UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ELLEN DE ALMEIDA MOREIRA

DIVERSIDADE DE ARCHAEA RUMINAL EM BOVINOS LEITEIROS CRIADOS EM AMBIENTE TROPICAL

ILHÉUS – BAHIA
2019

ELLEN DE ALMEIDA MOREIRA

DIVERSIDADE DE ARCHAEA RUMINAL EM BOVINOS LEITEIROS CRIADOS EM AMBIENTE TROPICAL

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Área de concentração: Produção e Comportamento Animal

Orientador: Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

ILHÉUS – BAHIA

2019

ELLEN DE ALMEIDA MOREIRA

DIVERSIDADE DE ARCHAEA RUMINAL EM BOVINOS LEITEIROS CRIADOS EM AMBIENTE TROPICAL

ILHÉUS-BA, 28/02/2019

_____	_____
Thierry Ribeiro Tomich	Camila Soares Cunha
_____	_____
Alexandre Lima Ferreira	Hilário Cuquetto Mantovani

_____
Luiz Gustavo Ribeiro Pereira
(Orientador)

ILHÉUS – BAHIA

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Acácio e Gizilene, que com muito carinho e amor, não mediram esforços para que eu pudesse concluir mais esta etapa da minha vida. Por estarem sempre ao meu lado me apoiando e amparando em cada dificuldade, e acima de tudo por acreditarem em meus sonhos.

Ao meu irmão, Eric, pela amizade, companheirismo, carinho e apoio de sempre. A minha família por todo apoio, incentivo e compreensão pela ausência.

Ao professor e orientador, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, a quem tenho grande admiração e respeito, pelos ensinamentos, paciência, conselhos, amizade e pela confiança depositada em mim.

À minha amiga Shirley, pela amizade, pelos ensinamentos, conselhos, paciência, por não medir esforços para me ajudar. Aos amigos Alexandre e João Paulo, pela amizade, por toda a ajuda, e principalmente pelos ensinamentos.

Ao André Neves, por todo o suporte com as análises, ensinamentos e incentivo.

Ao professor e co-orientador, José Augusto Gomes Azevedo, pelos ensinamentos e amizade.

Aos pesquisadores da Embrapa Gado de Leite Thierry Ribeiro Tomich, Fernanda Samarini Machado e Mariana Magalhães Campos pelos ensinamentos, apoio e amizade. Aos funcionários e amigos da Embrapa Rosemeire (Meirinha), Marcial (Mengo), José Moreira, Luiz do Carmo, Ernando, Marcão, Cláudio pela amizade e por toda ajuda.

A FAPESB, pela concessão da bolsa de estudos. A Embrapa, FAPEMIG, CNPq e CAPES pelos recursos financeiros concedidos ao Projeto RumenGases, o qual este trabalho faz parte.

DIVERSIDADE DE ARCHAEA RUMINAL EM BOVINOS LEITEIROS CRIADOS EM AMBIENTE TROPICAL

RESUMO

O trato gastrointestinal dos ruminantes abriga comunidade microbiana complexa que permite o aproveitamento de alimentos fibrosos para a geração de produtos de origem animal de elevada densidade nutricional. Essa comunidade microbiana é influenciada pelas espécies hospedeiras, raças, idade, estado de saúde, dieta e localização geográfica. A relação entre a diversidade da comunidade de archaea com a composição racial dos hospedeiros, os planos nutricionais e o tipo de pastejo adotado em condições de clima tropical ainda são pouco estudadas, embora importantes para elucidar como afetam a produção ou o rendimento de metano (CH_4). O presente estudo foi desenvolvido com os objetivos: *i)* avaliar a influência da composição racial do hospedeiro, estratégias de pastejo e planos nutricionais na diversidade da comunidade archaea avaliada por sequenciamento de nova geração e *ii)* estudar a relação da comunidade archaea sobre a produção e rendimento de metano entérico em bovinos leiteiros criados em condições tropicais. Foram desenvolvidos três estudos. No primeiro foram avaliados os efeitos de três composições raciais (Holandês, Holandês x Gir e Gir) e de três planos nutricionais (ingestão de 11, 14 e 19 g/kg de PV) na comunidade archaea e a correlação da população de archaea com as emissões de CH_4, desempenho animal e variáveis relacionadas à fermentação ruminal. No segundo estudo foi avaliado o efeito de duas estratégias de pastejo na comunidade de archaea de vacas Girolando sobre pastejo de gramínea tropical e a correlação da população de archaea com as emissões de CH_4 e desempenho animal. Os intervalos de pastejo foram: (*a*) intervalo de pastejo fixo de 30 dias (30-FG) e (*b*) quando o dossel interceptou 95% de radiação fotossinteticamente ativa (95-LI). No terceiro estudo foi avaliado o impacto do consumo de matéria seca (CMS) na diversidade e abundância da comunidade de archaea e a correlação da população de archaea com as emissões de CH_4 e desempenho animal em novilhos Girolando criados em ambiente tropical. Os resultados do primeiro estudo revelaram que a composição racial influenciou as abundâncias relativas dos gêneros *Methanobrevibacter* e *Methanosphaera*, e da espécie *Methanobrevibacter acididurans*. *Methanosphaera* foi mais abundante nas novilhas da raça

Holandês, enquanto *Methanobrevibacter* e *M. acididurans* foram mais abundantes nos animais da raça Gir. A análise de correlação canônica regularizada mostrou correlação positiva entre o clado *Methanobrevibacter ruminantium* e nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) e correlações negativas entre *Methanosphaera* ISO3-F5 e relação A:P, e o clado *Methanobrevibacter gottschalkii* e $N\text{-}NH_3$. Embora a diversidade da comunidade archaea não tenha sido diferente entre raças e planos alimentares, os resultados deste estudo suportam a hipótese de que existe contribuição da genética do hospedeiro sobre a composição do microbioma ruminal. Em relação ao segundo estudo, foi observado que os intervalos de pastejo e os períodos de pastejo influenciaram as abundâncias relativas das espécies *Methanosphaera sp.* Grupo 5, Grupo 4 MpT1, Grupo 8 sp. WGK1 e Grupo 9 sp. ISO4-G1. *Methanosphaera sp.*Grupo 5 foi mais abundante na estratégia de pastejo 30 – FG no período dois, enquanto Grupo 4 MpT1 e o Grupo 8 sp. WGK1 foram mais abundantes no intervalo de pastejo 95 - LI no primeiro período. Já a abundância relativa pertencente à espécie ISO4-G1 foi mais abundante no segundo período. A análise de correlação canônica regularizada mostrou correlações positivas entre o clado *M. gottschalkii* e CH_4 g/dia, CH_4 g/kg MS_i e CH_4 g/kg PB, bem como entre Grupo 11 sp. BRNA1 e CH_4 g/kg PB. O clado *M. ruminantium* apresentou correlações negativas com CH_4 g/kg MS_i e CH_4 g/kg PB, assim como o clado *Methanobrevibacter boviskoreani* e produção de leite kg/dia. Embora a diversidade da comunidade de archaea não tenha sido diferente entre os intervalos de pastejo, os resultados deste estudo fornecem evidências de que as estratégias de manejo das pastagens pode afetar a composição do microbioma em bovinos leiteiros e existe variação temporal na diversidade de archaea entre os ciclos de pastejo. Já no terceiro estudo, embora a comunidade archaea tenha apresentado baixa diversidade, diferiu entre os níveis de alimentação e foi composta por poucas espécies cuja abundância não diferiu em resposta aos diferentes níveis de CMS. A análise de correlação canônica regularizada mostrou correlações positivas entre Grupo 9 sp. ISO4-G1 e Grupo 4 sp. MpT1 e CH_4 g/kg MS_i, enquanto que a espécie *Methanosphaera* sp. ISO3-F5 apresentou correlação negativa com CH_4 g/kg MS_i.

Palavras-chave: Gado de leite. Gases de efeito estufa. Microbioma. Microbiologia ruminal. Ruminantes.

RUMINAL ARCHAEA DIVERSITY OF DAIRY RAISED IN A TROPICAL ENVIRONMENTAL

ABSTRACT

The gastrointestinal tract of ruminants harbors a microbial complex that allows the use of fibrous foods for a generation of animal products of high nutritional density. This microbial community is influenced by host species and breeds, age, health status, diet and geographic location. The interface between archaea communities with host breed composition, nutritional supplements and grazing type adopted under tropical climatic conditions is still little studied, while those important to elucidate how they affect the production or yield of methane (CH_4). The present study was developed with the objectives of: i) evaluating the influence of host racial composition, pasture management practices and feeding plans on the archaeal community diversity evaluated by new generation sequencing, and ii) studying the relationship of the archaeal community on the production and yield of enteric methane in dairy cattle raised under tropical conditions. Three studies were developed. In the first one, the effects of three breed compositions (Holstein, Holstein x Gyr and Gyr) and three nutritional plans (intake of 11, 14 and 19 g/kg of BW) on the archaeal community and the correlation of the archaeal population with the emissions of CH_4, animal performance and variables related to ruminal fermentation. The second study evaluated the effect of two grazing strategies in the crossbred (Holstein x Gyr) cow archaea community on tropical grass grazing and the correlation of the archaeal population with the CH_4 emissions and animal performance. The grazing intervals were: (*a*) 30-day fixed grazing interval (30-FG) and (*b*) when the canopy intercepted 95% photosynthetically active radiation (95-LI). In the third study, the impact of dry matter intake (DMI) on the diversity and abundance of rumen archaeal communities and the correlation of archaeal population with CH_4 emissions and animal performance on crossbred (Holstein x Gyr) steers raised in a tropical environment were evaluated. The results of the first study revealed that the breed composition influenced the relative abundances of the genera *Methanobrevibacter* and *Methanosphaera*, and of the specie *Methanobrevibacter acididurans*. Methanosphaera was more abundant in Holstein heifers, while *Methanobrevibacter* and *Methanobrevibacter acididurans* were more abundant in the Gir breed. The regularized canonical correlation analysis showed a positive correlation

between *M. acididurans* and Acetate: Propionate (A: P) and negative correlation between *Methanosphaera ISO3-F5* and A: P. Although the diversity of the archaeal community was not different between breeds and nutritional plans, the results of this study support the hypothesis that there is a contribution of host genetics to the composition of the ruminal microbiome. In relation to the second study, it was observed that grazing intervals and grazing periods influenced the relative abundances of the species *Methanosphaera sp.* Group 5, *Group* 4 MpT1, Group 8 sp. WGK1 and Group 9 sp. ISO4-G1. *Methanosphaera sp.* Group 5 was more abundant in grazing strategy 30-FG in period two, while Group 4 MpT1 was more abundant in the grazing interval 95-LI in the first period. However, the relative abundance of the ISO4-G1 species was more abundant in the second period and the *WGK1* species tended to be more abundant in the 95-LI grazing interval in the first period. The regularized canonical correlation analysis showed positive correlations between the clade *Methanobrevibacter gottschallkii* and CH_4 g/day, CH_4 g/kg DMI and CH_4 g/kg CP, as well as between *Mmc.* Group 11 sp. BRNA1 and CH4 g/kg CP. The clade *Methanobrevibacter ruminantium* showed negative correlations with CH_4 g/kg DMI and CH_4 g/kg CP, as well as the clade *Methanobrevibacter boviskoreani* and milk production kg/day. Although the diversity of the archaea community was not different between grazing intervals, the results of this study provide evidence that pasture management strategies may affect the composition of the microbiome in dairy cattle and there is a temporal variation in the diversity of archaea between the grazing cycles. In the third study, although the archaeal community presented low diversity, it differed between feeding levels and was composed of a few species whose abundance did not differ in response to different levels of DMI. Correlated canonical correlation analysis showed positive correlations between Mmc. Group 9 sp. ISO4-G1 and Mmc. Group 4 sp. MpT1 and CH4 g/kg DMI, whereas the species Methanosphaera sp. ISO3-F5 presented negative correlation with CH4 g/kg DMI.

Keywords: Dairy cattle. Greenhouse gases. Microbiome. Rumen microbiology. Ruminants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo dos produtos NADH H^+ e dissipadores de elétrons.....**20**
Figura 2 - A via de formação do metano a partir de acetato, metanol,e CO2. Os números referem-se aos sete passos do ciclo **21**
Figura 3. Comparação da abundância relativa de gêneros e espécies de archaea identificadas nas novilhas Gir, F1 e Hol nos três planos nutricionais **44**
Figura 4. Boxplot representando os índices de riqueza e de diversidade das comunidades de archaea em novilhas Gir, F1 e Hol e os três planos nutricionais.....**45**
Figura 5. Boxplot de archaea diferencialmente abundantes nas novilhas Gir, F1e Hol.....**46**
Figura 6. Gráfico de correlação em círculo e mapa de imagem agrupada (CIM) entre a comunidade de archaea do rúmen a nível de espécie e emissões de CH_4, variáveis fermentativas e de desempenho animal.. .....**47**
Figura 7. Comparação da abundância relativa de espécies de archaea identificadas nos intervalos de pastejo nos dois períodos **63**
Figura 8. Boxplot representando os índices de riqueza e de diversidade das comunidades de archaea de vacas Girolando nos dois intervalos de pastejo e períodos **64**
Figura 9. Boxplot de archaea diferencialmente abundantes nas vacas Girolando nos dois intervalos de pastejo e períodos.....**64**
Figura 10. Gráfico de correlação em círculo e mapa de imagem agrupada (CIM) entre a comunidade de archaea do rúmen a nível de espécies e emissões de CH_4 e variáveis de desempenho **65**
Figura 11. Boxplot representando os índices de riqueza e de diversidade das comunidades de archaea dos novilhos Girolando nos três níveis de alimentação **79**
Figura 12. Comparação da abundância relativa de espécies de archaea identificadas nos níveis de alimentação.....**80**
Figura 13. Gráfico de correlação em círculo e mapa de imagem agrupada (CIM) entre a comunidade de archaea do rúmen a nível de espécies e emissões de CH_4 e variáveis de desempenho de novilhos Girolando **81**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medidas de diversidade baseada em unidades taxonômica operacionais da comunidade de archaea do rúmen de novilhas Gir, F1 e Hol nos três planos nutricionais **43**

Tabela 2. Dados meteorológicos mensais em Coronel Pacheco (MG) **57**

Tabela 3. Medidas de diversidade baseada em unidades taxonômicas operacionais da comunidade de archaea do rúmen de vacas Girolando nos dois intervalos de pastejo e períodos **62**

Tabela 4. Medidas de diversidade baseada em unidades taxonômica operacionais da comunidade de archaea do rúmen de novilhos Girolando nos três níveis de alimentação..... **78**

SUMÁRIO

RESUMO ..... **ix**
ABSTRACT ..... **vii**
SUMÁRIO ..... **viii**
1 INTRODUÇÃO **10**
2 OBJETIVOS **11**
3 REVISÃO DE LITERATURA **11**
3.1 Composição do microbioma ruminal **11**
3.1.1 Bactérias **12**
3.1.2 Protozoários **12**
3.1.3 Fungos **13**
3.1.4 Archaea **14**
3.2 Interações entre archaea e outros microrganismos no rúmen **15**
3.3 Fermentação ruminal **18**
3.4 Metanogênese **20**
3.5 Métodos de mensuração de metano **22**
3.6 Técnicas moleculares para identificação de metanogênicos **23**
3.7 Fatores que afetam a metanogênese no rúmen **25**
4 REFERÊNCIAS **27**
5 CAPÍTULO I **36**
RESUMO **37**
ABSTRACT **38**
5.1 INTRODUÇÃO **39**
5.2 MATERIAL E MÉTODOS **40**
5.3 RESULTADOS **43**
5.4 DISCUSSÃO **47**
5.5 CONCLUSÕES **50**
5.6 REFERÊNCIAS **50**
6 CAPÍTULO II **53**
RESUMO **54**
ABSTRACT **55**
6.1 INTRODUÇÃO **56**

6.2 MATERIAL E MÉTODOS 57
6.3 RESULTADOS 62
6.4 DISCUSSÃO 66
6.5 CONCLUSÕES 67
6.6 REFERÊNCIAS 68
7 CAPÍTULO III 71
RESUMO 72
ABSTRACT 73
7.1 INTRODUÇÃO 74
7.2 MATERIAL E MÉTODOS 75
7.3 RESULTADOS 78
7.4 DISCUSSÃO 81
7.5 CONCLUSÕES 83
7.6 REFERÊNCIA 83
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS 87

1 INTRODUÇÃO

A atividade pecuária envolve milhões de pessoas no mundo, tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. Com um aumento esperado na população mundial de 7,4 bilhões para 9,6 bilhões em 2050, haverá uma maior demanda de produtos de origem animal como leite e carne per capita. Portanto, um grande desafio na produção pecuária é aumentar a produtividade e, ao mesmo tempo, reduzir o impacto ambiental. (GERBER et al., 2013).

Nas últimas décadas, concentrações crescentes de gases de efeito estufa (GEE) na atmosfera levaram ao aumento das temperaturas globais e das mudanças climáticas. Dentre os vários GEE, a agropecuária contribui de forma significativa com a emissão de três deles: metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e óxido nitroso (NO_2) (IPCC, 2014). As emissões de metano derivam de várias fontes, entretanto as maiores fontes globais de CH_4 são as áreas úmidas naturais e construídas. Além dessas fontes de produção de CH_4 também existem as fontes antropogênicas, como plantações de arroz, criação de animais domesticados, aterros e queima de combustíveis fósseis (ARONSON et al., 2013). A pecuária contribui significativamente para a produção de GEE, segundo ao Quarto Inventário Brasileiro de Emissões de GEE (MCT, 2017), em 2017 a fermentação entérica respondia por cerca de 90% do total de emissões de CH_4 referentes ao setor de agricultura no Brasil.

A produção de metano a partir de ruminantes ocorre durante a digestão microbiana dos alimentos no rúmen, que abriga um grande número de microrganismos que têm a capacidade de converter alimentos ricos em fibras em produtos de elevada densidade nutricional, como leite e carne. A produção de CH_4 depende do tipo de alimento e do hospedeiro (JOHNSON; JOHNSON, 1995). Além disso, a produção de CH_4 pode ser influenciada por diversos fatores, como dieta, raça, localização geográfica, e parâmetros fisiológicos, como tempo de mastigação, tamanho e taxa de passagem do rúmen (HENDERSON et al., 2015; JAMI; MIZRAHI, 2012). Esses fatores podem beneficiar certos tipos de comunidades microbianas no rúmen, o que, por sua vez, influencia a digestão dos alimentos em produtos finais que podem afetar a produção animal.

Recentemente, com a possibilidade de utilização de sequenciamento de nova geração, avanços na pesquisa em microbiologia ruminal têm crescido nos últimos anos (AUFFRET et al., 2017; BAINBRIDGE et al., 2016; CARBERRY et al., 2012; CERSOSIMO et al., 2016; DANIELSSON et al., 2017; HENDERSON et al., 2015; KITTELMANN et al., 2014; WALLACE et al., 2015), entretanto os estudos conduzidos com animais criados em

condições de clima tropical ainda são limitados (CUNHA et al., 2017, 2018, DIAS et al., 2017, 2018), assim é necessário a realização de estudos nessas condições para a melhor compreensão de como a diversidade do microbioma relaciona-se com a utilização de alimentos e a produção de CH_4.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi investigar a estrutura e a diversidade de populações de archaea em bovinos leiteiros e as relações entre populações metanogênicas e a produção de CH_4 em animais criados em ambiente de clima tropical.

Os objetivos específicos dos estudos descritos nos Capítulos I-III foram:

- Investigar correlações entre emissões de CH_4, estrutura da comunidade de archaea, desempenho animal e variáveis fermentativas (Capítulo I - III);
- Investigar o efeito da composição racial e planos nutricionais na comunidade de archaea (Capítulo I);
- Investigar o efeito de intervalos de pastejos na comunidade de archaea (Capítulo II);
- Avaliar o impacto do consumo de matéria seca na diversidade e abundância de archaea (Capítulo III).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Composição do microbioma ruminal

O ecossistema ruminal é um ambiente diverso, estritamente anaeróbio e, apresenta relações ecológicas complexas envolvendo principalmente bactérias (10^{10}-10^{11} células/ml), archaea (10^7 a 10^9cel/ml), protozoários (10^4-10^6/ml), fungos anaeróbios (10^3-10^5 zoósporo/ml) e bacteriófagos (10^8-10^9/ml) (KAMRA, 2005), podendo ser atribuídos a diferentes grupos funcionais, que degradam a ampla variedade de componentes dos alimentos ou metabolizam alguns dos produtos formados por outros microrganismos. Apesar da importância da população microbiana ruminal para a saúde e a produtividade animal, o conhecimento sobre a diversidade desta população precisa ser ampliado, uma vez que, menos de 1% dos microrganismos do rúmen foram cultivados e identificados. A estrutura dessa comunidade microbiana é influenciada por muitos fatores, incluindo espécies hospedeiras, idade, estado de saúde, dieta, localização geográfica, variações genotípicas e fisiológicas individuais e uso de

antibióticos. Desta forma, os princípios como nicho de ocupação, pressão seletiva, adaptação e interações entre as populações, bem como a cinética de utilização do substrato devem ser levados em consideração na avaliação do microbioma ruminal e suas interações (CARBERRY et al., 2012; TAJIMA et al., 2001).

3.1.1 Bactérias

As bactérias ruminais formam o grupo mais diversificado dentro do rúmen, capaz de utilizar fibra, amido, proteína e açúcares. No rúmen, podem ser observadas quatro subpopulações de bactérias: (*i*) população composta por bactérias livres no líquido ruminal; (*ii*) população de bactérias ligada às partículas de alimento; (*iii*) população de bactérias ligada ao epitélio ruminal; e (*iv*) bactérias associadas a superfície dos protozoários (KOIKE et al., 2003; MCALLISTER et al., 1994). Populações bacterianas associadas às partículas de alimentos são predominantes e respondem por até 75% da comunidade bacteriana do rúmen (KOIKE et al., 2003). As bactérias associadas ao epitélio representam apenas uma pequena fração da comunidade de bactérias do rúmen e estão mais intimamente relacionadas à atividade metabólica do hospedeiro do que as bactérias do conteúdo ruminal (WALLACE et al., 1979).

A comunidade bacteriana do rúmen é responsável pela quebra dos componentes dos alimentos, permitindo que os ruminantes obtenham cerca de 70% da energia metabolizável a partir da fermentação ruminal dos alimentos (HERNANDEZ-SANABRIA et al., 2012). As bactérias do rúmen são altamente diversificadas e variam em sua especificidade de substrato, sendo que a maioria utiliza monômeros liberados do material vegetal pela hidrólise de polímeros, como celulose, hemicelulose, pectina, amido e lipídios (STEWART et al., 1997), sendo os filos Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria os mais abundantes (TAPIO et al., 2017b). *Ruminococcus*, *Butyrivibrio* e *Fibrobacter* abrigam as principais espécies celulolíticas conhecidas, e o gênero *Prevotella*, apesar de não ser celulolítico, engloba uma grande variedade de espécies com diferentes capacidades de degradação do substrato (MIZRAHI; JAMI, 2018).

3.1.2 Protozoários

Os protozoários são microrganismos eucarióticos unicelulares, e embora sejam menores em riqueza comparados às bactérias e archaea, respondem por até 50% da biomassa microbiana do rúmen e podem contribuir para aproximadamente um terço da degradação dos

alimentos (WILLIAMS; COLEMAN, 1997). Os protozoários ciliados do rúmen são metabolicamente ativos, sendo capazes de influenciar a fermentação dos alimentos e as comunidades microbianas do rúmen e, consequentemente a quantidade e a proporção dos produtos finais da fermentação. Os protozoários produzem grandes quantidades de hidrogênio (H_2) através do englobamento de matéria orgânica, principalmente bactérias, em vacúolos digestivos onde ocorre a hidrólise (MORGAVI et al., 2010), desta forma, para aumentar o acesso ao H_2, os microrganismos metanogênicos do rúmen estão simbioticamente envolvidos com os protozoários. Como resultado, segundo Newbold et al. (1995) 9% a 25% dos microrganismos metanogênicos do rúmen estão associados aos protozoários (dentro ou em contato próximo).

Protozoários são de dois tipos principais: Holotricha e Entodiniomorfos. As diferenças entre os protozoários Holotricha e Entodiniomorfos parecem estar relacionadas à preferência de substrato, consumo de O_2, produção de H_2, taxa de crescimento e produtos finais de fermentação. Assim, pode-se esperar que alguns protozoários tenha um impacto maior sobre a metanogênese ruminal do que outros. Em apoio a essa premissa, Belanche et al. (2015) observaram que os protozoários Holotricha parecem estar mais intimamente relacionados com a produção de CH_4 do que os Entodiniomorfos. Contudo, permanece desconhecido se este efeito depende da presença de um maior número de metanogênicos associados aos protozoários Holotricha, ou da presença de uma população específica de metanogênicos associados a esses protozoários (BELANCHE et al., 2014).

3.1.3 Fungos

Os fungos anaeróbios também constituem parte integrante do microbioma ruminal e mostraram contribuir para a digestão da parede celular da planta. Os fungos presentes no rúmen pertencem ao filo Neocallimastigomycyota, sendo responsáveis por 5% a 20% da biomassa microbiana do rúmen (GRUNINGER et al., 2014). Devido à presença de diferentes enzimas, como proteases, celulases e hemicelulases, tem sido sugerido que os fungos desempenham um papel central na colonização e ruptura de tecidos lignocelulolíticos permitindo uma maior acessibilidade à fibra (MIZRAHI; JAMI, 2018). Similarmente aos protozoários, os fungos anaeróbios possuem organelas especializadas chamadas hidrogenossomas, que durante a fermentação produzem H_2, CO_2, acetato, formato, lactato e etanol como resíduos metabólicos (GRUNINGER et al., 2014). As dietas à base de fibras

estimulam o crescimento fúngico no rúmen, em comparação com dietas ricas em carboidratos solúveis (KAMRA, 2005).

Os fungos anaeróbios do rúmen, assim como os protozoários ciliados, permanecem pouco conhecidos, em relação à diversidade. A dificuldade na análise taxonômica dos fungos decorre do fato de que o marcador rRNA comumente usado, região espaçadora do transcrito interno 1 (ITS 1 - *Internal Transcribed Space*), é limitada em suas informações filogenéticas para fungos. Koetschan et al. (2014) propuseram o uso adicional de uma estrutura secundária central comum da região ITS1 dos fungos anaeróbicos para melhorar a capacidade de classificação taxonômica dos fungos usando sequenciamento de alto rendimento. A melhora na classificação dos fungos no rúmen possibilitou a avaliação recente de sua composição e dinâmica em diferentes animais e dietas. No estudo de Ishaq et al. (2017) ao avaliarem o efeito da acidose ruminal subaguda (SARA) induzida, observaram que as vacas leiteiras ao mudarem abruptamente de uma dieta rica em fibras para uma dieta de alto grão com ou sem suplementação com levedura seca ativa para induzir SARA aumentou drasticamente o número e abundância na taxa de fungos raros. O tratamento com levedura ativa aumentou a riqueza fúngica, mas não a diversidade. Já Tapio et al. (2017a) ao avaliarem o efeito de dietas com baixo e alto concentrado e com ou sem suplementação de óleo de girassol na comunidade microbiana ruminal, observaram uma queda na abundância de fungos em dietas com alto concentrado sem adição de óleo. Em outro estudo, Kittelmann et al. (2014) ao avaliarem a correlação entre a estrutura da comunidade microbiana ruminal e o rendimento de CH_4 de ovinos não observaram diferença na estrutura da comunidade fúngica em relação às emissões de CH_4 dos ovinos.

3.1.4 Archaea

As archaea são um grupo de procariontes que constituem um domínio da vida filogeneticamente separado e, embora se assemelhem morfologicamente a bactérias, elas diferem em sua parede celular e composição da membrana (GRIBALDO et al., 2006). Os microrganismos metanogênicos exibem uma diversidade química de paredes celulares, como a pseudomureína em espécies de *Methanobrevibacter* e *Methanobacterium*, e as paredes compostas por metanocondroitina de *Methanosarcina* (MADIGAN et al., 2016). Existem também importantes diferenças entre os cofatores presentes em diferentes espécies de metanogênicos, como variações sistemáticas nas quantidades relativas de análogos da

coenzima F_{420}, pterinas e corrinóides do tipo B12 em diferentes espécies metanogênicas (STEWART et al., 1997).

As archaea metanogênicas são um grupo filogeneticamente diverso estritamente anaeróbico com metabolismo de energia restrito à formação de CH_4 a partir de dióxido CO_2 e H_2, formato, metanol, metilaminas e/ou acetato, podendo ser encontradas em diferentes ambientes anaeróbios (CERSOSIMO; WRIGHT, 2015; THAUER et al., 2008). Atualmente, existem sete ordens conhecidas de microrganismos metanogênicos: Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanococcales, Methanocellales, Methanopyrales, Methanosarcinales e a recém-descoberta ordem Methanomassiliicoccales. De acordo com Cersosimo e Wright (2015), 120 espécies e 33 gêneros de microrganismos metanogênicos foram identificados no rúmen.

No rúmen, alguns metanogênicos vivem em uma relação simbiótica com outros microrganismos, como bactérias e protozoários, e outros são de vida livre. Existe uma relação sinérgica entre os microrganismos fermentadores que produzem H_2 e metanogênicos que utilizam H_2, envolvendo a transferência interespecífica de H_2. Esta relação sinérgica aumenta a fermentação dos alimentos, mantendo a pressão de H_2 baixa (THIELE et al., 1988). A maioria dos metanogênicos no rúmen são hidrogenotróficos, ou seja, utilizam o H_2 produzido através da fermentação ruminal para reduzir o CO_2 em CH_4 (MORGAVI et al., 2010). Estes incluem espécies do gênero *Methanobrevibacter*, como *Methanobrevibacter gottschalkii*, *Methanobrevibacter thaueri* e *Methanobrevibacter millerae* (JANSSEN; KIRS, 2008). Outras vias de metanogênese podem ser encontradas no rúmen de animais adultos, como a metilotrófica usada pela família Methanomassiliicoccaceae (POULSEN et al., 2013) e as vias acetoclásticas menos prevalentes usadas por membros da ordem de Methanosarcinales (LAMBIE et al., 2015; MORGAVI et al., 2010).

3.2 Interações entre archaea e outros microrganismos no rúmen

O rúmen abriga um grande número de diferentes espécies de microrganismos e, a interações entre esses grupos é essencial para sustentar suas populações e atividades no rúmen, no entanto essas interações ainda não são totalmente compreendidas (WOLIN et al., 1997). A interação dos metanogênicos com outras bactérias através da transferência de H_2 interespécies no processo de fermentação permite que os microrganismos metanogênicos ganhem energia para seu próprio crescimento, enquanto o acúmulo de H_2 é evitado, o que

beneficia o crescimento de bactérias produtoras de H_2 permitindo maior degradação dos alimentos ingeridos (BOADI et al., 2004).

As bactérias celulolíticas desempenham um papel fundamental no ecossistema ruminal, uma vez que, a maioria dos membros deste grupo produz H_2 como produto final da fermentação e grande parte do ataque primário dos alimentos ingerido pelos ruminantes é mediado por essas bactérias. Para um contínuo processo de fermentação, o H_2 liberado como subproduto da fermentação deve ser continuamente removido do rúmen. Embora as archaea estejam envolvidas diretamente apenas nos estágios finais da fermentação, elas são importantes, pois são capazes de utilizar efetivamente elétrons na forma de H_2 para reduzir o CO_2 para CH_4, mantendo assim a pressão de H_2 no rúmen baixa. Desta forma, na sua ausência, a transferência de H_2 interespécies é afetada, e o acúmulo de H_2 no rúmen inibe a reoxidação de coenzimas envolvidas nas reações redox nas células bacterianas, afetando os processos de fermentação (BOADI et al., 2004; MORGAVI et al., 2010; WOLIN et al., 1997).

Kittelmann et al. (2014) identificaram três ruminótipos diferentes que pareciam estar associados a variações na produção de CH_4 em ovelhas. Dois destes (Q e S) foram ligados a rendimentos significativamente mais baixos de CH_4 do que o terceiro tipo (H). O ruminótipo Q de baixo CH_4 foi associado a proporção acetato:propionato significativamente menor que S e H, e abrigou abundâncias relativas altas de *Quinella ovalis* produtora de propionato. O ruminótipo S de baixo CH_4 foi caracterizado por *Fibrobacter spp.*, *Kandleria vitulina*, *Olsenella spp.*, *Prevotella bryantii* e *Sharpea azabuensis*, produtoras de lactato e succinato. O ruminótipo H de alto CH_4 apresentou maiores abundâncias relativas de espécies pertencentes a *Ruminococcus,* Clostridiales, *Prevotella* entre outros, muitos dos quais são conhecidos por formar quantidades significativas de H_2. Em outro estudo, Danielsson et al. (2017) observaram dois clusters distintos relacionados à produção de metano em vacas leiteiras. Um cluster foi associado com baixa produção de CH_4 (cluster L) enquanto o outro cluster foi associado com alta produção de CH_4 (cluster H) e os emissores médios ocorreram em ambos os clusters. As diferenças entre os clusters foram principalmente ligadas às abundâncias diferenciais de certas OTUs pertencentes à *Prevotella*. Além disso, várias OTUs pertencentes à família Succinivibrionaceae foram dominantes em amostras pertencentes ao cluster L. De forma semelhante, Kamke et al. (2016) também encontraram agrupamentos semelhantes na composição da comunidade bacteriana em ovinos relacionados a emissores de alto, baixo e médio rendimento de CH_4. Já, Chaucheyras-Durand et al. (2010) observaram que a produção

de CH_4 foi reduzida quando a espécie fibrolítica não produtora de H_2, *Fibrobacter succinogens*, era predominante, sem prejudicar significativamente a degradação das fibras e da fermentação ruminal.

A conversão de H_2 e CO_2 em acetato por meio da acetogênese ocorre em muitos ecossistemas anaeróbios microbianos, e é uma via competitiva para a produção de CH_4. A conversão de H_2 e CO_2 em CH_4 é termodinamicamente mais favorável e produz mais energia do que a conversão de H_2 e CO_2 em acetato. Entretanto, a perda de energia da alimentação e a emissão de CH_4 para a atmosfera pela produção de CH_4 poderiam ser minimizadas, se H_2 e CO_2 forem utilizados para formar acetato em vez de CH_4 (GAGEN et al., 2015; LE VAN et al., 1998). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a homoacetogênese é estimulada após a inibição seletiva de metanogênicos e o uso de leveduras como aditivo alimentar ruminal (FONTY et al., 2007; LE VAN et al., 1998; NOLLET et al., 1998). No entanto, tentativas de aumentar a acetogênese através do aumento do número de homoacetogênicos no rúmen de forma natural ou pela adição de isolados não-ruminais não obtiveram sucesso em diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* (DEMEYER et al., 1996; IMMIG et al., 1996).

A produção de H_2 por protozoários do rúmen via fermentação fornece substrato para os metanogênicos, e os protozoários se beneficiam da remoção de H_2, uma vez que o H_2 é inibidor de seu metabolismo. Além disso, os protozoários também podem fornecer vantagem aos metanogênicos extinguindo o oxigênio (O_2) através de seus hidrogenossomos tolerantes ao O_2, ou agindo como um veículo para a retenção de metanogênicos de crescimento mais lento no rúmen (NEWBOLD et al., 1995; WILLIAMS; COLEMAN, 1997). Os protozoários do rúmen não são essenciais para a sobrevivência do hospedeiro, portanto a defaunação tem sido amplamente utilizada para estudar o papel dos protozoários ciliados no rúmen. A defaunação foi, portanto, investigada em relação à produção de CH_4 e, embora alguns estudos não tenham mostrado correlação entre os protozoários e a produção de CH_4 (BIRD et al., 2008; HEGARTY et al., 2008; MORGAVI et al., 2012), outros estudos confirmaram essa relação (HEGARTY, 1999; MORGAVI et al., 2010; NEWBOLD et al., 1995; RANILLA et al., 2007). Em uma recente meta-análise, Newbold et al. (2015) observaram redução de 11% da produção de CH_4 na ausência de protozoários no rúmen.

Os fungos anaeróbicos presentes no rúmen, assim como os protozoários, produzem quantidades abundantes de H_2, juntamente com CO_2, formato e acetato como produtos finais do seu metabolismo. Portanto, a colaboração entre fungos e metanogênicos produtores de H_2 representa outro exemplo de transferência interespecífica de H_2. Vários estudos investigaram

as interações entre fungos do rúmen e metanogênicos (GRUNINGER et al., 2014; TAPIO et al., 2017b). Embora haja motivos para supor que a abundância de fungos possa estar relacionada às emissões de CH_4, existem poucos trabalhos correlacionando os fungos e as emissões de CH_4. Cunha et al. (2017) ao avaliarem a correlação das comunidades microbianas do rúmen de vacas leiteiras de baixa e alta produção de leite, bem como a de vacas secas, criadas em condições tropicais com as emissões de CH_4 e características de produção animal, não observaram correlações significativas com as emissões de CH_4. Wang et al. (2017) relataram um declínio na emissão de CH_4 após a eliminação dos fungos no rúmen, o que foi associado com a reduzida produção de H_2 e com uma mudança no padrão de fermentação de acetato para propionato, que compete com a metanogêneses para utilização do H_2.

3.3 Fermentação ruminal

Em ruminantes, a degradação das macromoléculas dos alimentos ingeridos ocorre no rúmen, retículo e omaso, que juntos são chamados de retículo-rúmen. O rúmen é colonizado por uma microbiota densa e geneticamente diversa, composta por diversas espécies de bactérias, protozoários, archaea e fungos, que interagem entre si desempenhando um papel importante na digestão dos alimentos e no fornecimento de nutrientes para o hospedeiro (CHENG; MCALLISTER, 1997; MIZRAHI; JAMI, 2018).

A comunidade microbiana ruminal é responsável pela fermentação e degradação de fibras vegetais convertendo o material vegetal em compostos digestíveis, como ácidos graxos voláteis (AGV), e servem como a principal fonte de energia para o hospedeiro (NAGARAJA et al., 1997). Quando os alimentos entram no rúmen, os microrganismos primários, como bactérias, fungos e protozoários, começam a digerir as macromoléculas dos alimentos, com o auxilio de diversas enzimas produzidas por esses microrganismos. Para a hidrólise das estruturas das cadeias de celulose, são necessárias diversas enzimas, como as celulases, xilanases, β-glucanases, amilase, e proteases, que podem ser de origem endógena e microbiana (MOSS et al., 2000; WANG; MCALLISTER, 2002).

A fermentação da glicose, liberada a partir da degradação das macromoléculas dos alimentos, é um processo oxidativo que ocorre principalmente pela rota glicolítica de Emden-Meyerhof-Parnas (EMP), gerando cofatores reduzidos como NADH. Para que a fermentação continue é necessário a reoxidação desses cofatores por meio de reações e desidrogenase, liberando H_2 no rúmen (Figura 1). O NAD+ é regenerado por transferência de elétrons através de receptores de elétrons que não seja o O_2, como CO_2, sulfato, nitrato ou fumarato. O

transporte de elétrons está ligado à geração de ATP como resultado de um gradiente de elétrons gerado através da membrana onde esses cofatores estão presentes. Nesse processo, dois ATPs são consumidos na fase inicial da fosforilação das hexoses, e quatro ATPs são formados durante a oxidação das trioses (KOZLOSKI, 2011; MOSS et al., 2000; RUSSELL; WALLACE, 1997).

A partir do piruvato várias rotas diferentes podem ser utilizadas até a formação dos produtos finais da fermentação, que são principalmente os ácidos graxos voláteis (acetato, propionato e butirato), CO_2 e CH_4. Na produção de acetato, inicialmente o piruvato é oxidado por uma piruvato desidrogenase ligada ao NAD para formar acetil coenzima-A (acetil-CoA), sendo a transferência de elétrons mediada por uma ferredoxina. A seguir, acetil-CoA é substituída por um grupo fosfato, formando acetil-fosfato, por uma reação de fosfotransacetilase reversível. Na ultima fase, o acetil-fosfato é influenciado pelo acetato quinase, produzindo ATP e liberando acetato. Já na produção de butirato, duas moléculas de o acetil-SCoA são convertidas em acetoacetil–SCoA por uma série de reações, e sequencialmente é reduzido, desidratado e reduzido novamente formando o butiril-SCoA. O grupo SCoA é substituído por um grupo fosfato, originando butiril-fosfato, no qual é posteriormente é desfosforilado, liberando butirato e formando um ATP (KOZLOSKI, 2011; RUSSELL; WALLACE, 1997).

O proprionato pode ser sintetizado por duas vias diferentes no rúmen: a do succinato ou do acrilato. A produção de propionato pela via do succinato envolve a carboxilação do piruvato para formar oxaloacetato, que é reduzido a malato pela malato desidrogenase. O malato é então desidratado por fumarase, com fumarato sendo hidrogenado por uma fumarato redutase. Alternativamente, o fosfoenolpiruvato pode ser convertido diretamente a oxaloacetato pela ação de uma transcarboxilase, tendo metilmalonil-SCoA como doador do grupo carboxila. Os estágios finais do metabolismo do propionato implicam na formação de succinil-CoA, uma reação mutase dependente de vitamina B12, uma descarboxilação e a hidrólise do éster CoA. Na via do acrilato, inicialmente o piruvato é convertido a lactato, o qual associa-se com a coenzima-A, formando lactil-SCoA, que é em seguida desidratado formando acrilil-SCoA, e posteriormente reduzido por uma flavoproteína, formando por final o propionato. Esta via não inclui uma carboxilação ou descaboxilação. A redução do acetil-CoA envolve uma cadeia de transporte de elétrons empregando ferredoxina e uma flavoproteína de transporte de elétrons. A formação de propionato por esta rota não resulta na síntese de ATP (KOZLOSKI, 2011; RUSSELL; WALLACE, 1997).

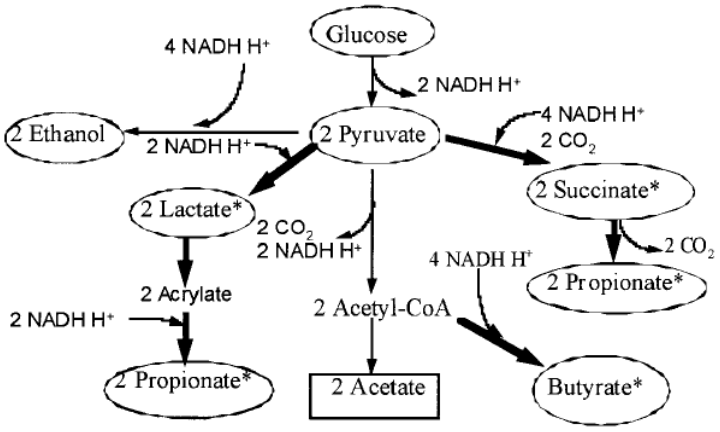

Figura 1 - Metabolismo dos produtos NADH H^+ e dissipadores de elétrons. Fonte: MOSS et al.(2000)

As proporções dos produtos finais da fermentação no rúmen podem mudar de acordo com a dieta que chega ao rúmen, resultando em diferentes quantidades de H_2 formado e, portanto, a quantidade de CH_4 formado por unidade de alimento digerido depende da quantidade de H_2 formado. A produção de acetato e butirato promovem a produção de metano, uma vez que resultam em uma maior liberação de H_2 líquido, enquanto a formação de propionato pode ser considerada como um caminho competitivo para o uso de H_2 no rúmen, reduzindo a disponibilidade de substrato para a metanogênese (JANSSEN, 2010).

3.4 Metanogênese

No rúmen, a formação de CH_4 (metanogênese) é a maior e mais importante via de remoção de H_2, que é um dos principais produtos finais da fermentação dos alimentos pelas bactérias, protozoários e fungos (MOSS et al., 2000). A via da metanogênese varia dependendo dos substratos, podendo assim as archaea ser divididas em três categorias nutricionais: *i*) hidrogenotróficas, que oxidam H_2 e reduzem o CO_2, entretanto alguns também podem usar formato para reduzir o CO_2; *ii*) metilotróficas, que usam compostos metílicos, como as metilaminas e o metanol; e *iii*) acetoclásticas, que utilizam acetato para produção de CH_4. Além disso, alguns dos metanogênicos são versáteis e podem usar vários substratos (GARCIA et al., 2000).

Bioquimicamente, a metanogênese é um processo complexo que envolve diversas coenzimas, sendo quase totalmente exclusivas dos metanogênicos, como a coenzima M, metanofurano e coenzima F_{420} (WHITMAN et al., 2006). O metabolismo energético dos

metanogênicos pode ser constituído de duas fases: uma etapa oxidativa, na qual a coenzima M (HS-CoM) e a coenzima B (HS-CoB) são oxidadas, e uma etapa redutora, na qual o heterodissulfureto da coenzima M e coenzima B é reduzido (THAUER, 1998).

A redução do CO_2 para CH_4 envolve sete etapas (Figura 2). Inicialmente o CO_2 é reduzido com o transportador C_1 metanofurano (MFR) para formilmetanofurano catalisada pela formilmetanofurano desidrogenase (Fwd). Posteriormente o grupo formil é transferido do MFR para o segundo transportador C_1 a tetra-hidrometanopterina (H_4MPT) catalisado por formilmetanofurano: H_4MPT formiltransferase (Ftr). O formil-H_4MPT é então reduzido a metil-H_4MPT através do metil-H_4MPT ciclohidrolase (Mch), metileno-H_4MPT desidrogenase dependente de F_{420} (Mtd) e metileno-H_4MPT redutase dependente de F_{420} (Mer). O grupo metil da metil-H_4MPT é transferido para coenzima M (CoM) através da metil-H_4MPT:CoM metiltransferase transmembranar (Mtr). A metil-CoM redutase (Mcr) é responsável pela redução final do grupo metil ao CH_4. A coenzima B (CoB) é o doador de elétrons direto nesta redução, e o CoB oxidado forma o heterodissulfeto com CoM (CoM-S-S-CoB). E por final o CoM-S-S-CoB é reduzido pelo complexo heterodissulfureto redutase (Hdr) para produzir HS-CoM. O potencial de membrana gerado a partir de Fwd e Mtr contribui para o potencial de membrana envolvido na conservação de energia. A formação de metil-CoM, a reciclagem de CoM e a formação de CH_4 é conservada com as outras vias de metanogênese (LIU; WHITMAN, 2008; THAUER, 1998; WHITMAN et al., 2006).

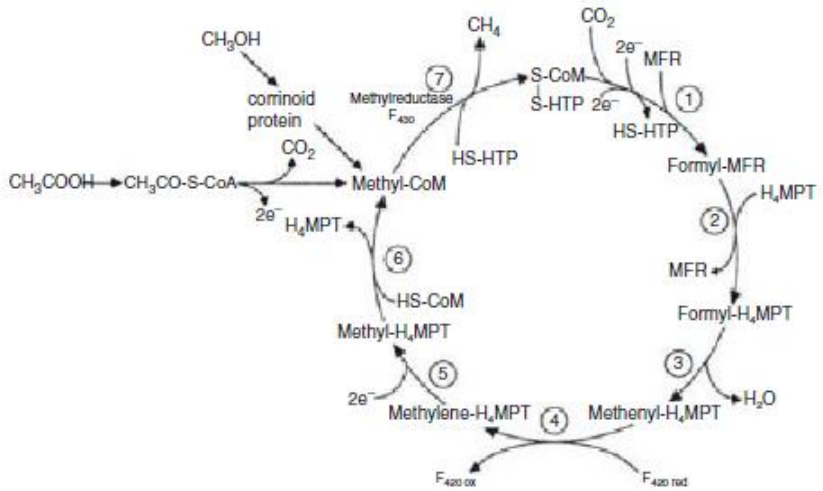

Figura 2 - A via de formação do metano a partir de acetato, metanol e CO2. Os números referem-se aos sete passos do ciclo. Fonte: WHITMAN et al. (2006)

Na via acetoclástica, o acetato é primeiro convertido em acetil-coenzima A pela acetil-CoA sintetase ou por acetato quinase (Ack) e fosfoacetil transferase (Pta). O monóxido de carbono (CO) desidrogenase cliva então a acetil-CoA, liberando o CO e transferindo o grupo metil para H_4MPT, entrando na via de metanogênese em Mtr. O CO é o oxidado pela ferrodoxina (Fdx) e H_2, produzindo CO_2, que alimenta a via da metanogênese (FOURNIER; GOGARTEN, 2008). A via metilotrófica, dependendo do doador de elétrons, pode ocorrer de duas formas diferentes: *i*) se tem H_2, o grupo metil do metanol é transferido para HS-CoM por duas metiltransferases (Mt1 e Mt2) e *ii*) quando o H_2 está ausente, parte do metanol é oxidado para servir como redutor no sistema metil redutase. Os grupos metílicos entram na via da metanogênese na etapa final da metanogênese, onde ocorre a redução do grupo metil pela Mcr (WHITMAN et al., 2006).

As reações envolvidas na produção de CH_4 no rúmen são os únicos mecanismos geradores de energia das archaea. As archaea possuem dois mecanismos de conservação de energia: (*i*) uma força próton-motiva associada à reação de metil-redutase, utilizada para conduzir a síntese de ATP, e (*ii*) uma força sódio-motiva formada durante a metanogênese e utilizada para conduzir a oxidação de grupos metil durante o crescimento a partir de compostos metílicos. Quando o metano é formado a partir de H_2 e CO_2, o ATP é produzido a partir da força sódio-motiva formada durante a transferência do grupo metil de metanopterina para CoM através da enzima metil-transferase. Em seguida, esse estado energizado da membrana comanda a síntese de ATP, por meio de uma ATPase próton-dirigida após a conversão da força sódio-motiva em uma força próton-motiva pela troca de Na^+ por H^+ através da membrana (MADIGAN et al., 2016).

3.5 Métodos de mensuração de metano

Atualmente, existem diversos métodos disponíveis para a mensuração de CH_4, todos com suas vantagens e desvantagens. Métodos confiáveis são importantes quando se estima a quantidade de CH_4 produzida de indivíduos e/ou diferentes tipos de dietas, uma vez que, a escolha do método afeta os resultados. A escolha do método para mensuração de CH_4 depende do objetivo do estudo, e diversos fatores precisam ser levados em conta, como o nível de precisão exigido, a escala e o planejamento dos experimentos. Além disso, o custo em relação à qualidade dos resultados de um determinado método também deve ser levado em consideração (BHATTA; ENISHI, 2007).

As câmaras respirométricas são consideradas o método padrão para mensuração de CH_4, uma vez que, permite mensurações completas da produção de CH_4, consumo de O_2 e produção de CO_2, e quantificação da produção de calor que ocorre simultaneamente, permitindo assim estimar a taxa metabólica do corpo inteiro (KAIYALA; RAMSAY, 2011). Além disso, apresenta acurada mensuração e baixa variabilidade, entretanto o investimento para o estabelecimento das câmaras respirométricas é alto, a capacidade limitada do sistema pode restringir o número de animais, além de criar um ambiente artificial que pode afetar o comportamento animal (BHATTA; ENISHI, 2007; STORM et al., 2012).

Na tentativa de superar essas restrições, a técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF_6) foi desenvolvida, o que elimina a necessidade de confinamento do animal, permitindo que as emissões de CH_4 sejam estimadas em condições de pastejo (JOHNSON et al., 2007). A técnica do gás traçador SF_6 baseia-se na taxa de liberação conhecida do gás traçador SF_6 e na razão entre a concentração de SF_6 e CH_4, onde o SF_6 é fornecido através de uma cápsula de permeação, a qual é colocada no rúmen, e a razão entre as concentrações de CH_4 e SF_6 é medida e corrigida com base nas concentrações do ambiente, e uma vez que, a concentração do gás traçador é conhecida, a taxa de produção de CH_4 pode ser calculada (HILL et al., 2016). Embora esse método apresente a vantagem de poder ser usado em animais em seu ambiente natural, é necessário alta demanda de mão de obra e tem alta variabilidade (STORM et al., 2012).

A produção de CH_4 também pode ser medida com métodos *in vitro*, embora os métodos *in vivo* sejam mais precisos, uma vez que medem diretamente no animal, a mensuração *in vitro* apresenta baixo custo, além de ser menos onerosa (BHATTA; ENISHI, 2007). Este método prediz o CH_4 ruminal e permite estudos de cinética de fermentação. Essa abordagem leva em conta a dinâmica ruminal da degradabilidade e cinética de fermentação no rúmen. As técnicas *in vitro* são utilizadas para simular o que ocorre *in vivo*, portanto é importante ter conhecimento das limitações do método (STORM et al., 2012).

3.6 Técnicas moleculares para identificação de metanogênicos

O isolamento de microrganismos é um passo importante no processo de compreensão da biologia e ecologia de espécies microbianas. No entanto, a maioria dos microrganismos em ambientes naturais normalmente não cresce em condições de laboratório, devido à dificuldade de simulação do ambiente ruminal em condições de laboratório. Inicialmente, a compreensão da comunidade microbiana do rúmen era dependente dos métodos de cultura, entretanto com

o avanço das técnicas de biologia molecular vários métodos independentes de cultura foram desenvolvidos nos últimos anos, e os avanços nas técnicas moleculares e o uso de marcadores moleculares como o gene rRNA 16S e as regiões ITS tem superado as limitações *in vitro* no estudo da diversidade microbiana do rúmen levando a uma compreensão mais aprofundada da comunidade ruminal (TAPIO et al., 2017b; ZHOU et al., 2011).

Para a quantificação de certas espécies ou grupos de espécies, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é um método independente de cultura comumente utilizado, e tem sido usada em muitos estudos sobre a microbiota ruminal para comparar diferenças entre indivíduos, dietas e efeitos de aditivos alimentares (NATHANI et al., 2013; WALLACE et al., 2015; ZHOU et al., 2009). Entretanto, a qPCR apresenta alto custo de ensaio e baixo rendimento. Além disso, a construção de *primers* para qPCR depende fortemente de sequências existentes em bancos de dados (ZHOU et al., 2011).

Técnicas moleculares de fingerprinting podem ser usadas para comparação entre tratamentos ou outros tipos de mudanças no ambiente de estudo, a fim de estudar a ecologia microbiana do rúmen. As técnicas de tipagem molecular mais utilizadas são eletroforese em gel desnaturante com gradiente (DGGE – *denaturing gradient gel electrophoresis*) e o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição terminal (T-RFLP – *terminal restriction fragment length polymorphism*) (ZHOU et al., 2011). A DGGE é um método de tipagem molecular que permite a separação de amplicons de tamanhos iguais com diferentes sequências em diferentes gradientes desnaturantes, onde a diversidade da comunidade metanogênica pode ser visualizada comparando os vários padrões de bandas, onde cada banda representa um filotipo microbiano, que podem diferir em suas sequências de bases de forma significativa ou até por uma única mudança de base (MUYZER et al., 1993). O T-RFLP é um método de perfil microbiano onde um gene alvo é amplificado por PCR a partir do DNA usando um conjunto de *primers*, no qual um dos dois tem a extremidade marcada com um corante fluorescente. Os produtos da PCR são tratados com uma enzima de restrição que corta o DNA em sequências específicas gerando informações de impressão digital que são visualizados em forma de bandas (LIU et al., 1997; ZHOU et al., 2011). Entretanto, tal como acontece em outras tecnologias baseadas em PCR, o T-RFLP pode subestimar a diversidade microbiana (FIERER; JACKSON, 2006).

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH – *fluorescence in situ hybridization*) é um procedimento em que sondas de fluorescência são utilizadas para hibridizar com genes específicos, permitindo a distribuição da população alvo dentro de uma comunidade

microbiana a ser investigada. As sondas fluorescentes podem ser utilizadas na identificação filogenética de microrganismos que contêm uma sequência de ácido nucleico complementar à sonda. (AMANN et al., 2001; KONG et al., 2010).

A análise da biblioteca de clones de DNA pode ser usada para se obter o uso de homólogos para analisar a diversidade e as relações filogenéticas entre os membros das comunidades microbianas. As bibliotecas de clones podem ser construídas a partir de amplicons de PCR, geralmente aplicado a genes comumente expressos em amostras direcionadas, como o gene rRNA 16S e o gene mcrA para metanogênicos (CHOUARI et al., 2005). Atualmente, a análise da biblioteca de genes rRNA 16S tem sido amplamente utilizado para identificar os constituinte dentro de um ecossistema microbiano (SHIN et al., 2004; TAJIMA et al., 2001; TAN et al., 2011a).

A estimativa da diversidade genética tornou-se possível devido ao sequenciamento do gene rRNA 16S, que fornece uma visão das comunidades microbianas complexas. O sequenciamento do gene rRNA 16S é um dos marcadores genéticos universais para a análise da comunidade microbiana procariota, uma vez que, existem na maioria das espécies microbianas, entretanto têm regiões variáveis de V1 a V9 em suas sequências que permitem a separação em diferentes grupos taxonômicos (KOTHARI et al., 2018; THULASI et al., 2015).

Novas tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, como Roche - 454, Illumina - Solexa, Applied Biosystems - SOLiD e Helicos BioSciences, são tecnologias massivas de sequenciamento de baixo custo que permitem o sequenciamento de produtos de PCR sem uma etapa extra de clonagem, além disso, fornece uma nova visão sobre todo o genoma do ambiente ruminal, incluindo genes que estão presentes dentro dessa comunidade microbiana em níveis muito baixos (METZKER, 2010). Vários pesquisadores estão empregando o sequenciamento de amplicons para explorar o microbioma ruminal e suas alterações em resposta a diferentes fatores variáveis (CERSOSIMO et al., 2016; HENDERSON et al., 2015; JAMI; MIZRAHI, 2012; PAZ et al., 2016; ROEHE et al., 2016).

3.7 Fatores que afetam a metanogênese no rúmen

A metanogênese pode ser afetada por diversos fatores, incluindo dieta, raça, localização geográfica, e parâmetros fisiológicos, como tempo de mastigação, tamanho e taxa de passagem do rúmen (HENDERSON et al., 2015; MIZRAHI; JAMI, 2018). Portanto, as principais estratégias de mitigação da metanogênese baseia-se na inibição do crescimento ou atividade metabólica dos metanogênicos, ou ainda na modulação do microbioma ruminal para

que a fermentação seja deslocada para a diminuição da produção de H_2 (BOADI et al., 2004; PATRA et al., 2017).

O consumo de matéria seca (CMS) é um dos principais fatores que afetam a metanogênese. A produção total de CH_4 (g/dia) está positivamente correlacionada com a ingestão de MS, mas o rendimento de CH_4 (g/kg MSi) tende a diminuir com o aumento do consumo, entretanto, a extensão do declínio varia com o tipo de alimento (PINARES-PATIÑO et al., 2009). Isto provavelmente está relacionado ao aumento da taxa de passagem no rúmen, diminuição na digestão da fibra, maior eficiência microbiana e uma tendência a concentrações molares mais elevadas de propionato (PINARES-PATIO et al., 2003). Maior CMS com maior produção de leite e menores rendimentos de CH_4, são frequentemente observados em dietas com carboidratos mais digeríveis. A produção de CH_4 aumenta quando a proporção de volumoso na dieta aumenta. O rendimento de CH_4 da fermentação ruminal de forragens de leguminosas é geralmente menor que o rendimento de forragem de gramíneas. Além disso, o estágio de maturação, método de conservação, tratamento químico e processamento físico também afetam a de produção de CH_4. Wallace et al. (2014) observaram que a dieta altamente concentrada resultou em menores emissões de CH_4 do que a dieta com uma quantidade de concentrado média. Além disso, também observaram que a produção de CH_4 foi correlacionada com a abundância de archaea, independentemente da raça. De forma semelhante, McGovern et al. (2017) observaram efeitos do CMS na composição de espécies metanogênicas ativas no rúmen. Em outro estudo, Moate et al. (2017) relataram menor emissão de CH_4 em animais alimentados com dieta contendo farelo de trigo em substituição à cevada.

Outro fator que pode afetar a metanogênese são os metabólitos secundários presentes nas plantas, tais como taninos, saponinas, flavonoides, compostos organossulfurados e óleos essenciais, visto que são tóxicos para vários tipos de microrganismos no rúmen (KUMAR et al., 2014; PATRA et al., 2017). Os taninos diminuem a produção de CH_4 inibindo diretamente os metanogênicos e indiretamente diminuindo a produção de H_2 como resultado da diminuição da digestão da fibra e da população de protozoários no rúmen (PATRA et al., 2012). Estudos sobre as relações entre a estrutura e atividade dos taninos mostraram que os tipo S e pesos moleculares podem afetar a produção de CH_4 e abundância e diversidade de archaea no rúmen (SAMINATHAN et al., 2015, 2016, TAN et al., 2011a, 2011b). Os óleos essenciais ocorrem amplamente em plantas e animais, podendo consistir de compostos voláteis de origem terpenóide ou não terpenóide (BOADI et al., 2004). Óleos essenciais estão

presentes em muitas plantas e podem desempenhar um papel importante contra ataques bacterianos, fúngicos ou de insetos. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser atribuída aos terpenóides e compostos fenólicos, por exemplo, monoterpenos, limoneno, timol e carvacrol. No entanto o modo específico de ação dos constituintes dos óleos essenciais ainda é pouco compreendido (CIESLAK et al., 2013). Pawar et al. (2014) ao avaliarem o efeito de sete óleos essenciais (alho, cravo, capim-limão, cúrcuma, e canela) nas emissões de CH_4 observaram redução de 38,5% na emissão de CH_4 com o óleo de alho. Já Günal et al. (2017) ao verificar o efeito de quatro diferentes óleos essenciais (cravo, tomilho branco, citronela e anis) na produção de CH_4 observaram que embora a adição de óleo de anis e de tomilho branco tenham resultado em menor produção de CH_4, eles tiveram impacto negativo na fermentação microbiana ruminal, por outro lado, o óleo de cravo reduziu a produção de CH_4 sem afetar a fermentação ruminal.

As gorduras são adicionadas às dietas de gado leiteiro para aumentar a densidade energética das dietas, aumentar a produção de leite e modificar a composição de ácidos graxos da gordura do leite, além disso, a produção de CH_4 também pode ser consistentemente reduzida pela adição de gordura ou ácidos graxos às dietas de ruminantes. No entanto, a inclusão de lipídeos em níveis acima de 6% a 7% do CMS pode reduzir o consumo de alimento e a digestibilidade da fibra, resultando em menor produção de leite ou ganho diário (BOADI et al., 2004; KUMAR et al., 2014). Lyons et al. (2017) observaram mudança na composição da comunidade de archaea do rúmen de cordeiros alimentados com óleo de linhaça. Em outro estudo, ao investigarem o efeito do ácido oleico na produção de CH_4, foi observado que a suplementação com o ácido oleico na dieta pode reduzir a produção de CH_4 e aumentar a quantidade de alguns ácidos graxos. Já Kim et al. (2014) observaram que a diversidade de metanogênicos associados aos protozoários ciliados foi reduzida em mais de 50% na utilização de óleo de coco e coco em pó.

4 REFERÊNCIAS

AMANN, R.; FUCHS, B. M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 231–236, 2001.

ARONSON, E. L.; ALLISON, S. D.; HELLIKER, B. R. Environmental impacts on the diversity of methane-cycling microbes and their resultant function. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 225, 2013.

AUFFRET, M. D. et al. Identification, Comparison, and Validation of Robust Rumen

Microbial Biomarkers for Methane Emissions Using Diverse Bos Taurus Breeds and Basal Diets. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2642, 2017.

BAINBRIDGE, M. L. et al. Rumen bacterial communities shift across a lactation in Holstein, Jersey and Holstein × Jersey dairy cows and correlate to rumen function, bacterial fatty acid composition and production parameters. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 5, p. fiw059, 2016.

BELANCHE, A.; DE LA FUENTE, G.; NEWBOLD, C. J. Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, n. 3, p. 663–677, 2014.

BELANCHE, A.; DE LA FUENTE, G.; NEWBOLD, C. J. Effect of progressive inoculation of fauna-free sheep with holotrich protozoa and total-fauna on rumen fermentation, microbial diversity and methane emissions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 3, 2015.

BHATTA, R.; ENISHI, O. Measurement of Methane Production from Ruminants. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1305–1318, 2007.

BIRD, S. H.; HEGARTY, R. S.; WOODGATE, R. Persistence of defaunation effects on digestion and methane production in ewes. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, n. 2, p. 152, 2008.

BOADI, D. et al. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, n. 3, p. 319–335, 2004.

CARBERRY, C. A. et al. Effect of phenotypic residual feed intake and dietary forage content on the rumen microbial community of beef cattle. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 14, p. 4949–58, 2012.

CERSOSIMO, L. M. et al. Influence of periparturient and postpartum diets on rumen methanogen communities in three breeds of primiparous dairy cows. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 78, 2016.

CERSOSIMO, L. M.; WRIGHT, A.-D. G. Rumen Methanogens. In: **Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution**. New Delhi: Springer India, 2015. p. 143–150.

CHANGE, I. P. ON C. **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F. et al. Influence of the composition of the cellulolytic flora on the development of hydrogenotrophic microorganisms, hydrogen utilization, and methane production in the rumens of gnotobiotically reared lambs. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 24, p. 7931–7, 2010.

CHENG, K.-J.; MCALLISTER, T. A. Compartmentation in the rumen. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. p. 492–522.

CHOUARI, R. et al. Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 1104–

1115, 2005.

CIESLAK, A. et al. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **animal**, v. 7, n. s2, p. 253–265, 2013.

CUNHA, C. S. et al. Assessing the impact of rumen microbial communities on methane emissions and production traits in Holstein cows in a tropical climate. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 492–499, 2017.

CUNHA, C. S. et al. Compositional and structural dynamics of the ruminal microbiota in dairy heifers and its relationship to methane production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2018.

DANIELSSON, R. et al. Methane Production in Dairy Cows Correlates with Rumen Methanogenic and Bacterial Community Structure. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 226, 2017.

DEMEYER, D.; FIEDLER, D.; DE GRAEVE, K. Attempted induction of reductive acetogenesis into the rumen fermentation in vitro. **Reproduction Nutrition Development**, v. 36, n. 3, p. 233–240, 1996.

DIAS, J. et al. Effect of Pre-weaning Diet on the Ruminal Archaeal, Bacterial, and Fungal Communities of Dairy Calves. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1553, 2017.

DIAS, J. et al. Bacterial Community Dynamics across the Gastrointestinal Tracts of Dairy Calves during Preweaning Development. **Applied and environmental microbiology**, v. 84, n. 9, p. AEM.02675-17, 2018.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 3, p. 626–631, 2006.

FONTY, G. et al. Establishment and Development of Ruminal Hydrogenotrophs in Methanogen-Free Lambs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6391 LP-6403, 2007.

FOURNIER, G. P.; GOGARTEN, J. P. Evolution of acetoclastic methanogenesis in Methanosarcina via horizontal gene transfer from cellulolytic Clostridia. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 1124–7, 2008.

GAGEN, E. J.; DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Acetogenesis as an alternative to methanogenesis in the rumen. In: **Livestock production and climate change**. Wallingford: CABI, 2015. p. 292–303.

GARCIA, J.-L.; PATEL, B. K. .; OLLIVIER, B. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. **Anaerobe**, v. 6, n. 4, p. 205–226, 2000.

GERBER et al. 2013. **Tackling climate change through livestock – A global Assessment of emissions and mitigation opportunities**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

GRIBALDO, S.; BROCHIER-ARMANET, C. The origin and evolution of Archaea: a state of the art. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 361, n. 1470, p. 1007–22, 2006.

GRUNINGER, R. J. et al. Anaerobic fungi (phylum *Neocallimastigomycota*): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, n. 1, p. 1–17, 2014.

GÜNAL, M.; PINSKI, B.; ABUGHAZALEH, A. A. Evaluating the effects of essential oils on methane production and fermentation under *in vitro* conditions. **Italian Journal of Animal Science**, v. 16, n. 3, p. 500–506, 2017.

HEGARTY, R. S. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, n. 8, p. 1321, 1999.

HEGARTY, R. S. et al. Effects of the absence of protozoa from birth or from weaning on the growth and methane production of lambs. **British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 06, p. 1220, 2008.

HENDERSON, G. et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14567, 2015.

HERNANDEZ-SANABRIA, E. et al. Impact of feed efficiency and diet on adaptive variations in the bacterial community in the rumen fluid of cattle. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1203–14, 2012.

HILL, J. et al. Measuring Methane Production from Ruminants. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 26–35, 2016.

IMMIG, I. et al. Attempts to induce reductive acetogenesis into a sheep rumen. **Archiv für Tierernaehrung**, v. 49, n. 4, p. 363–370, 1996.

ISHAQ, S. L. et al. An Investigation into Rumen Fungal and Protozoal Diversity in Three Rumen Fractions, during High-Fiber or Grain-Induced Sub-Acute Ruminal Acidosis Conditions, with or without Active Dry Yeast Supplementation. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1943, 2017.

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33306, 2012.

JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology**, v. 160, n. 1–2, p. 1–22, 2010.

JANSSEN, P. H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3619–25, 2008.

JOHNSON, K. A. et al. The SF6 Tracer Technique: Methane Measurement From Ruminants. In: **Measuring Methane Production From Ruminants**. Dordrecht: Springer Netherlands,

2007. p. 33–67.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 8, p. 2483–2492, 1995.

KAIYALA, K. J.; RAMSAY, D. S. Direct animal calorimetry, the underused gold standard for quantifying the fire of life. **Comparative biochemistry and physiology.** Part A, Molecular & integrative physiology, v. 158, n. 3, p. 252–64, 2011.

KAMKE, J. et al. Rumen metagenome and metatranscriptome analyses of low methane yield sheep reveals a Sharpea-enriched microbiome characterised by lactic acid formation and utilisation. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 56, 2016.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, n. 1, p. 124-135, 2005.

KIM, E. T. et al. Effects of Coconut Materials on <i>In vitro</i> Ruminal Methanogenesis and Fermentation Characteristics. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 12, p. 1721–1725, 2014.

KITTELMANN, S. et al. Two Different Bacterial Community Types Are Linked with the Low-Methane Emission Trait in Sheep. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103171, 2014.

KOETSCHAN, C. et al. Internal Transcribed Spacer 1 Secondary Structure Analysis Reveals a Common Core throughout the Anaerobic Fungi (Neocallimastigomycota). **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91928, 2014.

KOIKE, S. et al. Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 4, p. 1429–35, 2003.

KONG, Y. et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of microbial communities in the rumens of cattle fed different diets. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 20, p. 6933–8, 2010.

KOTHARI, R. K. et al. Comprehensive Exploration of the Rumen Microbial Ecosystem With Advancements in Metagenomics. In: **Metagenomics**. Elsevier, 2018. p. 215–229.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2011.

KUMAR, S. et al. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 31–44, 2014.

LAMBIE, S. C. et al. The complete genome sequence of the rumen methanogen Methanosarcina barkeri CM1. **Standards in genomic sciences**, v. 10, p. 57, 2015.

LE VAN, T. D. et al. Assessment of reductive acetogenesis with indigenous ruminal bacterium populations and Acetitomaculum ruminis. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3429–36, 1998.

LIU, W. T. et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4516–22, 1997.

LIU, Y.; WHITMAN, W. B. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 171–189, 2008.

LYONS, T. et al. Linseed Oil Supplementation of Lambs' Diet in Early Life Leads to Persistent Changes in Rumen Microbiome Structure. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1656, 2017.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MCALLISTER, T. A. et al. Microbial Attachment and Feed Digestion in the Rumen. **Journal of Animal Science**, 1994. 72:3004-3018.

MCGOVERN, E. et al. Plane of nutrition affects the phylogenetic diversity and relative abundance of transcriptionally active methanogens in the bovine rumen. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13047, 2017.

METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2010.

MCT. **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil**. Disponível em: <http://sirene.mcti.gov.br/documents/1686653/1706227/4ed_ESTIMATIVAS_ANUAIS_WEB.pdf/a4376a93-c80e-4d9f-9ad2-1033649f9f93>. Acesso em: 10 ago. 2018.

MIZRAHI, I.; JAMI, E. Review: The compositional variation of the rumen microbiome and its effect on host performance and methane emission. **animal**, p. 1–13, 2018.

MOATE, P. J. et al. Wheat is more potent than corn or barley for dietary mitigation of enteric methane emissions from dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 9, p. 7139–7153, 2017.

MORGAVI, D. P. et al. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**, v. 4, n. 07, p. 1024–1036, 2010.

MORGAVI, D. P. et al. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause–effect relationship. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 03, p. 388–397, 2012.

MOSS, A. R.; JOUANY, J.-P.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, n. 3, p. 231–253, 2000.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. 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, 1993.

NAGARAJA, T. G. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: **The Rumen Microbial**

Ecosystem. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. p. 523–632.

NATHANI, N. M. et al. Comparative evaluation of rumen metagenome community using qPCR and MG-RAST. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 55, 2013.

NEWBOLD, C. J. et al. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1313, 2015.

NEWBOLD, C. J.; LASSALAS, B.; JOUANY, J. P. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 230–234, 1995.

NOLLET, L. et al. Effect of the addition of Peptostreptococcus productus ATCC 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell-free supernatant of Lactobacillus plantarum 80. **Animal Feed Science and Technology**, v. 71, n. 1–2, p. 49–66, 1998.

PATRA, A. et al. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 13, 2017.

PATRA, A. K.; MIN, B.-R.; SAXENA, J. Dietary Tannins on Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract in Ruminants. In: **Dietary Phytochemicals and Microbes**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 237–262.

PAWAR, M. M. et al. Effects of Essential Oils on In Vitro Methanogenesis and Feed Fermentation with Buffalo Rumen Liquor. **Agricultural Research**, v. 3, n. 1, p. 67–74, 2014.

PAZ, H. A. et al. Rumen Bacterial Community Composition in Holstein and Jersey Cows Is Different under Same Dietary Condition and Is Not Affected by Sampling Method. **Frontiers in Microbiology**, v. 07, p. 1206, 2016.

PINARES-PATIÑO, C. et al. Effects of intensification of pastoral farming on greenhouse gas emissions in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, n. 5, p. 252–261, 2009.

PINARES-PATIO, C. S. et al. Rumen function and digestion parameters associated with differences between sheep in methane emissions when fed chaffed lucerne hay. **The Journal of Agricultural Science**, v. 140, n. 2, p. S0021859603003046, 2003.

POULSEN, M. et al. Methylotrophic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, p. 1428, 2013.

RANILLA, M. J.; JOUANY, J.-P.; MORGAVI, D. P. Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species in vitro. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 675–680, 2007.

ROEHE, R. et al. Bovine Host Genetic Variation Influences Rumen Microbial Methane Production with Best Selection Criterion for Low Methane Emitting and Efficiently Feed Converting Hosts Based on Metagenomic Gene Abundance. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 2, p. e1005846, 2016.

RUSSELL, J. B.; WALLACE, R. J. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. p. 246–282.

SAMINATHAN, M. et al. Effects of condensed tannin fractions of different molecular weights from a *Leucaena leucocephala* hybrid on *in vitro* methane production and rumen fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 13, p. 2742–2749, 2015.

SAMINATHAN, M. et al. Effects of condensed tannin fractions of different molecular weights on population and diversity of bovine rumen methanogenic archaea in vitro, as determined by high-throughput sequencing. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 146–160, 2016.

SHIN, E. C. et al. Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence. **Anaerobe**, v. 10, n. 6, p. 313–319, 2004.

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. p. 10–72.

STORM, I. M. L. D. et al. Methods for Measuring and Estimating Methane Emission from Ruminants. **Animals : an open access journal from MDPI**, v. 2, n. 2, p. 160–83, 2012.

TAJIMA, K. et al. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2766–74, 2001.

TAN, H. Y. et al. Diversity of bovine rumen methanogens In vitro in the presence of condensed tannins, as determined by sequence analysis of 16S rRNA gene library. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 492–498, 2011a.

TAN, H. Y. et al. Effects of condensed tannins from Leucaena on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 169, n. 3–4, p. 185–193, 2011b.

TAPIO, I. et al. Taxon abundance, diversity, co-occurrence and network analysis of the ruminal microbiota in response to dietary changes in dairy cows. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0180260, 2017a.

TAPIO, I. et al. The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 7, 2017b.

THAUER, R. K. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson:1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. **Microbiology**, v. 144, n. 9, p. 2377–2406, 1998.

THAUER, R. K. et al. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 579–591, 2008.

THIELE, J. H.; CHARTRAIN, M.; ZEIKUS, J. G. Control of Interspecies Electron Flow during Anaerobic Digestion: Role of Floc Formation in Syntrophic Methanogenesis. **Applied**

and environmental microbiology, v. 54, n. 1, p. 10–19, 1988.

THULASI, A. et al. Metagenomic approaches in harnessing gut microbial diversity. In: **Livestock production and climate change**. Wallingford: CABI, 2015. p. 90–99.

WALLACE, R. J. et al. An independent microbial flora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen. **Nature**, v. 279, n. 5712, p. 424–426, 1979.

WALLACE, R. J. et al. (2014). Archaeal abundance in post-mortem ruminal digesta may help predict methane emissions from beef cattle. **Scientific reports**, 4, 5892. Doi: 10.1038/srep05892.

WALLACE, R. J. et al. The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 839, 2015.

WANG, S. et al. Contribution of Ruminal Fungi, Archaea, Protozoa, and Bacteria to the Methane Suppression Caused by Oilseed Supplemented Diets. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1864, 2017.

WANG, Y.; MCALLISTER, T. A. Rumen Microbes, Enzymes and Feed Digestion-A Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 15, n. 11, p. 1659–1676, 2002.

WHITMAN, W. B.; BOWEN, T. L.; BOONE, D. R. The Methanogenic Bacteria. In: **The Prokaryotes**. New York, NY: Springer New York, 2006. p. 165–207.

WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. The rumen protozoa. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. p. 73–139.

WOLIN, M. J.; MILLER, T. L.; STEWART, C. S. Microbe-microbe interactions. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. p. 467–491.

ZHOU, M.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GUAN, L. L. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6524–33, 2009.

ZHOU, M.; MCALLISTER, T. A.; GUAN, L. L. Molecular identification of rumen methanogens: Technologies, advances and prospects. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166–167, p. 76–86, 2011.

5 CAPÍTULO I

EFEITO DA COMPOSIÇÃO RACIAL E PLANOS NUTRICIONAIS NA DIVERSIDADE DE ARCHAEA NO RÚMEN DE NOVILHAS LEITEIRAS CRIADAS EM AMBIENTE TROPICAL

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da composição racial e planos nutricionais na comunidade de archaea e a correlação da população de archaea com as emissões de CH_4 com variáveis fermentativas e de desempenho animal. Os dados foram provenientes de 27 novilhas de três diferentes raças (nove Gir, nove Holandês x Gir e nove Holandês) que foram distribuídas aleatoriamente em três planos nutricionais: ingestão de 11, 14 e 19 g/kg de PC. As dietas consistiram de silagem de milho e concentrado (70,7 e 29,3% de matéria seca). A produção e o rendimento de CH_4 entérico foram medidos em câmaras respirométricas de circuito aberto durante dois períodos consecutivos de 24 horas. A diversidade filogenética da comunidade de archaea ruminal foi avaliada por sequenciamento da região V6-V8 do gene rRNA 16S. A composição das raças influenciou as abundâncias relativas dos gêneros *Methanobrevibacter* e *Methanosphaera*, e da espécie *Methanobrevibacter acididurans*. *Methanosphaera* foi mais abundante em animais da raça Holandês, enquanto *Methanobrevibacter* e *M. acididurans* foram mais abundantes em Gir. A análise de correlação canônica regularizada mostrou correlação positiva entre *M. acididurans* e relação Acetato: Propionato (A: P) e correlação negativa entre *Methanosphaera* ISO3-F5 e relação A: P. Embora a diversidade da comunidade archaea não tenha sido diferente entre raças e planos alimentares, os resultados deste estudo suportam a hipótese de que existe contribuição da genética do hospedeiro sobre a composição do microbioma ruminal.

Palavras-chave: Archaea. Metano. Microbioma ruminal. Novilha leiteira. Zebu.

EFFECT OF BREED COMPOSITION AND NUTRICIONAL PLANS ON THE RUMEN ARCHAEA DIVERSITY OF DAIRY RAISED IN A TROPICAL ENVIRONMENT

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of breed composition and nutritional plans on the archaeal community and the correlation of the archaeal population with CH_4 emissions, animal performance and fermentative variables. Data were derived from twenty-seven heifers of different breeds (9 Gyr, 9 Holstein x Gyr and 9 Holstein) that were randomly allocated to three nutritional plans: intake of 11, 14 and 19 g/kg BW. Diets consisted of corn silage and concentrate (70.7 and 29.3% dry matter basis). The production and yield of enteric CH_4 were measured by open-circuit respiration chambers for two consecutive 24-h periods. The phylogenetic diversity of the ruminal archaeal community was assessed by sequencing the V6-V8 region of the16S rRNA gene. Breeds composition influenced the relative abundances of the genera *Methanobrevibacter* and *Methanosphaera*, and the species *Methanobrevibacter acididurans. Methanosphaera* was more abundant in Holstein, while *Methanobrevibacter* and *M. acididurans* were more abundant in Gyr. The regularized canonical correlation analysis showed positive correlation between *M. acididurans* and Acetate: Propionate (A: P) ratio, and a negative correlation was observed between *Methanosphaera ISO3-F5* and A: P ratio. Although the archaeal community diversity was not different between breeds and food plans, the results of this study support the hypothesis that there is a contribution of host genetics to the composition of the ruminal microbiome.

Keywords: Archaea. Methane. Rumen microbiome. Dairy heifer. Zebu cattle.

5.1 INTRODUÇÃO

A pecuária é uma fonte importante de emissões de gases de efeito estufa (GEE), com a produção de ruminantes respondendo por cerca de 81% das emissões de GEE do setor pecuário, e 90% dos quais é resultado da metanogênese ruminal (HRISTOV et al., 2013). O CH_4 ruminal representa impacto econômico e ambiental negativo sobre a produção animal, uma vez que a perda de energia que poderia estar disponível para o crescimento e a produção de leite é perdida entre 2% e 12% da energia bruta (JOHNSON; JOHNSON, 1995).

Archaea metanogênica é um grupo filogeneticamente diverso de Euryarchaeota estritamente anaeróbico que converte H_2 e CO_2, produzidos pelos protozoários, bactérias e fungos em CH_4, mantendo baixa pressão parcial de H_2 e direcionando a fermentação para a produção de produtos finais menos reduzidos, como o acetato. Alguns metanogênicos no rúmen também utilizam outros substratos para metanogênese, como compostos contendo metil (THAUER et al., 2008). A composição da microbiota ruminal é formada por microbioma ruminal *core* (JAMI; MIZRAHI, 2012; JANSSEN; KIRS, 2008), e diferenças de animal para animal na abundância de gêneros específicos indicam que a microbiota ruminal e seus efeitos interativos na emissão de CH_4 podem ser influenciados por vários fatores, incluindo dieta, raça e localização geográfica (HENDERSON et al., 2015).

Embora as atividades e as interações entre comunidades microbianas no rúmen tenham sido estudadas, pouco se sabe sobre como as populações archaea são influenciadas pelos fenótipos hospedeiros e condições de criação em ambiente tropical. Estudos anteriores mostraram que há efeito genético aditivo do animal hospedeiro na quantidade de CH_4 produzida pela comunidade microbiana ruminal e relação positiva entre a abundância relativa de archaea e a quantidade de CH_4 produzida por animais (ROEHE et al., 2016; WALLACE et al., 2015).

Devido ao avanço em técnicas moleculares, como o sequenciamento de nova geração, o conhecimento da microbiologia ruminal aumentou nos últimos anos, mas as correlações entre composição racial e planos nutricionais com diversidade de comunidades de archaea e produção ou rendimento de CH_4 ainda não estão claras. Portanto, objetivou-se neste estudo avaliar o efeito da composição racial e planos nutricionais com distintas ofertas de alimentos na comunidade de archaea e avaliar a correlação da população de archaea com as emissões de CH_4, desempenho animal e variáveis fermentativas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Desenho e análise experimental

O estudo foi conduzido no Laboratório de Bioenergética da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), no Complexo Experimental Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, de março a setembro de 2014. Todos os procedimentos de cuidados e manuseio de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG, Protocolo CEUA-EGL 01/2012).

Vinte e sete novilhas (nove Holandês - Hol, nove Gir e nove Holandês x Gir - F1) com peso inicial de 401 ± 39 Kg, 303 ± 59 Kg e 457 ± 48 Kg, respectivamente, foram distribuídas aleatoriamente em três grupos contendo nove animais cada. Os tratamentos consistiram de três planos nutricionais: 11, 14 e 19 g/kg PC para ganho de peso previsto de 200, 400 e 800 g/dia, respectivamente. As novilhas foram alojadas em sistema Tie stall com acesso livre à água. Durante todo o experimento, todas as novilhas foram alimentadas com a mesma dieta, uma vez por dia pela manhã. A dieta foi composta por 70,7% de silagem de milho, 13,0% de milho moído, 15,7% de farelo de soja, 0,4% de núcleo mineral (Bovigold®, DSM | Tortuga, Brasil) e 0,2% de cloreto de sódio. A dieta apresentou teor de matéria seca de 488,69 g/kg e teor de proteína bruta (PB) de 143,76 g/Kg, fibra em detergente neutro (FDN) e carboidratos não fibrosos (CNF) de 347,84 e 407,65 g/kg MS, respectivamente, e o teor de energia metabolizável foi de 2,4 Mcal/kg MS. Os ingredientes do concentrado foram coletados para análise e amostras representativas de silagem, concentrado e sobras foram coletadas diariamente e agrupadas mensalmente para análise química, conforme descrito por Oliveira Filho et al. (2018). As emissões de CH_4 das novilhas foram estimadas usando duas câmaras respirométricas de circuito aberto seguindo protocolo de Machado et al. (2016), no qual cada animal passou dois períodos de 24 horas nas câmaras respirométricas para estimar as emissões de metano.

Amostragem ruminal e extração de DNA

Para avaliar a diversidade genética da população de archaea ruminais, cerca de 70 mL de amostras do rúmen foram coletadas através do tubo esofágico após as medidas de metano. As amostras foram imediatamente analisadas quanto ao pH e, em seguida, congeladas e armazenadas a -20° C para posterior avaliação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) e análise populacional metanogênica. As extrações de DNA

foram realizadas de acordo com Stevenson e Weimer (2007) e posteriormente tratadas com ribonuclease A RNAse (10 mg/mL).

Análise de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e nitrogênio amoniacal (N-NH_3)

Para a determinação de AGCC, as amostras de conteúdo ruminal foram centrifugadas e posteriormente filtradas através de uma membrana de politetrafluoroetileno de 0,22 µm. A solução obtida foi analisada diretamente por cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) (ANDERSSON; HEDLUND, 1983). A concentração de N-NH_3 foi quantificada após destilação de Kjeldahl com óxido de magnésio e cloreto de cálcio de acordo com o método 2.065 (AOAC, 1980).

Preparação de bibliotecas para sequenciamento de amplicons

As bibliotecas de amplicons do gene rRNA 16S foram construídas usando os *primers* Ar915aF e Ar1386R de acordo com Kittelmann et al. (2013) para amplificar as regiões V6 a V8. Os amplicons foram gerados utilizando Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e cada amplificação por PCR continha 2 µL de amostra de DNA (20 ng/µL), 17,2 µL de água de grau biologia molecular, 2,5 µL de tampão de reação 10X (Platinum® Taq Polymerase, Invitrogen), 1 µL de $MgCl_2$ 50X (50 mM), 1,0 µL de mix de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de *primer* forward (10 mM), 0,5 µL de *primer* reverse (10 mM) e 0,3 µL de Invitrogen Platinum Taq polymerase (5 U/mL) em um volume total de 25 µL. O programa de PCR foi de 95º durante 3 min, seguido por 25 ciclos de 95º C (30 s), 55º C(30 s), 72º C (30 s) com extensão final de 5 min a 72º C. Os amplicons foram purificados usando Magnetic Bead Capture Kit (Ampure Agencourt). Determinou-se a concentração de DNA utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies). Além disso, o DNA (5 µL) foi analisado em gel de agarose a 1,5% e visualizado por coloração com gel red para verificar a integridade do DNA.

Após a purificação, afim de, indexar cada uma das amostras, uma segunda reação de PCR foi realizada, permitindo que as amostras fossem agrupadas para sequenciamento em flow cell. Utilizaram-se dois iniciadores de indexação (iniciadores de indexação Illumina Nextera XT, Illumina, Suécia) por amostra. Cada reação de PCR continha 5 µL de iniciador índice 1 (N7xx), 5 µL de iniciador índice 2 (S5xx), 25 µL de Kapa HiFi Hot Start Ready mix, 10 µL de água para PCR. A PCR foi realizada conforme descrito acima, entretanto apenas 12 ciclos de amplificação foram completados em vez de 25. Os produtos da PCR foram visualizados

utilizando eletroforese em gel e, subsequentemente purificados como descrito acima. Todos os amplicons purificados foram reunidos em uma quantidade molar igual e a concentração final da biblioteca foi determinada utilizando um ensaio de PCR quantitativo SYBR green com iniciadores específicos para os adaptadores Illumina Kapa (KAPA Biosystems, Boston, Massachusetts, USA). A mistura da amostra (2 nM) foi desnaturada com NaOH 0,1 N, depois diluída para 20 pM e combinada com 20% (v/v) de PhiX 20pM desnaturada. As amostras foram sequenciadas na plataforma MiSeq, usando um kit V3 de 2 x 300 ciclos, seguindo o protocolo padrão de sequenciamento da Illumina.

Análise das sequências

As sequências lidas foram processadas e analisadas usando o pacote do software QIIME (Quantitative Insights em Microbial Ecology) versão 1.9 de acordo com Caporaso et al. (2010b). Resumidamente, as bases de cada leitura de sequenciamento com um escore Q menor do que 25 foram cortadas, então as leituras pareadas (R1 e R2) foram mescladas para formar sequências únicas usando o script fastq-join (ARONESTY, 2011). Os dados das sequências foram agrupados em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com base na semelhança de 99% usando o algoritmo uclust (EDGAR, 2010). A sequência mais abundante em cada OTU foi selecionada como sequência representativa e alinhada com o banco de dados Greengenes usando o software PyNast (CAPORASO et al., 2010a). A taxonomia foi atribuída a cada OTU usando a versão 14.07 do banco de dados RIM-DB (SEEDORF et al., 2014) e resumida a nível de espécie. Os dados de sequência analisados neste estudo foram depositados no NCBI Sequence Read Archive (SRA), sob o número de acesso PRJNA438696.

Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos dados microbianos foram realizadas utilizando o software R 3.4.3 (TEAM, 2017). A tabela de OTU foi utilizada para estimar a riqueza das amostras (Chao1) e o índice de diversidade (Shannon) para a comunidade de archaea usando QIIME. Diferenças na riqueza e diversidade de comunidades de archaea foram testadas pelo teste de Kruskal Wallis (KRUSKAL; WALLIS, 1952). Em seguida, a Análise de Composição de Microbiomas (ANCOM), que usa as transformações de registro de Aitchison para transportar os dados para o espaço Euclidiano, foi usada para comparar a abundância relativa de cada táxon de archaea com todos os táxons restantes, um de cada vez (MANDAL et al., 2015).

Para lidar com contagens zero nos conjuntos de dados, o ANCOM usou um valor arbitrário de pseudo *count* de 0,001. Posteriormente, o teste de soma de classificação de Kruskal Wallis (KRUSKAL; WALLIS, 1952) foi calculado em cada razão logarítmica para encontrar diferenças entre as composições da raça. Os valores de *p* de cada teste foram ajustados para *false discovery rate* (FDR) usando o algoritmo de Benjamini-Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) e limiar de FDR menor que 0,05 foi aplicado para determinar a significância. Por fim, mapas de imagem em cluster e gráficos de correlação foram gerados a partir da saída da análise de correlação canônica regularizada (rCC) conforme implementado no pacote R mixOmics (GONZÁLEZ et al., 2008). Antes de executar a análise de rCC, os dados foram normalizados por *total sum scaling* (TSS) e depois transformados pela *centered log ratio* para projetar os dados de um simplex para um espaço Euclidiano (NEVES et al., 2017). Os parâmetros de regularização ($\lambda 1$ e $\lambda 2$) e as correlações canônicas foram determinados por meio de procedimento de *cross-validation* (CV) padrão em superfície bidimensional.

5.3 RESULTADOS

No total, 916.673 leituras brutas foram obtidas de 27 amostras. Após a filtragem, 688.467 sequências de alta qualidade foram utilizadas para a análise a jusante, com cada amostra contendo uma média de 25.498 leituras após a verificação da qualidade. O número total de OTUs no nível de similaridade de 99% foi de 3.998. A estimativa de cobertura de *Good* mostrou que a profundidade de sequenciamento utilizada neste estudo foi capaz de caracterizar mais de 90% da comunidade de archaea (Tabela 1).

Tabela 1. Medidas de diversidade baseada em unidades taxonômica operacionais da comunidade de archaea do rúmen de novilhas Gir, Holandês x Gir (F1) e Holandês (Hol) nos três planos nutricionais

Índice	11 (g/kg PC)			14 (g/kg PC)			19 (g/kg PC)			*p*-value (FDR)		
	Hol	F1	Gir	Hol	F1	Gir	Hol	F1	Gyr	CR	PN	CRxPN
Chao 1	1488.2	1618.5	1516.3	1669.7	1609.7	1581.0	1696.3	1546.0	1605.0	0.8669	0.5578	0.7388
Shannon	5.0	5.3	5.5	5.5	5.4	5.6	5.5	5.3	5.5	0.4221	0.4061	0.3652
Good's Coverage (%)	91.5	90.9	91	90.3	90.6	90.9	91.4	91.1	90.8	0.7991	0.4629	0.4908

CR = Composição racial, PN = Planos nutricionais

A análise taxonômica das leituras atribuiu todas as sequências da comunidade de archaea ao filo Euryarchaeota. As famílias foram representadas por Methanobacteriaceae (99,9 ± 0,1%) e Methanomassiliicoccaceae (0,1 ± 0,1%). Euryarchaeota foi dominada por *Methanobrevibacter*, que representou 90,6 ± 0,1% das sequências das archaea, seguidas por *Methanosphaera* e *Methanobacterium*, representando 9,1 ± 0,1% e 0,2 ± 0,1% da comunidade das archaea, respectivamente (Figura 3A). Com o uso do RIM-DB foi possível identificar (> 97% de similaridade) os clados *Methanobrevibacter gottschalkkii e Methanobrevibacter ruminantium*, que representaram, em média, 58,5 ± 3,0 e 29,3 ± 3,0% de todas as sequências encontradas, independentemente da composição racial ou planos nutricionais, respectivamente (Figura 3B).

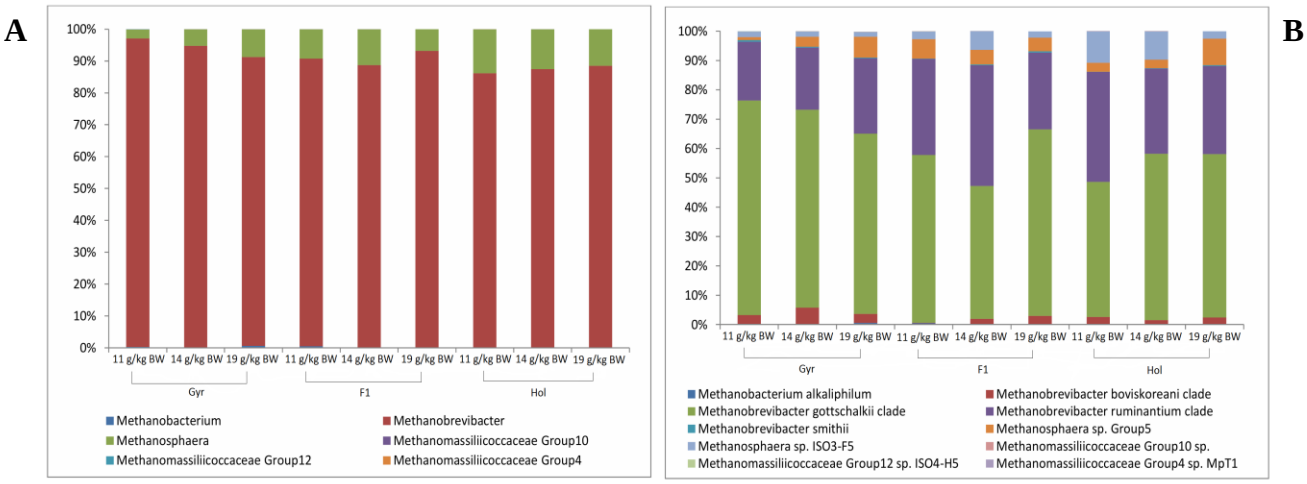

Figura 3. Comparação da abundância relativa de gêneros (A) e espécies (B) de archaea identificadas nas novilhas Gir, Holandês x Gir (F1) e Holandês (Hol) nos três planos nutricionais (11, 14 e 19 g / kg PC)

Os estimadores de riqueza da comunidade (índice de Chao1) e diversidade (índice de Shannon) não foram diferentes (Kruskal-Wallis P> 0,05, Tabela 1) entre as composições raciais e os planos nutricionais (Figura 4). No entanto, a composição e estrutura da comunidade archaea foram distintas para composição racial (FDR <0,05). A abundância relativa das sequências pertencentes ao gênero *Methanosphaera* foi mais abundante em novilhas Holandês (Kruskal-Wallis P <0,05, Figura 5B), enquanto a abundância relativa das sequências pertencentes ao gênero *Methanobrevibacter* foi mais abundante em novilhas Gir (Kruskal-Wallis P <0,05, Figura 5A). Sequências pertencentes à espécie *Methanobrevibacter acididurans* foram mais abundantes em novilhas Gir (Kruskal-Wallis P <0,05, Figura 5C) quando comparadas às novilhas Holandês.

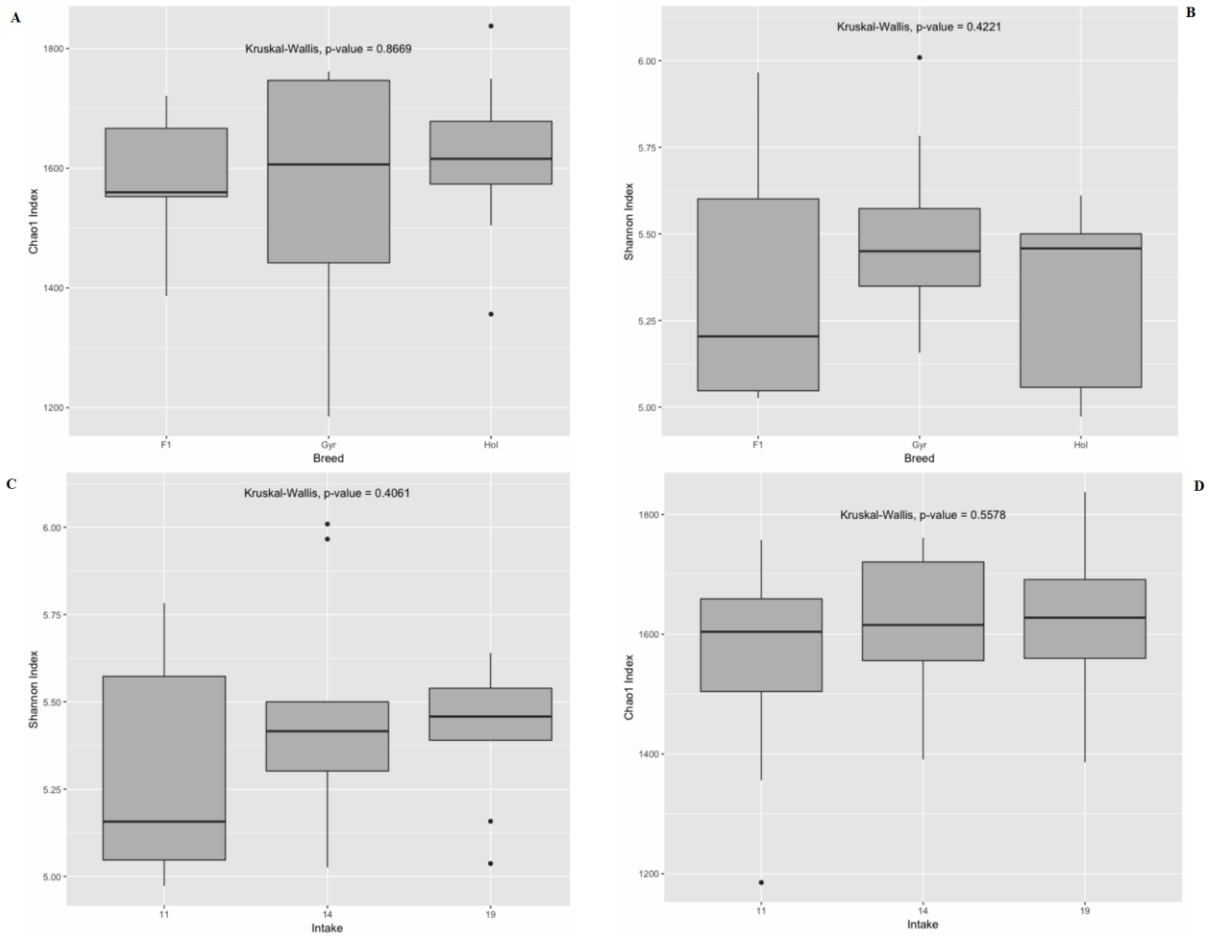

Figura 4. Boxplot representando os índices de riqueza (índice de Chao 1; A e B) e de diversidade (índice de Shannon; C e D) das comunidades de archaea em novilhas Gir, Holandês x Gir (F1) e Holandês (Hol) e os três planos nutricionais (11, 14 e 19 g / kg de peso corporal)

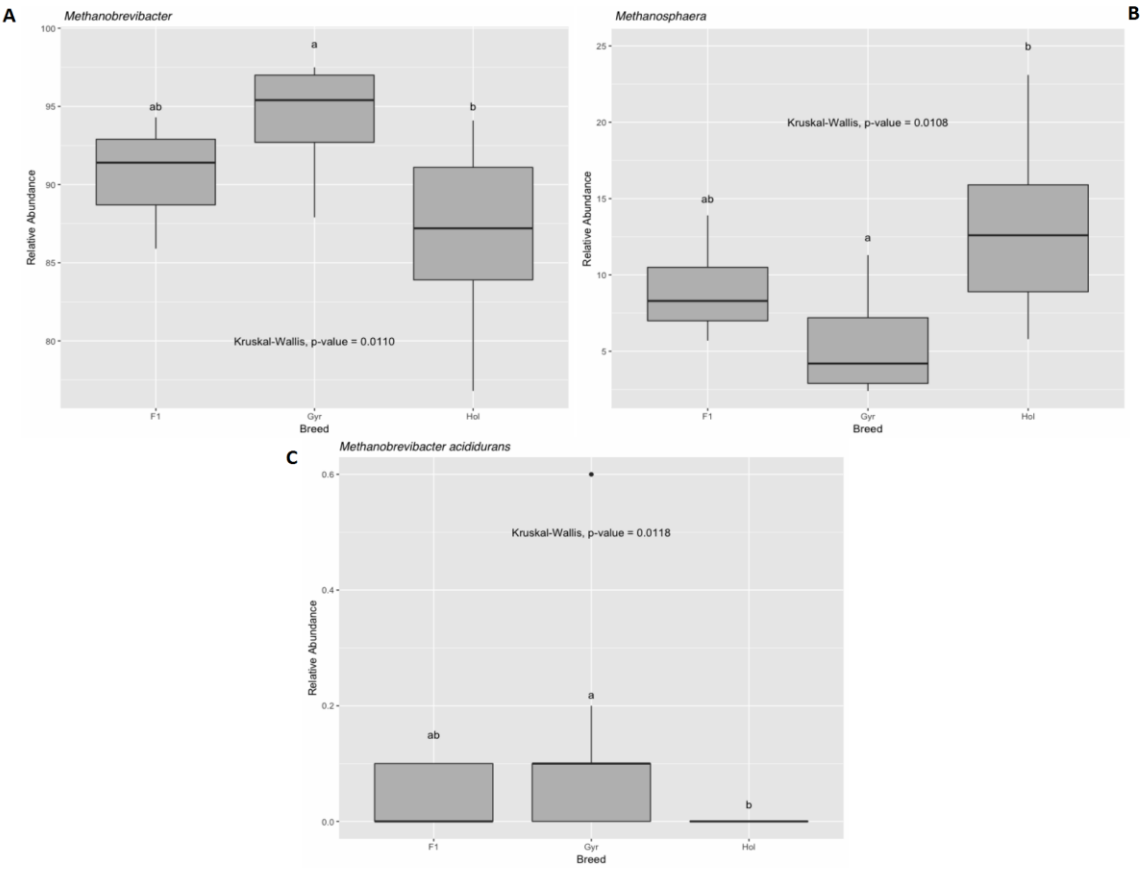

Figura 5. Boxplot de archaea diferencialmente abundantes nas novilhas Gir, Holandês x Gir (F1) e Holandês (Hol)

Usando rCCA, foram testadas as combinações lineares entre as matrizes de dados representadas pela comunidade archaea, as emissões de CH_4, o desempenho animal e as variáveis fermentativas para destacar as estruturas de correlação mais relevantes (Figura 6). Correlações negativas foram observadas entre *Methanosphaera* ISO3-F5 e relação A: P, bem como entre *M. gottschalkii* e N-NH_3. Espécies *M. acididurans* e *M. ruminantium* mostraram correlações positivas com relação A: P e N-NH_3, respectivamente.

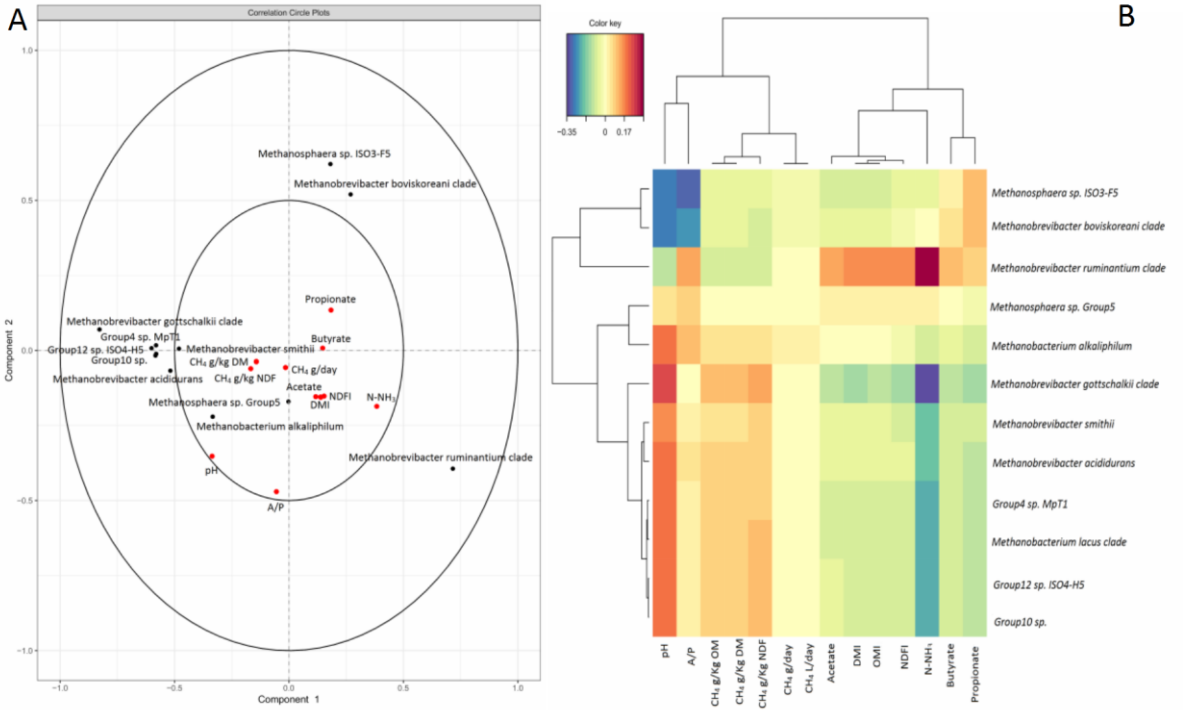

Figura 6. Gráfico de correlação em círculo e mapa de imagem agrupada (CIM) gerados a partir da saída da análise de correlação canônica regularizada (rCC) aplicada à comunidade de archaea do rúmen a nível de espécie e emissões de CH_4, variáveis fermentativas e de desempenho animal. (A) O gráfico de correlação em círculo mostra os dois primeiros componentes do rCC a nível de espécie, onde a comunidade de archaea, as emissões de CH_4, as variáveis fermentativas e de desempenho são exibidas dentro de um círculo de raio 1 centrado na origem, com variáveis fortemente correlacionadas sendo projetadas na mesma direção a partir da origem. Quanto maior a distância da origem, mais forte é a associação. (B) O gráfico CIM exibe as estruturas de correlação entre as variáveis. Cada bloco colorido representa uma associação entre archaea, emissões de CH_4, variáveis fermentativas e de desempenho abrangendo uma faixa de cores de azul (correlação negativa), para amarelo (correlação fraca), para vermelho (correlação positiva).

5.4 DISCUSSÃO

A fermentação de macromoléculas dos alimentos por microrganismos presentes no rúmen desempenha papel importante na produtividade e no desempenho animal, e há evidências substanciais de que fatores relacionados aos hospedeiros (por exemplo, variação individual e genética) podem contribuir para moldar as populações microbianas no trato gastrointestinal (WEIMER et al., 2010). Apesar da importância dos fatores genéticos

associados à composição da comunidade microbiana, as interações entre essas comunidades e os mecanismos do hospedeiro responsáveis pelas variações no fenótipo metabólico são completamente desconhecidas. Nesse estudo, avaliou-se a influência de três composições raciais criadas em condições tropicais sobre a diversidade da comunidade metanogênica ruminal, a fim de compreender a complexa interação entre a comunidade de archaea, emissão de CH_4 e variáveis fermentativas e produtivas. Como a dieta é um dos fatores ambientais que dificultam a compreensão dos efeitos genéticos do hospedeiro sobre a composição da comunidade microbiana, nesse estudo a fim de minimizar as influências dietéticas e fisiológicas, os animais foram mantidos sob a mesma dieta e manejo, mas com variações nos planos nutricionais.

Ao comparar as raças e os planos nutricionais, o índice de Chao 1 não foi significativo, indicando que a abundância das espécies foi distribuída similarmente nas diferentes raças. As bibliotecas de archaea não apresentaram diferenças significativas nos índices de diversidade entre as composições raciais e os planos nutricionais, sugerindo que o perfil da comunidade de archaea foi semelhante entre as três raças. Isso pode estar relacionado à baixa densidade de archaea (0,3 - 4% do total de microrganismos) no rúmen (JANSSEN; KIRS, 2008).

O rúmen de todas as composições raciais apresentou núcleo dominante de OTUs atribuído a alguns grupos taxonômicos. Por exemplo, os membros dos clados *M. gottschalkii* e *M. ruminantium* foram encontrados em todas as amostras, representando 88,5% da comunidade archaea. Juntamente com *Methanosphaera sp.* Group 5, *Methanosphaera sp.* ISO3-F5 e o clado *M. boviskoreani* estiveram presentes em 99,4 ± 0,3% da comunidade de archaea em todas as amostras. De maneira semelhante, Henderson et al. (2015), ao avaliar a comunidade microbiana ruminal em 32 espécies de animais de 35 países, observaram que os membros dos clados *M. gottschalkii* e *M. ruminantium* foram encontrados em quase todas as amostras e foram os dois maiores grupos. Em contraste com o observado para a comunidade de archaea, as bactérias do rúmen formam o grupo mais abundante e geneticamente diverso de microrganismos ruminais, com *Prevotella*, *Butirivibrio*, *Ruminococcus* e *Fibrobacter*, *Lachnospiraceae* não classificada e *Succinivibrionaceae* não classificada sendo os mais abundantes (DANIELSSON et al., 2017; HENDERSON et al., 2015). Assim, as divergências de archaea do rúmen são menores do que as observadas para as bactérias do rúmen, independentemente das raças ou do ambiente em que os animais são criados.

Embora a diversidade da comunidade de archaea não tenha sido diferente entre as raças, houve influência da raça na composição da comunidade archaea. Segundo De Mulder et al. (2018), fatores biológicos relacionados à raça, tais como diferenças fenotípicas, fisiológicas e imunológicas, podem desempenhar um papel importante na formação de uma microbiota ruminal específica da raça. Diferenças no comportamento alimentar entre as raças leiteiras *Bos taurus*, Zebu (*Bos Taurus indicus*) e cruzamentos são prováveis fatores a serem considerados na avaliação das mudanças no perfil de abundância de archaea. Por exemplo, a raça Holandês, para maximizar sua ingestão, tende a ingerir alimentos mais rapidamente do que outras raças (O'DRISCOLL et al., 2009). Como a dieta foi oferecida uma vez ao dia nesse estudo, as novilhas da raça Holandês tenderam a aumentar a frequência alimentar e diminuir o tempo gasto com a ingestão diária, aumentando assim a concentração de H_2 dissolvido logo após a alimentação. Estas dinâmicas podem refletir na concentração de H_2 dissolvido ao longo do dia, que por sua vez pode afetar a comunidade de archaea, favorecendo *Methanosphaera* que requer apenas 1 mol de H_2 para produzir 1 mol de CH_4, ao contrário de *Methanobrevibacter* que requer 4 moles de H_2 para produzir 1 mol de CH_4 (BEAUCHEMIN, 2018; FRICKE et al., 2006). Além disso, como a salivação aumenta durante a alimentação, baixas frequências alimentares podem levar a menores quantidades de saliva, modificando o pH ruminal e, assim influenciando a microbiota ruminal (BEAUCHEMIN et al., 2008; LI et al., 2019).

Cunha et al. (2017) também não encontraram correlações entre as emissões de CH_4 e *Methanobrevibacter*. Nesse estudo, no entanto, foi observada correlação positiva entre *Methanobrevibacter* e a relação A:P (variável diretamente relacionada à produção de CH_4), indicando que a produção de acetato está ligada à formação de equivalentes redutores necessários para os metanogênicos produzirem metano (SCHÄREN et al., 2018). Por outro lado, encontrou-se forte correlação negativa entre *Methanosphaera* e relação A:P, o que é lógico, já que *Methanosphaera* pode crescer com hidrogênio mais grupos metil derivados de metanol ou metilaminas (HENDERSON et al., 2015). Assim, o aumento da relação A:P poderia aumentar a disponibilidade de H_2 no rúmen a ser utilizado principalmente por grupos hidrogenotróficos (como *Methanobrevibacter*) em vez de metilotróficos dependentes de H_2 como *Methanosphaera spp*.

5.5 CONCLUSÕES

A caracterização da comunidade metanogênica ruminal em três composições raciais de animais leiteiros, alimentados com diferentes planos nutricionais e criadas em clima tropical é pioneira. Notavelmente, uma comunidade *core* de metanogênicos foi detectada e composta por cinco espécies, *Methanobrevibacter gottschalkkii* clade, *Methanobrevibacter ruminantium* clade, *Methanosphaera sp.* Group 5, *Methanosphaera sp.* ISO3-F5 e *Methanobrevibacter boviskoreani* clade. Embora a diversidade da comunidade archaea não tenha sido diferente entre raças e planos alimentares, os resultados deste estudo suportam a hipótese de que existe contribuição da genética do hospedeiro sobre a composição do microbioma ruminal. Além disso, não foi confirmada correlação entre a diversidade da comunidade de archaea e as emissões de CH_4, entretanto foi possível observar forte correlação entre a diversidade da comunidade de archaea e a relação A:P. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer como o hospedeiro influencia a comunidade archaea e para avaliar seu impacto nas emissões de CH_4 e no desempenho animal.

5.6 REFERÊNCIAS

ANDERSSON, R.; HEDLUND, B. HPLC analysis of organic acids in lactic acid fermented vegetables. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 176, n. 6, p. 440–443, 1983.

ARONESTY, E. ea-utils: Command-line tools for processing biological sequencing data. **Durham, NC: Expression Analysis**, 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 1980. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13th ed.**

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Short Communication: Salivary Secretion During Meals in Lactating Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 2077–2081, 2008.

BEAUCHEMIN, K. A. Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 6, p. 4762–4784, 2018.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. (1995). **Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple TestingJournal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological),** 57(1), 289-300. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2346101> Acesso em: 21 mar. 2018

CAPORASO, J. G. et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 2, p. 266–7, 2010a.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing

data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335–6, 2010b.

CUNHA, C. S. et al. Assessing the impact of rumen microbial communities on methane emissions and production traits in Holstein cows in a tropical climate. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 492–499, 2017.

DANIELSSON, R. et al. Methane Production in Dairy Cows Correlates with Rumen Methanogenic and Bacterial Community Structure. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 226, 2017.

DE MULDER, T. et al. Impact of breed on the rumen microbial community composition and methane emission of Holstein Friesian and Belgian Blue heifers. **Livestock Science**, v. 207, p. 38–44, 2018.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.

FRICKE, W. F. et al. The genome sequence of Methanosphaera stadtmanae reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H2 for methane formation and ATP synthesis. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 642–58, 2006.

GONZÁLEZ, I.; MARTIN, P. G. P.; BACCINI, A. CCA: An R Package to Extend Canonical Correlation Analysis. **JSS Journal of Statistical Software**, v. 23, n. 12, 2008.

HENDERSON, G. et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14567, 2015.

HRISTOV, A. N. et al. SPECIAL TOPICS — Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options1. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 11, p. 5045–5069, 2013.

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33306, 2012.

JANSSEN, P. H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3619–25, 2008.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 8, p. 2483–2492, 1995.

KITTELMANN, S. et al. Simultaneous Amplicon Sequencing to Explore Co-Occurrence Patterns of Bacterial, Archaeal and Eukaryotic Microorganisms in Rumen Microbial Communities. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e47879, 2013.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583–621, 1952.

LI, F. et al. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 6, 2019.

MACHADO, F. S. et al. Technical note: A facility for respiration measurements in cattle. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 6, p. 4899–4906, 2016.

MANDAL, S. et al. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. **Microbial ecology in health and disease**, v. 26, p. 27663, 2015.

NEVES, A. L. A. et al. Enhancing the Resolution of Rumen Microbial Classification from Metatranscriptomic Data Using Kraken and Mothur. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2445, 2017.

O'DRISCOLL, K.; BOYLE, L.; HANLON, A. The effect of breed and housing system on dairy cow feeding and lying behaviour. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 116, n. 2–4, p. 156–162, 2009.

OLIVEIRA FILHO, C. A. A. et al. Nutritional plans on the intake, digestibility, and performance of dairy heifers of different breed compositions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 2, p. 247–255, 2018.

ROEHE, R. et al. Bovine Host Genetic Variation Influences Rumen Microbial Methane Production with Best Selection Criterion for Low Methane Emitting and Efficiently Feed Converting Hosts Based on Metagenomic Gene Abundance. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 2, p. e1005846, 2016.

SCHÄREN, M. et al. Interrelations between the rumen microbiota and production, behavioral, rumen fermentation, metabolic, and immunological attributes of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 4615–4637, 2018.

SEEDORF, H. et al. RIM-DB: a taxonomic framework for community structure analysis of methanogenic archaea from the rumen and other intestinal environments. **PeerJ**, v. 2, p. e494, 2014.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 165–174, 2007.

TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017.

THAUER, R. K. et al. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 579–591, 2008.

WALLACE, R. J. et al. The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 839, 2015.

WEIMER, P. J. et al. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 12, p. 5902–12, 2010.

6 CAPÍTULO II

EFEITO DE INTERVALOS DE PASTEJO DE *Urochloa brizantha* cv. MARANDU SOBRE A DIVERSIDADE DE ARCHAEA EM VACAS LEITEIRAS EM AMBIENTE TROPICAL

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de intervalos de pastejo na comunidade de archaea de vacas Girolando sobre pastejo e avaliar a correlação da população de archaea com as emissões de metano (CH_4) e desempenho animal. Os intervalos de pastejo foram: *(i)* intervalos de pastejo fixos de 30 dias (30-FG) e *(ii)* quando o dossel interceptou 95% de radiação fotossinteticamente ativa (95-LI). Foram utilizadas seis vacas multíparas com 548 ± 61,0 kg PV e 70 ± 18,1 dias em leite (DIM). O delineamento experimental foi o de blocos completamente randomizados com medidas repetidas no tempo. A diversidade filogenética da comunidade de archaea ruminal foi avaliada por sequenciamento da região V6-V8 do gene 16S rRNA. Os intervalos de pastejo e o período influenciaram as abundâncias relativas das espécies *Methanosphaera sp.* Grupo 5, Grupo 4 MpT1, Grupo 8 sp. WGK1 e Grupo 9 sp. ISO4-G1. *Methanosphaera sp.* Grupo 5 foi mais abundante no intervalo de pastejo 30-FG no período dois, enquanto o Grupo 4 MpT1 e o Grupo 8 sp. WGK1 foram mais abundantes no intervalo de pastejo 95-LI no primeiro período. Já a abundância relativa do Grupo 9 sp. ISO4-G1 foi mais abundante no segundo período. A análise de correlação canônica regularizada mostrou correlações positivas entre o clado *M. gottschallkii* e CH_4 g/dia, CH_4 g/kg MS_i e CH_4 g/kg PB, bem como entre Grupo 11 sp. BRNA1 e CH_4 g/kg PB. O clado *M. ruminantium* apresentou correlações negativas com CH_4 g/kg MS_i e CH_4 g/kg PB, assim como o clado *M. boviskoreani* e produção de leite kg/dia. Embora a diversidade da comunidade de archaea não tenha sido diferente entre os intervalos de pastejo, os resultados deste estudo fornecem evidências de que o tipo de manejo das pastagens pode afetar a composição do microbioma em bovinos leiteiros.

Palavras-chave: Interceptação luminosa. Microbioma ruminal. Pastagem tropical. Vacas leiteiras.

EFFECT OF GRAZING INTERVALS OF *Urochloa brizantha* cv. MARANDU ON THE ARCHAEA DIVERSITY IN DAIRY COWS IN A TROPICAL ENVIRONMENTAL

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of grazing intervals on the archaeal community of Girolando cows on grazing and to evaluate the correlation of the archaeal population with methane (CH_4) emissions and animal performance. The grazing intervals were: (*i*) 30 – day fixed grazing intervals (30-FG) and (*ii*) when canopy was intercepting 95% photosynthetically active radiation (95-LI). Six multiparous cows with 548 ± 61.0 kg BW and 70 ± 18.1 days in milk (DIM) were used. The experimental design was completely randomized blocks with time-repeated measures. The phylogenetic diversity of the ruminal archaeal community was assessed by sequencing the V6-V8 region of the16S rRNA gene. Grazing intervals and the period influenced the relative abundances of the species *Methanosphaera sp.* Group 5, Group 4 MpT1, Group 8 sp. WGK1 and Group 9 sp. ISO4-G1. *Methanosphaera sp.* Group 5 was more abundant in the grazing interval 30-FG in second period, while Group 4 MpT1 and the Group 8 sp. WGK1 species were more abundant in the grazing interval 95-LI in the first period. However, the relative abundance of the Group 9 sp. ISO4-G1 species was more abundant in the second period. The regularized canonical correlation analysis showed positive correlations between the clade *M. gottschallkii* and CH_4 g/day, CH_4 g/kg DMI and CH_4 g/kg CP, as well as between Group 11 sp. BRNA1 and CH_4 g/kg CP. The *clade M. ruminantium* showed negative correlations with CH_4 g/kg DMI and CH_4 g/kg CP, as well as the *clade M. boviskoreani* and milk production kg/day. Although the diversity of the archaea community was not different between grazing intervals, the results of this study provide evidence that the type of pasture management may affect the composition of the microbiome in dairy cattle.

Keywords: Light interception. Rumen microbiome. Tropical grass. **C**rossbred dairy cows.

6.1 INTRODUÇÃO

Em condições tropicais, as pastagens são a base para a alimentação dos bovinos. No entanto, é amplamente explorada em áreas degradadas e de baixa produtividade, promovendo a degradação da terra, da água, da biodiversidade e a emissão de quantidades significativas de gases de efeito estufa em relação à unidade de produto animal produzida. A eficiência da pecuária depende do manejo adequado das pastagens e do desempenho animal, e a produção animal está diretamente relacionada à oferta, ao consumo, ao valor nutricional da forragem e do metabolismo ruminal (DIAS-FILHO, 2014; SILVA; NASCIMENTO JÚNIOR, 2007).

Em países onde a pecuária é relevante para a economia, como o Brasil, a emissão de gases de efeito estufa pelos ruminantes é uma preocupação. Aproximadamente 70% das emissões de CH_4 são provenientes da produção pecuária (MCT, 2017), portanto, melhorias no manejo de pastejo e avanços na compreensão sobre microrganismos metanogênicos do rúmen são um desafio e importantes para o desenvolvimento de estratégias de mitigação de CH_4.

A produção de CH_4 no rúmen pode ser influenciada por diversos fatores, sendo a dieta um dos principais, já que afetam a produção de CH_4, pois dietas mais fibrosas resultam em mais H_2 residual devido à maior quantidade de acetato produzido, enquanto dietas com alto teor de amido induzem maior produção de propionato, diminuindo a produção de H_2 e consecutivamente a produção de CH_4 no rúmen. Entretanto, diferenças na produção de CH_4 devido à dieta são mais influenciadas pelo clima e geografia, uma vez que, as forrageiras em condições tropicais geralmente apresentam menor digestibilidade e sua degradação no rúmen resulta em maior proporção de acetato e CH_4 (BOADI et al., 2004).

A interceptação luminosa (IL) do dossel tem sido proposta como referência de acompanhamento do processo de rebrota, uma vez que permite a colheita da forragem sempre na mesma condição fisiológica (CARNEIRO PEDREIRA et al., 2007) sendo em condições tropicais, 95% IL o melhor momento para interromper o processo de crescimento, garantindo assim a produção de forragens de melhor qualidade (EUCLIDES et al., 2014). Em contraste, métodos tradicionais de intervalos de pastejo baseados em períodos fixos de rebrota podem promover o pastejo em momentos inadequados, reduzindo a eficiência da colheita e o valor nutritivo (MOURA et al., 2017).

A implementação de práticas adequadas de manejo para melhorar a qualidade das pastagens aumenta a produtividade animal e pode reduzir a intensidade de emissão de CH_4 (g/kg de produto de origem animal). Portanto, uma melhor compreensão de como a comunidade de archaea pode ser influenciada por diferentes intervalos de pastejos pode ser

importante para aumentar o desempenho e produção animal e até mesmo reduzir os problemas ambientais. Diante disso, objetivou-se avaliar o efeito dos intervalos de pastejo na comunidade de archaea e a correlação da população de archaea com as emissões de CH_4 e desempenho animal.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

O estudo foi conduzido no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em Coronel Pacheco, de janeiro a abril de 2014. Todos os procedimentos de cuidados e manuseio de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG, Protocolo CEUA-EGL 16/2013).

O clima da região é Cwa (mesotérmico) de acordo com Köppen, com verão chuvoso entre outubro e março e inverno seco de junho a setembro. O solo da área experimental foi classificado como Fluvisol Distrófico (FAO, 2006) ou Neossolo Flúvico Distrófico (EMBRAPA, 2006). As seguintes características químicas foram observadas: pH em água = 5,0; matéria orgânica = 3,5%; P (Método Mehlich-1) = 4,2 mg/dm^3; K = 160 mg/dm^3; Ca = 1,0 cmolc/dm^3; Mg = 0,7 cmolc/dm^3; Al = 0,15 cmolc/dm^3; H + Al = 4,8 cmolc/dm^3; capacidade de troca catiônica = 6,8 cmolc/dm^3 e saturação de base = 30%. A pastagem foi suplementada com 200 kg/ha de N e K_2O e 50 kg/ha de P_2O_5 divididos em três aplicações iguais no início do ciclo experimental e de acordo com a disponibilidade de umidade do solo (6 de janeiro, 18 de fevereiro e 4 de abril de 2014). Os dados climáticos observados durante o período experimental foram coletados em uma estação meteorológica automática, situada a 200 m da área experimental (Tabela 2).

Tabela 2. Dados meteorológicos mensais em Coronel Pacheco (Minas Gerais, Brasil) durante o estudo

	Temperatura °C					Umidade	Chuva
	Média	Média Máxima	Média Mínima	Máxima	Mínima	%	(mm)
Janeiro	24,9	32,6	19,3	35,1	16,5	74,5	113,4
Fevereiro	24,5	32,4	18,7	34,7	16,7	72,2	31,0
Março	23,5	30,1	18,9	33,3	16,4	80,9	119,6
Abril	22,1	28,5	18,1	32,6	8,2	81,4	101,4
Média	23,7	30,7	19,1	34,0	15,2	78,4	153,8

Fonte: Estação Agrometeorológica Automática Coronel Pacheco- (A557), Instituto Nacional de Meteorologia (INMET; Brasília, DF, Brasil)

A área experimental consistiu de quatro hectares de capim Marandu (*Urochloa brizantha* cv. Marandu) divididos em 4 módulos com 11 piquetes de 880 m^2 cada. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com dois blocos e quatro repetições (piquetes) dentro de cada bloco por tratamento. As medidas foram repetidas de acordo com o tempo (dois ciclos de pastejo – março e abril). Blocos foram definidos considerando diferenças edáficas de áreas experimentais.

Duas estratégias de intervalos de pastejo rotacionado (IP) como critério para iniciar a desfolha foram investigadas: (*i*) iniciar o pastejo após um intervalo de 30 dias do último período de pastejo (período fixo de descanso - 30-FG) ou (*ii*) iniciar o pastejo quando o dossel atingisse 95% de interceptação luminosa (período de descanso variável - 95-LI). Nas duas estratégias de intervalos de pastejo, o período de ocupação nos piquetes foi de três dias. Utilizou-se seis vacas multíparas Holandês x Zebu (548 ± 61,0 kg PC) com 70 ± 18,1 dias em lactação como testadores, três vacas para cada intervalo de pastejo. A digestibilidade, o consumo e as avaliações das emissões de CH_4 foram repetidas no tempo. O manejo e monitoramento da interceptação luminosa das pastagens foram avaliados conforme descrito por Moura et al. (2017).

As vacas receberam suplementação concentrada individualmente, duas vezes ao dia no momento da ordenha. O concentrado foi composto por 70% de milho moído, 26% de farelo de soja, 3% de núcleo mineral (20,5% Ca, 6% P, 2% S, 2% Mg, 3,5% K, 7% Na, 15ppm Co, 700ppm Cu, 10ppm Cr, 700 ppm Fe, 40 ppm I, 1.600 ppm Mn, 19 ppm Se, 2.500 ppm Zn, 200.000UI / kg Vit. A, 50.000UI / kg Vit.D3 e 1.500UI / kg Vit.E) e 1% de bicarbonato de sódio.

Mensuração de metano

As emissões de metano foram medidas usando o gás marcador inerte hexafluoreto de enxofre (SF_6) como descrito por Johnson e Jonhnson (1995) com adaptações propostas por Primavesi et al. (2004). As concentrações de CH_4 e SF_6 foram determinadas por cromatografia gasosa e o fluxo de CH_4 liberado pelo animal foi calculado em relação ao fluxo de SF_6, medido a partir da taxa de liberação de SF_6 da cápsula de permeação depositada no rúmen e das concentrações de CH_4 e SF_6 em amostras de gás (JOHNSON et al., 2007). Para coletar os gases, utilizou-se cangas de tubo de PVC com tubo capilar de aço inoxidável acoplado ao cabresto. Antes do início de cada dia de coleta, as cangas passavam por processo de limpeza, eram evacuados a aproximadamente –13 PSI e, então, colocados no pescoço de

cada animal e acoplados ao cabresto usando válvula de liberação rápida. A cápsula com taxa de liberação de SF_6 conhecida foi introduzida no rúmen com o auxílio de sonda dois dias antes do início da amostragem. Os dados foram coletados em cinco dias consecutivos ao final de cada período de avaliação. As cangas evacuadas foram colocados nos animais após a ordenha e após 24 h, eram trocadas por cangas limpas e evacuadas, e a pressão de cada canga foi registrada. As cangas contendo amostras de gases foram pressurizadas com aproximadamente 13 PSI de gás N_2 (99,999% de pureza). Seguindo os mesmos procedimentos, um conjunto de quatro cangas (amostragem "em branco") foi colocado na área frequentada por animais para medir a concentração de metano no ambiente. As amostras de gases das cangas foram coletadas e armazenadas em tubos Exetainer® e a análise das concentrações de CH_4 e SF_6 foi realizada no Laboratório de Cromatografia Gasosa da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

As concentrações de CH_4 e SF_6 nas amostras foram avaliadas em cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama e detector de condutividade térmica e duas colunas (HP-Plot/Q 30m×0,530mm×40,0m e HP-Molesieve 30m×0,530mm×25,0 µm) ligado a duas válvulas de seis vias. Uma coluna foi utilizada para o sistema amostrador, conectada a uma alça de 0,5 mL, e outra foi utilizada como seletor, permitindo ou bloqueando a passagem de constituintes através da segunda coluna (para CH_4), e com detector de captura de elétrons (µECD) e coluna (HP-Molesieve 30 m×0,530 mm×25,0 µm) com um loop de 0,5 mL conectado a uma válvula (para SF_6). As taxas de emissão de CH_4 foram calculadas através das concentrações medidas de CH_4 e SF_6 e a taxa de emissão conhecida de SF_6, subtraindo-se sempre as médias diárias das concentrações de CH_4 medidas nas cangas controle (b), utilizando a seguinte razão: CH_4 (g/h) = taxa de emissão de SF_6 (g/h) x {[CH_4 (µg/m^3)] – [CH_4 (µg/m^3)] b} / [SF_6 (µg/m^3)]. Os resultados foram expressos em g de CH_4/animal/dia, g de CH_4/kg de leite, g de CH_4/kg de DMI, g de CH_4/kg de proteína bruta (PB) e g de CH_4/kg de FDN digestível.

Amostragem ruminal e extração de DNA

Para avaliar a diversidade genética da população de archaea ruminal, cerca de 70 mL de amostras do rúmen foram coletadas através do tubo esofágico após as medidas de metano. As amostras foram imediatamente analisadas quanto ao pH e, em seguida, congeladas e armazenadas a -20°C para posterior análise metanogênica. As extrações de DNA foram

realizadas de acordo com Stevenson e Weimer (2007) e posteriormente tratadas com ribonuclease A RNAse (10 mg/mL).

Preparação de bibliotecas para sequenciamento de amplicons

As bibliotecas de amplicons do gene rRNA 16S foram construídas usando os primers Ar915aF e Ar1386R de acordo com Kittelmann et al. (2013) para amplificar as regiões V6 a V8. Os amplicons foram gerados utilizando Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e cada amplificação por PCR continha 2 µL de amostra de DNA (20 ng/µL), 17,2 µL de água de grau biologia molecular, 2,5 µL de tampão de reação 10X (Platinum® Taq Polymerase, Invitrogen), 1 µL de $MgCl_2$ 50X (50 mM), 1,0 µL de mix de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de primer forward (10 mM), 0,5 µL de primer reverse (10 mM) e 0,3 µL de Invitrogen Platinum Taq polymerase (5 U/mL) em um volume total de 25 µL. O programa de PCR foi de 95º durante 3 min, seguido por 25 ciclos de 95º C (30 s), 55º C(30 s), 72º C (30 s) com extensão final de 5 min a 72º C. Os amplicons foram purificados usando Magnetic Bead Capture Kit (Ampure Agencourt). Determinou-se a concentração de DNA utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies). Além disso, o DNA (5 µL) foi analisado em gel de agarose a 1,5% e visualizado por coloração com gel red para verificar a integridade do DNA.

Após a purificação, afim de, indexar cada uma das amostras, uma segunda reação de PCR foi realizada, permitindo que as amostras fossem agrupadas para sequenciamento em flow cell. Utilizaram-se dois iniciadores de indexação (iniciadores de indexação Illumina Nextera XT, Illumina, Suécia) por amostra. Cada reação de PCR continha 5 µL de iniciador índice 1 (N7xx), 5 µL de iniciador índice 2 (S5xx), 25 µL de Kapa HiFi Hot Start Ready mix, 10 µL de água para PCR. A PCR foi realizada conforme descrito acima, entretanto apenas 12 ciclos de amplificação foram completados em vez de 25. Os produtos da PCR foram visualizados utilizando electroforese em gel e subsequentemente purificados como descrito acima. Todos os amplicons purificados foram reunidos em uma quantidade molar igual e a concentração final da biblioteca foi determinada utilizando um ensaio de PCR quantitativo SYBR green com iniciadores específicos para os adaptadores Illumina Kapa (KAPA Biosystems, Boston, Massachusetts, USA). A mistura da amostra (2 nM) foi desnaturada com NaOH 0,1 N, depois diluída para 20 pM e combinada com 20% (v/v) de PhiX 20pM desnaturada. As amostras foram sequenciadas na plataforma MiSeq, usando um kit V3 de 2 x 300 ciclos, seguindo o protocolo padrão de sequenciamento da Illumina.

Análise das sequências

As sequências lidas foram processadas e analisadas usando o pacote do software QIIME (Quantitative Insights em Microbial Ecology) versão 1.9 de acordo com Caporaso et al. (2010b). Resumidamente, as bases de cada leitura de sequenciamento com um escore Q menor do que 25 foram cortadas, então as leituras pareadas (R1 e R2) foram mescladas para formar sequências únicas usando o script fastq-join (ARONESTY, 2011). Os dados das sequências foram agrupados em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com base na semelhança de 99% usando o algoritmo uclust (EDGAR, 2010). A sequência mais abundante em cada OTU foi selecionada como sequência representativa e alinhada com o banco de dados Greengenes usando o software PyNast (CAPORASO et al., 2010a). A taxonomia foi atribuída a cada OTU usando a versão 14.07 do banco de dados RIM-DB (SEEDORF et al., 2014) e resumida a nível de espécie. Os dados de sequência analisados neste estudo foram depositados no NCBI Sequence Read Archive (SRA), sob o número de acesso PRJNA 415040.

Procedimentos estatísticos

As análises estatísticas dos dados microbianos foram realizadas utilizando o software R 3.4.3 (TEAM, 2017). A tabela de OTU foi utilizada para estimar a riqueza das amostras (Chao1) e o índice de diversidade (Shannon) para a comunidade de archaea usando QIIME. Diferenças na riqueza e diversidade de comunidades de archaea foram analisadas usando o pacote CAR em R com um modelo misto de medidas repetidas (ANOVA). Em seguida, a Análise de Composição de Microbiomas (ANCOM), que usa as transformações de registro de Aitchison para transportar os dados para o espaço Euclidiano, foi usada para comparar a abundância relativa de cada táxon de archaea com todos os táxons restantes, um de cada vez (MANDAL et al., 2015). Para lidar com contagens zero nos conjuntos de dados, o ANCOM usou um valor arbitrário de pseudo *count* de 0,001. Posteriormente, a análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas foi calculada em cada razão logarítmica para encontrar diferenças entre os intervalos de pastejo. Os valores de *p* de cada teste foram ajustados para *false discovery rate* (FDR) usando o algoritmo de Benjamini-Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) e um limiar de FDR menor que 0,10 foi aplicado para determinar a significância. Por fim, mapas de imagem em cluster e gráficos de correlação foram gerados a partir da saída da análise de correlação canônica regularizada (rCC) conforme implementado no pacote R mixOmics (GONZÁLEZ et al., 2008). Antes de executar a análise de rCC, os

dados foram normalizados por *total sum scaling* (TSS) e depois transformados pela *centered log ratio* para projetar os dados de um simplex para um espaço Euclidiano (NEVES et al., 2017). Os parâmetros de regularização (λ1 e λ2) e as correlações canônicas foram determinados por meio de procedimento de *cross-validation* (CV) padrão em uma superfície bidimensional.

6.3 RESULTADOS

Após as análises de filtragem, o número de sequências obtidas foi de 112.234 para archaea. A cobertura de Good mostrou que a profundidade de sequenciamento foi capaz de caracterizar mais de 73% da comunidade archaea (Tabela 1).

Tabela 3. Medidas de diversidade baseada em unidades taxonômicas operacionais da comunidade de archaea do rúmen de vacas Girolando nos dois intervalos de pastejo (30-FG e 95-LI) e períodos

Índice	95-LI		30-FG		*p*-value (FDR)		
	P1	P2	P1	P2	IP	P	IP x P
Chao 1	28500	26500	27300	29200	0.8091	0.9763	0.4326
Shannon	8.1	8.0	7.9	7.9	0.5922	0.8283	0.8283
Good's Coverage (%)	72.0	73.0	72.7	72.3	1.0000	0.8026	0.6171

IP = Intervalo de pastejo; P = Período

A análise taxonômica das leituras atribuiu todas as sequências da comunidade de archaea ao filo Euryarchaeota. As famílias foram representadas por Methanobacteriaceae (93,5 ± 0,2%) e Methanomassiliicoccaceae (6,5 ± 0,2%). Euryarchaeota foi dominada por *Methanobrevibacter*, que representou 87,8 ± 1,1% das sequências das archaea, seguido pelo Methanomassiliicoccaceae Grupo 12, *Methanosphaera* e *Methanobacterium*, representando 4,4 ± 1,1%; 4,3 ± 2,1% e 1,5 ± 0,8% da comunidade de archaea, respectivamente. Com o uso do RIM-DB foi possível identificar (> 97% de similaridade) os clados *M. gottschalkii* e *M. ruminantium*, que representaram, em média, 62,5 ± 3,3 e 19,9 ± 2,9% de todas as sequências encontradas no presente estudo, independentemente do intervalo de pastejo e períodos, respectivamente (Figura 7).

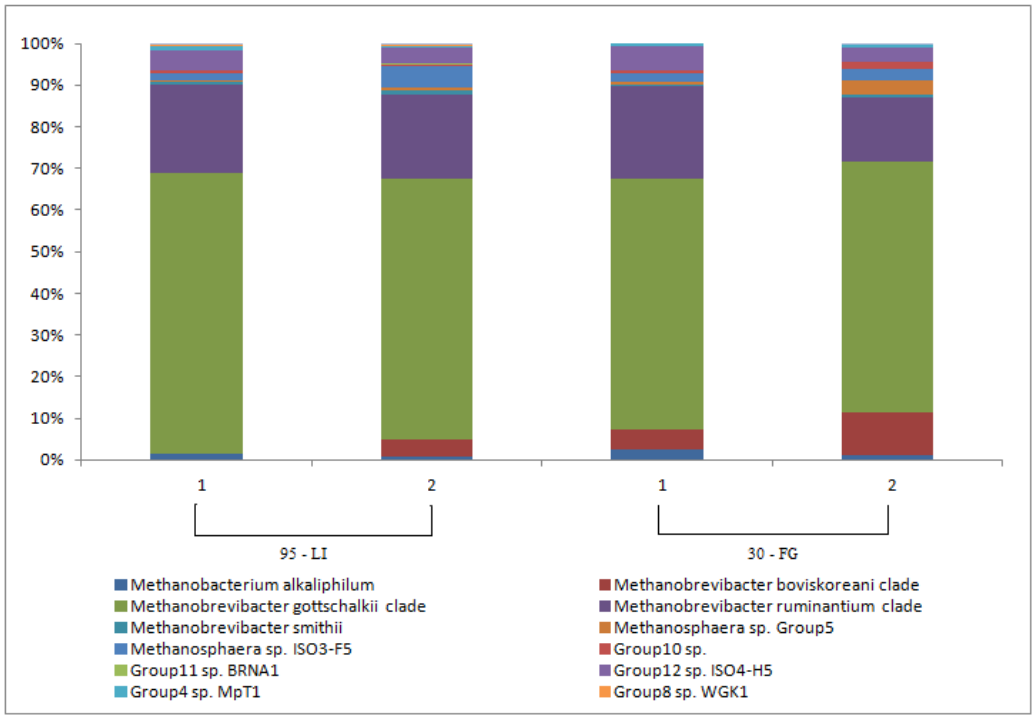

Figura 7. Comparação da abundância relativa de espécies de archaea identificadas nos intervalos de pastejo nos dois períodos

A análise dos fragmentos do gene rRNA 16S não revelaram diferenças significativas na riqueza (índice de Chao1) e diversidade (índice de Shannon) da comunidade de archaea entre os intervalos de pastejo e os períodos (ANOVA $P > 0,10$, Figura 8). No entanto, a composição e estrutura da comunidade das archaea foram distintas entre os intervalos de pastejo e períodos (FDR < 0,10). A abundância relativa das sequências pertencentes à espécie *Methanosphaera sp.* Grupo 5 foi mais abundante no intervalo de pastejo 30-FG no período dois, enquanto o Grupo 4 MpT1 e o Grupo 8 sp. WGK1 foram mais abundantes no intervalo de pastejo 95-LI no primeiro período (ANOVA $P < 0,10$; Figura 9). Já a abundância relativa do Grupo 9 sp. ISO4-G1 foi mais abundante no segundo período (ANOVA $P < 0,10$; Figura 9).

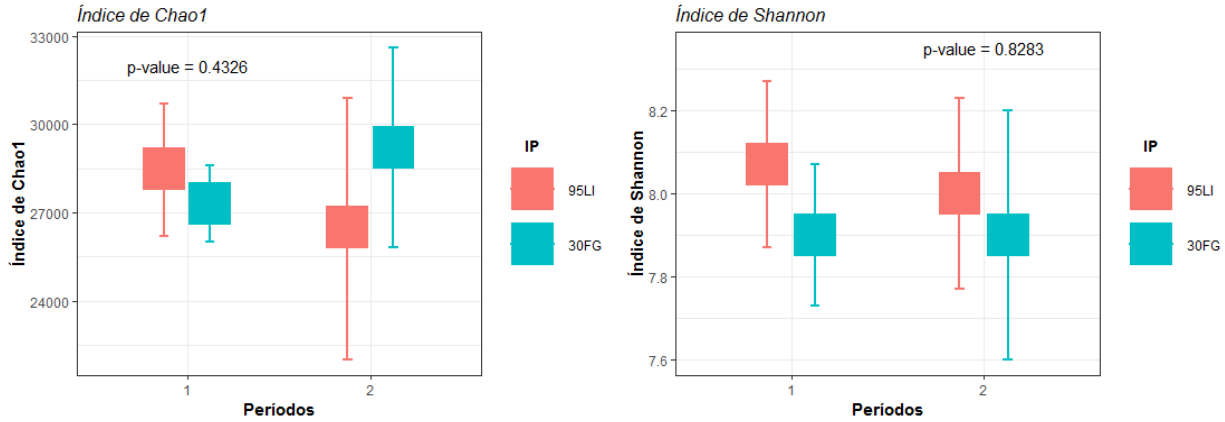

Figura 8. Boxplot representando os índices de riqueza (índice de Chao 1) e de diversidade (índice de Shannon) das comunidades de archaea de vacas Girolando nos dois intervalos de pastejo (30-FG e 95-LI) e períodos

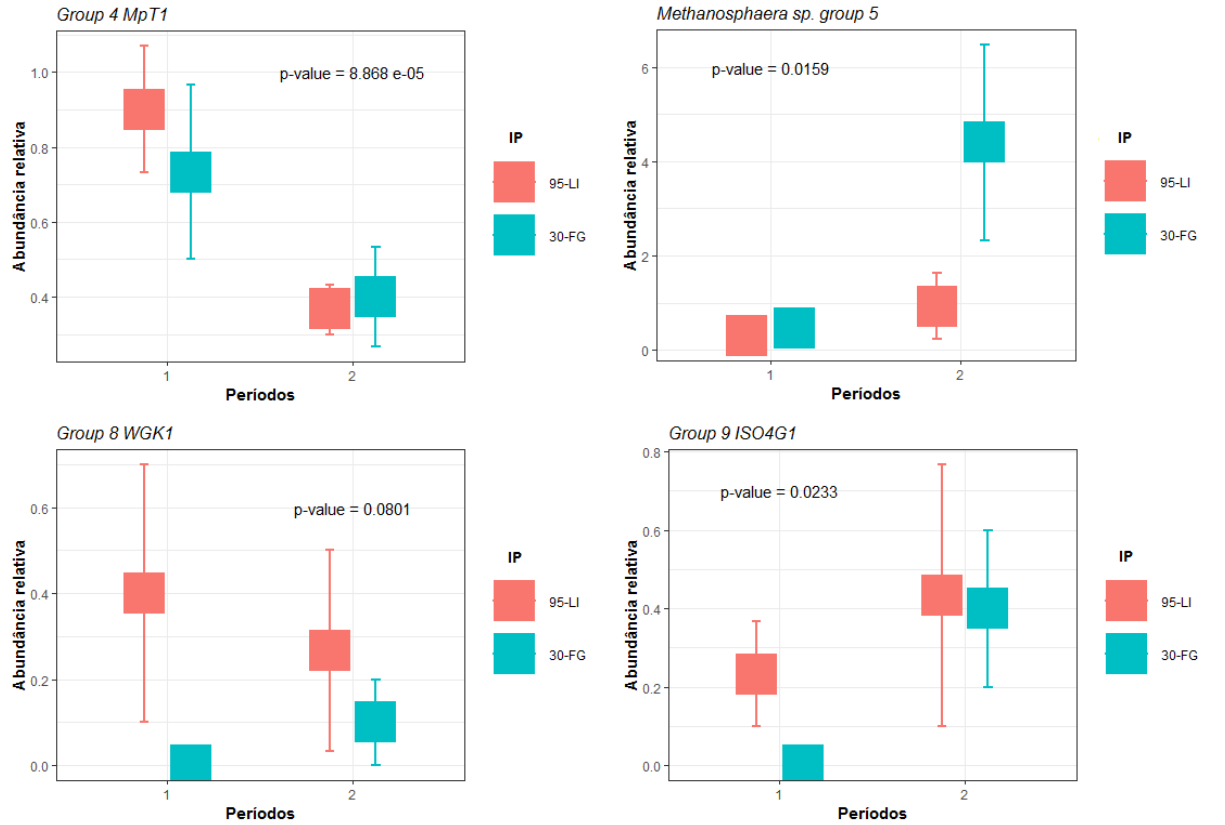

Figura 9. Boxplot de archaea diferencialmente abundantes nas vacas Girolando nos dois intervalos de pastejo (30-FG e 95-LI) e períodos

Usando rCCA, foram testadas as combinações lineares entre as matrizes de dados representadas pela comunidade de archaea, as emissões de CH_4 e as variáveis de desempenho animal para destacar as estruturas de correlação mais relevantes (Figura 10). Correlações positivas foram observadas entre o clado *M. gottschallkii* e CH_4 g/dia, CH_4 g/kg MS_i e CH_4 g/kg PB, bem como entre o Grupo 11 sp. BRNA1 e CH_4 g/kg PB. O clado *M. ruminantium* apresentou correlações negativas com CH_4 g/kg MS_i e CH_4 g/kg PB, assim como o clado *M. boviskoreani* e produção de leite kg/dia.

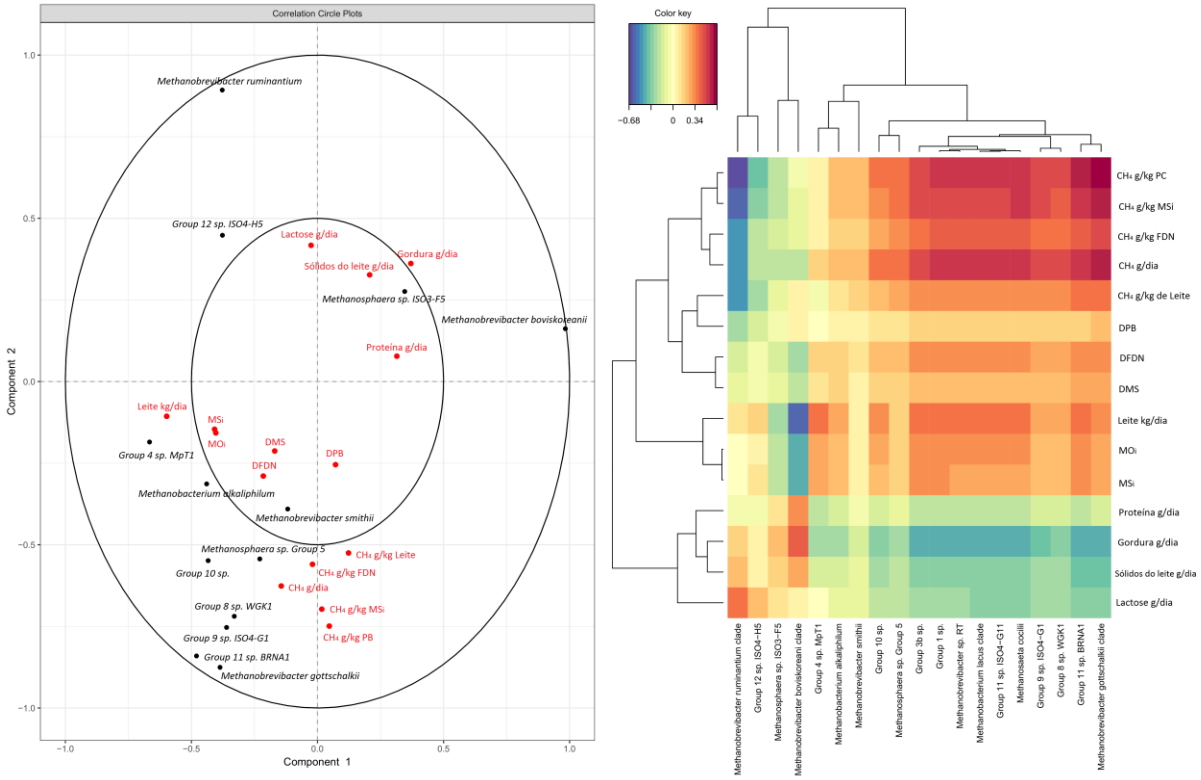

Figura 10. Gráfico de correlação em círculo e mapa de imagem agrupada (CIM) gerados a partir da saída da análise de correlação canônica regularizada (rCC) aplicada à comunidade de archaea do rúmen a nível de espécies e emissões de CH_4 e variáveis de desempenho. (A) O gráfico de correlação em círculo mostra os dois primeiros componentes do rCC a nível de espécie, onde as emissões de archaea e CH_4 e as variáveis de desempenho são exibidas dentro de um círculo de raio 1 centrado na origem, com variáveis fortemente correlacionadas sendo projetadas na mesma direção a partir da origem. Quanto maior a distância da origem, mais forte é a associação. (B) O gráfico CIM exibe as estruturas de correlação entre as variáveis. Cada bloco colorido representa uma associação entre archaea, emissões de CH_4 e variáveis de desempenho abrangendo uma faixa de cores de azul (correlação negativa), para amarelo (correlação fraca), para vermelho (correlação positiva).

6.4 DISCUSSÃO

A estrutura da comunidade microbiana ruminal pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo espécies hospedeiras, idade, estado de saúde, dieta e localização geográfica. Embora haja evidências que o manejo das pastagens possa afetar a comunidade microbiana do rúmen, ainda não está claro como o manejo das pastagens podem afetar a comunidade archaea (NICOL et al., 2003). No presente estudo foi avaliada a influência de dois intervalos de pastejos sobre a diversidade da comunidade de archaea ruminal de vacas Girolando, a fim de compreender a complexa interação entre a comunidade de archaea, produção de CH_4 e desempenho animal.

De forma semelhante a estudos anteriores (HENDERSON et al., 2015; JEYANATHAN et al., 2011), ao compararmos os intervalos de pastejo, as bibliotecas de archaea não apresentaram diferenças significativas nos índices de diversidade, sugerindo que o perfil da comunidade de archaea foi semelhante entre os intervalos de pastejo, podendo estar relacionado à baixa densidade de archaea no rúmen e a restrita gama de substratos utilizados pelas archaea (HENDERSON et al., 2015; JANSSEN; KIRS, 2008).

Methanobrevibacter tem sido descrito como o principal grupo de metanogênicos no rúmen, o que de forma semelhante foi observado no presente estudo, podendo ser devido à sua capacidade de utilizar ampla gama de substratos como CO_2, H_2 e formato e convertê-los em CH_4. As populações metanogênicas predominantes observadas nos intervalos de pastejo podem ter sido decorrentes de uma variação na utilização dos substratos, bem como pela competição de H_2. *M. gottschallkii* requer acetato para o crescimento (MILLER; LIN, 2002), enquanto *M. ruminantium* utilizam formato no metabolismo energético (CERSOSIMO; WRIGHT, 2015), portanto, uma vez que, as dietas a base de forragem induzem a maior produção de acetato (NOZIÈRE et al., 2010), a abundância de *M. gottschallkii* neste estudo pode estar relacionada com este fato.

Com relação à estrutura da comunidade archaea, embora a diversidade da comunidade archaea não tenha sido diferente entre os intervalos de pastejo, houve influência das estratégias de pastejo na estrutura e composição da comunidade de archaea. As diferenças na composição da comunidade de archaea provavelmente são mediadas por mudanças na estrutura da comunidade de outros grupos de microrganismos do rúmen, uma vez que, os metanogênicos utilizam subprodutos da fermentação (H_2, formato e metanol) realizada por microrganismos fermentadores (SEEDORF et al., 2015). Segundo Da Silva et al. (2015) mudanças no padrão de acúmulo de forragem podem ocorrer se o intervalo de pastejo permitir

interceptação luminosa maior que 95%, reduzindo a proporção de folhas e aumentando a proporção de colmo. Em pastagens tropicais, o aumento da oferta de forragem pode aumentar o consumo, entretanto quando o dossel forrageiro supera 95% de IL, as características estruturais da pastagem são modificadas, tendendo a reduzir a qualidade da forragem, principalmente pela elevação do percentual de partes da planta com maiores concentrações de FDN, resultando no consumo de dieta com menor taxa de digestão (BATISTEL et al., 2012; CARNEVALLI et al., 2006). Nesse estudo, o capim cv. Marandu alcançou 95% de IL antes de 30 dias de rebrota (24 dias em média) (MOURA, 2017), o que reduziu o IP e o tempo de acúmulo de MS do pasto para 95-LI e maior oferta de forragem para 30-FG, fato que pode explicar a mudança na abundância relativa das espécies *Methanosphaera sp. group 5, Group 4 MpT1, Group 9 sp. ISO4-G1* e *Group 8 sp. WGK1* entre os intervalos de pastejo.

No estudo de Danielsson et al. (2017), a abundância relativa do clado *M. gottschalkii* foi relacionada com a maior produção de CH_4, enquanto a abundância relativa de *M. ruminantium* foi relacionada à baixa produção de CH_4, corroborando com o presente estudo, em que foi possível observar correlação positiva e negativa entre as espécies do clado *M. gottschalkii* e *M. ruminantium*, respectivamente, com o rendimento de CH_4 (g/kg MS_i). Além disso, segundo Kittelmann et al. (2013), as abundâncias dos clados *M. gottschalkii* e *M. ruminantium* apresentam correlação negativa. Portanto, as correlações negativas e positivas dos clados *M. gottschalkii* e *M. ruminantium,* respectivamente, com a produção de CH_4 observadas nesse estudo podem estar relacionadas à competição pelo mesmo substrato, já que as espécies de *Methanobrevibacter* são hidrogenotróficas.

6.5 CONCLUSÕES

Embora a diversidade da comunidade archaea não tenha sido diferente entre os intervalos de pastejo, os resultados deste estudo suportam a hipótese de que diferentes intervalos de pastejo podem afetar a estrutura e a composição do microbioma ruminal. Além disso, foi confirmada correlações entre a diversidade da comunidade de archaea e o rendimento de CH_4. Entretanto, mais estudos envolvendo análise da produção de CH_4 e a estrutura da população microbiana ruminal são necessários para aumentar o entendimento das relações entre as comunidades e a produção de CH_4 e melhorar as estratégias de longo prazo para reduzir as emissões de CH_4 produzido pelos bovinos.

6.6 REFERÊNCIAS

ARONESTY, E. ea-utils: Command-line tools for processing biological sequencing data. **Durham, NC: Expression Analysis**, 2011.

BATISTEL, F. et al. Diferentes ofertas de forragem e a produção de leite em vacas mestiças Holandês x Gir. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, p. 870–874, 2012.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. **Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple TestingJournal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological),** 57(1), 289-300. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2346101> Acesso em: 21 mar. 2018

BOADI, D. et al. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, n. 3, p. 319–335, 2004.

CAPORASO, J. G. et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 2, p. 266–7, 2010a.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335–6, 2010b.

CARNEIRO PEDREIRA, B.; GUILHERME SILVEIRA PEDREIRA, C.; CARNEIRO DA SILVA, S. Estrutura do dossel e acúmulo de forragem de Brachiaria brizantha cultivar Xaraés em resposta a estratégias de pastejo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42, n. 2, p. 281–287, 2007.

CARNEVALLI, R. A. et al. Herbage production and grazing losses in Panicum maximum cv. Mombaça under four grazing managements. **Tropical Grasslands**, v. 40, p. 165–176, 2006.

CERSOSIMO, L. M.; WRIGHT, A.-D. G. Rumen Methanogens. In: **Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution**. New Delhi: Springer India, 2015. p. 143–150.

DA SILVA, S. et al. Ecophysiology of C4 Forage Grasses—Understanding Plant Growth for Optimising Their Use and Management. **Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 598–625, 2015.

DANIELSSON, R. et al. Methane Production in Dairy Cows Correlates with Rumen Methanogenic and Bacterial Community Structure. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 226, 2017.

DIAS-FILHO, M. B. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.

EMBRAPA, CNDPDS. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-SPI, 2006.

EUCLIDES, V. P. B. et al. Manejo do pastejo de cultivares de Brachiaria brizantha (Hochst)

Stapf e de Panicum maximum Jacq. **Revista Ceres**, v. 61, n. suppl, p. 808–818, 2014.

FAO. **World reference base for soil resources 2006: a framework for international classification, correlation and communication**. World Soil Resources Reports No. 103. FAO, Rome, 2006.

GONZÁLEZ, I.; MARTIN, P. G. P.; BACCINI, A. CCA: An R Package to Extend Canonical Correlation Analysis. **JSS Journal of Statistical Software**, v. 23, n. 12, 2008.

HENDERSON, G. et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14567, 2015.

JANSSEN, P. H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3619–25, 2008.

JEYANATHAN, J. et al. Methanogen community structure in the rumens of farmed sheep, cattle and red deer fed different diets. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 311–326, 2011.

JOHNSON, K. A. et al. The SF6 Tracer Technique: Methane Measurement From Ruminants. In: **Measuring Methane Production From Ruminants**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 33–67.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 8, p. 2483–2492, 1995.

KITTELMANN, S. et al. Simultaneous Amplicon Sequencing to Explore Co-Occurrence Patterns of Bacterial, Archaeal and Eukaryotic Microorganisms in Rumen Microbial Communities. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e47879, 2013.

MANDAL, S. et al. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. **Microbial ecology in health and disease**, v. 26, p. 27663, 2015.

MILLER, T. L.; LIN, C. Description of Methanobrevibacter gottschalkii sp. nov., Methanobrevibacter thaueri sp. nov., Methanobrevibacter woesei sp. nov. and Methanobrevibacter wolinii sp. nov.. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 819–822, 2002.

MCT. **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil**. Disponível em: <http://sirene.mcti.gov.br/documents/1686653/1706227/4ed_ESTIMATIVAS_ANUAIS_WEB.pdf/a4376a93-c80e-4d9f-9ad2-1033649f9f93>. Acesso em: 10 ago. 2018.

MOURA, A. M. et al. Pasture productivity and quality of Urochloa brizantha cultivar Marandu evaluated at two grazing intervals and their impact on milk production. **Animal Production Science**, v. 57, n. 7, p. 1384, 2017.

MOURA, A. M. **Características produtivas e qualitativas do pasto, desempenho e emissão de metano de vacas Holandês X Zebu em pastagem de capim-Marandu**. 2017. 123 P. Tese de Doutorado em Zootecnia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo

Horizonte, 2017.

NEVES, A. L. A. et al. Enhancing the Resolution of Rumen Microbial Classification from Metatranscriptomic Data Using Kraken and Mothur. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2445, 2017.

NICOL, G. W.; GLOVER, L. A.; PROSSER, J. I. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 152–162, 2003.

NOZIÈRE, P. et al. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: from feed starch and fibre to nutrients available for tissues. **animal**, v. 4, n. 07, p. 1057–1074, 2010.

PRIMAVESI, O. et al. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras Dairy cattle enteric methane measured in Brazilian tropical conditions**. Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 39, n. 3, p. 277-283, 2004.

SEEDORF, H. et al. RIM-DB: a taxonomic framework for community structure analysis of methanogenic archaea from the rumen and other intestinal environments. **PeerJ**, v. 2, p. e494, 2014.

SEEDORF, H.; KITTELMANN, S.; JANSSEN, P. H. Few highly abundant operational taxonomic units dominate within rumen methanogenic archaeal species in New Zealand sheep and cattle. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 3, p. 986–95, 2015.

SILVA, S. C. DA; NASCIMENTO JÚNIOR, D. DO. Avanços na pesquisa com plantas forrageiras tropicais em pastagens: características morfofisiológicas e manejo do pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. suppl, p. 122–138, 2007.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 165–174, 2007.

TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017.

7 CAPÍTULO III

EFEITO DO CONSUMO DE MATÉRIA SECA SOBRE A DIVERSIDADE DE ARCHAEA DO RÚMEN E A PRODUÇÃO DE METANO DE TOUROS MESTIÇOS DA RAÇA HOLDANDÊS-GIR EM AMBIENTE TROPICAL

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do consumo de matéria seca (CMS) na diversidade e abundância da comunidade de archaea do rúmen e a correlação da população de archaea com as emissões de CH_4 e desempenho animal em novilhos Girolando criados em ambiente tropical. Os animais foram alocados aleatoriamente em 3 grupos de fornecimento de CMS restritos a 1,2% (mantença), 1,8% (intermediário) e 2,5% (*ad libitum*) do peso corporal. A dieta consistiu de uma mistura de silagem de milho e concentrado (59,6% e 40,4%, respectivamente, com base na matéria seca). O consumo diário de ração e o peso corporal foram registrados semanalmente durante um período de 28 dias e a produção e o rendimento de CH_4 foram medidos em câmaras respirométricas de circuito aberto por dois períodos consecutivos de 24 horas. Para avaliar a diversidade filogenética da comunidade de archaea do rúmen, foram coletadas amostras de líquido ruminal de cada animal no abate. O DNA foi extraído e os amplicons do gene rRNA 16S da comunidade archaea foram sequenciados utilizando a tecnologia Illumina. Investigações em níveis de espécies mostraram baixa diversidade da comunidade, entretanto, não houve mudança na composição da comunidade archaea entre os níveis de consumo. A análise de correlação canônica regularizada mostrou correlações positivas entre os Grupo 9 sp. ISO4-G1 e Grupo 4 sp. MpT1 com CH_4 g/kg MS_i, enquanto que a espécie *Methanosphaera* sp. ISO3-F5 apresentou correlação negativa com CH_4 g/kg MSi.

Palavras-chave: Archaea. Gado de leite. Gases de efeito estufa. Pecuária. Ruminantes.

EFFECT OF DRY MATTER INTAKE ON THE RUMEN ARCHAEA DIVERSITY AND METHANE PRODUCTION OF CROSSBRED HOLSTEIN-GYR GROWING BULLS IN TROPICAL ENVIRONMENT

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the impact of dry matter intake (DMI) on the diversity and abundance of the archaeal community of the rumen and the correlation of the archaea population with CH_4 emissions and animal performance in Girolando steers raised in a tropical environment. The animals were randomly allocated into 3 groups of DMI supply restricted to 1.2% (maintenance), 1.8% (intermediate) and 2.5% (*ad libitum*) of body weight. The diet consisted of a mixture of corn silage and concentrate (59.6% and 40.4%, respectively, based on dry matter). Daily feed intake and body weight were recorded weekly for a period of 28 days and CH_4 production and yield were measured in respirometric open circuit chambers for two consecutive 24 hour periods. To evaluate the phylogenetic diversity of the rumen archaeal community, ruminal fluid samples were collected from each animal at slaughter. The DNA was extracted and the 16S rRNA gene amplicons from the archaea community were sequenced using Illumina technology. Investigations at species levels showed low community diversity, however, there was no change in the archaeal community composition between intake levels. Correlated canonical correlation analysis showed positive correlations between Group 9 sp. ISO4-G1 and Group 4 sp. MpT1 with CH_4 g/kg DMI, whereas the species Methanosphaera sp. ISO3-F5 presented negative correlation with CH_4 g/kg DMI.

Keywords: Archaea. Dairy cattle. Greenhouse gases. Livestock. Ruminants.

7.1 INTRODUÇÃO

O microbioma ruminal desempenha papel fundamental na fisiologia do animal hospedeiro, uma vez que, é responsável pela fermentação do material vegetal ingerido e sua transformação em moléculas prontamente utilizáveis no metabolismo energético dos animais. Entretanto, as forças que moldam essas comunidades microbianas ainda não são totalmente compreendidas. A dieta e o comportamento alimentar demonstram ter influência na formação do microbioma intestinal de mamíferos (FRIEDMAN et al., 2017; MUEGGE et al., 2011). Diversos estudos mostraram que diferentes regimes dietéticos têm impacto sobre a composição do microbioma ruminal (DANIELSSON et al., 2012; ZHOU et al., 2011). Além disso, as proporções dos produtos finais da fermentação ruminal podem mudar de acordo com a dieta que chega ao rúmen, resultando em diferentes quantidades de H_2 formado e, consequentemente na quantidade de CH_4 formado por unidade de alimento digerido (JANSSEN, 2010).

No rúmen, o CH_4 é produzido por archaea metanogênicas, que ocupam aproximadamente de 2% a 5% do microbioma ruminal e são a força motriz para o complexo metabolismo das comunidades microbianas do rúmen, servindo como sumidouro de elétrons para todo o ecossistema microbiano ruminal (FRIEDMAN et al., 2017). Como processo de aceitação de elétrons, a metanogênese remove H_2 do rúmen, mantendo a pressão parcial de H_2 baixa, evitando a inibição do funcionamento normal de enzimas microbianas envolvidas em reações de transferência de elétrons e reduzindo a fermentação ruminal (WOLIN et al., 1997).

A quantidade de emissão de CH_4 dos bovinos pode ser afetada por vários fatores, incluindo o tipo de dieta, níveis de ingestão e taxa de passagem do rúmen, o que pode levar a diferentes coeficientes de digestibilidade da matéria seca (BLAXTER; CLAPPERTON, 1965; MIZRAHI; JAMI, 2018). Sabe-se que não apenas o tipo de dieta, mas também certas condições de alimentação como dietas de baixa ingestão ou baixa digestibilidade, podem levar ao aumento das perdas de energia através da produção de CH_4 em ruminantes (BLAXTER; CLAPPERTON, 1965). Portanto, este estudo empregou o sequenciamento de próxima geração do gene rRNA 16S para avaliar o impacto de três diferentes níveis de consumo de matéria seca na estrutura da comunidade de archaea e a correlação da população de archaea com as emissões de CH_4 e desempenho animal no rúmen de novilhos Girolando criados em condições tropicais.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

Desenho e análise experimental

O estudo foi conduzido no Laboratório de Bioenergética da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), no Complexo Experimental Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco, de outubro a dezembro de 2013. Todos os procedimentos de cuidados e manuseio de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Protocolo CEUA-UFV 44/2012).

Nove novilhos Girolando (Holandês x Gir) com peso inicial de 155 ± 5 kg e aproximadamente 10 meses de idade, foram distribuídas aleatoriamente em três grupos contendo três animais cada. Os tratamentos consistiram de três níveis de alimentação: mantença (suprimento de MS restrito a 1,2% do PC), intermediário (suprimento de MS restrito a 1,8% do PC) e *Ad libitum* (meta de 5% de sobras). Os novilhos foram alojados em sistema Tie stall com acesso livre à água. Durante todo o experimento, todos os novilhos foram consistentemente alimentados com a mesma dieta, uma vez por dia pela manhã, para minimizar as influências alimentares na comunidade microbiana. A dieta foi composta por 59,6% de silagem de milho, 27,4% de milho moído, 10,0% de farelo de soja, 1,0% de ureia, 1,4% de mistura mineral e 0,6% de calcário. A dieta apresentou teor de matéria seca de 417 g/kg e teor de proteína bruta (PB) de 148,0 g/kg, fibra em detergente neutro (FDN) e carboidratos não fibrosos (CNF) de 336,0 e 426,0 g/kg MS, respectivamente, e o teor de energia metabolizável foi de 2,4 Mcal/kg MS. Os ingredientes do concentrado foram coletados para análise e amostras representativas de silagem, concentrado e sobras foram coletadas diariamente e agrupadas mensalmente para análise química, conforme descrito por Oss et al. (2017). As emissões de CH_4 dos novilhos foram estimadas usando duas câmaras respirométricas de circuito aberto seguindo um protocolo desenvolvido por Machado et al. (2016), no qual cada animal passou dois períodos de 24 horas nas câmaras de respirométricas para estimar as emissões de metano.

Amostragem ruminal e extração de DNA

Para avaliar a diversidade genética da população de archaea ruminais, cerca de 50 mL de amostras do rúmen foram coletadas após o abate dos animais. As amostras foram imediatamente analisadas quanto ao pH e, em seguida, congeladas e armazenadas a -20°C para posterior análise populacional metanogênica. As extrações de DNA foram realizadas de

acordo com Stevenson e Weimer (2007) e posteriormente tratadas com ribonuclease A RNAse (10 mg/mL).

Preparação de bibliotecas para sequenciamento de amplicons

As bibliotecas de amplicons do gene rRNA 16S foram construídas usando os primers Ar915aF e Ar1386R de acordo com Kittelmann et al. (2013) para amplificar as regiões V6 a V8. Os amplicons foram gerados utilizando Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e cada amplificação por PCR continha 2 µL de amostra de DNA (20 ng/µL), 17,2 µL de água de grau biologia molecular, 2,5 µL de tampão de reação 10X (Platinum® Taq Polymerase, Invitrogen), 1 µL de $MgCl_2$ 50X (50 mM), 1,0 µL de mix de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de primer forward (10 mM), 0,5 µL de primer reverse (10 mM) e 0,3 µL de Invitrogen Platinum Taq polymerase (5 U/mL) em um volume total de 25 µL. O programa de PCR foi de 95º durante 3 min, seguido por 25 ciclos de 95º C (30 s), 55º C(30 s), 72º C (30 s) com extensão final de 5 min a 72ºC. Os amplicons foram purificados usando Magnetic Bead Capture Kit (Ampure Agencourt). Determinou-se a concentração de DNA utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies). Além disso, o DNA (5 µL) foi analisado em gel de agarose a 1,5% e visualizado por coloração com gel red para verificar a integridade do DNA.

Após a purificação, afim de, indexar cada uma das amostras, uma segunda reação de PCR foi realizada, permitindo que as amostras fossem agrupadas para sequenciamento em flow cell. Utilizaram-se dois iniciadores de indexação (iniciadores de indexação Illumina Nextera XT, Illumina, Suécia) por amostra. Cada reação de PCR continha 5 µL de iniciador índice 1 (N7xx), 5 µL de iniciador índice 2 (S5xx), 25 µL de Kapa HiFi Hot Start Ready mix, 10 µL de água para PCR. A PCR foi realizada conforme descrito acima, entretanto apenas 12 ciclos de amplificação foram completados em vez de 25. Os produtos da PCR foram visualizados utilizando electroforese em gel e subsequentemente purificados como descrito acima. Todos os amplicons purificados foram reunidos em uma quantidade molar igual e a concentração final da biblioteca foi determinada utilizando um ensaio de PCR quantitativo SYBR green com iniciadores específicos para os adaptadores Illumina Kapa (KAPA Biosystems, Boston, Massachusetts, USA). A mistura da amostra (2 nM) foi desnaturada com NaOH 0,1 N, depois diluída para 20 pM e combinada com 20% (v/v) de PhiX 20pM desnaturada. As amostras foram sequenciadas na plataforma MiSeq, usando um kit V3 de 2 x 300 ciclos, seguindo o protocolo padrão de sequenciamento da Illumina.

Análise das sequências

As sequências lidas foram processadas e analisadas usando o pacote do software QIIME (Quantitative Insights em Microbial Ecology) versão 1.9 de acordo com Caporaso et al. (2010b). Resumidamente, as bases de cada leitura de sequenciamento com um escore Q menor do que 25 foram cortadas, então as leituras pareadas (R1 e R2) foram mescladas para formar sequências únicas usando o script fastq-join (ARONESTY, 2011). Os dados das sequências foram agrupados em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com base na semelhança de 99% usando o algoritmo uclust (EDGAR, 2010). A sequência mais abundante em cada OTU foi selecionada como sequência representativa e alinhada com o banco de dados Greengenes usando o software PyNast (CAPORASO et al., 2010a). A taxonomia foi atribuída a cada OTU usando a versão 14.07 do banco de dados RIM-DB (SEEDORF et al., 2014) e resumida a nível de espécie. Os dados de sequência analisados neste estudo foram depositados no NCBI Sequence Read Archive (SRA), sob o número de acesso PRJNA393312.

Análises Estatísticas

As análises estatísticas dos dados microbianos foram realizadas utilizando o software R 3.4.3 (TEAM, 2017). A tabela de OTU foi utilizada para estimar a riqueza das amostras (Chao1) e o índice de diversidade (Shannon) para a comunidade de archaea usando QIIME. Diferenças na riqueza e diversidade de comunidades de archaea foram testadas pelo teste de Kruskal Wallis (KRUSKAL; WALLIS, 1952). Em seguida, a Análise de Composição de Microbiomas (ANCOM), que usa as transformações de registro de Aitchison para transportar os dados para o espaço Euclidiano, foi usada para comparar a abundância relativa de cada táxon de archaea com todos os táxons restantes, um de cada vez (MANDAL et al., 2015). Para lidar com contagens zero nos conjuntos de dados, o ANCOM usou um valor arbitrário de pseudo *count* de 0,001. Posteriormente, o teste de soma de classificação de Kruskal Wallis (KRUSKAL; WALLIS, 1952) foi calculado em cada razão logarítmica para encontrar diferenças entre os níveis de alimentação. Os valores de *p* de cada teste foram ajustados para *false discovery rate* (FDR) usando o algoritmo de Benjamini-Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) e um limiar de FDR menor que 0,10 foi aplicado para determinar a significância. Por fim, mapas de imagem em cluster e gráficos de correlação foram gerados a partir da saída da análise de correlação canônica regularizada (rCC) conforme implementado

no pacote R mixOmics (GONZÁLEZ et al., 2008). Antes de executar a análise de rCC, os dados foram normalizados por *total sum scaling* (TSS) e depois transformados pela *centered log ratio* para projetar os dados de um simplex para um espaço Euclidiano (NEVES et al., 2017). Os parâmetros de regularização (λ1 e λ2) e as correlações canônicas foram determinados por meio de procedimento de *cross-validation* (CV) padrão em uma superfície bidimensional.

7.3 RESULTADOS

No total, foram obtidas 6,403295 leituras brutas de todas as nove amostras. Após a filtragem, foram obtidas 360.917 sequências de alta qualidade, com uma média de 40.101 ± 11.460 leituras por amostra. O número total de OTUs no nível de 99% de similaridade foi de 75.478. A estimativa de cobertura de *Good* mostrou que a profundidade de sequenciamento utilizada neste estudo foi capaz de caracterizar mais de 73% da comunidade de archaea no rúmen dos animais estudados (Tabela 4).

Tabela 4. Medidas de diversidade baseada em unidades taxonômica operacionais da comunidade de archaea do rúmen de novilhos Girolando nos três níveis de alimentação

Índice	***Ad libitum***	**Intermediário**	**Mantença**	***p*-value**
OTUs	6,518 ± 661	5,956 ±225	5,610 ± 264	0.0794
Chao1	63,168±15,464	50,159±6,820	47,569±1,071	0.2521
Shannon	7.90 ± 0.321	7.94 ± 0.043	7.40 ± 0.200	0.0992
Good's Coverage (%)	73.5 ± 3.1	76.2 ± 1.2	77.6 ± +1.1	0.1287

Na análise da diversidade da comunidade de archaea, não houve diferenças na riqueza de comunidades (Chao 1), entretanto foi observada diferença na diversidade (Shannon) da comunidade de archaea (Kruskal-Wallis P> 0,15, Tabela 4). A diversidade da comunidade de archaea nos níveis *ad libitum* e intermediário foi maior do que no nível de mantença (Figura 11A). Entretanto, a composição e estrutura da comunidade de archaea não foram diferentes entre os níveis de alimentação (FDR > 0,10).

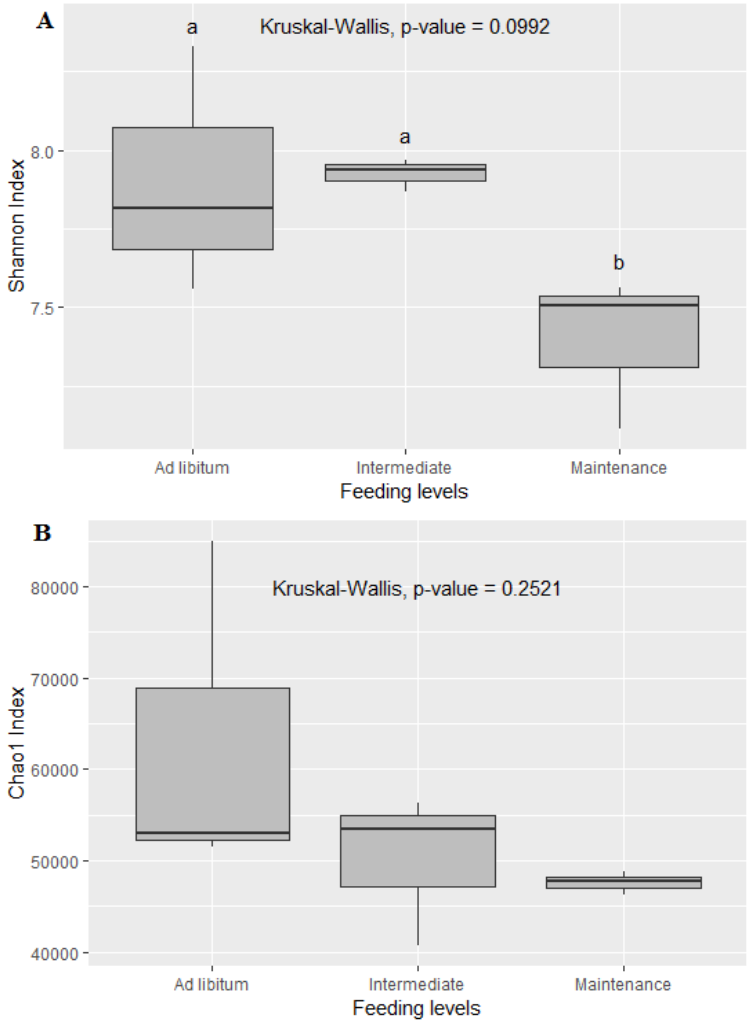

Figura 11. Boxplot representando os índices de riqueza (índice de Chao 1) e de diversidade (índice de Shannon) das comunidades de archaea dos novilhos Girolando nos três níveis de alimentação

A análise da composição taxonômica mostrou que todas as OTUs de archaea foram atribuídas ao filo Euryarchaeota. Dentro deste filo, detectaram-se representantes de quatro classes e seis ordens de archaea. No entanto, as comunidades de archaea foram dominadas por membros de apenas duas ordens, os Methanobacteriales e os Methanomassiliicoccales. Entre os Methanobacteriales, o gênero predominante da comunidade metanogênica ruminal foi Methanobrevibacter, que apresentou abundância relativa média de 94,2%. Como o uso do RIM-DB foi possível identificar (99% de similaridade) os clados *Methanobrevibacter gottschalkii* e *Methanobrevibacter ruminantium*, que representaram, em média, 66,4 ± 0,02% e 27,8 ± 0,04% de todas as sequências encontradas no presente estudo (Figura 12).

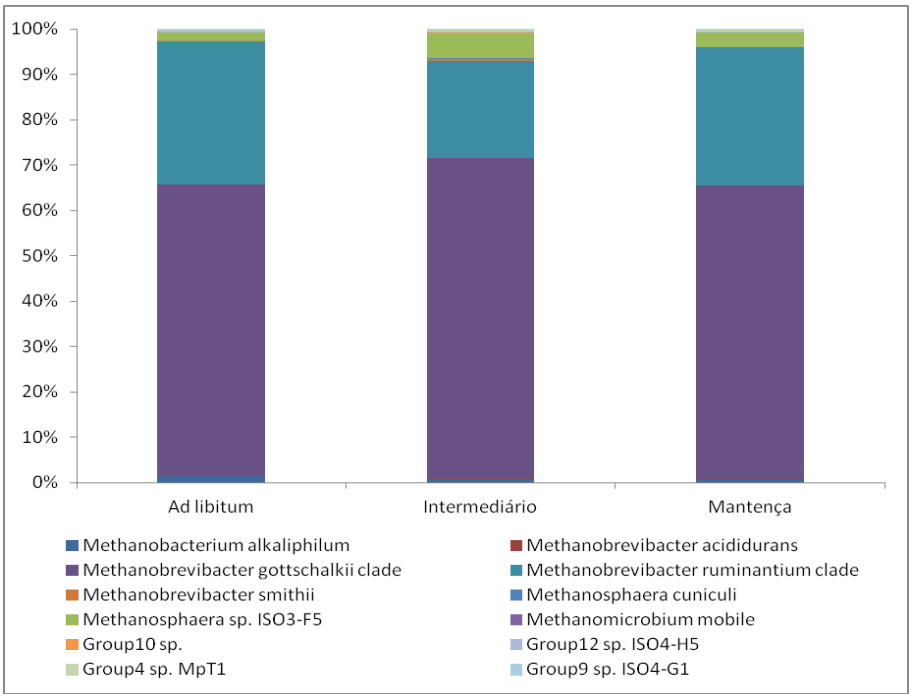

Figura 12. Comparação da abundância relativa de espécies de archaea identificadas nos níveis de alimentação

Uma matriz de correlação foi criada para testar as combinações lineares entre a comunidade de archaea, a produção e o rendimento de CH_4 (L/dia e g/kg MS_i) e variáveis de desempenho animal a fim de identificar as estruturas de correlação mais relevantes (Figura 13). O Grupo 9 sp. ISO4-G1 e Grupo 4 sp. MpT1 apresentaram correlação positiva com CH_4 g/kg MS_i, enquanto que a espécie *Methanosphaera* sp. ISO3-F5 apresentou correlação negativa com CH_4 g/kg MS_i.

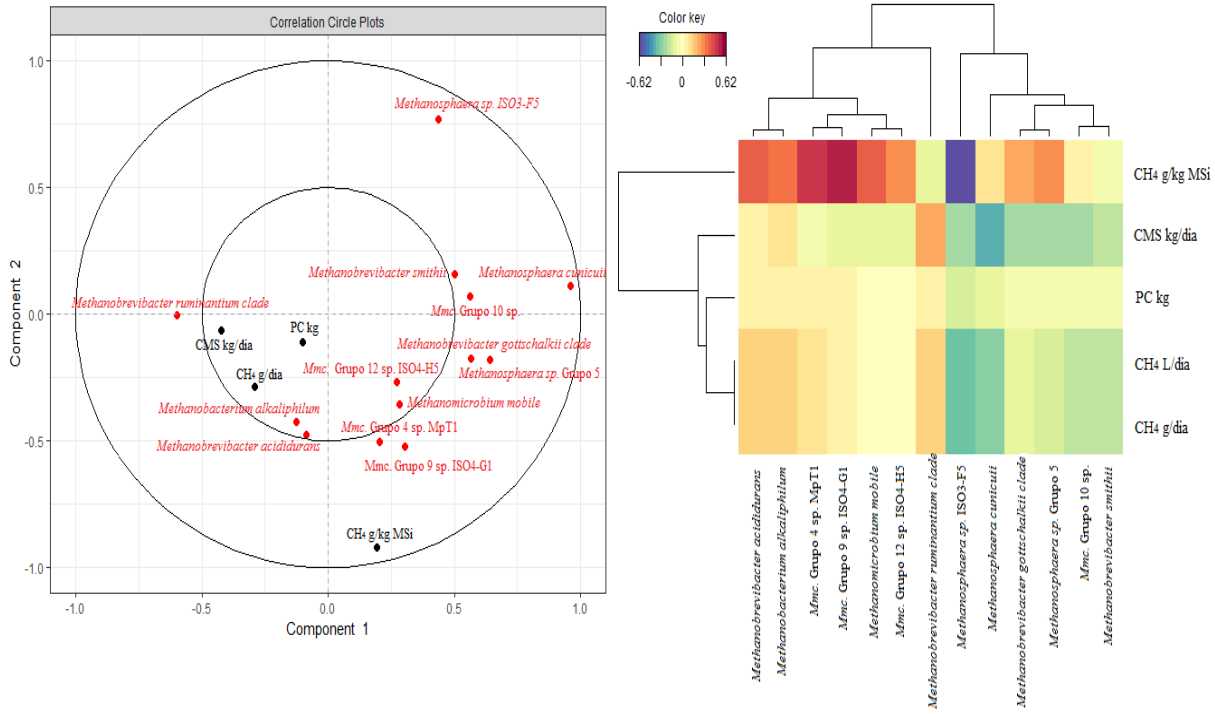

Figura 13. Gráfico de correlação em círculo e mapa de imagem agrupada (CIM) gerados a partir da saída da análise de correlação canônica regularizada (rCC) aplicada à comunidade de archaea do rúmen a nível de espécies e emissões de CH_4 e variáveis de desempenho de novilhos Girolando. (A) O gráfico de correlação em círculo mostra os dois primeiros componentes do rCC a nível de espécie, onde as emissões de archaea e CH_4 e as variáveis de desempenho são exibidas dentro de um círculo de raio 1 centrado na origem, com variáveis fortemente correlacionadas sendo projetadas na mesma direção a partir da origem. Quanto maior a distância da origem, mais forte é a associação. (B) O gráfico CIM exibe as estruturas de correlação entre as variáveis. Cada bloco colorido representa uma associação entre archaea, emissões de CH_4 e variáveis de desempenho abrangendo uma faixa de cores de azul (correlação negativa), para amarelo (correlação fraca), para vermelho (correlação positiva).

7.4 DISCUSSÃO

A comunidade de archaea deste estudo embora tenha apresentado baixa diversidade diferiu entre os níveis de alimentação e foi composta por poucas espécies cuja abundância não diferiu em resposta aos diferentes níveis de CMS. Em geral, os membros do gênero *Methanobrevibacter* dominaram a comunidade de archaea com altas proporções de *Methanobrevibacter gottschalkii* (66%) e *Methanobrevibacter ruminantium* (27%). Embora menos abundante, *Methanosphaera* (3,5%) parece ser um componente importante da

comunidade de archaea do rúmen. Recentemente, Henderson et al. (2015) relataram que as espécies *M. gottschalkii* e *M. ruminantium* foram amplamente distribuídas em amostras obtidas de diferentes regiões do mundo, representando até 74% de todas as archaea presentes no rúmen. Predominâncias semelhantes de *Methanobrevibacter spp*. foram observadas em outros estudos realizados com bovinos de corte e de leite (DANIELSSON et al., 2017; JEYANATHAN et al., 2011; KITTELMANN et al., 2013; ZHOU; HERNANDEZ-SANABRIA; GUAN, 2009).

A metanogênese ruminal pode ser afetada por diversos fatores, sendo um dos principais fatores o CMS. Sabe-se que o crescimento da microbiota ruminal está positivamente correlacionado com o consumo de alimentos devido aos substratos e nutrientes disponíveis para o crescimento microbiano (LI et al., 2019; PATHAK, 2008). Por exemplo, todos os membros do gênero *Methanobrevibacter* são capazes de utilizar CO_2 e H_2 para produzir CH_4, no entanto *M. gottschalkii* também requer acetato para o crescimento (MILLER; LIN, 2002), enquanto *M. ruminantium* requer formato (CERSOSIMO; WRIGHT, 2015). Por outro lado, o gênero *Methanosphaera* utiliza H_2 e metanol como substratos para a formação de CH_4 (FRICKE et al., 2006). Enquanto formato e metanol são produtos menores da fermentação microbiana, o acetato é amplamente produzido por várias bactérias do rúmen e fungos anaeróbios, favorecendo o estabelecimento de *M. gottschalkii* em vez de outros metanogênicos, como *Methanosphaera* que possuem metabolismo energético mais restrito. Portanto a variação na população metanogênica predominante observada nos três níveis de CMS pode estar relacionada aos substratos disponíveis e a disponibilidade de H_2 no rúmen.

Além disso, tanto o consumo de alimentos quanto o tamanho do rúmen têm impacto na taxa de passagem, que pode afetar o crescimento microbiano no rúmen, uma vez que, está associada ao fluxo de energia e tempos de geração microbiana (LI et al., 2019; PINARES-PATIO et al., 2003; SNIFFEN; ROBINSON, 1987) e, assim selecionando diferentes espécies. Portanto, explicando a baixa abundância de Methanosphaera no tratamento *Ad libitum* (1,7%) em comparação aos tratamentos intermediário e mantença (5,3% e 3,2%, respectivamente).

Intuitivamente, a comunidade archaea parece ser o grupo microbiano mais estreitamente correlacionado com as emissões de CH_4, embora alguns membros de archaea estejam de fato correlacionados com o CH_4, alguns estudos têm demonstrado que não há associação entre o número de archaea e as emissões de CH_4 em bovinos (DANIELSSON et al., 2012, 2017; ZHOU et al., 2011). Segundo Tapio et al. (2017b) devido à alta variabilidade na relação da emissão de CH_4 com a abundância global de archaea, a composição da

comunidade de archaea e não apenas o tamanho da comunidade tem maior significância em relação às emissões de CH_4. Já para Shi et al. (2014) a atividade metabólica de espécies metanogênicas individuais é importante na produção de CH_4. Neste estudo, foi revelado correlação negativa entre o *Methanosphaera* sp. ISO3-F5 e o rendimento de CH_4 (g/kg MSi), o que corrobora com os achados de Kittelmann et al. (2014), no qual o gênero *Methanosphaera* foi significativamente mais abundante em animais de baixa emissão de CH_4. Por outro lado foram encontradas correlações positivas entre o Grupo 9 sp. ISO4-G1 e o Grupo 4 sp. MpT1 com o rendimento de CH_4 (g/kg MSi). Segundo Kelly et al. (2016), o grupo archaea ISO4-G1 pertencente à família Methanomassiliicoccaceae são metanogênicos metilotróficos dependentes de H_2 para produzir energia, usando metanol e metilaminas como substratos. Conforme demonstrado por Friedman et al. (2017) a via metilotrófica era representativa na produção de CH_4 em bovinos jovens, sugerindo, portanto que as condições ambientais durante os estágios iniciais de vida do animal favorecem vias alternativas para a produção de CH_4.

7.5 CONCLUSÕES

Nossa análise fornece dados de base sobre a estrutura da comunidade de archaea em bovinos alimentados em diferentes níveis de consumo em condições tropicais. No geral, nesse estudo, os tratamentos consistiram em três níveis de alimentação e os animais foram alimentados com a mesma dieta, embora a quantidade de substrato tenha sido diferente entre os tratamentos não foi suficiente para mudar a comunidade de archaea. Além disso, foi possível identificar que alguns grupos de archaea podem estar correlacionados com o rendimento de CH_4. Entretanto, estudos adicionais utilizando mais animais por grupo de tratamento são necessários para caracterizar a microbiota ruminal em ambiente tropical e para identificar microrganismos que estão ligados a baixas emissões de CH_4 entérico.

7.6 REFERÊNCIA

ARONESTY, E. ea-utils: Command-line tools for processing biological sequencing data. **Durham, NC: Expression Analysis**, 2011.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. **Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple TestingJournal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological),** 57(1), 289-300. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2346101> Acesso em: 21 mar. 2018

BLAXTER, K. L.; CLAPPERTON, J. L. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. **British Journal of Nutrition**, v. 19, n. 01, p. 511, 1965.

CAPORASO, J. G. et al. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 2, p. 266–7, 2010a.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335–6, 2010b.

CERSOSIMO, L. M.; WRIGHT, A.-D. G. Rumen Methanogens. In: **Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution**. New Delhi: Springer India, 2015. p. 143–150.

DANIELSSON, R. et al. Methanogenic Population and CH4 Production in Swedish Dairy Cows Fed Different Levels of Forage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 17, p. 6172, 2012.

DANIELSSON, R. et al. Methane Production in Dairy Cows Correlates with Rumen Methanogenic and Bacterial Community Structure. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 226, 2017.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.

FRICKE, W. F. et al. The genome sequence of Methanosphaera stadtmanae reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H2 for methane formation and ATP synthesis. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 642–58, 2006.

FRIEDMAN, N. et al. Diet-induced changes of redox potential underlie compositional shifts in the rumen archaeal community. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 174–184, 2017.

FRIEDMAN, N.; JAMI, E.; MIZRAHI, I. Compositional and functional dynamics of the bovine rumen methanogenic community across different developmental stages. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 3365–3373, 2017.

GONZÁLEZ, I.; MARTIN, P. G. P.; BACCINI, A. CCA: An R Package to Extend Canonical Correlation Analysis. **JSS Journal of Statistical Software**, v. 23, n. 12, 2008.

HENDERSON, G. et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14567, 2015.

JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science and Technology**, v. 160, n. 1–2, p. 1–22, 2010.

JEYANATHAN, J. et al. Methanogen community structure in the rumens of farmed sheep, cattle and red deer fed different diets. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 2, p. 311–326, 2011.

KELLY, W. J. et al. Complete Genome Sequence of Methanogenic Archaeon ISO4-G1, a Member of the Methanomassiliicoccales, Isolated from a Sheep Rumen. **Genome announcements**, v. 4, n. 2, 2016.

KITTELMANN, S. et al. Simultaneous Amplicon Sequencing to Explore Co-Occurrence Patterns of Bacterial, Archaeal and Eukaryotic Microorganisms in Rumen Microbial Communities. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e47879, 2013.

KITTELMANN, S. et al. Two Different Bacterial Community Types Are Linked with the Low-Methane Emission Trait in Sheep. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e103171, 2014.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583–621, 1952.

LI, F. et al. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 6, 2019.

MACHADO, F. S. et al. Technical note: A facility for respiration measurements in cattle. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 6, p. 4899–4906, 2016.

MANDAL, S. et al. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. **Microbial ecology in health and disease**, v. 26, p. 27663, 2015.

MILLER, T. L.; LIN, C. Description of Methanobrevibacter gottschalkii sp. nov., Methanobrevibacter thaueri sp. nov., Methanobrevibacter woesei sp. nov. and Methanobrevibacter wolinii sp. nov.. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 819–822, 2002.

MIZRAHI, I.; JAMI, E. Review: The compositional variation of the rumen microbiome and its effect on host performance and methane emission. **animal**, p. 1–13, 2018.

MUEGGE, B. D. et al. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 332, n. 6032, p. 970–4, 2011.

NEVES, A. L. A. et al. Enhancing the Resolution of Rumen Microbial Classification from Metatranscriptomic Data Using Kraken and Mothur. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2445, 2017.

OSS, D. B. et al. Energy and protein requirements of crossbred (Holstein × Gyr) growing bulls. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 4, p. 2603–2613, 2017.

PATHAK, A. K. Various factors affecting microbial protein synthesis in the rumen. **Veterinary World**, v. 1, n. 6, p. 186, 2008.

PINARES-PATIO, C. S. et al. Rumen function and digestion parameters associated with differences between sheep in methane emissions when fed chaffed lucerne hay. **The Journal of Agricultural Science**, v. 140, n. 2, p. S0021859603003046, 2003.

SEEDORF, H. et al. RIM-DB: a taxonomic framework for community structure analysis of methanogenic archaea from the rumen and other intestinal environments. **PeerJ**, v. 2, p. e494, 2014.

SHI, W. et al. Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. **Genome research**, v. 24, n. 9, p. 1517–25, 2014.

SNIFFEN, C. J.; ROBINSON, P. H. Protein and fiber digestion, passage, and utilization in lactating cows. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. **Journal of dairy science**, v. 70, n. 2, p. 425–41, 1 fev. 1987.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 165–174, 2007.

TAPIO, I. et al. The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 7, 2017.

TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017.

WOLIN, M. J.; MILLER, T. L.; STEWART, C. S. Microbe-microbe interactions. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. p. 467–491.

ZHOU, M. et al. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 5, p. 1148–1158, 2011.

ZHOU, M.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GUAN, L. L. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6524–33, 2009.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo fornece dados de base sobre a estrutura da comunidade de archaea em bovinos leiteiros criados em condições tropicais. Notavelmente, o rúmen apresenta uma comunidade *core* de metanogênicos, independente da composição racial, estratégias de pastejo e consumo de matéria seca, constituída principalmente por espécies do gênero *Methanobrevibacter* e *Methanosphaera*, como o *clado Methanobrevibacter gottschalkii*, o *clado Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanosphaera sp. Grupo 5* e *Methanosphaera sp. ISO3-F5*.

No geral, este estudo, mostrou que existem evidências de que existe influência da genética do hospedeiro que pode regular parcialmente a composição do microbioma ruminal, e que os intervalos de pastejo também podem afetar a composição do microbioma ruminal. Além disso, foi possível identificar que alguns grupos de archaea podem estar correlacionados com o rendimento de CH_4. Entretanto, estudos adicionais utilizando mais animais criados em condições tropicais ainda são necessários, auxiliando no desenvolvimento de estratégias de mitigação de CH_4 visando à redução do CH_4 e, assim, a sustentabilidade da pecuária em países tropicais como o Brasil.