Microbiologia ruminal sob a perspectiva metagenômica: Uma revisão das novas descobertas e tendências

https://doi.org/10.56238/levv15n39-185

Gilmara da Silva Miranda
Doutora em Zootecnia
Universidade Federal da Bahia (UFBA)
E-mail: gilmaramiranda01@gmail.com

Victor Gabriel Souza de Almeida
Graduado em Agronomia
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
E-mail: victor.gsa11@gmail.com

Cristian Martins de Souza
Graduado em Agronomia
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
E-mail: cr-tiam@hotmail.com

Adriele Aurélio da Silva
Graduanda em Agronomia
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
E-mail: drisilva842@gmail.com

Amanda Santana da Silva
Graduada em Agroecologia
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
E-mail: amandasantana200795@gmail.com

Luciana Queiroz Andrade
Graduada em Agroecologia
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
E-mail: lucianajq@gmail.com

Simone Bento da Silva
Graduanda em Zootecnia
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
E-mail: simonebento@aluno.ufrb.edu.br

Reinaldo Silva Brandão
Graduando em Zootecnia
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)
E-mail: reinaldoufrb@hotmail.com

RESUMO
A microbiologia ruminal estuda os microrganismos presentes no rúmen, o compartimento do estômago dos ruminantes responsável pela fermentação do alimento. Esses microrganismos, que incluem bactérias, protozoários, fungos e arqueas, desempenham um papel crucial na digestão da celulose e outros carboidratos complexos, permitindo que os ruminantes aproveitem nutrientes de plantas fibrosas. Tradicionalmente, o estudo da microbiota ruminal se baseava em técnicas de cultivo in vitro, limitadas a organismos que podiam ser cultivados em laboratório. No entanto, avanços em metagenômica (uma abordagem que permite a análise direta do DNA microbiano a partir de amostras ambientais, sem a necessidade de cultivo) têm revolucionado o campo. Com a metagenômica, os cientistas podem identificar e caracterizar toda a diversidade microbiana presente no rúmen, incluindo organismos previamente desconhecidos ou não cultiváveis. Esse método tem revelado uma microbiota muito mais complexa e diversa do que se pensava, oferecendo novos insights sobre as funções microbianas, interações entre espécies e sua influência na saúde e produtividade dos ruminantes. Esses novos conhecimentos são fundamentais para melhorar a eficiência alimentar, reduzir a produção de metano (um potente gás de efeito estufa) e desenvolver estratégias nutricionais e terapêuticas mais precisas para o manejo dos ruminantes. A metagenômica, portanto, está impulsionando uma nova era na microbiologia ruminal, com potencial para transformar a produção animal de forma sustentável e eficiente.

Palavras-chave: Diversidade Microbiana, Eficiência Alimentar, Ruminantes.

1 INTRODUÇÃO

Os ruminantes pertencem a classe dos mamíferos herbívoro ungulados, e a ordem Artiofactyla, e são capazes de utilizar forragens como principal fonte de alimento (HUNGATE, 1966). São animais com diferencial, principalmente pelo seu trato gastrointestinal complexo, composto por câmeras fermentativas responsáveis pela digestão, absorção de nutrientes e pela saúde geral do animal. O trato gastrointestinal desses animais comporta um ecossistema microbiano diverso e abundante (BORDIM et al., 2016).

A ampliação de conhecimentos sobre o microbioma ruminal, tem permitido avaliações detalhadas sobre a comunidade microbiana, suas características e funções. Esses avanços proporcionaram progressos significativos no que se refere à alimentação de ruminantes, permitindo uma maior eficiência no uso dos nutrientes e, consequentemente, um melhor aproveitamento pelo animal (MORGAVI et al., 2013).

Estudos que investigam as comunidades microbianas, assim como as características ruminais, são fundamentais para a compreensão e manipulação do desempenho e da saúde dos ruminantes (HUWS et al., 2018). Diversos estudos evidenciaram que os ruminantes, em conjunto com seu microbioma, evoluíram ao longo do tempo, tornando-se adaptáveis a uma ampla variedade de dietas, graças à plasticidade funcional das comunidades presentes no rúmen (MORGAVI et al., 2013).

Além das características evolutivas, outros fatores também influenciam a dinâmica dos microrganismos ruminais, como a idade (FONTY et al., 2007), o uso de medicação antimicrobiana (KLEEN et al., 2003), a sanidade animal (RUSTOMO et al., 2006), a localização geográfica (SUNDSET et al., 2007), o nível de estresse (LYNOMO et al., 2010), entre outros. Dessa forma, a metagenômica torna-se uma ferramenta indispensável para compreender a complexa comunidade microbiana presente no rúmen.

2 METODOLOGIA

Este artigo baseia-se em uma revisão bibliográfica, na qual foram coletadas informações a partir de uma ampla pesquisa na literatura existente. O levantamento envolveu produções científicas relacionadas à microbiologia ruminal, com foco no conhecimento derivado de estudos em metagenômica, incluindo atividades básicas de identificação, análise e interpretação de dados.

As plataformas de busca utilizadas para a coleta de dados incluíram: Elsevier, SciELO, Portal de Periódicos da Capes, Sci-Hub, Google Acadêmico e livros digitais, além de outras fontes de divulgação técnica. Os critérios de inclusão focaram em artigos publicados nos últimos dez anos, teses e dissertações, bem como outras produções científicas disponíveis na internet, totalizando 90 trabalhos analisados. Esta revisão é descritiva e fornece informações detalhadas sobre a aplicação da metagenômica no estudo da microbiologia ruminal.

3 DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE RUMINAL

O ecossistema ruminal, é constituído por uma comunidade microbiana dinâmica e diversa, composta por bactérias, arqueas, protozoários e fungos. Esses microrganismos interagem intimamente uns com os outros e têm uma relação simbiótica mutualística, que favorece o hospedeiro (MIZRAHI, 2013). A atividade metabólica desses microrganismos converte substratos fibrosos complexos em ácido graxos voláteis e proteína microbiana, que são usados pelo animal para manutenção, crescimento e lactação (RIBEIRO et al., 2017).

O rúmen é uma cavidade que apresenta condições favoráveis à sobrevivência e crescimento dos microrganismos. Uma câmara fermentativa anaeróbia, com temperatura relativamente constante (38-40°C) e pH entre 5,5 e 6,9 (HUNGATE, 1966; CLARKE, 1977; DEHORITY, 2003). De acordo com Orskov e Tyle, (1990), o pH do rúmen em conjunto com os substratos disponíveis para fermentação, são fatores que determinam a permanência dos microrganismos ruminais. No rúmen o potencial redox geralmente se encontra entre -250 e -450 mV, comprovando a ausência do oxigênio e o alto potencial redutor (VAN SOEST, 1994).

Os produtos finais da fermentação ruminal incluem ácidos graxos de cadeia curta principalmente acetato, propionato e butirato, gases como CO_2 e CH_4. Os Ácidos graxos voláteis se apresentam como a principal via de fornecimento de energia para o animal. Este processo de fermentação resulta em muitos produtos intermediários, tais como lactato, succinato, fornato, H_2 e NH_3 (HUNGATE, 1966).

Conforme Stewart et al. (1997), para que uma espécie seja considerada parte da microbiota ruminal, ela deve ser anaeróbia, produzir subprodutos no rúmen e desenvolver-se ativamente, com um metabolismo compatível com as condições normais desse ambiente.

Desse modo a microbiota do rúmen pode ser classificada em quatro tipos de subpopulações, a primeira população encontra-se integrada a líquidos, e é composta por microrganismos planctônicos suspenso no líquido ruminal, compreendendo os que se separam das partículas do alimento e os que consome fragmentos de alimentos solúveis no fluido ruminal (MCALLISTER et al., 1994). A segunda, são populações incorporadas a fração sólida, que inclui microrganismos aderidos de forma moderada ou forte as partículas do alimento, esse grupo é considerado essencial no processo da digestão (MCALLISTER et al., 1994) além de corresponder a aproximadamente 75% dos microrganismos presente no rúmen. O terceiro grupo é aquele aderida ao epitélio do rúmen, e que corresponde a 1% da população total do rúmen (CZERKAWSKI, 1986).

3.2 COMUNIDADE BACTERIANA DO RÚMEN

A comunidade bacteriana no rúmen é predominantemente composta por microrganismos estritamente anaeróbios. No entanto, há também a presença de algumas espécies anaeróbias facultativas, que desempenham um papel importante na manutenção das condições anaeróbias do ambiente. As bactérias do rúmen não apenas exibem uma grande diversidade, mas também possuem uma atividade metabólica significativamente elevada. Apresentam uma densidade populacional estimada de 10^{-11} célula/mL de conteúdo ruminal, seguida por arquéias (10^{8-9} mL^{-1}), protozoários ciliados (10^{6} mL^{-1}), e fungos com 10^{6} mL^{-1} (WANG et al., 2017).

Os primeiros estudos que permitiram a identificação e o entendimento do metabolismo das bactérias no rúmen surgiram a partir de pesquisas que utilizaram técnicas de cultivo bacteriano em condições anaeróbias (HUNGATE, 1966). Segundo análises filogenéticas, foi demonstrado que o microbioma central é composto principalmente por bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, que estão amplamente presentes nos ruminantes, independentemente da região geográfica (HENDERSON et al., 2015).

Por meio do sequenciamento do gene 16S do rRNA bacteriano, verificou-se que os filos Bacteroidetes e Firmicutes, independentemente da espécie, idade ou dieta, podem representar até 80% da população bacteriana no rúmen (MENEZES et al., 2011; Henderson et al., 2013; Mohammed et al., 2014). Em contrapartida, os filos *Proteobacteria, Fibrobacter, Verrucomicrobia, Tenericutes* e *Spirochaetes* estão presentes em concentrações menores (MENEZES et al., 2011).

As espécies bacterianas no rúmen podem se apresentar sob diferentes formas, como cocos, espirilos, bacilos ou vibriões. Elas também podem ser classificadas como micoplasmas (que não possuem parede celular), gram-positivas ou gram-negativas. As gram-positivas possuem uma parede celular espessa, formada por uma única camada de peptidoglicano, enquanto as gram-negativas apresentam uma estrutura mais complexa, com uma dupla membrana externa conectada por uma camada de glicopeptídeos (PURVES et al., 2002; KOZLOSKI, 2011). Na maioria dos casos, as espécies que degradam carboidratos estruturais são geralmente gram-positivas.

No ambiente do rúmen, é possível identificar uma grande variedade de bactérias altamente especializadas, capazes de utilizar substratos específicos, variados ou intermediários (HUNGATE, 1966). Assim, as bactérias ruminais podem ser classificadas conforme sua atividade metabólica, como fibrolíticas, amilolíticas (*Selenomonas ruminantium, Streptococcus bovis),* proteolíticas (*Prevotella spp.*), lipolíticas (*Anaerovibrio lipolytica*), produtoras de lactato (*Streptococcus bovis e Selenomonas ruminantium*) e consumidoras de lactato (*Megasphaera elsdenii*) (HUNGATE, 1966; MCCANN et al., 2014).

Apesar da ampla variedade de bactérias degradadoras de celulose, algumas espécies, como *Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus flavefaciens e R. albus*, demonstram uma capacidade

superior para digerir celulose em comparação com outras espécies celulolíticas conhecidas (ARCURI et al., 2011). Isso possivelmente se deve ao fato de essas espécies possuírem diversos genes que codificam enzimas específicas para a degradação de fibras (MATTHEWS et al., 2019).

A maioria das bactérias celulolíticas prefere uma faixa de pH próxima de 6. A sensibilidade ao pH é uma característica geral do crescimento bacteriano. Quando o pH ruminal cai abaixo desse valor, a atividade desses microrganismos é limitada; mesmo uma ligeira redução pode inibir a digestão da celulose (RUSSEL e WILSON, 1996). Algumas bactérias ruminais, no entanto, desenvolveram resistência e a capacidade de manter seu pH intracelular baixo, além de preservar um gradiente de pH através da membrana celular, evitando o acúmulo intracelular de ânions.

Além disso, a atividade celulolítica pode ser inibida pela presença de amido na alimentação, que favorece o crescimento de bactérias amilolíticas (gram-negativas) e afeta negativamente a digestão da fibra devido à competição entre esses grupos (STEENBAKKERS et al., 2008).

A pectina, por sua vez, é fermentada tanto por bactérias quanto por protozoários (DEHORITY, 1969), sendo que as principais bactérias envolvidas nesse processo são *Butyrivibrio fibrisolvens, Prevotella ruminicola, bacteroides ruminicola e Lachnospira multiparus*. Essas bactérias produzem e liberam enzimas pectinolíticas no ambiente ruminal; pectina liases são as enzimas primárias que hidrolisam a pectina em oligogalacturonídeos (DUSKOVA; MAROUNEK, 2001).

As espécies pertencentes ao gênero Bacteroides desempenham um papel importante na degradação de carboidratos não estruturais, como o amido, no ambiente ruminal, através da ação da enzima amilase (KAMRA, 2005).

Já na década de 1960, as características proteolíticas de espécies como B. *amylophilus, B. ruminicola, Butyrivibrio sp. e S. ruminantium* já haviam sido evidenciadas (ARCURI et al., 2011). Contudo, a maioria das bactérias ruminais depende dos carboidratos como principal fonte de energia, sendo que algumas espécies não conseguem crescer utilizando aminoácidos como único substrato. Muitas produzem pequenas quantidades de enzimas proteolíticas, que contribuem para a extensa atividade proteolítica no rúmen (NOCEK, 1988).

As bactérias proteolíticas do rúmen são responsáveis pela degradação das proteínas presentes na dieta, permitindo a síntese de ácidos graxos voláteis (AGVs) de cadeia curta, que são utilizados como fonte de energia e amônia pelo animal (ARCURI et al., 2011).

O grupo de organismos capazes de hidrolisar lipídios no rúmen é limitado, devido ao baixo potencial de óxido-redução do ambiente ruminal, característico de ambientes anaeróbios (DEHORITY, 2003). A espécie bacteriana *Anaerobivrio lipolytica* é capaz de hidrolisar lipídios, enquanto utiliza ribose, frutose, glicerol e lactato como fontes de energia. Os demais substratos são convertidos em acetato, propionato e CO_2, enquanto o glicerol é transformado em propionato e succinato. Todos esses processos resultam na produção de H_2 (STEWART et al., 1997).

Aderidas a parede do rúmen encontra-se um grupo de bactérias composto por bactérias anaeróbias facultativas, como *a actobacillus sp., Streptococcus sp.,* que digerem células epiteliais fenecidas e oferecem uma importante atividade ureolítica. Esses microrganismos exercem importante papel na manutenção do baixo nível de oxigênio no rúmen, ainda que representem apenas 1% na microbiota total do rúmen (ARCURI et al., 2011).

O lactato é um produto intermediário da fermentação ruminal, em dietas ricas em amido, a população deste tipo de bactérias capazes de o uso de ácido láctico é aumentada (COUNOTTE et al., 1981). *Megasphaera elsdeni*i é a principal espécie responsável para a metabolização do ácido láctico, assumindo importante papel na prevenção da acidose durante a o período de adaptação de dietas ricas em concentrado (COUNOTTE et al., 1981).

3.3 BACTÉRIAS PRODUTORAS DE METANO (*ARCHAEA)*

As bactérias produtoras de metano no rúmen são um importante grupo que regulam a fermentação ruminal, por meio da remoção eficiente de H_2. Pertencem ao domínio *Archaea* e ao filo *Euryarchaeota* (MORGAVI et al., 2010).

A retirada de H_2 através da redução de CO_2 a CH_4 é importante para o crescimento de outros microrganismos ruminais e para que ocorra fermentação eficiente dos substratos (YOKOYAMA; JOHNSON 1988). Esse grupo pode atuar de forma livre ou associados com protozoários.

A produção de metano como produto final da fermentação ruminal é considerado uma perda de energia pelos ruminantes, representando cerca de 2-12% da energia alimentar ingerida (MOHAMMED al et., 2004), além de contribuir negativamente para o efeito de estufa (GARNSWORTHY et al., 2012). Portanto, os metanógenos ruminais têm atraído muito atenção de pesquisa na última década, com o objetivo de compreender sua diversidade, estrutura da comunidade, a relação com outros microrganismos ruminais e com a eficiência alimentar, a emissão de CH_4 em respostas a intervenções dietéticas.

O processo de metanogênese é necessário para manter baixas concentrações de H^+ no ambiente ruminal, utilizando o CO_2 como aceptor de elétrons (BODAS et al., 2012).

Embora o H^+ seja um dos principais produtos finais da fermentação de bactérias, protozoários, e fungos, não se acumula no rúmen porque é rapidamente utilizado por alguns microrganismos que fazem parte do ecossistema. No rúmen, existe uma interrelação entre as espécies produtoras e utilizadoras de H^+ que é chamada "transferência interespécies H^+. A produção de metano no ambiente ruminal é um exemplo claro deste processo, onde existe uma associação entre espécies que produzem e utilizam H^+. O metano é gerado por metanogênicas que utilizam o dióxido de carbono e hidrogénio (VAN ZIJDERVELD et al., 2011).

Quando o H^+ não é utilizado pelas metanogênicas, o NADH pode ser reoxidado por uma desidrogenase para produzir etanol ou lactato. Esse processo ocorre rapidamente em animais alimentados com quantidades elevadas de açúcares fermentáveis (MOSS et al 2000).

Além do CO_2 para produzir CH_4, esses microrganismos conseguem também degradar substratos contendo os metilos (CH^{3-}) ou acetil ($CH3OO^-$), a exemplo do metanol e o acetato que atuam como receptores de elétrons (LIU; WHITMAN 2008). Estudos in vivo também mostraram que a inibição de metanogênicos diminui a proporção acetato: propionato, refletindo em mudanças na fermentação para ácidos graxos voláteis (AGV) (PATRA et al., 2012).

De acordo com bancos de dados públicos, 90% dos metanógenos ruminais identificados pertencem a gêneros conhecidos, com *Methanobrevibacter* sendo representado por 63,2% das sequências analisadas, seguido por M*ethanomicrobium* (7,7%), *Methanosphaera* (9,8%) e *Methanobacterium* (1,2%). A ordem *Thermoplasmatales*, anteriormente denominada como cluster C ruminal (*Rumen Cluster C - RCC*), é representada por 7,4% do total de sequências analisadas (MATTHEWS et al., 2019).

3.4 PROTOZOÁRIOS RUMINAIS

Os protozoários são organismos unicelulares, eucariontes, com cutícula e organização interna complexa com aparelho digestivo contendo boca, estomago, reto e ânus. variam em tamanho de 20 a 200 µm, sendo cerca de 10 a 100 vezes maiores que as bactérias (DEHORITY, 2003) utilizam as bactérias como sua fonte de aminoácidos e N (HUNGATE, 1966).

Apresentam um macronúcleo, micronúcleo e vacúolos contrácteis. Os vacúolos contráteis podem atuar na excreção de gases e produtos residuais líquidos (HUNGATE, 1966). Reproduzem-se por fissão binária (WARNER, 1966). Foram os primeiros microrganismos descoberto no rúmen por volta de 1843 (HUNGATE, 1966). Existem cerca de 104 a 106 células protozoárias por grama de conteúdo ruminal (DEHORITY, 2003).

A maioria dos protozoários presentes no rúmen são ciliados, no entanto, os flagelados também se fazem presente. Os ciliados são divididos em dois grupos (subclasses): *Holotricha e Entodiniomorpha*.

O *Entodinium* é o género mais abundante no rúmen (IBRAHIM et al. 1970; DEARTH et al. 1974). Por questões evolutivas, os ciliados tornaram-se altamente especializado para o ecossistema ruminal (DEHORITY, 2003), utilizam carboidratos (FINDLEY et al., 2011) e por conseguinte, liberam H_2, utilizado pelos microrganismos metanogênicos (SKILLMAN et al., 2006; TYMENSEN et al., 2012).

Utilizam a fagocitose sobre bactérias, como forma de controlar o número de bactérias no rúmen (SERRANO et al., 2011). Possuem a capacidade de ingerir e utilizar amido, proteína insolúvel e

também fermentar carboidratos e como resultado final pode ser gerados acetato, formato, butirato, propionato, H_2 e CO_2 (ABRAR et al., 2016).

São eficientes em utilizar quantidades elevadas de amido e ao mesmo tempo conseguem usar seus corpos para armazená-lo (WILLIAMS; COLEMAN, 1985). O uso desse mecanismo para engolfar, permite retardar a fermentação pelas bactérias e a formação de ácidos que abaixam o pH (MACKIE et al., 1978).

Os protozoários exercem um papel fundamental em animais alimentados com dietas com baixa proteína ou submetidos a curtos períodos de restrição (YOKOYAMA; JOHNSON, 1988). São capazes de converter proteínas bacterianas em proteínas protozoárias, quando não podem utilizar NH_3 de forma eficiente como fonte de nitrogênio.

3.5 FUNGOS ANAERÓBIOS RUMINAIS

No ambiente ruminal, os fungos anaeróbios são reconhecidos, por serem os principais atuantes na degradação da biomassa vegetal no rúmen (AKIN *et al*., 1988 ; LEE et al.; 2000). Pertencem ao filo *Neocallimastigomycota, que* compreende atualmente seis gêneros: *Neocallimastix, Piromyces, Caecomyces, Orpinomyces, Anaeromyces* diferente em características morfológicas: morfologia do talo e hifas (rizoidal vs. bulboso) e flagelação do zoósporo (mono flagelado vs. Poli flagelado) e forma do zoósporo (Ovoide, piriforme, esférica, elipsoide) (HO; BARR, 1995; OZKOSE *et al*., 2001).

A presença de fungos no rúmen foi questionada, devido a crença de que os fungos fossem aeróbios obrigatórios. No entanto, Orpin (1977) evidenciou que a parede celular desses organismos continha quitina, confirmando sua correta classificação no reino fungi. Desde então, pesquisa tem sido desenvolvidas para compreender os mecanismos que permitiram, que esses fungos sobrevivessem em meio anaeróbio.

Em relação as adaptações presentes nesse tipo de fungo, está inclusa a ausência de mitocôndrias, citocromos e outras características bioquímicas que fazem parte da via de fosforilação oxidativa (YARLETT *et al*., 1986 ; YOUSSEF *et al.,* 2013). No entanto, esses fungos anaeróbicos possuem organelas especializadas, chamadas hidrogenossomos, que se acoplam o metabolismo da glicose para a produção de energia celular na ausência do oxigênio.

Existem evidências que apoiam a função dos fungos como colonizadores primários e digestores de fibra no rúmen. Os zoósporos se desenvolvem em micélios, que então envolvem e quebram a estrutura vegetal. Como resultado de sua atividade e crescimento, penetram e rompem o tecido vegetal, o que também aumenta a área exposta do substrato, facilitando o acesso a outros microrganismos utilizadores de fibras no rúmen, como bactérias e protozoários (YOUSSEF et al., 2013).

Os fungos anaeróbios conseguem quebrar o material lignocelulósico pela expressão de uma variedade de enzimas metabolizadoras de fibras, além do crescimento invasivo de seu micélio

vegetativo. Complexos livres e também multe enzimas, como celulossomas, foram identificados em espécies de fungos ruminais para as quais a sequência do genoma está disponível (YOUSSEF et al., 2013; GILMORE et al., 2015).

Fungos ruminais apresentam uma estreita associação com os metanógenos, uma relação mutuamente benéfica em que a atividade metabólica da última mantém o H_2 em níveis baixos, o que favorece a atividade da hidrogenase nos hidrogenossomas (BAUCHOP; MOUNTFORT, 1981)

3.6 VÍRUS NO AMBIENTE RUMINAL

Apesar de serem abundantes no ambiente ruminal, os vírus especialmente os bacteriófagos, possuem poucas informações a respeito da sua interação com os outros microrganismos presentes no rúmen. Estudos pioneiros sobre bacteriófagos no rúmen reconheceram diferentes tipos morfológicos tanto em bovinos como em ovinos (KLIEVE; BAUCHOP, 1988) pertencentes a três famílias de vírus, *Podoviridae, Myorividae, Syphorividae* (KLIEVE et al., 1996).

Os bacteriófagos exercem papel importante para limitar o número de bactérias no ecossistema, permitindo o equilíbrio das comunidades do rúmen, por meio da seleção natural de bactérias resistentes a fagos (MILLER et al., 2012).

Estão presentes em quantidade aproximada de 10^9 partículas por mL (TARAKANOV, 2006). São facilitadores da transferência horizontal de genes (HGT) (RODRIGUEZ et al., 2009; ROHWER; THUBER, 2009). HGT é definido como fenômeno comum e largamente difundido nas comunidades microbianas, colaborando para a evolução dos microrganismos nesses locais (KOONIN; WOLF, 2008; AMINOV, 2011).

As técnicas para mitigação de metano entérico compreendem a terapia com bacteriófagos (PATRA, 2012), de modo que os bacteriófagos conseguem alcançar e lisar espécies de bactérias indesejadas (KLIEVE et al., 1999; BACH et al., 2002).

3.7 ABORDAGEM METAGENÔMICA NO AMBIENTE RUMINAL

Desde o desenvolvimento da Técnica de Hungate, que permitiu o cultivo de bactérias ruminais estritamente anaeróbias fora do rúmen (HUNGATE, 1950), a microbiologia ruminal experimentou um avanço significativo. Embora as técnicas baseadas em cultivo tenham sido bem-sucedidas no isolamento de diversos microrganismos, devido à enorme diversidade de espécies presentes no rúmen, esses métodos não são os mais adequados para monitorar as mudanças na estrutura das comunidades microbianas. O número de espécies de microrganismos isoladas e caracterizadas a partir do rúmen ainda é considerado baixo.

De acordo com um estudo realizado por Han et al. (2015), que avaliou a diversidade de bactérias ruminais em cabras antes e após o desmame, analisando o DNA genômico dos

microrganismos extraído do rúmen, foi observado que 72,14% das bactérias identificadas não podiam ser cultivadas. Esses resultados ressaltam o grande número de espécies bacterianas presentes no rúmen que ainda não foram inteiramente caracterizadas.

Entretanto, com a ampliação das técnicas moleculares, o uso do sequenciamento de alto desempenho e o surgimento das chamadas técnicas de nova geração (Next-Generation Sequencing), bem como o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática, foi possível expandir significativamente os conhecimentos sobre a diversidade microbiana em diferentes ecossistemas (MATTHEWS et al., 2019).

Entre os métodos utilizados para estudar a diversidade microbiana, a metagenômica se destaca como uma alternativa eficaz, permitindo acessar de forma mais abrangente a diversidade dos microrganismos presentes no ambiente analisado, possibilitando estudos genômicos da microbiota sem a necessidade de cultivo dos microrganismos (TESSLER et al., 2017).

A metagenômica refere-se à técnica de sequenciamento total do material genômico de uma amostra. Crucialmente, ao sequenciar os genomas de todos os organismos presentes, em vez de focar em um único gene marcador, é possível obter informações sobre a função dos genes, estrutura e organização dos genomas, além de identificar novos genes e biocatalisadores e explorar as relações evolutivas dentro da comunidade (ROUMPEKA et al., 2017).

Existem dois métodos principais para estudar o microbioma utilizando o sequenciamento de alto rendimento: o sequenciamento de genes marcadores e a metagenômica, que analisa o genoma inteiro (WGS). Em estudos de genes marcadores, primers genéricos são projetados para amplificar, por PCR, genes específicos, como o 16S rRNA para bactérias e arqueas, e o 18S rRNA para fungos (ROUMPEKA et al., 2017).

A utilização dessas técnicas permite detectar alterações em espécies individuais, desde que o primer adequado seja utilizado. A quantificação das espécies também é possível. No entanto, apenas uma pequena fração da microbiota do rúmen é representada por essas espécies enumeradas. Consequentemente, mudanças em espécies que não são quantificadas podem não ser detectadas (MIDDELBOS et al., 2007).

O principal aspecto que diferencia o sequenciamento genômico do metagenômico é a necessidade de isolar os microrganismos em condições laboratoriais antes de realizar o sequenciamento do DNA no sequenciamento genômico. Em contraste, a metagenômica permite a análise das sequências de DNA coletadas diretamente da amostra ambiental, fornecendo informações biológicas fundamentais para a compreensão da comunidade microbiana como um todo (MATTHEWS et al., 2019).

O sequenciamento "shotgun" do genoma inteiro (Whole Genome Shotgun Sequencing - WGS) é uma técnica que envolve a fragmentação completa das moléculas de DNA coletadas diretamente do

ambiente em pequenos pedaços, que são sequenciados de forma completamente aleatória. Dessa maneira, é possível não apenas avaliar a diversidade microbiana e a abundância de microrganismos nos respectivos ambientes, mas também montar genomas completos, prever genes, identificar enzimas e vias metabólicas, e quantificar elementos genômicos funcionais (KUNIN et al., 2008; HUWS et al., 2018).

Depois do sequenciamento metagenômico da amostra, é necessário analisar o conteúdo gerado, utilizando ferramentas de bioinformática, que auxiliam na geração de grandes volumes de dados. Conforme relatado por Dudhagara et al. (2015), existem diversas opções de ferramentas offline disponíveis que permitem classificar leituras metagenômicas utilizando como referência um conjunto de dados conhecidos, como Pacote de software Metagenomics Rapid Annotation, Software Integrated Microbial Genomes and Metagenomes, METAVIR, Metagenomics Reports, MyTaxa.

Pesquisa integrada que utiliza metagenômica, bioinformática, nutrição e inferências estatísticas tem proporcionado uma oportunidade única para que nutricionistas de ruminantes e microbiologistas do rúmen trabalhem de forma sinérgica. Esse trabalho conjunto visa melhorar a eficiência na utilização de nutrientes, minimizar a produção de resíduos e reduzir as emissões de metano e amônia, aumentando, assim, a produtividade dos rebanhos e reduzindo os impactos ambientais negativos.

Em um estudo conduzido por Delgado et al. (2019), que avaliou as associações entre a microbiota ruminal e características relacionadas à eficiência alimentar em bovinos da raça Holandesa por meio de sequenciamento metagenômico, os resultados revelaram que vacas mais eficientes apresentavam maior abundância relativa de *Bacteroidetes e Prevotella*, e menor abundância de *Firmicutes.* Além disso, observou-se que as *metanobactérias* e o gênero *Methanobrevibacter* eram menos abundantes nos animais com maior eficiência alimentar. O estudo também identificou diferenças na composição da microbiota desses animais, tanto em nível taxonômico quanto em nível de gênero.

A influência do hospedeiro sobre o microbioma ruminal foi destacada em um estudo de Weimer et al. (2010). Eles observaram que, mesmo após a troca de quase todo o conteúdo ruminal entre vacas, a composição bacteriana foi restaurada às condições originais, incluindo os valores de pH ruminal e as concentrações de ácidos graxos voláteis. Em um estudo similar realizado por Weimer et al. (2017) com vacas Holandesas de baixa e alta eficiência alimentar, evidenciou-se novamente a capacidade dos hospedeiros de regenerar a microbiota ruminal original.

Wallace et al. (2015), ao investigar as diferenças microbianas que resultam em fenótipos de bovinos com alta e baixa emissão de metano, observaram que a abundância do gene 16S rRNA, indicativa das arqueas predominantemente *Methanobrevibacter*, era 2,5 vezes maior em grandes emissores de metano. Em contrapartida, as bactérias da família *Succinivibrionaceae*, pertencentes ao filo *Proteobacteria,* eram quatro vezes menos abundantes. Emissões mais baixas de metano foram

associadas a uma maior abundância de *Succinivibrionaceae,* bem como a mudanças na produção de acetato e hidrogênio, que resultaram em menor metanogênese.

Em outro estudo, Singh et al. (2014) avaliaram a microbiota ruminal de búfalos como um recurso genético para a extração de enzimas microbianas aplicáveis à produção de biocombustíveis. Eles identificaram contigs que codificam enzimas envolvidas na degradação da biomassa vegetal, como hidrolases de glicosídeo, módulos de ligação de carboidratos, glicosiltransferases, esterases de carboidratos e liases de polissacarídeos. Esses achados demonstram que o microbioma ruminal de búfalos é rico em genes funcionais relacionados à degradação de polissacarídeos, o que sugere um grande potencial para a descoberta de novas moléculas aplicáveis à indústria de biocombustíveis.

Embora os fungos sejam os microrganismos mais estudados em relação às enzimas responsáveis pela degradação da biomassa vegetal, como as celulases*, xilanases, mananases, glicosidases e glucanases* (WHITE et al., 2014), quase todas as enzimas disponíveis comercialmente para a desconstrução de material lignocelulósico são derivadas de fungos. Isso se deve à maior produção de enzimas por fungos em comparação com bactérias, facilitando sua extração e purificação. Gêneros como *Trichoderma, Penicillium, Aspergillus, Fusarium e Humicola* são frequentemente mencionados na literatura, com T*richoderma* sendo considerado o mais eficiente na produção de celulases e xilanases (LYND et al., 2002). Penicillium e Trichoderma são amplamente aplicados na produção comercial de lignocelulases (GUSAKOV, 2011).

Portanto, uma compreensão aprofundada do ecossistema ruminal só pode ser alcançada se todos os aspectos pertinentes a esse microbioma forem levados em consideração. A integração de recursos genômicos, metagenômicos e nutricionais permitirá uma interpretação mais detalhada das interações entre os microrganismos ruminais. Estudos nessa área podem auxiliar na adoção de estratégias alimentares mais eficientes, resultando em maior produtividade animal e menores emissões de metano, contribuindo, assim, para a sustentabilidade nos sistemas de produção.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante das pesquisas que acima foram citadas, conclui-se que a metagenômica, ao permitir o estudo de comunidades microbianas sem a necessidade de isolamento e cultivo em meio de cultura, proporcionou uma compreensão mais profunda da vasta população de microrganismos presentes no rúmen e de seu papel no organismo dos ruminantes.

O estudo detalhado desses microrganismos possibilitou avanços significativos na conversão alimentar, na redução da emissão de metano e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e nutricionais mais eficazes para o rebanho. Isso é especialmente relevante, considerando que muitos desses microrganismos eram previamente desconhecidos ou não podiam ser cultivados em laboratório.

REFERÊNCIAS

ABRAR, A. et al. Diversity and fluctuation in ciliate protozoan population in the rumen of cattle. Animal Science Journal, v. 87, n. 9, p. 1188-1192, 2016. DOI: https://doi.org/10.1111/asj.12591

AKIN, D. E.; BENNER, R. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. Applied and Environmental Microbiology, v. 54, n. 5, p. 1117-1125, 1988. DOI: https://doi.org/10.1128/aem.54.5.1117-1125.1988

AMINOV, R. I. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. Frontiers in Microbiology. v.2, n. 2, p. -158, 2011. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00158

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELL, TT, PIRES AV, OLIVEIRA SG, editors. Nutrição de ruminantes**.** Jaboticabal: Funep; v.2, n.4, p. 115- 147, 2011.

BACH, S. J. et al. Transmission and control of Escherichia coli O157: H7—a review. Canadian journal of animal science, v. 82, n. 4, p. 475-490, 2002. DOI: https://doi.org/10.4141/A02-021

BAUCHOP, T.; MOUNTFORT, D. O.; Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. Appl Environ Microbiol. v.42, n. 6, p 1103–1110, 1981. DOI: https://doi.org/10.1128/aem.42.6.1103-1110.1981

BODAS, R. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. Animal Feed Science and Technology, v. 176, n. 1-4, p. 78-93, 2012. DOI: https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010

BORDIM, S. et al. Microscópicos e eficientes: importância dos microrganismos no ambiente ruminal. Revista Brasileira de Zoociências, v. 17, n. 2, 2016.

CLARKE, R. T. J. Protozoa in the rumen ecosystem. In: Clarke RTJ, Bauchop T (eds) microbial ecology of the gut. Academic, London, p. 251–275, 1977.

COUNOTTE, G. H. M. et al. Role of Megasphaera elsdenii in the fermentation of DL-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle. Applied and Environmental Microbiology, v. 42, n. 4, p. 649-655, 1981. DOI: https://doi.org/10.1128/aem.42.4.649-655.1981

CZERKAWSKI, J. W. An introduction to rumen studies. Pergamon Press, Oxford/New York. 1986.

DEARTH, R. N.; DEHORITY, B. A.; POTTER, E. L. Rumen microbial numbers in lambsbs as affected by level of feed intake and dietary diethyletiboeatrol; Journal of Animal Science.v. 38, n. p.991-996, 1974. DOI: https://doi.org/10.2527/jas1974.385991x

DEHORITY, B. A. Pectin-fermenting bacteria isolated from the bovine rumen. Journal of Bacteriology, v. 99, n. 1, p. 189-196, 1969. DOI: https://doi.org/10.1128/jb.99.1.189-196.1969

DEHORITY, B. A. Rumen microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, 2003.

DELGADO, B. et al. Whole rumen metagenome sequencing allows classifying and predicting feed efficiency and intake levels in cattle. Scientific reports, v. 9, n. 1, p. 11, 2019. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-018-36673-w

DUDHAGARA, P. et al. Web resources for metagenomics studies. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, v. 13, n. 5, p. 296-303, 2015. DOI: https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.10.003

DUSKOVA, D.; MAROUNEK, M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectindegrading enzymes in the rumen bacterium Lachnospira multiparus. Letters in Applied Microbiology**,** v. 33, n.1, p. 159-163, 2001. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00970.x

FINDLEY, S. D. et al. Activity-based metagenomic screening and biochemical characterization of bovine ruminal protozoan glycoside hydrolases. Applied and Environmental Microbiology, v. 77, n. 22, p. 8106-8113, 2011. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.05925-11

FONTY, G. et al. Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogen-free lambs. Applied and Environmental Microbiology, v. 73, n. 20, p. 6391-6403, 2007. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.00181-07

GARNSWORTHY, P. C. et al. Variation among individual dairy cows in methane measurements made on farm during milking. Journal of dairy science, v. 95, n. 6, p. 3181-3189, 2012. DOI: https://doi.org/10.3168/jds.2011-4606

GILMORE, S. P; HENSKE, J. K.; O'MALLEY, M. A. Driving biomass breakdown through engineered cellulosomes. Bioengineered**.** v. 6, n.4, p. 204–208. 2015. DOI: https://doi.org/10.1080/21655979.2015.1060379

GUSAKOV, A. V. Alternatives to Trichoderma reesei in biofuel production. Trends in biotechnol, v. 29, n. 9, p. 419-425, 2011. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004

HAN, X. et al. Rumen bacterial diversity of 80 to 110-day-old goats using 16S rRNA sequencing. PloS one, v. 10, n. 2, p. e0117811, 2015.
DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117811

HENDERSON, G. et al. Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. PloS one, v. 8, n. 9, p. e74787, 2013. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074787

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. DOI: https://doi.org/10.1038/srep14567

HO, Y. W.; BARR, D. J. S. Classification of Anaerobic Gut Fungi from Herbivores with Emphasis on Rumen Fungi from Malaysia. Mycologia**,** v.87 n.5, p.655-677.1995. DOI: https://doi.org/10.1080/00275514.1995.12026582

HUNGATE, R. E. Mutualisms in protozoa. Annual Review of Microbiology, v. 4, n. 1, p. 53-66, 1950. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.mi.04.100150.000413

HUNGATE R. E. The rumen and its microbes. New York: Academic Press. Department of Bacteriology and Agricultural Experiment Station. University of California. Davis, CA, p. 544, 1966.

HUWS, S. A. et al. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. Frontiers in microbiology, v. 9, p. 2161, 2018. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02161

IBRAHIM, E. A.; INGALLS, J. R.; STANGER, N. E. Effect of dietary diethylstilboestrol on populations of ciliate protozoa in dairy cattle. Journal of Animal Science, v. 50, n.1. p.101-106, 1970. DOI: https://doi.org/10.4141/cjas70-012

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

KLEEN, J. L. et al. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. Journal of Veterinary Medicine Series A, v. 50, n. 8, p. 406-414, 2003. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2003.00569.x

KLIEVE, A. V.; BAUCHOP, T. Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. Applied and Environmental Microbiology, v. 54, n. 6, p. 1637-1641, 1988. DOI: https://doi.org/10.1128/aem.54.6.1637-1641.1988

KLIEVE, A. V. et al. Genetic homogeneity and phage susceptibility of ruminal strains of Streptococcus bovis isolated in Australia. Letters in Applied Microbiology, v. 29, n. 2, p. 108-112, 1999. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00596.x

KLIEVE, A. V.; SWAIN, R. A.; NOLAN, J. V. Bacteriophages in the rumen: types present, population size and implications for the efficiency of feed utilisation. In: Proceedings of the Australian Society of Animal Production. p. 92-94. 1996.

KOONIN, E. V.; WOLF, Y. I. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. Nucleic acids research, v. 36, n. 21, p. 6688-6719, 2008. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkn668

KOZLOSKI, G.V. Bioquímica dos ruminantes. 3.ed. Santa Maria: UFSM, p.216, 2011.

KUNIN, V. et al. A bioinformatician's guide to metagenomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 72, n. 4, p. 557-578, 2008. DOI: https://doi.org/10.1128/mmbr.00009-08

LEE, W.L.; HÁ, J.K.; CHENG, K.J. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions. Applied and environmental microbiology, v. 66, n.9, p. 3807–3813, 2000. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3807-3813.2000

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. DOI: https://doi.org/10.1196/annals.1419.019

LYND, L. R. et al. How biotech can transform biofuels. Nature biotechnology, v. 26, n. 2, p. 169-172, 2008. DOI: https://doi.org/10.1038/nbt0208-169

MACKIE, R. I. et al. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. The Journal of Agricultural Science, v. 90, n. 2, p. 241-254, 1978. DOI: https://doi.org/10.1017/S0021859600055313

MATTHEWS, C. et al. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. Gut microbes, v. 10, n. 2, p. 115-132, 2019. DOI: https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1505176

MCALLISTER, T. A. et al. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. Journal of animal science, v. 72, n. 11, p. 3004-3018, 1994.
DOI: https://doi.org/10.2527/1994.72113004x

MCCANN, J. C.; WICKERSHAM, T.A.; LOOR, J.J. High-throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. Bioinformatics and Biology, v.3, n. 8, p.109–125, 2014. DOI: https://doi.org/10.4137/BBI.S15389

MENEZES, A. B. et al. Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. FEMS microbiology ecology, v. 78, n. 2, p. 256-265, 2011. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01151.x

MIDDELBOS, I. S. et al. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations Journal of Animal Science., v.85, n.11, p.3022-3032, 2007. DOI: https://doi.org/10.2527/jas.2007-0079

MILLER, M. E. B. et al. Phage–bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome. Environmental microbiology, v. 14, n. 1, p. 207-227, 2012. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02593.x

MIZRAHI, I. Rumen symbioses. In The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations ed. Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E. and Thompson, F. p. 533–544. 2013. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-30194-0_1

MOHAMMED, N. et al. Effects of ionophores, vitamin B6 and distiller's grains on in vitro tryptophan biosynthesis from indolepyruvic acid, and production of other related compounds by ruminal bacteria and protozoa. Animal feed science and technology, v. 116, n. 3-4, p. 301-311, 2004. DOI: https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.07.017

MOHAMMED, R. et al. Bacterial communities in the rumen of Holstein heifers differ when fed orchardgrass as pasture vs. hay. Frontiers in Microbiology, v. 5, p. 689, 2014. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00689

MORGAVI, D. P. et al. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. animal, v. 4, n. 7, p. 1024-1036, 2010. DOI: https://doi.org/10.1017/S1751731110000546

MORGAVI, D. P. et al. Rumen microbial (meta) genomics and its application to ruminant production. animal, v. 7, n. s1, p. 184-201, 2013.
DOI: https://doi.org/10.1017/S1751731112000419

MOSS, A. R.; J. P. JOUANY, J.; NEWBOLD. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. Ann. Zootech. N.49, p.231-253. 2000. DOI: https://doi.org/10.1051/animres:2000119
NOCEK, J. E.; RUSSEL, J.B. Protein and Energy as an Integrated System. Relationship of Ruminal Protein and Carbohydrate Availability to Microbial Synthesis and Milk Production. J. Dairy Sci., n.71, p.2070-2107, 1988. DOI: https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79782-9

ORPIN, C. G. The occurrence of chitin in the cell walls of the rumen organisms Neocallimastix frontalis, Piromonas communis and Sphaeromonas communis. J Gen Microbiol. v.99, n.1, p. 215-218.1977.

ØRSKOV, E. R.; TYLE, M. Energy nutrition in ruminants. Cambridge: Elsevier Science Publishers.p. 146, 1990.

OZKOSE, E. Molecular Morphology and Ecology of Anaerobic Fungi. Tese de Doutorado. Universidade de Gales, Aberyswyth. 2001.

PATRA, A. K. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. Environ Monit Assess**,** v.184, n.4. p.1929–1952, 2012. DOI: https://doi.org/10.1007/s10661-011-2090-y

PATRA, A. K.; YU, Z. Effects of Essential Oils on Methane Production and Fermentation by, and Abundance and Diversity of, Rumen Microbial Populations**.** Appl Environ Microbiol; v.78, n.12. p.4271–80, 2012. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.00309-12

PURVES, W. K. et al. Vida: a ciência da biologia. 6ª ed - Porto Alegre: Artmed, p. 461-465, 2002.
RIBEIRO, G. O. et al. Repeated inoculation of cattle rumen with bison rumen contents alters the rumen microbiome and improves nitrogen digestibility in cattle. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 1276, 2017. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-017-01269-3

RODRIGUEZ, F. V. et al. Explaining microbial population genomics through phage predation. Nature Precedings, p. 1-1, 2009. DOI: https://doi.org/10.1038/npre.2009.3489.1

ROHWER, F.; THURBER, R. V. Viruses manipulate the marine environment. Nature, v. 459, n. 7244, p. 207-212, 2009. DOI: https://doi.org/10.1038/nature08060

ROUMPEKA, D. D.; ESCALETTES, F.; FOTHERINGHAM; I. A review of bioinformatics tools for bio-prospecting from metagenomic sequence data. Frontiers in genetics, v. 8, n.2, p. 23-36, 2017. DOI: https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00023

RUSSEL, J. B.; WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? Journal of Dairy Science, v. 79, n. 8, 1503-1509, 1996. DOI: https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76510-4

RUSTOMO, B. et al. Acidogenic value of feeds I. The relationship between the acidogenic value of feeds and in vitro ruminal pH changes. Canadian Journal of Animal Science, v. 86, n. 1, p. 109-117, 2006. DOI: https://doi.org/10.4141/A04-074

RUSTOMO, B. et al. Effects of rumen acid load from feed and forage particle size on ruminal pH and dry matter intake in the lactating dairy cow. Journal of Dairy Science, v. 89, n. 12, p. 4758-4768, 2006. DOI: https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72525-5

SERRANO, R. D. C.; SIERRA, L. M. P. Técnicas de quantificação da síntese microbiana no rúmen: uma revisão. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, v. 6, n. 1, p. 46-53, 2011.

SINGH, K. M. et al. High potential source for biomass degradation enzyme discovery and environmental aspects revealed through metagenomics of Indian buffalo rumen. BioMed research international, v. 2014, n. 1, p. 267189, 2014.
DOI: https://doi.org/10.1155/2014/267189

SKILLMAN, L. C. et al. Development and validation of a real-time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between Entodinium populations in sheep offered a hay-based diet. Applied and environmental microbiology, v. 72, n. 1, p. 200-206, 2006. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.200-206.2006

STEENBAKKERS, P. JM et al. A serpin in the cellulosome of the anaerobic fungus Piromyces sp. strain E2. Mycological research, v. 112, n. 8, p. 999-1006, 2008. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.021

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: The rumen microbial ecosystem. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. p. 10-72. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_2

SUNDSET, M. A. et al. Novel rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer. Microbial ecology, v. 54, p. 424-438, 2007.
DOI: https://doi.org/10.1007/s00248-007-9254-x

TARAKANOV, B. V. The Phenomenon of Bacteriophagy in the Rumen of Ruminants. Moscow: Nauchny mir. 2006.

TESSLER, M. et al. Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing. Scientific reports, v. 7, n. 1, p. 6589, 2017. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-017-06665-3

TYMENSEN L., BARKLEY C., MCALLISTER TA. Diversidade relativa e análise da estrutura da comunidade de protozoários ruminais de acordo com T-RFLP e métodos microscópicos. J. Microbiol. Métodos. V.88, n.1, p.1–6. 2012.

UYENO, Y.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y. rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. Letters in Applied Microbiology, v.1.n. 51, p. 570–577, 2010. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02937.x

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

VAN ZIJDERVELD, S. M. et al. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. Journal of dairy science, v. 94, n. 8, p. 4028-4038, 2011. DOI: https://doi.org/10.3168/jds.2011-4236

WALLACE, R. J. et al. Contribution of fungi, archaea, protozoa and ruminal bacteria to the suppression of methane caused by diets supplemented with oilseeds. BMC Genomics, v.16, n.2, p.839, 2015.

WANG, S. et al. Contribuição de fungos, arquéias, protozoários e bactérias ruminais para a supressão de metano causada por dietas suplementadas com sementes oleaginosas. Frente. Microbiol. v.8, n.1864, p.1-14, 2017.

WARNER, A. C. I. Diurnal changes in the concentrations of micro-organisms in the rumens of sheep fed to appetite in pens or at pasture. Microbiology, v. 45, n. 2, p. 243-251, 1966. DOI: https://doi.org/10.1099/00221287-45-2-243

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. 5902-5912, 2010. DOI: https://doi.org/10.3168/jds.2010-3500

WEIMER, P. J. et al. Transient changes in milk production efficiency and bacterial community composition resulting from near-total exchange of ruminal contents between high-and low-efficiency Holstein cows. Journal of Dairy Science, v. 100, n. 9, p. 7165-7182, 2017. DOI: https://doi.org/10.3168/jds.2017-12746

WHITE, B. A. et al. Biomass utilization by gut microbiomes. Annual review of microbiology, v. 68, n. 1, p. 279-296, 2014. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155618

WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. Hemicellulose-degrading enzymes in rumen ciliate protozoa. Current Microbiology, v. 12, p. 85-90, 1985.
DOI: https://doi.org/10.1007/BF01567397

YARLETT, N. et al. Hydrogenosomes in the rumen fungus Neocallimastix patriciarum. Biochemical Journal, v. 236, n. 3, p. 729-739, 1986. DOI: https://doi.org/10.1042/bj2360729

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

YOUSSEF, N. H. et al. The genome of the anaerobic fungus Orpinomyces sp. strain C1A reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader. Applied and environmental microbiology, v. 79, n. 15, p. 4620-4634, 2013.
DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.00821-13