação ao glúten de milho, demonstrando assim que a degradabilidade da fonte utilizada influencia na microbiota ruminal. O filo Actinobacteria foi encontrado em grandes proporções nas forragens e milho que integravam a dieta de bovinos Nelore (OLIVEIRA et al., 2013). E quando estão em situações com nutrientes limitados fazem a morte celular programada que acaba resultando em um acúmulo de aminoácido e nucleotídeo (BARKA et al., 2016), podendo assim tornar-se fonte proteica para outros microrganismos.

O baixo teor de proteína degradável no rumem para o DDG pode ser influenciado pelo o processo de obtenção desse ingrediente com a retirada dos solúveis presentes (MAXIN et al., 2013). A maior abundância do filo de Synergistetes, em dietas com DDG, sugere que os aminoácidos presentes em tal alimento favorecem o desenvolvimento desse filo. Militon et al. (2015), concluíram que o filo Synergistetes pertencem ao grupo de microrganismos que degradam aminoácidos. O DDG é um alimento com baixo teor de lisina e altos teores de alanina, tirosina e leucina (MAXIN et al., 2013).

Dados sobre a possível associação entre a retenção de N e a microbiota ruminal são escassos. No presente estudo, ao relacionarmos animais alimentados com dietas de alto grão e diferentes eficiências de retenção de nitrogênio e a microbiota ruminal, encontramos que a maioria dos microrganismos relacionados à alta retenção de N são gram – negativas.

Além disso, constatamos que estes microrganismos estão associados com a fixação de nitrogênio e produção de aminoácidos e apresentam uma correlação com a excreção de nitrogênio pela urina. Como é o caso do gênero *Endomicrobium_ other*, associando com a alta retenção de N, a espécie *Endomicrobium proavitum*, tem um genoma para codificar 19 aminoácidos, tendo as

principais enzimas para a produção de glutamina e metionina (ZHENG et al., 2017). Também associada a alta retenção de N, a família Spirochateace desempenha um importante papel de fixador de N no intestino de capivaras e cupins, principalmente quando esses animais têm em suas dietas baixos teores de N, pois, este filo possuem homólogos de um gene de nitrogenase (LILBURN et al., 2001; GARCIA-AMADO et al., 2012).

Ao compararmos os resultados de estudos relacionando a microbiota ruminal e a eficiência alimentar, verificamos que o gênero *Endomicrobium_*other não foi reportado nesses estudos (CARBERRY et al., 2012; MYER et al., 2015; ELOLIMY et al., 2018). Já o filo Spirochetes e a família Spirochateace foram identificados em menores proporções em relação aos outros microrganismos e não afetaram a eficiência alimentar (McCANN et al., 2014). Tais comparações nos leva acreditar que esses microrganismos estão diretamente relacionados com eficiência de utilização de N, e que possivelmente os microrganismos relacionados a eficiência alimentar não possuam características para utilização de nitrogênio.

Nossos resultados sugerem que microrganismos associados à alta retenção de N também estão correlacionados com a excreção urinaria de N. O gênero *Victivallis* correlacionou-se positivamente com a ENU e foi associado à alta retenção de N. Este gênero pode estar envolvido na síntese de aminoácidos, uma espécie pertencente ao gênero *Victivallis* isolada de amostras fecais de humanos possui uma sequência específica de aminoácidos composto por 1.427 aminoácidos (TEMUUJN et al., 2012).

O filo Elusimicrobia associado com alta retenção de N, está presente em ambientes anaeróbicos como no intestino de frangos (MEDVECKY et al., 2018). Este microrganismo participa da despoluição das águas realizando a desnitrificação de águas poluídas com nitrogênio, isso ocorre devido sua capacidade de secreção de nitrogenases e a fixação de N, além dessas características estes microrganismos estão envolvidos na degradação peptídica pela transaminação, levando a formação de alanina (TANG et al., 2018). Associados também a alta retenção de N as *Eubacterium* são precursoras da degradação proteica, podendo contribuir com 16% das atividades totais proteolíticas no rúmen (HARTINGER et al., 2018).

O terceiro grupo mais abundante em nosso estudo foram microrganismos não classificados (Unassigned) que se correlacionaram positivamente com a ENF, negativamente com a ENU e estiveram associados a alta retenção de N. Apesar dos avanços nas técnicas de identificação da microbiota ruminal, praticamente em todos os estudos desse ecossistema observa-se uma grande proporção de OTUs não classificadas. Nosso resultado sugere que microrganismos que ainda não foram classificados no ambiente ruminal podem se correlacionar com as rotas de excreção de N e a eficiência de retenção de N no ruminante. Este achado também ressalta a importância de continuar caracterizando o microbioma ruminal, elucidando melhor as interações dieta-microrganismo-animal.

Observamos que a maior parte dos microrganismos envolvidos com a baixa retenção de N estão presentes em ambientes anaeróbicos e relacionados com a utilização de nitrogênio (WOZNY, 1977; COOK et al., 2010; LI et al., 2015; LIU et al., 2018; HARTINGER et al., 2018), por isso é provável que ocorra competição pelo substrato nitrogenado dentro desse ecossistema. Uma parte desses microrganismos estão associados a hiperprodução de amônia e foram associados com a excreção de N urinário.

O gênero *Prevotella* representa de 56 a 60% dos gêneros totais do rúmen (MAO et al., 2016). Presente em nosso estudo a família Prevotellaceae e o gênero *Prevotella*, estiveram associados com baixa retenção de N. É possível que além de participar da degradação de proteína sua participação na degradação do amido, celulose, hemicelulose e pectina (HARTINGER et al., 2018), as tornam menos eficientes na utilização do nitrogênio. Myer et al. (2015), ao analisarem a eficiência alimentar e relacionar com a diversidade microbiana, relataram que animais ineficientes apresentavam maiores proporções de *Prevotella*, justificando que a diversidade de utilização dos nutrientes contribuiu para tal achado.

O gênero *Lactobacillus* esteve associado à baixa retenção de N, tal gênero tem a capacidade de produzir lactato e é correlacionado a quadros de acidose subaguda (METZELER- ZEBELI et al., 2013). A maior abundância do gênero *Lactobacillus* nos grupos de média e baixa retenção resultou no menor pH ruminal desses grupos quando comparados com o grupo de alta retenção de N que apresentou maior pH ruminal e menor abundância desse gênero. O *Lactobacillus*

produz um composto nitrogenado (amina biogênica) que estão presentes em todos os organismos (WANG et al., 2013), porém o excesso dessa substância no ambiente, principalmente em alimentos acaba tornando os mesmos tóxicos, pois o desequilíbrio homeostático celular se torna prejudicial (CARDOZO et al., 2013).

Bactérias pertencentes à família Lachnospiraceae, possuem baixa atividade proteolítica (WALLACE e BRAMMALL, 1985). No ambiente ruminal são competidores com outros microrganismos proteolíticos (HARTINGER et al., 2018). Este tipo de competição pode estar relacionado a correlação negativa observada desta família com a retenção de N, assim como gênero de Lachnospiraceae_other se correlacionou negativamente com a ENF. Pertencente a essa família *Lactonifactor* e *Lachnospiraceae_other* estiveram associados a baixa retenção de nitrogênio e se correlacionaram positivamente com ENF e ENU. Esta família possuem características proteolíticas e peptidolíticas fracas em relação aos outros microrganismos com as mesmas funções (HARTINGER et al., 2018).

Bifidobacterium foi associado a baixa retenção de nitrogênio, apesar de serem bactérias com capacidade ureolítica (WOZNY, 1977). Esse microrganismo é utilizado como probiótico com características de neutralizar a colonização de patógenos pela competição por sítios semelhantes e eles secretam peptídeos antibacterianos (CHEN et al., 2012). Tal característica pode ter beneficiado um mutualismo com o gênero *Coprococcus*, também associado a baixa retenção de N, pois, esse gênero é beneficiado na presença de *Bifidobacterium*, tem sido reportado como produtor de ácido propionico no intestino humano (LIU et al., 2018). Outro possível mutualismo associado à baixa retenção de nitrogênio é dos gêneros *Weissella* e *Lactobacillus*. *Weissella* possuem um gene para a proteína de ligação ao muco e a sequência de nucleotídeos que fazem a interação ocorrerem com outros microrganismos como do gênero *Lactobacillus* (ABRIOUEL et al., 2015).

O gênero *Butyrivibrio* possui duas espécies *B. fibrisolvans* e *B. proteoclasticus*, que foram identificadas em espécies de ruminantes em todos os continentes, atribuindo essa forte presença no ecossistema ruminal devido as suas características na degradação da fibra e principalmente da proteína (HARTINGER et al., 2018). He et al. (2018), identificaram um gênero *Butyrivibrio_2* que sintetiza proteína bacterina a partir do nitrogênio não proteico da dieta, se correlacionando

negativamente com NH_3 e positivamente com o butirato. Em nosso trabalho esse gênero esteve associado com baixa retenção de N e foi correlacionado negativamente com a retenção de N.

O gênero *Mogibacterium* foi correlacionado negativamente com a retenção de N e esteve também associado a baixa retenção de N. Este gênero foi identificado a primeira vez por, Li et al. (2012), e aparentemente não tem capacidade fermentativa e além do ambiente ruminal estão presentes na boca humana (LIU et al.,2015). No ambiente ruminal acredita-se que o *Mogibacterium* fique junto ao epitélio ruminal fazendo a absorção da amônia, além disso observou-se sua abundância em animais alimentados em dietas de alto grão (LIU et al.,2015).

Peptostreptococcaeae é um grupo pertencente às bactérias hiperprodutoras de amônia (HARTINGER et al.,2018). Presente em nosso estudo *Peptostreptococcaeae_other* foi associado a baixa retenção de N e não foi identificado no grupo de alta retenção de N. Se assemelhando com microrganismos do gênero *Clostridium* que estão associados com bactérias hiperprodutoras de amônia (HARTINGER et al.,2018), o gênero *Hespillia*, esteve correlacionando negativamente com a retenção de N e positivamente com a ENU. Estes resultados sugerem que a baixa retenção de nitrogênio pode estar correlacionada a microrganismos com alta capacidade de produção de amônia durante a fermentação ruminal, o que pode favorecer a absorção de amônia pelo epitélio e a maior excreção de N via urina.

5.Conclusão

Os teores e as fontes de proteína presentes nas dietas de ruminantes modificam a diversidade bacteriana ruminal, mas não eficiência de retenção de nitrogênio em bovinos de corte alimentados com dietas de alto grão. A alta retenção de nitrogênio foi associada a microrganismos com capacidade de fixação de nitrogênio e síntese de aminoácidos no ambiente ruminal, assim como ao grupo de OTUs sem classificação. Por outro lado, a baixa retenção de nitrogênio foi associada

a microrganismos que facilitam a maior excreção de nitrogênio urinário, mediante a baixa atividade proteolítica, hiperprodução de amônia e transporte de amônia pelo epitélio ruminal.

6.Referencias

Abriouel, H., Lerma, L. L., Casado Muñoz, M. D. C., Montoro, B. P., Kabisch, J., Pichner, R., & Gálvez, A. (2015). The controversial nature of the *Weissella* genus: technological and functional aspects versus whole genome analysis-based pathogenic potential for their application in food and health. **Frontiers in microbiology**, v 6, p 1197.

AFRC.,Agricultural and Food Research Council(1992) Technical Committee on Response to Nutrients No 9. Nutrients requirements of ruminant animal: Protein. **Nutrition Abstracts and Review (Series B)**. v 6, 2p787-818.

Allen MS e Linton JAV (2007) In vivo methods to measure digestibility and digestion kinetics of feed fractions in the rumen. In: **Simpósio Internacional de Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes**. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. p.72–89.

AOAC. Official Methods of Analysis.(1990) 15th. ed. **Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, VA, USA.

Bach A, Calsamiglia S, Stern MD (2005) Nitrogen Metabolism in the Rumen. **Journal Dairy Science**. v 88:(E. Suppl.):E9–E21.

Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP,Clément C,Ouhdouch Y & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v 80,n1, 1-43.

Brake DW, Titgemeyer EC, Jones ML, & Anderson DE (2010),. Effect of nitrogen supplementation on urea kinetics and microbial use of recycled urea in steers consuming corn-based diets. **Journal of Animal Science**, v 88,n8, 2729-2740.

Cardozo M, Lima KS, Franca TC, & Lima ALS (2013). Aminas biogênicas: um problema de saúde pública. **Revista Virtual de Química**, v 5, n 2, p149-168.

Calsamiglia S, Stern MD, Firkihs JL. (1995). Effects of protein source on nitrogen metabolism in continuous culture and intestinal digestion in vitro. **Journal of Animal Science** v73, p1819–1827.

Calsamiglia S, Ferret A, Reynolds CK, Kristensen NB, Van Vuuren AM (2010) Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal**, v.4, p.1184-1196.

Campanaro S, Treu L, Cattani M, Kougiass PG, Vendramin V, Schiavon S, Tagliapietra F, Giacomini A, Corich, V. (2017). In vitro fermentation of key dietary compounds with rumen fluid: A genome-centric perspective. **Science of the Total Environment**, 584, 683-691.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, New York, v.7, p.335-336.

Carberry CA, Kenny DA, Han S, McCabe MS, Waters SM (2012) The effect of phenotypic residual feed intake (RFI) and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 14, p. 4949-4958.

Cook KL, Rothrock Jr, MJ, Lovanh N, Sorrell JK, & Loughrin, JH. (2010). Spatial and temporal changes in the microbial community in an anaerobic swine waste treatment lagoon. **Anaerobe**, v16, n2, p 74-82.

Chanthakhoun V, Wanapat M, Berg J (2012) Level of crude protein in concentrate supplements influenced rumen characteristics, microbial protein synthesis and digestibility in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Livestock Science**, v 144, n3, 197-204.

Charrad M, Ghazzali N, Boiteau V, Niknafs A (2014). NbClust: An R Package for Determining the Relevant Number of Clusters in a Data Set. **Journal of Statistical Software**, 61(6), 1-36. URL <http://www.jstatsoft.org/v61/i06/>.

Chen XB e Gomes MJ (1992) **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of technical details**. Rowett Research Institute; International Feed Resources Unit, p21.

Chen, W., Liu, F., Ling, Z., Tong, X., & Xiang, C. (2012). Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. **PloS One**, v7, n(6), e39743.

Elolimy AA, Abdelmegeid MK, McCann JC, Shike DW, Looor JJ (2018) Residual feed intake in beef cattle and its association with carcass traits, ruminal solid-fraction bacteria, and epithelium gene expression. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 9(1), 67

Fenner, H (1965) Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, v.48, p. 249–251.

García-Amado MA, Godoy-Vitorino F, Piceno YM, Tom LM, Andersen GL, Herrera, EA, & Domínguez-Bello MG (2012). Bacterial diversity in the cecum of the world's largest living rodent (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Microbial ecology**, v 63, n (4), p 719-725.

Granja-Salcedo YT, Ribeiro CS, De Jesus RB, Gomez IAS, Rivera AR, Messana JD, Canesin RC, Berchielli TT (2016) 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.

Granja-Salcedo YT, Ramirez-Uscategui RA, Machado EG, Messana JD, Kishi LT, Dias AVL, Berchielli TT (2017). Studies on bacterial community composition are affected by the time and storage method of the rumen content. **PloS one**, v12,p(4), e0176701.

Guan LL, Nkrumah JD, Basarab JA, Moore SS (2008). Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. **FEMS microbiology letters**, v288,n(1),p 85-91.

Harterting T, Gresner N, Sudekum KH (2018) Does intra-ruminal nitrogen recycling waste valuable resources? A review of major players and their manipulation. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.9, p 1-21.

Henderson G, COX F, Kittelmann S, Heidarian MV, Zethof M, Noel SJ, Waghorn GC, Janssen PH (2013) Effect of DNA Extraction Methods and Sampling Techniques on the Apparent Structure of Cow and Sheep Rumen Microbial Communities. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n.9. p. e74787.

He F, Liu D, Zhang L, Zhai J, Ma Y, Xu Y, Guangshun J, Ke R. Ma, J. (2018). Metagenomic analysis of captive Amur tiger faecal microbiome. **BMC veterinary research**, v14,n (1), p379.

HeY, Yu Z, Qiu Q, Shao T, Niu W, Xia C, Cao B. (2018). Effects of dietary protein levels and calcium salts of long-chain fatty acids on nitrogen mobilization, rumen microbiota and plasma fatty acid composition in Holstein bulls. **Animal Feed Science and Technology**, v 246, p 1-10.

Hugenholtz P, Hooper SD, Kyripides NC (2009). Focus: synergistetes. **Environmental microbiology**, v11, n(6), p1327-1329.

Huws SA., Creevey CJ et al. (2018) Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: Past, present, and future. **Frontiers in Microbiology**, v9.

Jin W, Xue C, Liu J, Yin Y, Zhu W, Mao S, (2017). Effects of disodium fumarate on in vitro rumen fermentation, the production of lipopolysaccharide and biogenic amines, and the rumen bacterial community. **Current Microbiology**, v74, n(11), p1337-1342.

Kampmann K, Ratering S, Kramer I, Schmidt M, Zerr W, Schnell S, (2012). Unexpected stability of Bacteroidetes and Firmicutes communities in laboratory biogas reactors fed with different defined substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 7, p. 2106-2119.

Kim, K. H., JIN, G. L., OH, Y. K., & SONG, M. K. (2010). Effects of starch and protein sources on starch disappearance in the gastrointestinal tract of Hanwoo (Korean native) steers. **Animal Science Journal**, 81(3), 331-337.

Kim, YH, Nagata, R., Ohkubo, A., Ohtani, N., Kushibiki, S., Ichijo, T., & Sato, S. (2018). Alterações no pH ruminal e reticular e comunidades bacterianas em bovinos da raça Holandesa alimentados com dieta rica em grãos. **Pesquisa veterinária BMC**, v14 p(1), 310.

Kohn RA, Dinneen MM and Russek-Cohen E (2005) Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. **Journal of Animal Science**. v. 83, n. 4, p. 879-889.

Khiaosa-Ard, R., Metzler-Zebeli, BU, Ahmed, S., Muro-Reyes, A., Deckardt, K., Chizzola, R., ... e Zebeli, Q. (2015). A fortificação de grãos secos de destiladores mais solúveis com farelo de semente de uva na dieta modula a mitigação de metano e a microbiota ruminal em Rusitec. **Journal of Dairy Science**, 98 (4), 2611-2626.

Li L, Qin Y, Kong Z, Wu J, Kubota K, & Li YY. (2019). Characterization of microbial community and main functional groups of prokaryotes in thermophilic anaerobic co-digestion of food waste and paper waste. **Science of the Total Environment**, 652, 709-717.

Li S, Peng C, Cheng T, Wang C, Guo L, Li, D. (2019). Nitrogen-cycling microbial community functional potential and enzyme activities in cultured biofilms with response to inorganic nitrogen availability. **Journal of Environmental Sciences**, 76, 89-99.

Li, S. W., Chen, Y. S., Lee, Y. S., Yang, C. H., Sriannual, S., Wu, H. C., & Chang, C. H. (2017). Comparative genomic analysis of bacteriocin-producing *Weissella cibaria* 110. **Applied microbiology and biotechnology**, 101(3), 1227-1237.

Lilburn TG, Kim KS, Ostrom NE, Byzek KR, Leadbetter JR, Breznak JA, (2001). Nitrogen fixation by symbiotic and free-living spirochetes. **Science**, 292(5526), 2495-2498.

Liu G, Chen H, Chen J, Wang X, Gu Q, & Yin Y, (2018). Effects of bifidobacteria-produced exopolysaccharides on human gut microbiota in vitro. **Applied microbiology and biotechnology**, 1-10.

Leupp JL, Lardy GP, Karges KK, Gibson ML, Caton JS, (2009). Effects of increasing level of corn distillers dried grains with solubles on intake, digestion, and ruminal fermentation in steers fed seventy percent concentrate diets. **Journal of animal science**, 87(9), 2906-2912.

Mao SY, Huo WJ, & Zhu WY (2016). Microbiome–metabolome analysis reveals unhealthy alterations in the composition and metabolism of ruminal microbiota with

increasing dietary grain in a goat model. **Environmental microbiology**, 18(2), 525-541.

Maxin G, Ouellet DR, Lapierre H (2013). Ruminal degradability of dry matter, crude protein, and amino acids in soybean meal, canola meal, corn, and wheat dried distillers grains. **Journal of dairy science**, 96(8), 5151-5160.

Medvecky, M., Cejkova, D., Polansky, O., Karasova, D., Kubasova, T., Cizek, A., & Rychlik, I. (2018). Whole genome sequencing and function prediction of 133 gut anaerobes isolated from chicken caecum in pure cultures. **BMC genomics**, 19(1), 561

Metzler-Zebeli BU, Schmitz-Esser S, Klevenhusen F, Podstatzky-Lichtenstein L, Wagner M, & Zebeli Q. (2013). Grain-rich diets differently alter ruminal and colonic abundance of microbial populations and lipopolysaccharide in goats. **Anaerobe**, 20, 65-73.

Militon C, Hamdi O, Michotey V, Fardeau ML, Ollivier B, Bouallagui H, Hamdi M & Bonin, P. (2015). Ecological significance of Synergistetes in the biological treatment of tuna cooking wastewater by an anaerobic sequencing batch reactor. **Environmental Science and Pollution Research**, 22(22), 18230-18238.

McCann JC, Wiley LM, Forbes TD, Rouquette Jr FM, e Tedeschi LO, (2014) Relationship between the rumen microbiome and residual feed intake-efficiency of Brahman bulls stocked on bermudagrass pastures. **PLoS One**, 9(3), e91864

Myer PR, Smith TP, Wells JE, Kuehn LA, e Freetly, HC (2015). Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. **PLoS One**, 10(6), e0129174

Nagata R, Kim YH, Ohkubo A, Kushibiki S, Ichijo T, Sato S (2018). 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.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC (2001) **Nutrients requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington: National Academy Press, p381.

Neubauer V, Petri R, Humer E, Kröger I, Mann E, Reisinger N, Wagner M, e Zebeli Q. (2018). Dietas de alto grão suplementadas com compostos fitogênicos ou leveduras autolisadas modulam a comunidade bacteriana ruminal e fermentação em vacas secas. **Journal of dairy science** , 101 (3), 2335-2349.

Oliveira MNV, Jewell KA, Freitas FS, Benjamin LA, Tótola MR, Borges AC, Moraes, CA, Suen G (2013) Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. **Veterinary microbiology**, 164(3-4), 307-314.

Oliveira CA e Millen DD (2014) Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. **Animal Feed Science and Technology**, v.197, p.64-75.

Owens FN, Secrist DS, Hill WJ e Gill, DR (1998). Acidosis in cattle: a review. **Journal of animal science**, 76(1), 275-286.

Ribeiro GO, Oss DB, He Z, Gruninger RJ, Elekwachi C, Forster RJ, Yang W.; Beauchemin KA, McAllister TA (2017) Repeated inoculation of cattle rumen with bison rumen contents alters the rumen microbiome and improves nitrogen digestibility in cattle. **Scientific Reports**, 7(1), 1276.

Schwab CG e Broderick GA (2017). A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows. **Journal of dairy science**, v 100(12), p 10094-10112.

Schulz, K., Hunger, S., Brown, G. G., Tsai, S. M., Cerri, C. C., Conrad, R., & Drake, H. L. (2015). Methanogenic food web in the gut contents of methane-emitting earthworm *Eudrilus eugeniae* from Brazil. **The ISME journal**, 9(8), 1778.

Silva LFC, Valadares Filho SC, Chizzotti ML, Rotta PP, Prados LFP, Valadares RFD, Zanetti D, Braga JMS (2012) Creatinine excretion and relationship with body weight of Nelore cattle, **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.41, no.3, Viçosa Mar.

Sinclair KD, Garnsworthy PC, Mann GE, Sinclair LA (2014) Reducing dietary protein in dairy cow diets: implications for nitrogen utilization, milk production, welfare and fertility. **Animal**, v 8(02), p 262-274.

Stewart CS, Flint HJ, Bryant MP (1997). The rumen bacteria. in: **The Rumen Microbial Ecosystem**. P.N. HOBSON and Stewart, C. S, eds. Published by Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London

Tang Y, Li M, Xu D, Huang J, & Sun J.(2018). Application potential of aerobic denitrifiers coupled with a biostimulant for nitrogen removal from urban river sediment. **Environmental Science and Pollution Research**, 25(6), 5980-5993.

Temuujin U, Chi WJ, Park JS, Chang YK, Song JY, & Hong SK (2012). Identification and characterization of a novel β -galactosidase from *Victivallis vadensis* ATCC BAA-548, an anaerobic fecal bacterium. **Journal of Microbiology**, 50(6), 1034-1040.

Tamminga S (1992) Nutrition management of dairy-cows as a contribution to pollution-control. **Journal of Dairy Science** 75(1):345–357

Tamminga S (1996) A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. **Journal of Animal Science** 74(12):3112–3124

Valadares Filho SC, Marcondes MI, Chizzotti ML, Paulino PVR (2010) (Eds.) **Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados BR-CORTE**. Viçosa: DZO-UFV, p.113-133.

Valadares RFD, Broderick GA, Valadares Filho SC, Clayton MK (1999) Effect of replacing alfafa with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal Dairy Science**, 82:2686-2696.

Valente TNP, Detmann E, Valadares Filho SC, Cunha MD, Queiroz AC, Sampaio CB (2011) In situ estimation of indigestible compounds contents in cattle 59 feed and feces using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 40(3), 666–675.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583–3597.

Van Soest, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2 edn, (Cornell University Press, 1994)

Verbic J, Chen XB, Macleod NA, Orskov ER (1990) Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v.114, p.243-248.

Wallace RJ, & BRAMMALL ML (1985). The role of different species of bacteria in the hydrolysis of protein in the rumen. **Microbiology**, 131(4), 821-832.

Walker ND, Newbold CJ and Wallace RJJ (2005) Nitrogen metabolism in the rumen. Pages 71–115 in **Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle and the environment**. Pfeffer E and Hristov AN, ed. CAB Int., Wallingford, UK.

Wang DS, Zhang RY, Zhu WY, & Mao SY. (2013). Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and biogenic amines in the rumen of dairy cows. **Livestock Science**, 155(2-3), 262-272.

Wang M, Chen S, Han Y, Chen L, Wang D (2019). Responses of soil aggregates and bacterial communities to soil-Pb immobilization induced by biofertilizer. **Chemosphere**, 220, 828-836.

Wei Y, Yang F, Wu Q, Gao J, Liu W, Liu C, Guo X, Suwal S, Kou Y, Zhang B, Wang Y, Zheng K, Wang, Y. (2018). Protective effects of bifidobacterial strains against toxigenic *Clostridium difficile*. **Frontiers in Microbiology**, 9, 888.

Witzig M, Lengowski MB, Zuber KHR, Mohring J, Rodehutscor M (2018) Effects of supplementing corn silage with different nitrogen sources on ruminal fermentation and microbial populations in vitro. **Anaerobe** 51, 99e109

Wozny MA, Bryant MP, Holdeman LT, & Moore WE (1977). Urease assay and urease-producing species of anaerobes in the bovine rumen and human feces. **Applied and Environmental Microbiology**, 33(5), 1097-1104.

Zoetendal EG, Plugge CM, Akkermans AD, & de Vos WM, (2003). *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 53(1), 211-215.

Zhang Q, Li Y, Xing J, Brookes PC, Xu J, (2018). Soil available phosphorus content drives the spatial distribution of archaeal communities along elevation in acidic terrace paddy soils. **Science of The Total Environment**. 658 (2019) 723–731

Zhang, T., Mu, Y., Zhang, D., Lin, X., Wang, Z., Hou, Q., ... & Hu, Z. (2018). Determination of microbiological characteristics in the digestive tract of different ruminant species. **MicrobiologyOpen**, e769

Zheng H, Dietrich C, & Brune A (2017). Genome analysis of *Endomicrobium proavitum* suggests loss and gain of relevant functions during the evolution of intracellular symbionts. **Applied and environmental microbiology**, AEM-00656.

Zhou JW, Zhong CL, Liu H, Degen AA , Titgemeyer EC, Ding LM, Shang ZH, Guo XS, Qiu Q, Li ZP, Yang, G. (2017). Comparison of nitrogen utilization and urea kinetics between yaks (*Bos grunniens*) and indigenous cattle (*Bos taurus*). **Journal of animal science**, 95(10), 4600-4612.

Declaração de Responsabilidade

“As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade da autora e não necessariamente refletem a visão da FAPES e da CAPES.”

Tabela S1. Mediana e rango interquartil da abundância de unidades taxonômicas operacionais classificadas em teor de filo nas dietas experimentais com diferentes teores (10 e 13%) e fontes (farelo de soja (FS), glúten (GLU) e grãos secos de destilaria (DDG)) de proteína bruta na dieta.

Domínio	Filo							P-valor	
		10			13			Teor	Fonte
		FS	GLU	DDG	FS	GLU	DDG		
Bacterias	Actinobacteria	0,46 ± 0,72 ^a	0,53 ± 0,16 ^c	0,34 ± 0,45 ^b	0,51 ± 1,01 ^a	0,47 ± 0,33 ^c	0,90 ± 0,48 ^b	0,627	<0,001
	Bacteria Other*	75,91 ± 0,01	114,59 ± 0,00	NI	3,61 ± 0,00	72,30 ± 0,01	112,0 ± 0,02	0,627	0,722
	Bacteroidetes	28,93 ± 5,14 ^{Ab}	26,24 ± 8,61 ^{Ac}	23,82 ± 14,28 ^{Aa}	22,69 ± 7,75 ^{Bb}	19,12 ± 7,57 ^{Bc}	19,25 ± 7,74 ^{Ba}	<0,001	<0,001
	Elusimicrobia	0,07 ± 0,10 ^{Ba}	0,08 ± 0,08 ^{Bc}	0,19 ± 0,22 ^{Bb}	0,23 ± 0,43 ^{Aa}	0,12 ± 0,14 ^{Ac}	0,24 ± 0,49 ^{Ab}	<0,001	0,083
	Fibrobacteres	0,32 ± 0,11	0,39 ± 0,39	0,11 ± 0,35	0,43 ± 0,43	0,14 ± 0,14	0,57 ± 0,20	0,627	0,981
	Firmicutes	27,47 ± 7,66	27,31 ± 1,95	27,20 ± 5,81	20,25 ± 9,05	29,66 ± 5,21	28,55 ± 6,49	0,627	0,083
	Lentisphaerae*	3,61 ± 0,01	72,30 ± 0,02	144,59 ± 0,03	506,07 ± 0,01	180,74 ± 0,01	397,63 ± 0,05	0,627	0,083
	Proteobacteria	5,08 ± 7,14	6,22 ± 9,57	4,04 ± 4,97	3,46 ± 3,44	3,83 ± 3,66	9,73 ± 7,26	0,627	0,722
	Spirochaetes	0,90 ± 0,38	0,81 ± 0,41	0,79 ± 0,68	1,81 ± 3,18	1,94 ± 1,18	1,63 ± 1,70	<0,001	0,722
	Synergistetes	0,09 ± 0,22 ^{Ab}	0,14 ± 0,06 ^{Ac}	0,19 ± 0,13 ^{Aa}	0,09 ± 0,07 ^{Bb}	0,05 ± 0,01 ^{Bc}	0,10 ± 0,04 ^{Ba}	<0,001	<0,001
	Tenericutes	0,09 ± 0,33	0,08 ± 0,06	0,06 ± 0,06	0,04 ± 0,09	0,30 ± 0,50	0,20 ± 0,16	0,627	0,722
	Unassigned	26,39 ± 10,04	26,98 ± 14,22	29,35 ± 22,57	39,44 ± 20,05	37,47 ± 14,25	31,70 ± 11,95	0,627	0,722
	Verrumicrobia*	361,48 ± 0,02	3,61 ± 0,00	397,62 ± 0,02	216,89 ± 0,01	7,23 ± 0,02	216,89 ± 0,02	0,627	0,083
Archaea	Euryarchaeota	4,81 ± 0,38	6,04 ± 2,37	5,71 ± 1,93	6,45 ± 2,29	4,41 ± 4,31	6,16 ± 2,08	0,627	0,992

* valores expressos em exponencial x 10⁻⁴; valores seguidos com letras maiúsculas sobrescritas diferenças estatísticas (P <0,10) com base no teste de Friedman para teores de proteína bruta; valores seguidos com letras minúsculas sobrescritas diferenças estatísticas (P <0,10) com base no teste de Friedman para fontes de proteína; NI: não identificado;

Tabela S2. Valores médios de consumo de matéria seca (CMS) e balanço de nitrogênio em novilhos Nelore com diferentes fontes e teores de proteína na dieta

	Teores de PB						EPM	Teor	Fonte	TxF
	10			13						
	FS	GLU	DDG	FS	GLU	DDG				
CMS, kg	5,64	4,79	6,29	5,26	4,26	5,35	0,282	0,296	0,202	0,821
CN, g	96,88	83,86	110,99	134,56	97,88	112,71	2,220	0,111	0,151	0,310
EPBmic g de PBmic/kg MODR	89,24	115,86	26,84	131,09	108,45	119,33	8,472	0,407	0,987	0,319
PBmic, g/d	182,66	138,49	90,85	129,01	80,21	60,65	25,710	0,596	0,480	0,886
N amoniacal, mg/DI	19,62	9,48	11,83	19,35	17,81	9,40	2,175	0,134	0,007	0,012
pH	6,10	6,44	6,46	6,61	6,37	6,40	0,084	0,235	0,578	0,833
ENF% do CN	3,31	9,07	6,23	6,41	5,59	6,64	1,383	0,030	0,233	0,296
ENU% do CN	3,90	5,34	2,38	6,30	1,258	6,73	0,927	0,616	0,844	0,090
RN% do CN	54,00	47,23	51,35	53,07	62,48	50,58	1,662	0,163	0,262	0,100

valores seguidos com letras minúsculas sobrescritas indicam diferenças estatísticas ($P < 0,01$) pelo teste de Duncan; EPM = erro padrão da média, CN = consumo de nitrogênio, PBmic = proteína microbiana ruminal, MODR = matéria orgânica degradada no rúmen, ENF = excreção de nitrogênio fecal, ENU = excreção de nitrogênio urinário, RN = retenção de nitrogênio

Tabela S3. Coeficientes de correlação entre de Spearman entre gêneros bacterianos e retenção de nitrogênio (RN), excreção fecal de nitrogênio (ENF) e excreção urinaria de nitrogênio (ENU) expressas em % de nitrogênio ingerido (NI).

	<i>Prevotella</i>		<i>Elusimicrobia</i>		<i>Mogibacterium</i>		<i>Anaerofustis</i>		<i>Butyrivibrio</i>		<i>Coproccoccus</i>		<i>Hespelia</i>		<i>Lactonifactor</i>		<i>Lachnospiraceae - Other</i>		<i>Syntrophomonas</i>		<i>Victivallis</i>		<i>Anaerobiospirillum</i>		<i>Treponema</i>		<i>Unassigned</i>	
	R	p	R	P	R	p	R	p	r	p	R	p	r	p	R	P	r	P	R	p	r	p	r	p	r	p	r	p
RN, % NI	-0,237	0,264	0,335	0,109	-0,527	0,008	-0,456	0,025	-0,434	0,034	-0,404	0,050	-0,606	0,002	-0,404	0,050	-0,464	0,022	0,282	0,182	0,324	0,123	-0,367	0,078	0,241	0,256	0,255	0,230
ENF, % NI	-0,331	0,114	0,033	0,878	0,044	0,840	0,163	0,447	-0,099	0,646	0,323	0,124	-0,178	0,406	-0,473	0,020	-0,401	0,050	-0,410	0,047	0,178	0,406	-0,386	0,062	0,154	0,474	0,466	0,022
ENU, %NI	0,545	0,006	-0,415	0,044	0,355	0,089	0,201	0,347	0,389	0,060	-0,048	0,822	0,666	0,001	0,545	0,006	0,721	0,007	0,009	0,966	-0,486	0,016	0,575	0,003	-0,478	0,018	-0,598	0,002

Apenas correlações significativas (P<0,05) para pelo menos uma das variáveis avaliadas são mostradas.