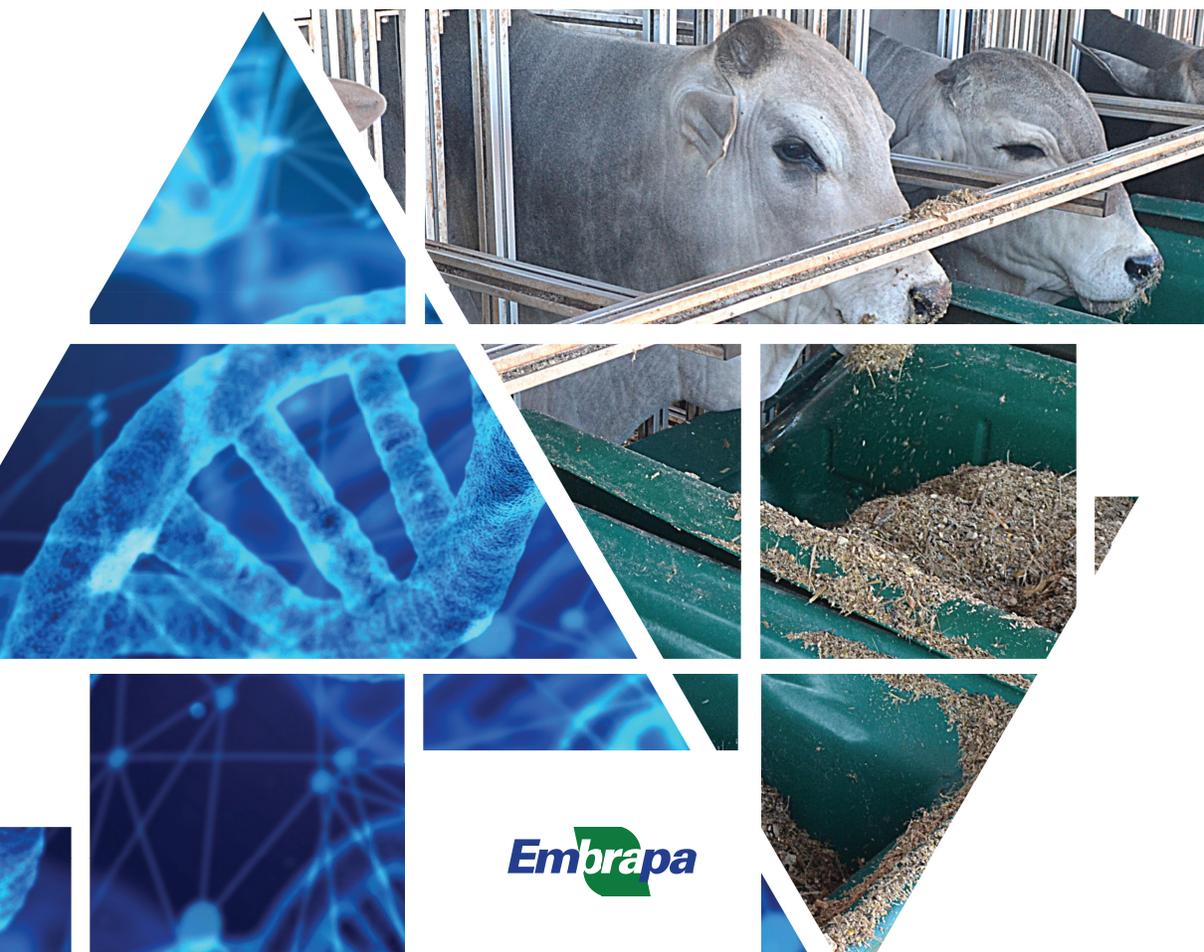


## Metagenômica, nanotecnologia e nutrição animal: alternativas para o uso de antibióticos e mitigação de gases de efeito estufa





**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Gado de Corte  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

## **DOCUMENTOS 283**

# Metagenômica, nanotecnologia e nutrição animal: alternativas para o uso de antibióticos e mitigação de gases de efeito estufa

*Fabiane Siqueira  
Marlene de Barros Coelho Caviglioni*

**Embrapa Gado de Corte  
Campo Grande, MS  
2021**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Corte**  
Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, MS,  
79106-550, Campo Grande, MS  
Fone: (67) 3368 2000  
Fax: (67) 3368 2150  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Gado de Corte

Presidente  
*Rodrigo Amorim Barbosa*

Secretário-Executivo  
*Rodrigo Carvalho Alva*

Membros  
Alexandre Romeiro de Araújo, Davi José  
Bungenstab, Fabiane Siqueira, Gilberto  
Romeiro de Oliveira Menezes, Marcelo Castro  
Pereira, Mariane de Mendonça Vilela, Marta  
Pereira da Silva, Mateus Figueiredo Santos,  
Vanessa Felipe de Souza

Supervisão editorial  
*Rodrigo Carvalho Alva*

Revisão de texto  
*Rodrigo Carvalho Alva*

Tratamento das ilustrações  
*Rodrigo Carvalho Alva*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica  
*Rodrigo Carvalho Alva*

Foto da capa  
*Canva/Rodrigo Alva*

**1ª edição**  
Publicação digitalizada (2021)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Embrapa Gado de Corte

---

Siqueira, Fabiane.

Metagenômica, nanotecnologia e nutrição animal : alternativas para o uso de  
antibióticos e mitigação de gases de efeito estufa / Fabiane Siqueira, Marlene de  
Barros Coelho Cavigliani. - Campo Grande, MS : Embrapa Gado de Corte, 2021.  
PDF (98 p.). - (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X ; 283).

1. Microrganismo. 2. Nanopartícula. 3. Nutrição animal. 4. População microbiana.  
5. Rúmen. 6. Ruminante. I. Cavigliani, Marlene de Barros Coelho. II. Título. III. Série.

CDD 636.085

## Autores

### **Fabiane Siqueira**

Bióloga, doutora em Ciências Biológicas (Genética), pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

### **Marlene de Barros Coelho Caviglioni**

Engenheira Metalurgista, doutora em Engenharia Metalúrgica e de Minas, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS



# Sumário

|  |    |
|--|----|
| Introdução.....  | 7  |
| Digestão dos ruminantes.....   | 13 |
| Rúmen .....  | 18 |
| Diversidade microbiana ruminal .....                                       | 20 |
| Bactérias .....  | 22 |
| Arqueias ou Metanógenos .....  | 26 |
| Protozoários .....   | 30 |
| Fungos .....   | 34 |
| Bacteriófagos e outros vírus.....  | 41 |
| Estratégias genômicas e metagenômicas para analisar a microbiota ruminal.. | 44 |
| Abordagens dependentes de cultivo .....                                    | 44 |
| Abordagens genômicas independentes de cultivo.....                         | 47 |
| Abordagens metagenômicas.....  | 50 |
| Metagenômica e nutrição animal .....                                       | 56 |
| Microbioma ruminal e eficiência alimentar .....                            | 56 |
| Microbioma ruminal e mitigação de metano.....                              | 62 |
| Microbioma ruminal e genes de resistência antimicrobiana.....              | 64 |
| Estratégias nanotecnológicas para manipular o microbioma ruminal .....     | 68 |
| Nanotecnologia e nanopartículas.....                                       | 68 |
| Tipos de nanomateriais .....   | 69 |
| Nanotecnologia e nutrição animal .....                                     | 71 |
| Considerações finais .....   | 79 |
| Referências .....  | 81 |



## Introdução

Os ruminantes são mamíferos herbívoros que compõem uma proporção significativa das espécies de animais domesticados em todo o mundo e, entre os animais de criação, são os mais adaptados à utilização das paredes celulares das plantas (Hungate, 1966). Eles possuem esta capacidade devido a grande variedade de espécies de microrganismos que habitam o seu trato gastrointestinal, degradando a lignocelulose das forragens e convertendo nitrogênio não proteico em proteína microbiana. Os produtos da fermentação ruminal são utilizados por estes animais como fontes de energia, aminoácidos e vitaminas, bem como para o seu crescimento, manutenção e produção de carne, leite ou lã. Por causa disso, os ruminantes, quando usados para transformar alimentos fibrosos produzidos, principalmente, em terras não adequadas para cultivo primário, contribuem enormemente com a demanda global de alimentos, fornecendo proteína de alta qualidade, além de vitaminas e minerais (Schader *et al.*, 2015).

Existem, atualmente, 7,8 bilhões de humanos no planeta (*Worldometer*, 2020) e, se as tendências atuais continuarem, o número de pessoas com fome chegará a 840 milhões até 2030, de acordo com o Mapa da Fome do Programa Mundial de Alimentos (*World Food Programme Hunger Map* - WFP, 2020). Há previsões que estimam que a população mundial atingirá 8,5 bilhões de pessoas em 2030, 9,7 bilhões em 2050 e 10,9 bilhões em 2100 (*United Nations*, 2019). Com a demanda de proteína animal crescendo, alguns modelos sugerem que a produção global de carne e leite terá de aumentar em 76% e 63%, respectivamente (Huws *et al.*, 2018). Consequentemente, a capacidade dos ruminantes de degradar paredes vegetais é de grande importância econômica tanto para os países desenvolvidos quanto para os que estão em desenvolvimento, nos quais, em muitas situações, a forragem é a principal fonte de nutrição. Mesmo em sistemas intensivos de terminação a lignocelulose é incorporada à ração dos bovinos, por ser relativamente barata e necessária para o funcionamento saudável do rúmen (Krause *et al.*, 2003).

No entanto, enquanto a fermentação microbiana desempenha um papel central na capacidade dos ruminantes de utilizar substratos fibrosos, este processo também apresenta consequências potencialmente deletérias, em particular àquelas associadas com emissões de gases de efeito estufa (GEE),

por meio da produção de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e metano ( $\text{CH}_4$ ), e com o excesso de nitrogênio (N) excretado na urina e nas fezes, bem como com a possibilidade de influenciar adversamente o valor nutricional dos produtos fornecidos pelos ruminantes, como carne e leite (Scollan *et al.*, 2011).

A produção de  $\text{CH}_4$ , que é o gás entérico que mais contribui com o aquecimento global, tem relação direta com a eficiência da fermentação ruminal, em virtude da perda de carbono e, conseqüentemente, da perda de energia bruta ingerida pelo animal. Estima-se que cerca de 2% da energia da dieta pode ser perdida para a produção de metano, podendo chegar a até 18% quando o animal está sendo alimentado com dietas fibrosas de baixa qualidade (Pedreira & Primavesi, 2011; Patra *et al.*, 2017). A produção de GEE também está diretamente ligada à qualidade da alimentação que o animal recebe, sendo que quanto melhor a digestibilidade do alimento, maior será a emissão diária de  $\text{CH}_4$ . Entretanto, apesar do aumento das emissões diárias, melhorar a produtividade por meio do fornecimento de forragem com melhor digestibilidade permite diminuir o tempo de permanência do animal no sistema e, conseqüentemente, diminuir a emissão de  $\text{CH}_4$  por quilo de carne produzido, sendo esta prática de mitigação altamente recomendada (De Zen *et al.*, 2008).

O microbioma ruminal também é fundamental para a eficiência do uso de nitrogênio devido ao seu papel na proteólise e catabolismo de aminoácidos, resultando em N microbiano, que contribui com 60% a 90% da proteína absorvida no duodeno. Desta forma, a eficiência do uso do N em ruminantes também precisa ser melhorada para otimizar a produção de carne e leite e reduzir a pegada ambiental das indústrias, pois os ruminantes excretam, aproximadamente, 70% do N ingerido na urina e nas fezes, como ureia e amônia, causando poluição da água e do solo. Uma vez no solo, uma porção do N excretado pode ser convertida por bactérias em óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), um GEE com potencial de aquecimento global 296 vezes maior do que o  $\text{CO}_2$  (Kingston-Smith *et al.*, 2010).

Devido às restrições de terra e a preocupação mundial com os impactos ambientais, o número de ruminantes pastando não pode aumentar e, portanto, os esforços de pesquisa devem ser direcionados para melhorar a eficiência da produção. Uma das abordagens que pode ser utilizada para atender estes desafios é manipular a microbiota ruminal para degradar de forma mais

eficiente a biomassa vegetal, resultando, assim, em maior disponibilidade de nutrientes para o hospedeiro. Apesar de muitos trabalhos já terem sido desenvolvidos neste sentido, a compreensão do microbioma ruminal ainda é bastante limitada, sendo a atuação dessa microbiota afetada por fatores extrínsecos e intrínsecos ao animal (Huws *et al.*, 2018).

De acordo com Krauser *et al.* (2003), nos últimos 50 anos ocorreram melhorias significativas em nossa compreensão sobre a digestão das fibras vegetais no rúmen e muitas destas informações foram traduzidas em estratégias de manejo nutricional, como por exemplo, a inclusão de suplementos de ureia como fonte de nitrogênio na dieta dos ruminantes com o intuito de aumentar a degradação das fibras (Hungate, 1966) e a elaboração de tratamentos mecânicos e químicos de forragens para melhorar a sua digestibilidade (Wilkins & Minson, 1970).

Outra estratégia de manejo nutricional que tem sido utilizada pelos produtores é o fornecimento de suplementos energéticos e proteicos para os animais, garantindo, assim, uma produção mais estável durante o ano todo. A suplementação possibilita maior eficiência de uso da energia dos alimentos, representada pela menor perda de  $\text{CH}_4$  como parte da energia ingerida por unidade de produto produzido (carne ou leite). Alguns trabalhos têm explorado o resultado da composição destes suplementos e do uso de aditivos, como leveduras e ácidos graxos insaturados, sobre a fermentação ruminal, visando identificar efeitos associativos entre os ingredientes da dieta e a produção de  $\text{CH}_4$  entérico (Pedreira & Primavesi, 2011).

Provavelmente, um dos meios mais eficazes de explorar informações sobre microbiologia e o processo de fermentação ruminal tem sido a construção de modelos computacionais que preveem o desempenho animal a partir das características dos ingredientes presentes nos alimentos (Fox *et al.*, 1995). Estes modelos têm a capacidade de fazer melhorias significativas na formulação da dieta e, embora não manipulem diretamente a digestão das fibras no rúmen, otimizam a utilização de nutrientes escassos pela microbiota ruminal. Os modelos são exemplos ideais de como avanços incrementais em nosso conhecimento sobre os processos microbianos foram utilizados para a obtenção de resultados significativos no metabolismo ruminal e na produção animal (Krause *et al.*, 2003).

Cabe ressaltar que na produção de ruminantes, os gastos com a nutrição correspondem entre 50% a 60% do custo total e o desempenho animal é decorrente, principalmente, do reflexo do manejo nutricional (Oliveira *et al.*, 2007b). Desta forma, identificar animais mais eficientes também é uma estratégia bastante vantajosa para a bovinocultura, levando a diminuição do consumo de matéria seca e maximizando, assim, o lucro dos produtores. Além disso, o uso de animais mais eficientes ajuda a diminuir os impactos ambientais que possam ser causados pelos sistemas produtivos (Huws *et al.*, 2018).

Neste contexto, tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) empregadas em estudos de diferentes microbiomas estão se tornando fundamentais para a geração de conhecimentos sobre a fisiologia e o metabolismo ruminal, sem a necessidade de cultivo prévio dos microrganismos. Os métodos associados a este tipo de análise incluem o sequenciamento de *amplicons* do rRNA 16S e do espaçador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer* - ITS), usados para comunidades bacterianas e fúngicas, respectivamente, e o sequenciamento metagenômico *shotgun*, onde fragmentos de DNA são sequenciados aleatoriamente, independentemente do microrganismo de origem (Matthews *et al.*, 2019).

O sequenciamento *shotgun* oferece a vantagem da identificação taxonômica em nível de espécie e a estimativa de vias metabólicas a partir de diferentes amostras ambientais. Assim, é possível identificar no conteúdo amostral, a função de cada microrganismo e estabelecer hipóteses sobre as interações fisiológicas entre os diferentes membros da comunidade. Além disso, este método também é útil para identificar microrganismos de baixa abundância, ou seja, das espécies que estão pouco ativas em um determinado ambiente (Matthews *et al.*, 2019).

A nanotecnologia é outra ferramenta científica que pode ser utilizada para melhorar o processo de decomposição da biomassa vegetal, por meio da manipulação dos microrganismos ruminais, fazendo com que o animal seja mais eficiente no aproveitamento do alimento consumido. A palavra nanotecnologia está associada ao estudo da manipulação da matéria visando a construção de materiais ou estruturas a partir dos próprios átomos em uma escala extremamente reduzida, a do nanômetro (nm), que corresponde à bilionésima parte do metro ( $10^{-9}$  m) (Riboldi, 2009).

Na medicina humana, a nanotecnologia tem possibilitado o desenvolvimento de novos medicamentos baseados em nanoestruturas complexas altamente seletivas, além de ser uma esperança no desenvolvimento de novos produtos, como por exemplo, máquinas moleculares (nanobots, nanossondas, nanossensores) que poderão propiciar métodos precoce de diagnóstico para o câncer; para enfermidades infecciosas; terapias; sistemas para administração de fármacos; monitoramento dos níveis de colesterol, hormônios ou glicose, entre outros benefícios. Além disto, esta tecnologia já possibilitou o desenvolvimento de cosméticos com maior poder de absorção e estabilidade; de medidores de níveis de glicose para diabéticos; de tintas com poderes abrasivos; produtos capilares com ativos nanoencapsulados que conseguem penetrar mais profundamente e reestruturar os fios; produtos com ação bactericida, fungicida, para proteção ultravioleta e antiodores; suplementos alimentares, entre outros (Lazzaretti & Hupffer, 2019).

Com relação a indústria alimentícia, a nanotecnologia está presente em toda a cadeia produtiva, desde o cultivo dos alimentos, o processamento e, posteriormente, nas embalagens por meio da utilização de nanopartículas ou de técnicas que empregam ferramentas nanotecnológicas. Desta forma, evidencia-se o emprego de nanofilmes para proteção e conservação dos alimentos (cor, sabor, aroma), nanossensores para verificar a deterioração dos produtos e o uso de embalagens com nanopartículas capazes de aumentar o tempo de vida útil dos alimentos, atuando como barreira contra umidade e microrganismos, além de serem utilizadas como agentes funcionais, ou seja, antioxidantes, corantes e conservantes. Já, na agricultura, as nanopartículas engenheiradas são aplicadas para ampliar o rendimento da produção de alimentos e reduzir o uso de defensivos agrícolas, sem causar danos ao solo e à água (Singh, 2017; Resch & Farina, 2015).

Na área de diagnóstico de enfermidades, a promessa do uso de biossensores baseados em nanopartículas é de aumentar em até 1.000 vezes o limite de detecção de patógenos de interesse veterinário e humano realizada por métodos convencionais que, geralmente, são demorados, trabalhosos e requerem o uso de equipamentos sofisticados e mão de obra especializada, como por exemplo, os ensaios de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-linked Immunosorbent Assays - ELISA*) e os testes que utilizam a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) (Mello Brandão & Gern, 2018).

Em 2017, em uma ampla revisão de literatura, Vidic e colaboradores descreveram o desenvolvimento de diferentes abordagens biotecnológicas que utilizaram a nanotecnologia e que foram capazes de detectar precocemente patógenos causadores de enfermidades em bovinos e em outras espécies de animais domésticos, que acarretam em perdas econômicas significativas devido ao enfraquecimento dos sistemas de produção e aumento dos custos veterinários, além de representar uma ameaça direta à segurança alimentar global. Neste trabalho, são apresentados biossensores precisos, simples e de fácil acesso para detecção de *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis* e outros patógenos causadores de diarreia em bezerros recém-nascidos, mastite aguda em vacas leiteiras e pneumonia em bovinos; da bactéria *Clostridium perfringens* que pode produzir várias toxinas e infectar diferentes espécies de animais; do protozoário intracelular *Eimeria*, causador da coccidiose em aves; dos vírus causadores de influenza aviária, língua azul, febre aftosa e *doença epizoótica hemorrágica*; entre outros agentes infecciosos.

Embora a maioria dos dispositivos analíticos apresentados por Vidic *et al.* (2017) sejam usados apenas em laboratórios de pesquisa, espera-se que no futuro próximo mais biossensores sejam desenvolvidos e disponibilizados ao mercado, devido à rápida disseminação de doenças infecciosas, incluindo várias zoonoses. Dessa forma, existe uma grande necessidade da comunidade científica em desenvolver dispositivos portáteis e miniaturizados que possam ser usados diretamente no campo por veterinários ou por autoridades nacionais responsáveis pela organização do controle e erradicação de doenças.

Com relação a interface microbiologia e nanotecnologia, existe um grande interesse dos pesquisadores no potencial uso de bactérias, leveduras e fungos como nanofábricas para a síntese de nanopartículas metálicas. Dentre estes microrganismos, os fungos apresentam uma série de vantagens, pois são relativamente fáceis de isolar, de cultivar e secretam grandes quantidades de enzimas extracelulares. Essas partículas são normalmente produzidas como resultado de reações entre a biomassa fúngica e as soluções aquosas de sais metálicos, resultando na produção de nanopartículas de forma mais rápida do que alguns métodos de sínteses física e química. Em pesquisas recentes protocolos simples foram desenvolvidos e têm sido usados para a produção de nanopartículas metálicas de ouro, prata, platina, sílica, titânia e

zircônia, considerando tanto procedimentos extracelulares quanto intracelulares (Mandal *et al.*, 2006; Rai *et al.*, 2009).

Utilizar fungos pra produzir enzimas exógenas é outra estratégia que também pode ser utilizada para manipular a fermentação ruminal, por meio de hidrólise direta, aumento na adesão microbiana, estimulação da população microbiana, ação bactericida e sinergismo com as enzimas microbianas existentes no rúmen. A utilização do fungo *Aspergillus oryzae* para produção destas enzimas tem gerado muito interesse, mas ainda existem poucas informações sobre o seu modo de ação (Berchielli *et al.*, 2011).

Apesar de ser uma área de pesquisa já bem consolidada em diversos campos, a aplicação de ferramentas nanotecnológicas na manipulação dos microrganismos ruminais ainda é muito limitada. Certamente, a médio e a longo prazos produtos originados de diferentes espécies microbianas estarão disponíveis, à medida que a indústria de biotecnologia for incorporando novos conhecimentos gerados em todo o mundo. Consequentemente, são necessárias inúmeras pesquisas para o desenvolvimento de insumos biológicos eficazes e que sejam seguros para a saúde humana, animal e para o meio ambiente.

Em função do exposto, a presente revisão tem como objetivos descrever, de forma geral, os principais microrganismos que habitam o rúmen de bovinos, seus possíveis efeitos no metabolismo ruminal e no desempenho animal, e como a utilização de abordagens metagenômicas e nanotecnológicas podem contribuir para o melhor aproveitamento do processo digestivo, aumentando, assim, a eficiência dos sistemas de produção, a saúde dos rebanhos e a sustentabilidade ambiental.

## Digestão dos ruminantes

A principal função do aparelho digestivo é converter os alimentos ingeridos pelo animal em componentes químicos capazes de serem absorvidos pelas células, para uso em uma variedade de necessidades fisiológicas, como manutenção corporal, crescimento, engorda, produção de leite e reprodução. Além disso, o trato digestivo também deve excretar os produtos e metabólitos

que não são aproveitados pelo organismo, fazendo com que a digestão de cada ser vivo esteja adaptada aos seus hábitos alimentares (Farabee, 2010).

Durante o processo evolutivo, os ruminantes, como bovinos, bubalinos, caprinos, ovinos, e outros, que se alimentam exclusivamente de vegetais, desenvolveram características anatômicas e simbióticas que lhes permitiram utilizar eficientemente carboidratos estruturais como fonte de energia e compostos nitrogenados não proteicos como fontes de proteína. Nestes animais, o estômago é bastante desenvolvido e multicavitário, se dividindo em quatro compartimentos chamados de rúmen, retículo, omaso e abomaso (Furlan *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2019).

Os compartimentos rúmen, retículo e omaso são câmaras de fermentação consideradas como pré-estômagos, com tamanhos e funções diferentes e que abrigam diferentes tipos de microrganismos. Estas três câmaras de fermentação retêm o alimento para que os microrganismos possam fermentá-lo, fornecendo-lhes condições ideais de pH, temperatura, pressão osmótica, equilíbrio iônico e anaerobiose. Assim, quanto maior o tempo de permanência da digesta nos pré-estômagos, mais intenso será o processo fermentativo (Furlan *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2019).

É importante salientar que o desenvolvimento destas estruturas ocorre em função do tipo de alimento no qual o animal é submetido. Considerando que o volume do rúmen-retículo está associado ao seu papel funcional, ou seja, de fermentação de nutrientes, o seu tamanho será tanto maior quanto mais forragem for adicionada à dieta do animal. Desta forma, caso o bovino seja alimentado com uma dieta rica em concentrado, o tamanho do rúmen-retículo, comparado ao animal alimentado somente com forragem, será menor (Furlan *et al.*, 2011).

O quarto compartimento, chamado de abomaso, é similar ao estômago dos não ruminantes, possuindo epitélio revestido por mucosa com glândulas secretoras de ácido, muco e hormônios e com grande capacidade de digestão dos nutrientes. Ao nascer, os pré-estômagos do bezerro são pequenos, não funcionais e sem microrganismos. As estruturas rúmen-retículo em conjunto permanecem em colapso e sem funcionamento enquanto a dieta for limitada ao leite. Deste modo, durante a lactação o abomaso é o compartimento de maior volume, sendo que, após a introdução da dieta sólida, os pré-estômagos

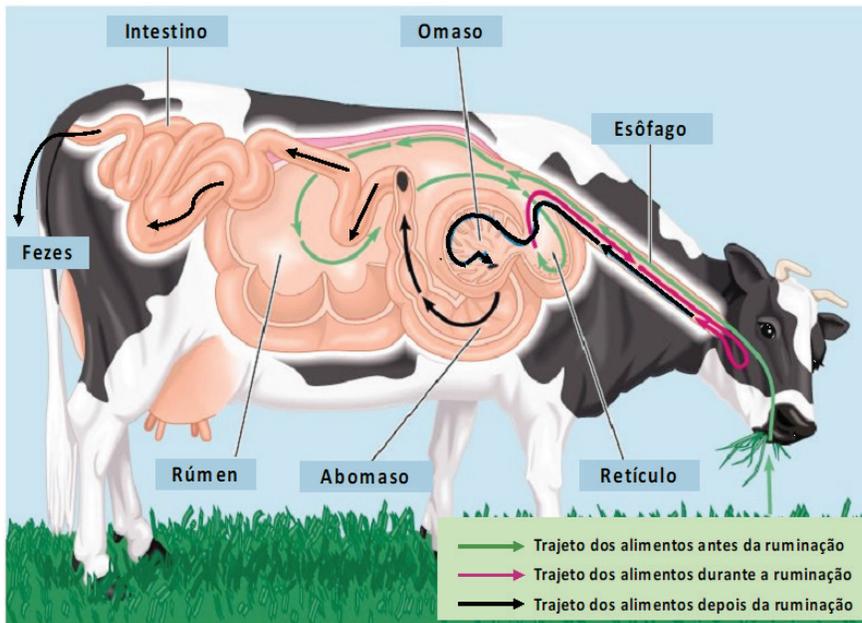
apresentam desenvolvimento acentuado e com capacidade adaptativa ao tipo de alimento ingerido, conforme anteriormente descrito (Furlan *et al.*, 2011).

Durante o período de transição (três a oito semanas), os bezerros, além do leite, começam a ingerir maiores quantidades de alimentos fibrosos, os quais são responsáveis pelo início da secreção salivar e desenvolvimento ruminotico. Nesta fase, o rúmen-retículo acelera a colonização de microrganismos, principalmente, pelo contato da saliva, eructação, bolo ruminal e fezes de animais mais velhos. Ao final deste período, o rúmen-retículo já apresenta as características, proporções, frequências e formas dos ciclos de motilidade da vida adulta, sendo que em animais adultos, a proporção média em tamanho dos quatro compartimentos do estômago complexo é de cerca de 80% rúmen, 5% retículo, 7% omaso e 8% abomaso (Furlan *et al.*, 2011; Schmitt *et al.*, 2011).

A denominação de ruminante destes animais advém de particularidades existentes em cada uma das fases do processo de digestão, na qual o alimento que já sofreu a primeira etapa de digestão no rúmen é regurgitado e novamente mastigado e deglutido, para então sofrer nova fermentação (Schmitt *et al.*, 2011). Assim, a ruminação exerce um efeito importante sobre a redução do tamanho das partículas dos alimentos e sobre o movimento do material sólido através do rúmen (Furlan *et al.*, 2011).

O processo de mastigação é dividido em duas etapas, a mastigação inicial e a ruminação. A primeira é rápida e sua função é conferir ao alimento um tamanho que permita a deglutição, enquanto na segunda etapa o bolo alimentar é regurgitado e remastigado até atingir o tamanho adequado para posterior fermentação ruminal (Furlan *et al.*, 2011). Como pode ser observado na Figura 1, uma vez deglutido, o alimento é parcialmente mastigado, passa pelo esôfago e vai para o rúmen, onde é prensado e submetido a ação de microrganismos que degradam os carboidratos solúveis e fibrosos, as proteínas e os ácidos graxos encontrados na biomassa ingerida (Van Soest, 1994).

Em seguida, o conteúdo do rúmen passa para o retículo, onde será macerado e triturado, para depois voltar à boca e ser mastigado novamente, no processo de ruminação. No retículo há glândulas salivares e vários microrganismos que têm a função de continuar a degradação da celulose iniciada no rúmen. Uma vez no retículo, o alimento é misturado à saliva, e, então, volta para a boca para ser mastigado novamente (Van Soest, 1994).



**Figura 1.** Representação do sistema digestivo dos ruminantes mostrando os trajetos percorridos pelos alimentos após sua ingestão. Adaptado de: <http://anatomiaanimal-descritiva.blogspot.com/>.

O início da ruminação ocorre entre meia e uma hora e meia após a ingestão do alimento. O número e a duração dos ciclos de ruminação dependem da estrutura (teor de fibra, tamanho das partículas), do número de refeições e da quantidade de alimento ingerido. Assim, podem ser observados, por dia, de quatro a 24 períodos de ruminação, com duração de 10 a 60 minutos cada, de maneira que até sete das 24 horas podem ser gastas com este processo (Furlan *et al.*, 2011). De acordo com Van Soest (1994), o tempo despendido com a ruminação é influenciado pela natureza da dieta, na qual alimentos concentrados reduzem o tempo de ruminação, enquanto forragens, com alto teor de parede celular, tendem a aumentá-lo.

Quando o alimento está bem triturado, é deglutido e passa diretamente para o omaso, onde a maior parte da água do bolo alimentar é absorvida (Figura 1). Posteriormente, o bolo alimentar, contendo os nutrientes não degradados

no rúmen, como carboidratos, proteínas e gorduras, além da proteína microbiana, segue para o abomaso para que ocorra a ação do suco gástrico e a digestão propriamente dita. A partir daí, a digestão ocorre como em qualquer outro animal, com a absorção de substâncias pelo intestino delgado e absorção de água pelo intestino grosso, com a produção e a eliminação das fezes (Van Soest, 1994).

Assim, a digestão é definida como a quebra física e química de substâncias complexas em moléculas simples, que serão, posteriormente, absorvidas pelo epitélio intestinal e utilizadas pelos animais para a manutenção de suas atividades vitais, crescimento e reprodução (Furlan *et al.*, 2011). De acordo com Schmitt *et al.* (2011), as principais vantagens do processo digestivo dos ruminantes são: (1) bom aproveitamento de dietas muito fibrosas; (2) capacidade de desdobrar a celulose, sendo esta a principal fonte de energia da dieta; (3) permite a síntese de proteínas microbianas de alto valor biológico a partir de proteínas vegetais de baixo valor biológico; e, (4) garante todos os componentes das vitaminas do complexo B.

Depois de fermentados, os carboidratos vegetais (celulose, amido e açúcares) irão produzir ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente, acético, propiônico e butírico, que poderão ser utilizados como fonte de energia para as células dos tecidos digestivos e/ou absorvidos pelas papilas ruminais encontradas na parede ruminal para, posteriormente, servir de fonte para síntese de energia, proteínas e vitaminas para o animal hospedeiro. Enquanto as células microbianas, resultantes do processo fermentativo, irão fornecer a maioria dos requisitos do animal em aminoácidos essenciais, após serem absorvidos no intestino delgado (Pedreira & Primavesi, 2011).

A fermentação dos carboidratos fibrosos também gera um excesso de hidrogênio ( $H_2$ ) e  $CO_2$  que precisam ser retirados do meio ruminal. Este processo é feito, principalmente, pelas arqueias metanogênicas que, de forma simbiótica com microrganismos fibrolíticos, utilizam o  $H_2$  para reduzir o  $CO_2$  a gás metano, que é constante e gradativamente eliminado para o meio ambiente por via oro-nasal, através do processo de eructação (Pedreira & Primavesi, 2011). De maneira que, quanto mais  $H_2$  é retirado do meio, maior é a proporção de NADH (Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina) oxidado e maiores são os rendimentos de acetato e ATP (Trifosfato de Adenosina). Se o  $H_2$  não for utilizado pelos microrganismos metanogênicos ele irá se acumular no

meio ruminal, impedindo a re-oxidação do NADH e, deste modo, impedindo a continuidade do catabolismo intracelular e interferindo no processo de degradação da porção fibrosa da biomassa vegetal (Valadares Filho & Pina, 2011).

Além de funções nutritivas, fisiológicas e de remoção dos subprodutos da fermentação, o rúmen também desempenha funções imunológicas e de proteção do hospedeiro, fazendo com que este compartimento do estômago complexo dos ruminantes seja o órgão mais estudado no que se refere à interação simbiótica entre hospedeiro e microbiota residente no trato digestivo (Furlan *et al.*, 2011). Desta forma, para atender os objetivos desta revisão será detalhado abaixo o papel do rúmen e dos microrganismos na digestão e na produção sustentável de carne bovina.

## Rúmen

Como já mencionado, o rúmen é uma câmara de fermentação anaeróbica e metanogênica que contém diversas espécies de microrganismos (microbiota ruminal) capazes de degradar alimentos celulolíticos e, no caso dos bovinos, fibras de baixa ou nenhuma digestibilidade, interferindo, assim, diretamente na produtividade e no desempenho animal. Em contraste com a microbiota, na qual cada espécie pode ser estudada separadamente, o microbioma ruminal é composto por todos os membros que interagem entre si, ocupam um habitat bem definido e apresentam propriedades físico-químicas distintas, resultando na formação de um ecossistema dinâmico e interativo, propenso a mudanças no tempo e no espaço. Dessa forma, o microbioma do rúmen envolve todo o espectro de moléculas produzidas pelos microrganismos, incluindo elementos estruturais (ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e polissacarídeos), metabólitos (moléculas de sinalização, toxinas, moléculas orgânicas e inorgânicas), elementos genéticos móveis (transposons, plasmídeos, fagos e vírus) e DNA extracelular derivado de células mortas (Berg *et al.*, 2020).

Em bovinos adultos o rúmen apresenta um volume de, aproximadamente, 100 litros (L), ocupando uma grande proporção da cavidade abdominal e apresentando um ecossistema microbiano estável e ao mesmo tempo dinâmico. Este ecossistema é estável porque o rúmen de animais saudáveis não sofre contaminação externa, apesar da entrada diariamente no seu interior de milhões de microrganismos por meio da alimentação, da água e do ar. E é dinâmico

porque a população de microrganismos muda consideravelmente devido a alterações que podem ocorrer na dieta do animal (Robson & Stewart, 1997).

O animal hospedeiro não tem controle direto sobre o metabolismo dos microrganismos no seu sistema digestório, mas são capazes de manter dentro destas condições que promovam o crescimento de diferentes espécies, favorecendo, assim, o processo fermentativo. Estas condições incluem ausência de oxigênio, manutenção da temperatura, do pH e dos padrões de motilidade característicos do segmento rumino reticular. Assim, dentro do rúmen há a presença permanente de substratos e de atividades fermentativas, com a temperatura se mantendo relativamente constante, em torno de 39°C a 42°C, e o pH variando entre 5,5 a 7,0 (Furlan *et al.*, 2011). Para manter o pH constante, o tamponamento ruminal é facilitado por uma grande quantidade de saliva (60 a 180 L/d em bovinos) produzida pelo ruminante, sendo esta rica em bicarbonato de sódio, potássio e ureia (Matthews *et al.*, 2019).

As condições anaeróbicas são mantidas pelos gases gerados durante a fermentação, como CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>; por bactérias anaeróbicas facultativas que consomem o oxigênio (O<sub>2</sub>) que entra no rúmen aprisionado nos alimentos ingeridos com a água ou por difusão através dos vasos sanguíneos; e/ou pela eliminação de O<sub>2</sub> pela eructação (Furlan *et al.*, 2011). Desta forma, somente microrganismos capazes de tolerar um baixo potencial redox (entre - 250 mV e - 450 mV) são capazes de sobreviver neste ecossistema (Kamra, 2005). Em virtude desta característica, as opções metabólicas dos microrganismos se tornam limitadas, sendo que estes são obrigados a trabalhar com excesso de equivalentes redutores (NADH), utilizando-os em uma variedade de reações. Assim, os microrganismos reduzem todos os compostos disponíveis, sendo o CO<sub>2</sub> reduzido a CH<sub>4</sub>, sulfatos a sulfetos, nitratos a amônia e ácidos graxos insaturados a saturados. Apesar deste excesso de compostos redutores, o crescimento microbiano permanece limitado pela disponibilidade de ATP (Owens & Goetsch, 1993; Valadares Filho & Pina, 2011).

A fermentação normal processa-se numa faixa de osmolaridade, variando entre 260 e 340 mOsm, quando é mantida razoavelmente constante e próxima a 280 mOsm. A pressão osmótica próxima de 260 mOsm é mais favorável aos protozoários ciliados e, acima de 350 mOsm é prejudicial para a maioria das espécies, pois ocorre a inibição da digestão da fibra vegetal e do amido por efeito direto sobre o metabolismo microbiano. O fluxo resultante de água através da parede

do rúmen é pequeno em condições normais de pressão osmótica, mas um influxo de água para o rúmen é detectado em condições de elevação da pressão osmótica e um efluxo em condições de diminuição em relação à pressão normal (Owens & Goetsch, 1993; Valadares Filho & Pina, 2011).

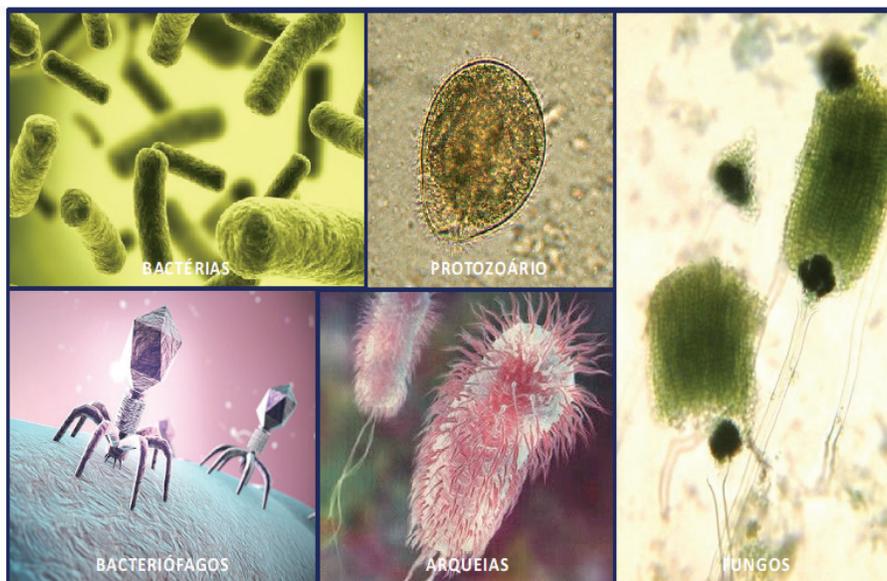
Para abrigar uma extensa diversidade biológica, que apresenta alta densidade populacional e complexas interações, existem no rúmen três microambientes cruzados: (1) a fase líquida, representando 25% da massa microbiana; (2) a fase sólida, representando 70%; e (3) as células epiteliais e de protozoários que compreendem 5% da massa microbiana (Ishler *et al.*, 1996; Brulc *et al.*, 2009; Matthews *et al.*, 2019). Muitos dos produtos finais da fermentação são absorvidos diretamente na parede ruminal na fase líquida, sendo as partículas de maiores tamanhos retidas por mais tempo para que sofram a degradação (Oliveira *et al.*, 2007a).

A interação existente entre o hospedeiro e o microbioma ruminal é sinérgica, com o animal fornecendo calor, umidade e alimentos, e os microrganismos produzindo proteína microbiana e subprodutos da digestão, como, por exemplo, os AGCCs que serão utilizados pelo hospedeiro. Desta forma, alterar a fermentação em direção a rotas metabólicas mais eficientes e direcionar o crescimento de microrganismos específicos são focos principais de estudos recentes relacionados ao desenvolvimento de soluções de inovação que visam aumentar a produtividade, garantindo a saúde dos rebanhos e a sustentabilidade ambiental (Matthews *et al.*, 2019). Consequentemente, qualquer estratégia de otimizar a fermentação ruminal deve levar em consideração as características físicas e químicas do rúmen e os aspectos ecológicos existentes entre as diversas populações de microrganismos e o animal hospedeiro, como simbiose, predação, competição, mutualismo e antibiose.

## Diversidade microbiana ruminal

Como mencionado previamente, os microrganismos presentes no rúmen produzem um arsenal de enzimas que desconstroem os polissacarídeos vegetais fornecendo nutrientes essenciais ao hospedeiro e utilizam proteínas e carboidratos do alimento ingerido pelo hospedeiro para crescer e se multiplicar. Após usarem esses substratos, esta microbiota, que inclui bactérias, arqueias, protozoários, fungos e bacteriófagos (Figura 2), produz metabólitos

resultantes de processos de fermentação (proteínas microbianas e AGCC), sendo estes metabólitos os principais nutrientes utilizados pelos ruminantes (Matthews *et al.*, 2019).



**Figura 2.** Tipos de microrganismos encontrados no sistema digestivo dos ruminantes. Adaptado de: Bactérias: <http://zootecniaativa.com/tag/rumen>; Bacteriófagos: <https://www.biologianet.com/biodiversidade/bacteriofagos.htm>; Fungos: <https://www.researchgate.net/publication/273693783>; Protozoário: [https://pt.wikipedia.org/wiki/Protozo%C3%A1rio#/media/Ficheiro:Balantidium\\_coli\\_wet\\_mount.jpg](https://pt.wikipedia.org/wiki/Protozo%C3%A1rio#/media/Ficheiro:Balantidium_coli_wet_mount.jpg); Arqueias: [https://static.mundoeducacao.uol.com.br/mundoeducacao/conteudo\\_legenda/51fc90aad8663943da7744b26688420a.jpg](https://static.mundoeducacao.uol.com.br/mundoeducacao/conteudo_legenda/51fc90aad8663943da7744b26688420a.jpg).

Apesar da existência destes diferentes grupos de microrganismos no rúmen, bactérias e protozoários são os grupos mais importantes e juntos representam mais de 90% de toda biomassa microbiana. Entretanto, apenas cerca de 8% destes microrganismos foram isolados até o momento (Weimer, 2015). Dessa forma, o sinergismo e o antagonismo destes diferentes grupos são diversos e ainda pouco compreendidos, sendo a qualidade e a quantidade dos produtos obtidos pela fermentação dependentes do tipo e das atividades enzimáticas destes seres vivos (Russel *et al.*, 1992).

Abaixo será apresentada uma breve descrição das principais populações componentes da microbiota ruminal, o estabelecimento destas no rúmen, suas exigências para seu adequado crescimento, sua distribuição espacial e algumas espécies que já foram descritas.

## **Bactérias**

As bactérias representam a principal população de microrganismos presentes no conteúdo ruminal, sendo os seres mais diversos tanto em número quanto em atividade metabólica. A densidade de bactérias no rúmen é uma das maiores encontradas em qualquer outro ecossistema conhecido, sendo, frequentemente, observados valores na grandeza de  $10^{10}$  células/grama de conteúdo ruminal (Stewart *et al.*, 1997). Os primeiros estudos relacionados à identificação e metabolismo das bactérias surgiram após a Segunda Guerra Mundial, com a ampliação de pesquisas e técnicas de cultivo bacteriano em ambiente anaeróbio (Hungate, 1966). Anteriormente a este período, os estudos relacionados à microbiota e a fermentação ruminal eram escassos.

Elas constituem de 60% a 90% da massa microbiana e são de suma importância no processo de fermentação e na degradação da lignina, celulose, hemicelulose, como também da proteína, do amido e do óleo contidos nos alimentos. A simbiose entre as bactérias e entre outros microrganismos ruminais promove a formação de AGCCs e de proteína microbiana ruminal (Teixeira, 2001; Kozloski, 2011). Desta forma, sobrevivem e predominam no ambiente ruminal as espécies que possuem em seu material genético as informações para síntese de enzimas que compõem as vias metabólicas mais eficientes no aproveitamento da energia contida no substrato (Stewart *et al.*, 1997).

As espécies bacterianas podem variar quanto à forma, podendo apresentar-se como cocos, bacilos, espirilos, vibriões, entre outras. Além desta classificação baseada em morfologia, as bactérias podem ser classificadas ainda em micoplasmas (bactérias que não possuem parede celular), gram-positivas e gram-negativas. As gram-positivas apresentam parede celular com uma única e espessa camada de peptidoglicano e as gram-negativas são mais complexas e apresentam dupla membrana externa, as quais são conectadas por uma camada de glicopeptídeos (Purves *et al.*, 2002; Kozloski, 2011).

A classificação das bactérias também é fundamentada no tipo de substrato no qual estes microrganismos agem e nos produtos finais da fermentação. Desta forma, são denominadas como fermentadoras de carboidratos estruturais (celulolíticas ou fibrolíticas), fermentadoras de carboidratos não-estruturais (amilolíticas e pectinolíticas), metanogênicas, proteolíticas, lipolíticas e lácticas, além das bactérias anaeróbias facultativas (Arcuri *et al.*, 2011). De acordo com Matthews *et al.* (2019), a composição bacteriana ruminal é ditada por vários fatores, incluindo a preferência por certos substratos (dieta), necessidades de energia e resistência a certos produtos finais metabólicos, que podem ser tóxicos para algumas espécies.

Segundo Kamra (2005), a maioria das bactérias ruminais degradadoras de carboidratos estruturais são gram-positivas, degradando a celulose, por meio de complexos enzimáticos denominados celulasas, e formando acetato, succinato, formato, butirato, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. Elas também disponibilizam substratos para as demais bactérias, sobretudo as metanogênicas (gram-positivas), que utilizam CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> para a produção de metano. Embora existam muitas bactérias degradadoras de celulose, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *R. albus* são as espécies mais desejáveis, pois sua capacidade de digerir celulose é muito maior do que a de outras bactérias celulolíticas conhecidas até o momento (Arcuri *et al.*, 2011). Isto ocorre, provavelmente, pelo fato destas espécies possuírem vários genes que codificam enzimas envolvidas na degradação das fibras (Matthews *et al.*, 2019).

Para as bactérias celulolíticas, a diminuição do pH ruminal (< 6,0) minimiza a atividade destes microrganismos e quando os níveis decrescem mesmo em pequenas quantidades, pode ocorrer a inibição da digestão da celulose. Estudos comprovam que em baixo pH intracelular, estes microrganismos cessam a atividade de crescimento, ocasionando uma toxicidade na célula bacteriana pelo acúmulo de ânions (Russel & Wilson, 1996). A atividade celulolítica também pode ser inibida devido à inclusão de amido na alimentação, o que induz o desenvolvimento de bactérias amilolíticas (gram-negativas) e altera a digestão da fibra, em decorrência da competição existente entre estes distintos grupos (Steenbakkers *et al.*, 2008).

Bactérias ruminais que degradam carboidratos de natureza não estrutural são fundamentais na quebra do amido, sendo este processo realizado pela enzima amilase (Kamra, 2005). A fermentação do amido é realizada por es-

pécies do gênero *Bacteroides*, principalmente, pela *Bacteroides amylophilus*, que utiliza amido, mas é incapaz de utilizar glicose ou outros monossacáridos. As espécies *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium* fermentam amido e açúcares solúveis, produzindo acetato, um importante AGCC para o metabolismo bovino. Entretanto, se as quantidades destes carboidratos forem elevadas, podem ser sintetizados também formato, etanol e propionato (Russell, 1988).

Algumas bactérias anaeróbias adquirem energia a partir da degradação da pectina, que representa 10% a 20% do total de carboidratos não estruturais nas forragens utilizadas na nutrição de ruminantes. A pectina é fermentada por bactérias e protozoários, sendo as espécies pectinolíticas *Prevotella ruminicola*, *Lachnospira multiparus*, *B. ruminicola* e *Butyrivibrio fibrisolvens* as principais bactérias que desempenham essa função. As pectina-liases são as principais enzimas que hidrolisam a pectina em oligogalacturonoides, produzindo grandes quantidades de acetato (Duskova & Marounek, 2001). Os subprodutos cítricos, como a polpa cítrica, também são amplamente utilizados nos sistemas de alimentação de ruminantes e contêm uma alta porcentagem de substâncias pécticas. Esses subprodutos podem ser utilizados como uma alternativa aos grãos altamente fermentáveis, impedindo o crescimento excessivo de *S. bovis* e a acidose ruminal associada (Santos *et al.*, 2001).

De acordo com Arcuri *et al.* (2011), a característica proteolítica das espécies *B. amylophilus*, *B. ruminicola*, *Butyrivibrio* sp. e *S. ruminantium* se tornou conhecida desde a década de 1960. Além disso, sabia-se que, apesar de grande número de bactérias presentes no rúmen fermentarem aminoácidos, a maioria delas é incapaz de crescer tendo aminoácidos como o único substrato (Nocek, 1988). Entretanto, na década de 1980, o cultivo *in vitro* de líquido ruminal enriquecido com produto da cocção de carnes (tripticase) permitiu o isolamento de três espécies de bactérias fermentadoras estritas de aminoácidos, que foram classificadas como *Peptostreptococcus* sp., *Clostridium aminophilum* e *C. sticklandi* (Paster *et al.*, 1993). Estas espécies não utilizam carboidratos como fonte de energia para crescimento e desaminam aminoácidos em taxas 20 vezes superiores às observadas em outras bactérias ruminais (Lima *et al.*, 2009).

A importância deste grupo de bactérias, chamado de *Proteobacteria*, se deve ao fato da proteína dietética, ao ser degradada pelos microrganismos do rú-

men, liberar AGCC e amônia (Teixeira, 2001). Consequentemente, se a taxa de desaminação excede a taxa de utilização de amônia para síntese microbiana, pode ocorrer perda de eficiência na conversão alimentar (Tedeschi *et al.*, 2000). As *Proteobacterias* têm sido descritas na literatura como representando cerca de 2% do total da população bacteriana ruminal a partir da quantificação do rDNA (DNA ribossomal). Entretanto, utilizando técnicas de mensuração do RNA, McSweeney (2009) afirma ter encontrado que este grupo representava até 28% dos clones sequenciados a partir de uma biblioteca de 16S rDNA. De modo similar, por meio da técnica de *microarrays*, a partir de RNA, indicou ser este grupo cerca de oito vezes maior do que os resultados obtidos a partir de amostras de DNA. Estes resultados indicam que o grupo *Proteobacteria* pode representar um papel bem mais significativo no metabolismo ruminal do que aquele considerado para este grupo (Arcuri *et al.*, 2011).

Bactérias proteolíticas também são responsáveis pela degradação de lipídeos, gerando nitrogênio em forma de amônia para as bactérias celulolíticas (Robson & Stewart, 1997). Porém, o grupo de organismos capaz de hidrolisar lipídios no rúmen não é muito numeroso, pelo fato deste ambiente apresentar potencial de óxido redução muito baixo, característico de ambientes anaeróbios (Dehority, 2003). A espécie *Anaerobivrio lipolytica* hidrolisa lipídios e, concomitantemente, utiliza ribose, frutose, glicerol e lactato como fonte de carbono e de energia. Esses substratos são fermentados a acetato, propionato e CO<sub>2</sub>, enquanto o glicerol é fermentado a propionato e succinato. Todos os substratos resultam em produção de H<sub>2</sub> (Stewart *et al.*, 1997).

Associado, principalmente, à parede do rúmen encontra-se um grupo de bactérias totalmente distinto dos demais. Este grupo, formado por microrganismos anaeróbios facultativos, como os *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, além de vários outros gêneros, digere células epiteliais mortas e apresentam importante atividade ureolítica em um ambiente situado na interfase entre o tecido bem oxigenado e o conteúdo ruminal anaeróbico. Estas bactérias aparentemente desempenham papel importante na manutenção de baixos níveis de oxigênio dissolvido no conteúdo ruminal, embora não compreendam mais que 1% da microbiota total encontrada no rúmen (Arcuri *et al.*, 2011).

Devido a enorme variedade de gêneros e espécies e a complexidade de interação existente entre os microrganismos ruminais, o número exato de espécies bacterianas existentes no rúmen ainda permanece desconhecido. No

entanto, mais de 200 espécies já foram identificadas por técnicas convencionais baseadas em cultura (Matthews *et al.*, 2019).

## Arqueias ou Metanógenos

Arqueias são organismos procariontes, estritamente anaeróbicos, morfologicamente semelhantes às bactérias, mas genética e bioquimicamente distintas, possuindo características que podem ser encontradas em eucariontes ou em bactérias, sendo os únicos microrganismos presentes no rúmen capazes de produzir o gás metano, que viabiliza o funcionamento do rúmen por servir como o principal dreno de hidrogênio (Hook *et al.*, 2010; Mosoni *et al.*, 2011).

À semelhança das bactérias, as arqueias possuem um único cromossomo circular, ausência de íntrons spliceossômicos, muitos genes estruturados em operons e organização celular simples. Entretanto, possuem RNAs polimerases mais parecidas com organismos eucariontes na composição e na sequência das subunidades do que com as bactérias; compartilham com os eucariotos alguns recursos de tradução e apresentam insensibilidade à maioria dos antibióticos antibacterianos. Esses microrganismos são conhecidos por habitar ambientes considerados extremos, como aqueles ricos em sais e com temperaturas elevadas, entretanto, existem espécies que vivem em ambientes moderados (Walsh & Doolittle, 2005).

A maioria das espécies de arqueias cultiváveis são membros de três filos principais: o *Euryarchaeota*, no qual se encontram todos os metanogênicos e muitos halófilos extremos; o *Crenarchaeota*, que inclui a maioria das espécies termofílicas; e, o *Korarchaeota*, que inclui organismos termofílicos extremos pouco conhecidos (Lurie-Weinberger & Gophna, 2015). No grupo dos extremófilos, incluem-se os (1) halófitos extremos: microrganismos que vivem em ambientes ricos em sal, geralmente localizados em regiões quentes e secas, onde há alta evaporação. Algumas dessas espécies toleram o ambiente rico em sal; outras, no entanto, dependem desse ambiente para sua sobrevivência, como, por exemplo, *Halobacterium*, que é incapaz de sobreviver quando a salinidade cai abaixo de 9%; e, (2) termófilos extremos: microrganismos que vivem em ambientes extremamente quentes, o que seria mortal para grande parte dos seres vivos. São exemplos de termófilos extremos arqueias do gênero *Sulfolobus*, que sobrevivem em fontes vulcânicas com tempera-

tura em torno de 90 °C (Lurie-Weinberger & Gophna, 2015). Em relação às arqueias que vivem em ambientes moderados, destacam-se as metanogênicas, grupo mais conhecido do domínio *Archaea* e que representa menos de 4% da comunidade microbiana ruminal (Lin *et al.*, 1997).

De acordo com bancos de dados públicos, 90% dos metanógenos ruminais identificados pertencem a 10 gêneros conhecidos, com *Methanobrevibacter* sendo representado por 63,2% das sequências analisadas, seguido por *Methanomicrobium* (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).

Como já citado anteriormente, a fermentação ruminal envolve um processo oxidativo, gerador de cofatores reduzidos (NADH, NADPH e FADH). Para que a atividade fermentativa não seja paralisada, estes cofatores são então re-oxidados (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> e FAD<sup>+</sup>) através de reações de desidrogenação, liberando H<sub>2</sub> no rúmen, que é continuamente removido do meio pela metanogênese. Desta forma, a formação de metano é essencial para o ótimo desempenho do ecossistema ruminal, evitando o acúmulo de H<sub>2</sub> no rúmen, o que poderia levar à inibição da atividade desidrogenase, envolvida na re-oxidação dos cofatores reduzidos. Além disso, a remoção eficiente do H<sub>2</sub> do rúmen auxilia na manutenção das condições ideais de pH ruminal, permitindo o desenvolvimento dos microrganismos fermentadores de fibras e o aumento da taxa de fermentação pela eliminação do seu efeito inibitório na degradação microbiana de materiais vegetais (Mosoni *et al.*, 2011).

Entretanto, bovinos podem produzir até 17 litros de CH<sub>4</sub>/hora e como este gás não pode ser absorvido pelo hospedeiro ele é emitido para o meio ambiente, constituindo, desta forma, uma perda substancial de energia oriunda da alimentação (Johnson & Ward, 1996; Arcuri *et al.*, 2011). Além disso, o metano liberado pelo animal pode ser prejudicial para o meio ambiente, pois sua emissão é responsável por cerca de 17% da emissão global de CH<sub>4</sub>, contribuindo, assim, para o aumento do efeito estufa e da poluição atmosférica (Patra *et al.*, 2017). Segundo Mosoni *et al.* (2011), nos ruminantes 80% do metano é gerado durante a fermentação das fibras e 20% é gerado pela decomposição das fezes dos animais, sendo que essas porcentagens podem variar dependendo da composição da dieta.

Apesar dos efeitos benéficos da metanogênese ruminal, como aumento da proteína microbiana e remoção de  $H_2$  do rúmen, estima-se que há perda de 2% a 18% da energia dos alimentos por meio da produção de metano, sendo maior esta perda em animais alimentados com forragem (Pedreira & Primavesi, 2011; Patra *et al.*, 2017). Isto significa que essa energia não é direcionada para atividades metabólicas básicas como, por exemplo, crescimento, prenhez, lactação, manutenção, entre outras. Assim, manipular a dieta dos ruminantes para reduzir o número de metanógenos poderá auxiliar na redução do impacto negativo gerado ao meio ambiente e na melhoria da eficiência da produção pecuária.

Outra forma de reduzir a produção de metano é aumentar a eficiência produtiva dos sistemas, visto que em sistemas que visam a produção de carne, o aumento da eficiência produtiva do animal reduz seu tempo de permanência no sistema de produção, diminuindo, desta forma, a produção de  $CH_4$  durante seu ciclo de vida. Como a produção intensiva de carne exige o abate precoce dos animais, fazem-se necessárias melhorias genéticas no rebanho, acompanhadas do fornecimento de dietas nutricionalmente mais completas. Neste contexto, a utilização de aditivos na alimentação dos ruminantes é um meio pelo qual isso pode ser conseguido.

Aditivos químicos, como os ionóforos, começaram a ser utilizados como alternativa para reduzir a produção de  $CH_4$  na década de 1970. Esses aditivos são antibióticos que agem de forma seletiva sobre a microbiota do rúmen e o seu uso tem por objetivo manipular a fermentação ruminal, aumentando a proporção molar de propionato e reduzindo a de acetato e butirato e, conseqüentemente, diminuindo a produção de metano (Mourthe *et al.*, 2011). Esses aditivos são produtos da fermentação de espécies de actinomicetos produzidos, principalmente, por bactérias do gênero *Streptomyces spp* e *Actinomadura spp*. Atualmente, são conhecidos mais de 120 tipos de ionóforos, mas, apenas a monensina (*S. aureofaciens*), a lasalocida (*S. cinnamomensis*), a salinomina (*S. albus*) e a laidomicina propionato são aprovados para inclusão em dietas de ruminantes (Machado *et al.*, 2011). Entretanto, a utilização de ionóforos vem sendo criticada por consumidores e por autoridades governamentais, os quais questionam sobre o fato de resíduos de medicamentos presentes em produtos de origem animal serem ou não prejudiciais à saúde dos consumidores e se o uso de antibióticos na alimentação animal poderia

contribuir para o aumento da incidência/prevalência de resistência microbiana na medicina humana (Salman *et al.*, 2006).

A metanogênese é o único mecanismo de síntese de ATP disponível nas arqueias metanogênicas. A metil coenzima A redutase (McrA, codificada pelo gene *mcrA*) catalisa a etapa final da metanogênese, o que significa que essa enzima e os genes associados a ela podem ser bons marcadores para a presença de metanógenos (Janssen & Kirs, 2008). Além disso, antimetanógenos, como o bromoclorometano, podem ser usados para inibir a produção de metano. O bromoclorometano reage com a vitamina B12 reduzida e inibe a via metabólica da metil transferase dependente de cobamida, responsável pela síntese da coenzima McrA. Dessa forma, desenvolver mecanismos para alterar esta via poderá interromper este passo e inibir a produção desta coenzima.

Em um estudo recente, Kinley *et al.* (2016) investigaram *in vitro* o uso de espécies de macroalgas de água doce e marinha como forma de reduzir as emissões de metano. As algas marinhas vermelhas *Asparagopsis taxiformis* suprimiram consistentemente a produção *in vitro* de CH<sub>4</sub> em até 99% quando adicionadas como suplemento (2% de matéria orgânica), sendo o bromofórmio o antimetanogênico presente em concentração suficiente na biomassa para ser eficaz na inibição da metanogênese. Os autores não observaram efeitos adversos na degradabilidade do substrato ou na produção de AGCC totais para a biomassa de *Asparagopsis* (2% de matéria orgânica) ou de bromofórmio ( $\leq 10 \mu\text{M}$ ).

O bromofórmio é semelhante ao bromoclorometano na sua capacidade de diminuir a atividade metanogênica. Assim, as algas marinhas vermelhas e, provavelmente, outras plantas ricas em organobromina podem oferecer uma abordagem natural potencialmente prática para mitigar a emissão de CH<sub>4</sub> (Machado *et al.*, 2014). Entretanto, estudos *in vivo* ainda são necessários para determinar as doses ideais e avaliar o efeito no microbioma ruminal, na fermentação da ração e os possíveis efeitos tóxicos. Além disso, a produção e o transporte em larga escala desses produtos para mitigar as emissões entéricas de metano globalmente também serão um desafio.

Perdas substanciais de energia pelos animais e possíveis prejuízos ambientais ocasionados pela emissão de CH<sub>4</sub> ruminal são desvantagens que ocor-

rem no processo de produção de ruminantes, especialmente se alimentados com dietas não balanceadas e ricas em fibras, como ocorre na maioria dos casos em regiões tropicais (Arcuri *et al.*, 2011). Entretanto, a pecuária de ruminantes, incluindo bovinos, ovinos, caprinos e camelídeos, é uma atividade cuja vantagem competitiva é exatamente a de transformar produtos de pouca utilidade para a humanidade, como vastas regiões cobertas por gramíneas, em produtos nobres, como carne, leite, lã e força motora (Van Soest, 1994), gerando, assim, a necessidade de intensificar esforços de pesquisa para melhorar o desempenho animal, a produtividade, mitigar as perdas de energia proveniente dos alimentos e a poluição ambiental.

Neste sentido, a ciência zootécnica e o melhoramento animal associados à microbiologia e às novas metodologias moleculares, como as ferramentas ômicas e nanotecnológicas, poderão oferecer alternativas para pecuária sustentável de ruminantes. Para isso, o primeiro passo é aumentar o conhecimento existente sobre a diversidade e a estrutura populacional dos metanógenos, sua relação com outros microrganismos ruminais, com a eficiência alimentar do hospedeiro e com a emissão de CH<sub>4</sub> para o meio ambiente.

## Protozoários

Os protozoários são eucariontes, unicelulares, não patogênicos e heterotróficos, ou seja, não possuem a capacidade de produzir seu próprio alimento, utilizando as bactérias como principal fonte de aminoácidos e nitrogênio (Hungate, 1966). Essa predação reduz a biomassa bacteriana livre no líquido ruminal; aumenta a reciclagem intrarruminal e a perda de nitrogênio pelo hospedeiro; e, reduz o fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado do hospedeiro, tanto pela menor população bacteriana quanto pela retenção dos protozoários no rúmen (Leng & Nolan, 1984). Apesar disto, eles são importantes no processo de fermentação ruminal e são habilitados para a digestão da maioria dos componentes dos alimentos, sobretudo na digestibilidade das fibras, sendo responsáveis por 30% a 40% da degradação do material fibroso (Kamra, 2005).

Estes microrganismos apresentam organização interna complexa e altamente diferenciada, com estruturas funcionais similares à boca, esôfago, estômago, reto e ânus. Em algumas espécies, ocorre ainda uma placa rígida,

semelhante a um exoesqueleto e variam em tamanho de 20 a 200 µm, sendo cerca de 10 a 100 vezes maiores do que as bactérias (Dehority, 1993). Em consequência do seu tamanho, a concentração de protozoários no rúmen, em geral, representa de 40% a 60% da biomassa microbiana total, fazendo com que sua presença no rúmen tenha efeitos benéficos e outros adversos para a produção animal.

Como efeitos benéficos podem ser citados aumentos na estabilidade da fermentação e do pH; no aspecto físico do animal; na concentração de AGCCs; na degradação da matéria seca e da fibra; e, na digestão do amido; diminuição na concentração de ácido láctico e na susceptibilidade à acidose; nos níveis de cobre no plasma sanguíneo e no fígado; e, nas susceptibilidades a toxidez por cobre e a diarreias. Como efeitos adversos podem ser citados aumentos na concentração de amônia; na atividade proteolítica; na metanogênese; nos níveis plasmáticos de ácidos graxos saturados; na susceptibilidade ao timpanismo; e, na gordura na carcaça; diminuição da população bacteriana; na síntese de proteína bacteriana; no fluxo de nitrogênio para o intestino delgado; nos níveis plasmáticos de ácidos graxos insaturados; no ganho de peso; no crescimento de lã; e, na eficiência da conversão alimentar (Arcuri *et al.*, 2011).

De acordo com o seu meio de locomoção, os protozoários são divididos em quatro grupos: ciliados, flagelados, rizópodos e esporozoários. Os ciliados se locomovem na água por meio do batimento de cílios numerosos e curtos, sendo, geralmente, encontrados em água doce e salgada, e em ambientes onde existe matéria vegetal em decomposição; os flagelados são de vida livre, utilizam o movimento de um único e longo flagelo para sua locomoção, sendo muitos deles parasitas de seres humanos; os rizópodos utilizam pseudópodos (“falsos pés”), moldando a forma do seu próprio corpo para se locomoverem e, os esporozoários, que não possuem organelas locomotoras nem vacúolos contráteis e são parasitas obrigatórios (Brusca & Brusca, 2003).

Embora existam alguns flagelados, a maior parte dos protozoários encontrados no rúmen são da classe dos ciliados e transformam uma variedade de constituintes vegetais e bacterianos em componentes celulares e em metabólitos que são usados pelo hospedeiro (Barnes, 1990). Calcula-se que os ciliados representem cerca de 2% do peso do conteúdo ruminal, 40% do

nitrogênio microbiano e proporcionem 60% dos produtos da fermentação microbiana neste órgão (Yokayama & Johnson, 1988).

Os protozoários ciliados podem ser classificados como utilizadores de açúcar, os que degradam amido e os que hidrolisam lignina e celulose. Eles também são relativamente ativos na hidrólise lipídica e podem produzir hidrogênio através de seus hidrossomos (Matthews *et al.*, 2019). Estes microrganismos, diferentemente das bactérias, são difíceis de cultivar *in vitro* por longos períodos (Williams, 1986). Dependendo das suas características morfológicas, eles são divididos em dois grupos, *Entodinia* e *Holotrichia* (Leng & Nolan, 1984; Oliveira *et al.*, 2007a).

Os entodiniomorfos ingerem, preferencialmente, partículas insolúveis suspensas no fluido ruminal e estão presentes em maior número quando a dieta é à base de forragem. Enquanto os holotrichias são capazes de se fixarem à parede do retículo e migrar em direção ao rúmen logo após a alimentação do hospedeiro, possivelmente em função da presença de açúcares solúveis. Apresentam maior capacidade de ingerir materiais solúveis e grânulos de amido, estando presentes em maior número quando a dieta é rica em grãos de cereais (Oliveira *et al.*, 2007a). O gênero *Entodinium* é o mais dominante em dietas ricas em grãos, degradando rapidamente o amido, absorvendo-o e convertendo-o em um polímero de armazenamento (Matthews *et al.*, 2019). De acordo com Dehority (2003), as espécies pertencentes a esse gênero predominam na fauna ruminal da maioria dos ruminantes de diferentes países, chegando a compreender entre 80% a 90% da população total.

Apesar das arqueias serem responsáveis pela produção de  $\text{CH}_4$ , um dos principais fornecedores de substrato para a ação destes microrganismos são os protozoários. Eles contribuem com o processo de metanogênese por meio do fornecimento de  $\text{H}_2$  durante a fermentação dos carboidratos. Protozoários e fungos aneróbios, dentre eles os ruminais, apresentam uma organela de elevada atividade metabólica, produtora de  $\text{H}_2$ , denominada de hidrogenossoma. Esta organela possui papel semelhante às mitocôndrias de eucariotos, pois possui membranas internas, produzindo também acetato,  $\text{CO}_2$  e ATP, pela ação combinada de diferentes enzimas. A associação somática das metanogênicas com protozoários ciliados representa uma típica relação simbiótica de transferência de  $\text{H}_2$  interespecies, em que ambos são favorecidos. As metanogênicas, por utilizarem o  $\text{H}_2$  produzido pelos ciliados, favorecem a

manutenção de um ambiente ruminal adequado ao desenvolvimento saudável dos protozoários (Pedreira *et al.*, 2005; Arcuri *et al.*, 2011).

Ainda que o papel dos protozoários na fermentação ruminal seja inquestionável (Hungate, 1966), a verdade é que o ruminante não necessita deles para viver, podendo a sua eliminação representar, em alguns casos, um benefício adicional para o animal. Neste sentido, estudos têm sido conduzidos no intuito de suprimir a atividade dos protozoários ciliados, como forma de mitigar a metanogênese e de melhorar o desempenho produtivo dos animais. Dessa forma, uma das estratégias utilizadas nesses estudos é a defaunação, que implica na remoção dos protozoários do rúmen usando uma extensa variedade de técnicas químicas e físicas (Williams & Coleman, 1997).

Uma das técnicas de defaunação que pode ser realizada envolve a remoção total do conteúdo ruminal do hospedeiro, sendo este um método invasivo pelo qual a mucosa é cuidadosamente lavada e o conteúdo ruminal é tratado por aquecimento ou congelamento para eliminar os protozoários. Em seguida, o conteúdo ruminal é retornado ao rúmen. Esta técnica é aplicada especialmente quando se quer estudar o papel dos protozoários na fermentação ruminal (Hook *et al.*, 2010). Cabe ressaltar que os dados obtidos, neste caso, precisam ser interpretados com cautela, pois a defaunação também leva a grandes mudanças na população microbiana do rúmen, que por sua vez podem alterar a produção de AGCC e resultar em uma diminuição na produção de metano, pois menos  $H_2$  metabólico estará disponível como substrato para a metanogênese (Demeyer, 1991; Williams & Coleman, 1997).

De acordo com Fortaleza *et al.* (2009), estudos com animais defaunados evidenciaram que esses microrganismos exercem efeito positivo no metabolismo ruminal, melhorando o ganho de peso do hospedeiro, provavelmente, devido a maior digestibilidade ruminal e total, juntamente com níveis mais altos de AGCC produzidos no rúmen. Segundo Nigri *et al.* (2017), vários trabalhos mostraram que a exclusão desses eucariotos trouxe efeito benéfico sobre a taxa de crescimento e eficiência de conversão alimentar de animais em condições específicas de alimentação, como confinamentos. Resultados observados na redução da emissão de metano são da ordem de 10% a 13% para ensaios realizados *in vivo* e *in vitro*, evidenciando que a eliminação da população de protozoários do rúmen para a mitigação de  $CH_4$  pode ser uma abordagem interessante (Hegarty, 1999; Morgavi *et al.*, 2010).

Contrariamente a esses benefícios, alguns estudos concluíram que os protozoários representam componente essencial do ecossistema microbiano no rúmen e que a sua exclusão tem efeito negativo sobre a produtividade dos ruminantes e a digestibilidade da fibra e da celulose (Nigri *et al.*, 2017). Assim, o papel dos protozoários ruminais na moderação da concentração de H<sub>2</sub> e da fermentação no rúmen ainda não está claramente compreendido para os diferentes tipos de dietas ou de categorias de ruminantes.

## Fungos

Os fungos estabelecem íntimas relações com outros organismos vivos, coevoluindo com representantes de todas as formas de vida, de bactérias ao homem. Na interação com os outros organismos, eles invadem as células em busca de nutrientes, abrigo ou transporte, estabelecendo uma relação de parasitismo ou de patogenicidade. Entretanto, eles também podem mediar a interface entre este organismo e seu ambiente físico e biológico, em troca de mecanismos que lhes garantam a sobrevivência, caracterizando uma relação mutualista ou simbiote. São organismos microscópicos, heterotróficos e eucariontes, com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados, como os filamentosos ou bolores (Pirozynski & Hawksworth, 1988).

Esses organismos são conhecidos desde o século IV a.C., quando Aristóteles, filósofo grego, organizou os seres vivos em dois reinos, *Animalia* e *Plantae*. Nesta classificação, os fungos juntamente com as algas e as plantas foram incluídos no reino *Plantae*, devido a semelhanças nos seus modos de vida. Tanto os fungos como as plantas são na sua maioria imóveis e apresentam semelhanças na morfologia geral e no habitat em que se desenvolvem. Durante um longo tempo eles permaneceram neste reino e apenas em 1969, Whittaker, cientista norte americano, propôs a separação e elegeu um grupo específico para os fungos, o reino *Fungi* (Baldauf & Palmer, 1993).

A principal característica que separa os fungos dos outros seres vivos é a formação da sua parede celular. Eles são os únicos seres vivos que possuem nesta estrutura quitina e glucanos ao mesmo tempo. Outros organismos podem possuir um ou outro polissacarídeo desses, mas não os dois ao mesmo tempo, por exemplo, glicanos também são encontrados em plantas e quitina nos exoesqueletos de artrópodes. A estrutura e a biossíntese de uma parede

celular fúngica são únicas e, portanto, são um excelente alvo para o desenvolvimento de drogas antifúngicas (Bowman & Free, 2006).

Apesar de serem invisíveis a olho nu, os fungos podem ser vistos quando frutificam, ou seja, em formas de cogumelos, trufas, bolores, mofos, e outras formas. Se reproduzem de forma sexuada (cariogamia e meiose), parassexual (cariogamia seguida de aneuploidia) ou assexuada (divisão nuclear mitótica). Apresentam distribuição mundial e desenvolvem-se em uma enorme variedade de habitats como ar, solo, água do mar, água doce, desertos, áreas com elevadas concentrações de radiações ionizantes, sedimentos em mar profundo, bem como podem viver associados a animais, insetos, plantas e detritos (Takahashi *et al.*, 2017). A grande biodiversidade das espécies fúngicas reflete-se em suas características macroscópicas, em diferentes propriedades biológicas, em variados sistemas enzimáticos e em uma vasta produção metabólica. Contudo, pouco se sabe sobre a verdadeira biodiversidade deste reino, que se estima incluir 1,5 milhões de espécies, com apenas cerca de 5% destas formalmente classificadas (Hawksworth, 2001; Takahashi *et al.*, 2017).

De acordo com Hibbett *et al.* (2007), não existe um sistema único de aceitação geral para os níveis taxonômicos mais elevados e frequentes mudanças ocorrem nos nomes em todos os patamares acima de espécie. Além disso, as espécies de fungos também podem ter múltiplos nomes científicos dependendo do seu ciclo de vida e modo de reprodução. Dessa forma, existem esforços entre vários pesquisadores no mundo todo para estabelecer e encorajar o uso de uma nomenclatura unificada e mais consistente. Alguns sítios da internet como *Index Fungorum* ([www.indexfungorum.org/](http://www.indexfungorum.org/)) e ITIS (<https://www.itis.gov/>) listam os nomes atuais das espécies de fungos fazendo referências cruzadas para os sinônimos mais antigos.

Em 2007, foi feita uma classificação para o reino *Fungi* a partir de um trabalho de investigação colaborativa em grande escala envolvendo dezenas de micologistas e outros cientistas que trabalham com taxonomia. Esta classificação reconhece sete filos (*Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Microsporidia* e *Neocallimastigomycota*). Os filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* têm um ancestral comum exclusivo e, por isso, são mais próximos filogeneticamente do que os outros grupos (Hibbett *et al.*, 2007).

Esses organismos são de extrema importância para a cadeia alimentar e para vários ecossistemas, sendo, ao lado das bactérias, os principais decompositores de matérias mortas. Na agricultura, são conhecidos, principalmente, por serem componentes da microbiota do solo, capazes de formar associações simbióticas com as plantas (fungos micorrízicos), gerando várias vantagens como biofertilização, bioregulação e proteção contra fungos fitopatogênicos. Espécies fúngicas têm sido cada vez mais utilizadas como bioinseticidas e bioherbicidas no controle biológico de pragas de forma inócua ao ambiente por serem capazes de produzir substâncias fungicidas, que podem ser utilizadas como alternativa para substituir pesticidas sintéticos, diminuindo a incidência da resistência de fungos fitopatogênicos e toxicidades potenciais para o ambiente e para os mamíferos (Takahashi *et al.*, 2017).

Na medicina, destacam-se pela produção de medicamentos, como antibióticos (*Penicillium chrysogenum*) e imunossupressores (*Tolypocladium inflatum*), sendo que um vasto número de metabólitos bioativos tem sido descrito a cada ano, aumentando muito o potencial e o escopo de aplicação destas substâncias como fármacos. Na indústria de alimentos, onde a atuação dos fungos é mais conhecida, estes são historicamente utilizados na produção de alimentos como pães (*Saccharomyces cerevisiae*), shoyo (*Aspergillus oryzae*), queijos (*Penicillium roqueforti*) e bebidas fermentadas, como cervejas, vinhos e cachaças (*Saccharomyces cerevisiae*) (Takahashi *et al.*, 2017).

No caso dos ruminantes, a importância dos fungos ruminais está em sua capacidade de colonizar e penetrar tecidos vegetais, pois seus rizóides rompem fisicamente as células vegetais possibilitando que outros microrganismos possam se nutrir e finalizar a digestão das fibras. Resumidamente, zoósporos móveis aderem-se aos fragmentos das forragens, invadindo os tecidos vegetais por meio de talos e rizóides. Após o período de crescimento vegetativo, ocorre a formação de estruturas reprodutivas denominadas de esporângios, que liberam zoósporos maduros que irão repetir o ciclo, colonizando material vegetal recém ingerido pelo hospedeiro (Dehority, 2003).

A importância deste rompimento físico no incremento da degradação da parede celular foi demonstrada *in vivo* de forma pioneira para fungos ruminais por Lee *et al.* (2000b). Estes autores compararam o efeito de culturas de fungos ruminais com o efeito apenas das enzimas produzidas por estas culturas

em parâmetros de fermentação ruminal, populações microbianas e atividade enzimática no rúmen de carneiros que receberam dietas à base de feno de gramíneas e concentrado proteico. Apenas o tratamento que continha células viáveis de fungos, ou seja, 200 mL da cultura de fungos de sete dias contendo tanto enzimas quanto fungos, resultou no aumento da digestibilidade de diferentes componentes da dieta, evidenciando que a adição de microrganismos vivos na dieta dos animais, com capacidade fibrolítica elevada, pode aumentar a eficiência de utilização de nutrientes por ruminantes.

Embora os fungos constituam a menor parte da biomassa dos microrganismos ruminais, eles possuem uma ampla gama de enzimas capazes de hidrolisar a maioria dos polissacarídeos estruturais que ocorrem nas paredes das células vegetais. Sua atividade enzimática é variável, dependendo de sua origem filogenética e, especialmente, de sua estrutura rizoidal, mas foi postulado que algumas espécies, como *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces joyonii* e *Orpinomyces communis*, podem digerir polissacarídeos estruturais mais eficientemente do que as espécies de bactérias celulolíticas em monocultura. A biomassa de fungos ruminais aumenta substancialmente em dietas ricas em forragens fibrosas, principalmente, altamente lignificadas e ficam praticamente ausentes em dietas ricas em concentrados à base de grãos de cereais (Castillo-González *et al.*, 2014).

Fungos ruminais são anaeróbicos, pertencentes à classe *Neocallimastigomycetes*, que é composta por cinco gêneros (*Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* e *Piromyces*) que abrangem 21 espécies conhecidas (Hibbett *et al.*, 2007). Estima-se que estes microrganismos representem cerca de 8% a 12% da biomassa microbiana total existente no rúmen e parece que são eles que iniciam o processo de decomposição dos alimentos consumidos pelos ruminantes. Embora as bactérias sejam os microrganismos mais importantes encontrados neste ambiente, os fungos são os melhores degradadores. Eles produzem altos níveis de celulasas e hemicelulasas, além de possuírem a capacidade de decompor a xilana, que é um polissacarídeo existente nas paredes celulares, devido à produção de enzimas xilanasas (Nam & Garnsworthy, 2007).

Mesmo que a importância dos fungos anaeróbicos na digestão de carboidratos esteja bem estabelecida, o papel que eles desempenham no metabolismo das proteínas ruminais ainda não está claro, pois a atividade de proteases de

isolados de fungos anaeróbicos varia significativamente (Michel *et al.*, 1993). Essas proteases fúngicas fornecem aminoácidos para o crescimento de fungos, ajudam na penetração do material vegetal e exibem atividade catalítica comparável às proteases altamente ativas produzidas por inúmeras bactérias ruminais (Bonnemoy *et al.*, 1993; Michel *et al.*, 1993). Além de produzir enzimas, os próprios fungos anaeróbicos contribuem para o suprimento de proteínas do hospedeiro, servindo como fonte de proteína microbiana de alta qualidade sintetizada no rúmen, passando para o abomaso e os intestinos para subsequente digestão e absorção pelo hospedeiro (Atasoglu & Wallace, 2002).

A capacidade dos fungos em reduzir o tamanho dos fragmentos de plantas sugere que a atividade fúngica pode afetar o tempo de permanência das partículas no rúmen, já que apenas as menores partículas são varridas para fora do rúmen. Por outro lado, a remoção de fungos anaeróbicos do rúmen resulta em uma diminuição na ingestão voluntária de alimentos e na degradação da matéria seca, indicando que a digestão dos alimentos é prejudicada nesses animais (Gordon & Phillips, 1998). Além disso, estudos já demonstraram que a eliminação dos fungos ruminais de ovelhas também reduziu significativamente a degradação de matéria seca, de fibra em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA) e a atividade da carboximetilcelulase (Ford *et al.*, 1987; Gordon & Phillips, 1993). Em 1993, Gordon e Phillips relataram que a ingestão de alimentos pode aumentar em até 40% em animais que apresentam fungos anaeróbicos no rúmen quando comparada aos animais que não possuem estes fungos.

Em contraste com um grande número de estudos baseados no funcionamento do rúmen, pouco se sabe sobre o papel e as interações microbianas dos fungos anaeróbicos nos outros órgãos do trato gastrointestinal dos ruminantes. Verificou-se que estes fungos estão presentes em todo o trato alimentar de bovinos e ovinos, desde as secreções salivares até as porções finais, apresentando quantidades mais elevadas no rúmen e omaso e depois diminuindo exponencialmente mais abaixo no trato, nos intestinos delgado e grosso (Rezaeian *et al.*, 2004).

Interações microbianas positivas ou negativas, que resultem em efeitos benéficos para o hospedeiro, por meio do incremento da digestibilidade e da utilização dos alimentos ingeridos, podem ser observadas entre os microrga-

nismos existentes no rúmen, especialmente entre as bactérias, os protozoários e os fungos (Kamra, 2005). Estas interações podem ser de mutualismo, quando ambos se beneficiam; de comensalismo, quando um se beneficia, mas não há efeitos negativos nem positivos sobre o outro; ou de parasitismo, quando um se beneficia em detrimento do outro (Dehority, 2003).

No caso dos fungos, essas interações dependem do local de ocupação dentro do ambiente ruminal, pois os fungos na forma vegetativa têm maior afinidade pela fase de digesta sólida, enquanto os zoósporos, em seu estágio de vida livre, são mais frequentes na fase líquida. Portanto, é esperado que os zoósporos interajam com microrganismos presentes na porção fluida da digesta ruminal, e fungos, em estágio vegetativo, com os microrganismos abundantes na fase sólida (Gordon & Phillips, 1998).

Evidências apontam para uma relação de predação dos fungos pelos protozoários, uma vez que se tem observado aumentos significativos na concentração de fungos e/ou zoósporos em animais defaunados (Gordon & Phillips, 1998). A incubação de fungos anaeróbicos com protozoários inibe a degradação mediada por fungos da parede celular de tecidos vegetais, presumivelmente, devido à predação protozoária de zoósporos e possíveis danos causados à parede celular dos fungos por enzimas protozoárias (Morgavi *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2000a).

Os efeitos da interação entre protozoários e fungos são mais bem avaliados quando esses microrganismos são cultivados em coculturas. Morgavi *et al.* (1994), relataram um aumento efetivo na quantidade de celulose por unidade de biomassa de fungo, apesar da diminuição da população fúngica devido à predação por protozoários. Os efeitos negativos da atividade predatória no crescimento dos fungos e, conseqüentemente, na quantidade de celulose degradada por esses fungos, foi parcialmente atenuada pela atividade fibrolítica dos protozoários ou por um aumento na atividade fúngica devido ao meio mais favorável.

No caso de interações entre fungos e bactérias, alguns desses microrganismos competem pelos mesmos nichos na superfície das partículas de alimento e, para isso, cada um deles utiliza mecanismos próprios para sobressair. No caso de bactérias fibrolíticas, a interação com fungos promove incremento na atividade quando se compara à atividade isolada da bactéria ou do

fungo (Gordon & Phillips, 1998). Alguns fungos estão envolvidos na nutrição cruzada com as bactérias, disponibilizando açúcares como resultado de seu metabolismo. Por outro lado, os fungos necessitam das bactérias para suprir as suas necessidades de vitaminas do complexo B, aminoácidos e outros substratos (Williams *et al.*, 1994).

A adição de substâncias na dieta, como enzimas, ionóforos, antibióticos e aditivos alimentares microbianos tem melhorado, potencialmente, o desempenho animal. Aditivos à base de fungos mostraram importante papel na degradação das fibras vegetais, podendo ser considerados facilitadores da degradação. Segundo Góes e Marson (2004), dentre os benefícios que podem ser atribuídos à inclusão de leveduras e de outros fungos nas dietas de ruminantes, destacam-se: o aumento das proporções dos AGCC, do pH ruminal e da digestibilidade de nutrientes, principalmente, das fibras; a redução da concentração de amônia; aumento do número de bactérias ruminais, principalmente, as celulolíticas; aumento do número de protozoários; alteração do fluxo de nitrogênio; aumento do fluxo de proteína microbiana para o duodeno; aumento na ingestão de matérias seca; aumento na produção de leite em vacas leiteiras; aumento da porcentagem de gordura no leite; diminuição da produção de metano; melhoras no ganho de peso e nas características de carcaça.

Todavia, o resultado desses aditivos microbianos na produção de ruminantes ainda é inconsistente e a sua ineficiência é frequentemente observada. Nem todas as culturas de *Saccharomyces cerevisiae* adicionadas na dieta modificam, efetivamente, a população bacteriana ruminal, pois os efeitos da utilização de leveduras são altamente dependentes da dose e da dieta fornecida. De maneira geral, em todas as pesquisas conduzidas, a adição de leveduras à dieta não produziu nenhum efeito que fosse prejudicial à performance do animal ou à sua eficiência na utilização dos alimentos (Góes & Marson, 2004).

De acordo com Almeida (2009), a habilidade dos microrganismos para degradar polissacarídeos, como a celulose, é uma característica de grande interesse, tanto na microbiologia industrial quanto na ecologia microbiana geral. A determinação do número e do tipo de microrganismos celulolíticos presentes em um complexo sistema, como é o rúmen, entretanto, é uma questão difícil de ser resolvida. Dessa forma, pesquisas vêm sendo realizadas com o obje-

tivo de melhorar a digestibilidade de alimentos de baixa qualidade, ricos em ligninocelulose, usando aditivos alimentares microbianos ou químicos.

A manipulação da fermentação do rúmen, seja pelo incremento no número de microrganismos ligninocelulolíticos, seja pela alteração na atividade desses microrganismos, é considerada como uma das melhores alternativas para tornar mais eficiente a degradação de polissacarídeos. Neste contexto, os fungos anaeróbicos, dentre os microrganismos ruminais, são considerados promissores, porque produzem enzimas extracelulares com elevadas atividades celulolítica e ligninocelulolítica.

## **Bacteriófagos e outros vírus**

Outro grupo de microrganismos que pode ser encontrado no rúmen é o de bacteriófagos ou fagos. Os bacteriófagos são vírus que infectam somente as bactérias. Esses vírus se aderem à bactéria, perfuram sua parede celular e injetam na célula hospedeira o seu conteúdo genético, sendo que o número de partículas virais encontradas ultrapassa o número de células bacterianas ( $3 \times 10^9$  –  $1,6 \times 10^{10}$ ) por mililitro de fluido ruminal (Klieve & Swain, 1993).

Os bacteriófagos são específicos para diferentes bactérias presentes no rúmen e são considerados patógenos obrigatórios. Entretanto, estes patógenos ajudam no turnover da massa bacteriana no rúmen, por disponibilizar, através da lise, proteína bacteriana como fonte de aminoácidos para o animal (Kamra, 2005). Os primeiros estudos que analisaram bacteriófagos no rúmen identificaram 26 tipos morfológicos em bovinos e ovinos (Klieve & Bauchop, 1988) e três famílias virais: *Myoviridae*, *Syphoviridae* e *Podoviridae* (Klieve *et al.*, 1996).

Um estudo mais recente de metagenômica viral do rúmen de bovinos identificou mais de 28.000 genótipos virais diferentes, sendo a grande maioria das partículas sequenciadas (aproximadamente 78%) pertencentes a vírus ainda não descritos. Este estudo também demonstrou que a maioria das sequências virais do microbioma acessado pertence a prófagos (fragmentos de DNA bacterianos de origem viral), superando o número de sequências de fagos líticos numa proporção de 2:1. Os autores constataram ainda que os prófagos e bacteriófagos encontrados estão mais associados aos principais

filos bacterianos encontrados no rúmen dos bovinos, ou seja, *Proteobacteria* e *Firmicutes*, sugerindo, assim, um papel dos vírus na formação dessas comunidades bacterianas. Os genótipos identificados neste estudo pertencem às seguintes famílias em ordem decrescente de prevalência: *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Herpesviridae*, *Phycodnaviridae*, *Mimiviridae*, *Poxviridae*, *Baculoviridae*, *Iridoviridae*, *Polydnaviridae*, *Adenoviridae*, *Bicaudaviridae* (Miller *et al.*, 2012).

Delwart (2007) ao revisar as principais características da metagenômica viral, destacou a importância da utilização desta abordagem em animais selvagens e domesticados, que estão sujeitos às mudanças ambientais ou condições de superlotação, situações que podem estar ligadas a aceleração da transmissão e evolução virais.

Embora os vírus sejam encontrados em abundância no ambiente ruminal, pouco se conhece sobre os tipos de vírus que estão presentes no rúmen e suas interações com os outros microrganismos. Mas, devido ao fato dos vírus serem as entidades biológicas mais abundantes do planeta e desempenharem um papel importante no equilíbrio do número de microrganismos em um ecossistema, provavelmente, os bacteriófagos estão envolvidos no controle da dinâmica populacional das bactérias ruminais, mantendo, assim, essa comunidade em equilíbrio (Miller *et al.*, 2012). Eles também podem apresentar impacto considerável na disponibilidade de proteínas no rúmen, e, conseqüentemente, na eficiência alimentar. Alguns estudos mostram que existem associações entre as populações de fagos no rúmen e a nutrição do animal, pois bactérias ruminais passam por fases de lise espontânea devido a presença de populações de fagos líticos, reduzindo, assim, a eficiência do ruminante em converter os alimentos ingeridos em energia (Swain *et al.*, 1996).

De acordo com Swain *et al.* (1996), em ovinos alimentados uma vez por dia, a população total de fagos oscilou, caindo para seus níveis mais baixos, aproximadamente, duas horas após a alimentação, seguido por um aumento contínuo, atingindo seus níveis mais altos oito a dez horas após a alimentação. A partir deste ponto, os números de fagos caíram a um nível bastante estável, que foi mantido através do restante do ciclo. Os autores também observaram que os animais alimentados continuamente apresentaram menos variação em suas populações de fagos, demonstrando que pode ser possível manipular a dieta animal para reduzir o nível de lise bacteriana induzida por fago.

De maneira geral, os vírus selecionam naturalmente os microrganismos que são resistentes a fagos e facilitam a transferência horizontal de genes (*Horizontal Gene Transfer* - HGT), ou seja, a transferência de material genético de um organismo para outro que não é a sua prole. A HGT é um fenômeno comum e generalizado nas comunidades microbianas e contribui para a evolução dos microrganismos nesses ecossistemas (Garcia-Vallve *et al.*, 2000).

A transferência de genes das glicosil hidrolases (GH) entre bactérias e fungos no rúmen também já foi documentada por Garcia-Vallve *et al.* (2000). Esses autores estudaram a homologia de sequências de genes das GH de fungos e da bactéria *Fibrobacter succinogenes* e observaram que, por semelhança de genes, as GHs dos fungos são de origem bacteriana e foram adquiridas por eventos de transferência horizontal de genes. Ricard *et al.* (2006), demonstraram que, no caso dos protozoários ciliados, a transferência horizontal de genes tem um papel importante na adaptação destes protozoários ao ambiente ruminal rico em carboidratos, transferindo genes que codificam enzimas degradadoras de polissacarídeos da parede celular das plantas.

Diante de evidências de HGT no ecossistema ruminal, acredita-se que esse mecanismo também ocorra envolvendo os bacteriófagos, mas ainda não foi investigado. Estudos de comparação de sequências de genomas microbianos individuais do rúmen e de metagenomas microbianos com o viroma ruminal (população total de bacteriófagos e vírus) poderão fornecer evidências diretas para o compartilhamento de informações genéticas entre o microbioma e o viroma, apoiando a ocorrência de HGT entre essas comunidades (Miller *et al.*, 2012).

Análise metagenômica de vírus sugere novos padrões de evolução, alterações nos padrões existentes na composição do ecossistema viral e revela novos grupos de vírus, além de agentes semelhantes a vírus. A principal finalidade da metagenômica viral é o estudo da totalidade de partículas *virus-like* isoladas, a partir de uma amostra ambiental, seguindo, principalmente, os protocolos desenvolvidos para a purificação de partículas de fagos de DNA (Kristensen *et al.*, 2010). Isso pode explicar, em parte, o fato das análises dos vírus do líquido ruminal serem limitadas a bacteriófagos, não havendo relato da presença de outros tipos virais nesse ambiente.

Como é o caso de outras populações, a abundância de bacteriófagos também é influenciada por fatores externos, o que significa que eles também podem ser controlados por diferentes estratégias. O alto número de bacteriófagos no rúmen sugere que eles podem ter uma função importante no equilíbrio do sistema ruminal. Além disso, estudos que envolvam a identificação de vírus que infectam também protozoários, fungos e arqueias presentes no rúmen e os efeitos que estes microrganismos provocam no sistema no qual eles habitam são de extrema importância para se conhecer o real papel do viroma ruminal (Souza, 2015).

## Estratégias genômicas e metagenômicas para analisar a microbiota ruminal

### Abordagens dependentes de cultivo

Até recentemente, o conhecimento da microbiologia ruminal era obtido, principalmente, por meio de técnicas clássicas que se baseiam em cultura, como isolamento, enumeração e caracterização nutricional. Entretanto, métodos tradicionais utilizados para o crescimento de microrganismos em condições laboratoriais são demorados e, muitas vezes, ineficientes.

A principal condição para o cultivo de qualquer microrganismo é fornecer um ambiente nutritivo isolado para que ocorra o crescimento desejado do ser vivo de interesse. Entretanto, o trato gastrointestinal de ruminantes possui uma grande variedade de condições fisiológicas, dificultando, assim, a replicação de sistemas ideais para o crescimento e manutenção de microrganismos. Embora microrganismos ruminais específicos possam crescer e ser caracterizados, Krause *et al.* (2013) estimaram que apenas 20% da microbiota ruminal pode ser cultivada usando técnicas padrão. Mais recentemente, McCabe *et al.* (2015) sugeriram que microrganismos cultiváveis do rúmen representam menos de 1% do total de espécies microbianas.

As técnicas dependentes de cultivo necessitam de várias condições de cultura seletiva e de enriquecimento para replicar o ambiente natural de vida dos microrganismos. A cultura de anaeróbios é bastante difícil devido à necessi-

dade de excluir o gás oxigênio do meio, ao lento crescimento desses seres e à complexidade de outros requisitos de crescimento (Rufener *et al.*, 1962).

No caso do conteúdo ruminal, o uso da fase sólida pode causar muitos problemas, pois muitos microrganismos aderem ao material particulado da fonte de alimentação e, portanto, são difíceis de separar. Uma solução de metilcelulose pode ser usada para facilitar a separação de bactérias das partículas sólidas com uma determinada eficiência (Ranilla & Carro, 2003). Contudo, como afirmado por Whitehouse *et al.* (1994), um protocolo ideal para dissociar microrganismos ruminais de material particulado requer, sem dúvida, uma combinação de métodos físicos e químicos para interromper a variedade de mecanismos de aderência utilizada por eles.

Os métodos tradicionais de classificação de bactérias ruminais foram baseados nos métodos padrão de identificação bacteriana, como morfologia e coloração de Gram. Os requisitos nutricionais e os produtos finais da fermentação também foram utilizados como meio de classificação. Hungate (1966), desenvolveu um método que utilizava tubos para cultivar e isolar espécies anaeróbicas em vez de placas de ágar convencionais. Esse método consistia em distribuir o meio de ágar em uma fina camada sobre a superfície interna de um tubo de ensaio, que era então lavado com um gás livre de oxigênio. Desta forma, o cultivo em tubo não demandava nenhuma incubação específica e poderia ser examinado sem precauções com a atmosfera.

Em um estudo baseado em cultura de populações microbianas realizado por Hungate (1966), determinou-se que a população bacteriana do rúmen é composta, principalmente, por bactérias gram-negativas quando os animais são alimentados com dietas de alta forragem, e por maior quantidade de bactérias gram-positivas, como *Lactobacillus*, quando os animais são alimentados com dietas ricas em grãos. Com estes e outros trabalhos de pesquisa, o cientista Hungate treinou a primeira geração de microbiologistas de rúmen da Nova Zelândia nas décadas de 1960 e 1970.

A evolução desta jornada culminou em 2012 com a elaboração do projeto *Hungate1000* (<http://www.rmgnetwork.org/hungate1000.html>). Este projeto tem o objetivo de produzir um conjunto de sequências genômicas de referências a partir de bactérias e arqueias ruminais cultivadas, juntamente com culturas representativas de fungos anaeróbicos e protozoários ciliados. Os dados

gerados permitirão pesquisas baseadas no genoma, destinadas a entender a função ruminal, a eficiência da conversão alimentar, a metanogênese e a degradação da parede celular da planta. Além disso, ampliará o conhecimento existente sobre a diversidade filogenética microbiana do rúmen por meio do sequenciamento do genoma de novos microrganismos (Creevey *et al.*, 2014).

Para guiar os esforços de isolamento e seleção de bactérias da microbiota ruminal para sequenciamento através do *Hungate1000*, Creevey *et al.* (2014), realizaram uma meta-análise de estudos disponíveis e comparáveis em bancos de dados com base no gene que codifica o RNA ribossomal 16S (rRNA 16S) de rúmen sobrepostos com dados representativos cultivados. Isso foi feito não apenas para avaliar a diversidade presente e identificar os táxons cultivados que permanecem não representados nas coleções de genomas de referência, mas também para identificar os táxons que exigem maior esforço de cultivo.

De acordo com Seshadri *et al.* (2018), atualmente, essa lista resultante de táxons cultivados está sendo usada pela equipe do *Hungate1000* para sequenciamento de organismos previamente não encontrados em associação com ruminantes. Os autores esperam que esta lista de táxons sirva como recurso para a comunidade de microbiologia ruminal interessada no isolamento de novos membros do microbioma.

No início do projeto *Hungate1000*, genomas de referência estavam disponíveis para apenas 14 bactérias e um metanógeno, de modo que a diversidade genômica ruminal era amplamente inexplorada. Os organismos analisados foram então escolhidos para tornar a cobertura dos microrganismos ruminais cultiváveis o mais abrangente possível. A metodologia utilizada foi o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA por meio do DNA extraído diretamente das cepas analisadas. Enquanto vários isolados foram sequenciados de alguns gêneros que degradam polissacarídeos (*Butyrivibrio*, *Prevotella* e *Ruminococcus*), muitas espécies foram representadas por apenas um ou alguns isolados. Assim, 410 genomas de referência foram sequenciados e analisados em combinação com 91 genomas publicamente disponíveis (Seshadri *et al.*, 2018).

Seshadri *et al.* (2018) se referem a esses 501 genomas como o Catálogo do Genoma Hungate, que inclui análises genômicas de 480 culturas bacterianas e 21 culturas de arqueias, representando quase todas as espécies de

rúmen cultivadas que foram caracterizadas taxonomicamente, bem como representantes de várias novas espécies e gêneros. Membros de nove filos, 48 famílias e 82 gêneros estão presentes nessa Coleção, que abrange 75% dos gêneros relatados no rúmen e permite a atribuição de microrganismos individuais às principais vias metabólicas envolvidas na função ruminal. As cepas da Coleção Hungate, permitirão uma melhor compreensão do fluxo de carbono no rúmen, incluindo a quebra da lignocelulose, através do metabolismo de substratos nos ácidos graxos de cadeia curta (*Short-chain fatty acid* – SCFAs) e produtos finais da fermentação, até a etapa final da formação de CH<sub>4</sub>. Essas culturas estão disponíveis para pesquisadores e os autores preveem que organismos adicionais terão suas sequências genômicas incluídas à medida que mais microrganismos ruminais puderem ser cultivados.

Estudando-se apenas os microrganismos cultivados de um ecossistema podem-se perder conhecimentos sobre as interações biológicas essenciais nos relacionamentos ecológicos. Não é surpreendente que poucas observações importantes, relacionadas com ecologia microbiana, antecederam as técnicas moleculares, visto que, antes destas terem sido desenvolvidas, as informações a respeito das comunidades microbianas eram coletadas diretamente do ecossistema ou dos microrganismos isolados (Atlas & Bartha, 1998).

## **Abordagens genômicas independentes de cultivo**

Mesmo que as técnicas baseadas em cultura sejam bem-sucedidas no isolamento de representantes-chave de bactérias, arqueias e fungos ruminais, elas não são adequadas para caracterizar a diversidade microbiana geral, pois, de acordo com McCabe *et al.* (2015), aproximadamente 99% das espécies que são encontradas no rúmen ainda não são cultiváveis. No entanto, nas últimas décadas, com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, sequenciamento Sanger, sequenciamento de alto desempenho ou de nova geração (*New Generation Sequencing* – NGS) e de ferramentas de bioinformática houve um aumento considerável no conhecimento da diversidade microbiana de diferentes ecossistemas (Matthews *et al.*, 2019).

Populações microbianas de ocorrência natural que nunca foram cultivadas certamente contêm riquezas bioquímicas e de diversidade filogenética desconhecidas. Até o surgimento das tecnologias de NGS, que possibilitaram o sequenciamento de genomas completos, os estudos genômicos baseavam-se essencialmente no sequenciamento de genes “marcadores” cujas sequências apresentam elevada variabilidade nucleotídica entre diferentes grupos taxonômicos, mas que se mantém essencialmente constante dentro de uma mesma espécie. O reconhecimento das posições nucleotídicas variantes pode ser usado para a identificação dos principais grupos taxonômicos presentes numa amostra ambiental (Vieira, 2017).

Uma estratégia para explorar a diversidade microbiana é a filogenia molecular, usando os marcadores macromoleculares apropriados. Devido aos requisitos biológicos universais para a realização de síntese proteica, os elementos que fazem parte do aparelho de tradução (RNAs, ribossomos, aminoácidos e enzimas específicas) parecem ser os mais adequados para o desenvolvimento de análises filogenéticas amplas (Pace *et al.*, 1986). Essas análises, geralmente, se baseiam em sequências dos genes do RNA ribossomal (rRNA) obtidas por clonagem e sequenciamento, usando DNA purificado a partir de amostras naturais ou, como na maioria dos estudos, após amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) (Hugenholtz *et al.*, 1998).

O RNA ribossomal faz parte da constituição dos ribossomos, compondo suas unidades e subunidades em conjunto com diversas proteínas. Nos ribossomos encontra-se, aproximadamente, 80% de todo o RNA contido na célula e neles é que são montadas as proteínas. Nos organismos procariontes as classes de rRNA são chamadas de 5S, 16S e 23S e nos eucariontes de 5S, 5,8S, 18S e 28S, sendo essa nomenclatura determinada em função da densidade dessas moléculas em gradiente de sedimentação em sucrose (Pace *et al.*, 1986).

Em se tratando de diversidade e filogenia de procariotos, a identificação molecular pelo sequenciamento genômico do rRNA 16S tem sido a abordagem mais utilizada para identificação e classificação de bactérias e arqueias. Esse gene é altamente conservado e foi pouco afetado por transferências gênicas horizontais, constituindo-se, por isso, em um adequado marcador filogenético e com boa discriminação dos microrganismos no nível de gênero e, em al-

guns casos, de espécie. O rRNA 16S é um dos componentes da subunidade ribossômica bacteriana 30S, enquanto os genes rRNA 23S e 5S compõem a subunidade maior 50S. Além disso, possui um tamanho de 1.650 pares de bases (pb), o que o torna mais informativo do que o gene rRNA 5S (120 pb) e menos laborioso de se trabalhar, em virtude de sua menor extensão, do que o gene rRNA 23S (3.000 pb) (Pace *et al.*, 1986). Destaca-se, ainda, que milhões de sequências do gene de rRNA 16S estão disponíveis para análises em bancos de dados (Chun *et al.*, 2007).

Desde que o sequenciamento do gene 16S rRNA foi usado pela primeira vez para estudar o ecossistema microbiano do rúmen, uma ampla cobertura de espécies bacterianas de baixa abundância permitiu a análise de comunidades microbianas raras. Este sequenciamento também mostrou que *Prevotella*, *Butyrivibrio* e *Ruminococcus* são as bactérias mais dominantes no rúmen e que a estrutura da comunidade é afetada por mudanças na dieta do hospedeiro. Em particular, foi demonstrado que a complexidade da dieta favorece o aumento da diversidade microbiana (Matthews *et al.*, 2019).

Segundo McSweeney *et al.* (2009), várias técnicas moleculares foram desenvolvidas para monitorar a abundância e a diversidade de diferentes gêneros e espécies de microrganismos ruminais. No caso de eucariotos, o uso de sequências de rRNA 18S para comparar protozoários ou fungos é de uso limitado devido à natureza altamente conservada das sequências de rRNA 18S. Como alternativa, a região espaçadora interna transcrita (*Internal Transcribed Spacer* – ITS) dos genes de rRNA tem sido usada para estudar ecologia e diversidade genética.

Com essas abordagens de sequenciamento genômico, podem surgir problemas relacionados à afiliação de sequências e levar à interpretação incorreta dos dados. De fato, diferentes afiliações de sequência podem ser obtidas de acordo com vários *pipelines* relacionados a bancos de dados de sequências de composição e qualidade diferentes. Além disso, a maioria das tecnologias de sequenciamento genômico fornece informações no nível de filo, ordem ou família, algumas atingem o nível de gênero, mas, ainda, não é possível ter uma descrição no nível da espécie. Como existe uma ampla diversidade funcional, mesmo no nível de gênero, a interpretação biológica dos dados pode ficar limitada (Matthews *et al.*, 2019).

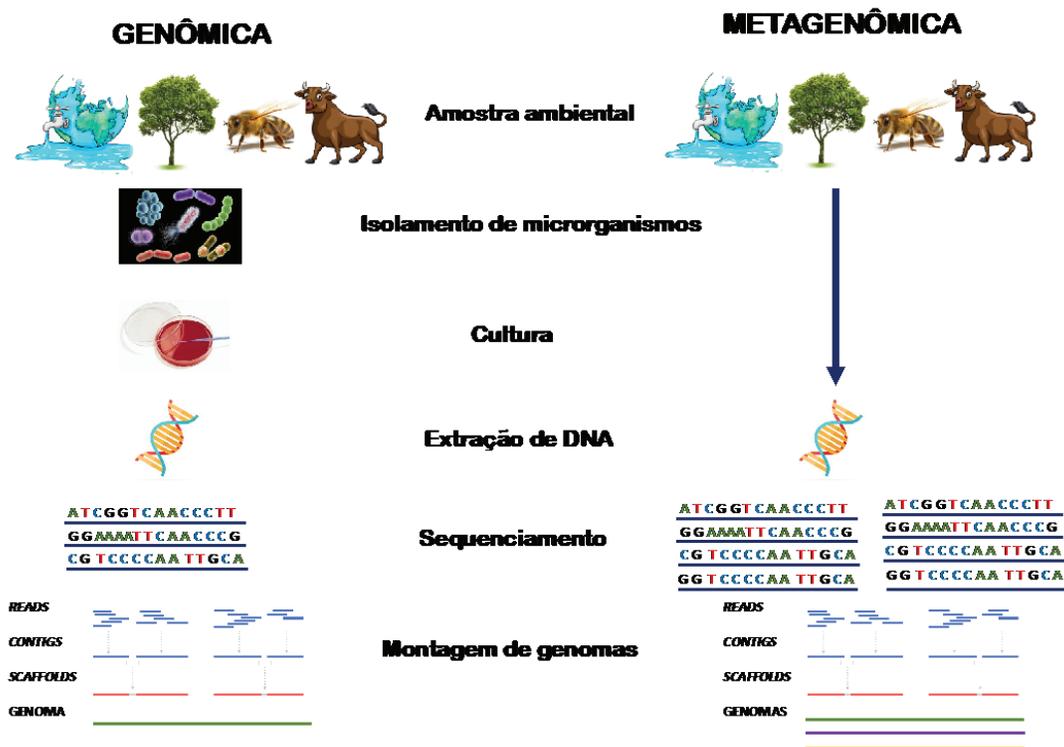
## Abordagens metagenômicas

Metagenômica designa o estudo de fragmentos de DNA que podem ser obtidos diretamente de uma amostra ambiental, sendo que neste caso, o termo ambiental não se refere somente a um ambiente natural como solo ou água de um rio, mas também inclui as superfícies externas ou as cavidades internas do corpo humano ou de outros animais. O termo foi cunhado por Handelsman *et al.* (1998), trabalhando com clonagem dos genomas existentes na microbiota do solo.

Desde então, a metagenômica tem adquirido relevância crescente na literatura científica, especificamente em consequência da evolução observada nas tecnologias de sequenciamento de alto desempenho (NGS). Estas tecnologias transformaram as pesquisas relacionadas aos ecossistemas microbianos complexos, conduzindo à uma completa mudança de paradigma na abordagem envolvida na identificação de microrganismos e nas limitações associadas a estudos dependentes de cultivo.

O principal aspecto que diferencia o sequenciamento genômico do metagenômico é que no genômico há necessidade do isolamento dos microrganismos e do crescimento destes em condições laboratoriais de cultura, antes de se efetuar o sequenciamento de DNA. Enquanto no metagenômico apenas a análise das sequências de DNA, extraídas diretamente de uma amostra ambiental, fornece informação biológica relevante para a maior parte dos organismos (Figura 3). Compreender a estrutura de comunidades microbianas é uma parte importante no reconhecimento de como os microrganismos são afetados pelo ambiente em que vivem e como, por sua vez, afetam o organismo hospedeiro (Matthews *et al.*, 2019).

Desde 2005, ano em que foi lançado o primeiro sequenciador de nova geração da empresa 454 (mais tarde adquirida pela Roche), vários fabricantes têm lançado plataformas de sequenciamento massivo capazes de produzir, em cada ensaio, desde alguns megabases (Mb) de DNA (por exemplo, Ion Torrent ou Roche 454) até um ou mais terabases de DNA (no caso das plataformas Illumina HiSeq ou NovaSeq). Assim, o potencial das novas plataformas de sequenciamento abriu oportunidades, até então inexistentes, para o sequenciamento de comunidades de organismos com grande profundidade (Vieira, 2017).



**Figura 3.** Esquema simplificado das principais diferenças entre o sequenciamento genômico e o sequenciamento metagenômico. Adaptado de Vieira, 2017.

Com a exceção das chamadas plataformas de sequenciamento de terceira geração, como as da *Pacific Biosciences* ou da *Oxford Nanopore Technologies*, que permitem sequenciar moléculas de DNA de grande comprimento e não requerem amplificação dos fragmentos de DNA pré-sequenciamento, a maioria das plataformas atuais requer que a amostra de DNA seja inicialmente cortada em fragmentos de 100 a 1000 pb de comprimento, por meio de técnicas de sonicação ou de digestão enzimática, ou amplificada por PCR usando oligonucleotídeos específicos para a(s) região(ões) genômica(s) de interesse. Os fragmentos produzidos são então ligados a sequências adaptadoras específicas para cada tipo de plataforma de sequenciamento (Vieira, 2017).

A abordagem metodológica mais abrangente e robusta utilizada em estudos de metagenômica é comumente chamada por sequenciamento *shotgun* do genoma inteiro (*Whole Genome Shotgun Sequencing* - WGS). Quando comparada com as análises baseadas no 16S rRNA, oferece a vantagem da identificação da taxonomia em nível de espécie e a estimativa de atividades de vias metabólicas a partir de amostras ambientais. Esta abordagem foi aplicada pela primeira vez ao rúmen para descobrir novas enzimas degradadoras de biomassa vegetal em 2011 por Hess e colaboradores. Posteriormente, a metagenômica foi usada para estudar muitos aspectos da microbiologia ruminal, incluindo emissões de metano em bovinos (Wallace *et al.*, 2015) e ovinos (Shi *et al.*, 2014), biomarcadores para prever a metanogênese ruminal (Auffret *et al.*, 2017b), o efeito da dieta, da taxa de conversão alimentar e da genética do hospedeiro na composição do microbioma ruminal (Roehe *et al.*, 2016; Auffret *et al.*, 2017a), aquisição de nutrientes (Mayorga *et al.*, 2016; Rubino *et al.*, 2017), e investigar o impacto dos aditivos para rações (Thomas *et al.*, 2017) na abundância de genes de resistência antimicrobiana.

O sequenciamento *shotgun* consiste em fragmentar todas as moléculas de DNA extraídas de um determinado ambiente em pequenos fragmentos e sequenciá-los aleatoriamente, sem qualquer tipo de seleção. Desta forma, é possível identificar o conteúdo amostral, a função de cada microrganismo e estabelecer hipóteses sobre as interações fisiológicas entre os diferentes membros da comunidade. Este método é útil para avaliar a diversidade microbiana total, detectando a abundância de microrganismos em um determinado ambiente, até mesmo dos membros de baixa abundância, ou seja, das espécies que estão pouco ativas ou inativas (Kunin *et al.*, 2008). Além disso, os benefícios da metagenômica incluem a capacidade de montar genomas completos ou quase completos (*Assembly binning*); prever genes; mapear enzimas e vias metabólicas; descobrir novas enzimas e novas vias; e, quantificar a abundância de elementos genômicos funcionais entre amostras de interesse (Huws *et al.*, 2018).

Após o sequenciamento de uma amostra metagenômica, a principal tarefa é analisar, por meio de ferramentas de bioinformática, a grande quantidade de dados gerados. De acordo com Dudhagara *et al.* (2015), várias ferramentas *offline* estão disponíveis para classificar leituras metagenômicas contra conjuntos de dados de referência conhecidos. Além disso, vários fluxos de

trabalho *online* podem oferecer uma exploração aprofundada desses dados sem a necessidade de computadores altamente configurados. Seguem abaixo alguns exemplos citados por estes autores:

1. Pacote de *software Metagenomics Rapid Annotation* (MG-RAST - <https://metagenomics.anl.gov/>). Os dados enviados para o MG-RAST são processados por um fluxo de trabalho de várias etapas, incluindo controle de qualidade, anotação automatizada e análise de amostras *shotgun* de procariontos, bem como amostras direcionadas. A anotação automatizada é feita usando vários conjuntos de dados de referência e o servidor suporta uma variedade de análises conduzidas pelo usuário, incluindo análises filogenéticas, funcionais, metabólicas e comparativas de dois ou mais metagenomas. Este *software* também oferece a capacidade de gerar dados em vários formulários de cluster que podem ser baixados em formato de texto simples ou exportar dados como arquivos FASTA e QIIME. Usuários registrados têm o direito de publicar seus dados abertamente ou manter dados privados e podem compartilhar dados entre vários usuários com confidencialidade protegida. Dessa forma, o MG-RAST oferece grande flexibilidade na análise, privacidade e compartilhamento de dados.
2. *Software Integrated Microbial Genomes and Metagenomes* (IMG/M - <http://img.jgi.doe.gov/m>) é um sistema de armazenamento, gerenciamento e análise de dados para metagenomas. O IMG/M permite análises combinadas com todos os rascunhos disponíveis e genomas, plasmídeos e vírus disponíveis no domínio público. Os usuários registrados podem enviar dados *online* e manter a privacidade dos dados por dois anos antes que sejam transferidos para o domínio público.
3. METAVIR (<http://metavir-meb.univ-bpclermont.fr/>) é um servidor *online* disponível gratuitamente e projetado exclusivamente para anotar sequências metagenômicas virais brutas e reunidas. Esse servidor é útil para explorar a diversidade viral a partir de metagenomas e realizar análises comparativas através de filogenias pré-computadas de genes marcadores virais, curvas de rarefação e análises multivariadas construídas em *kde* assinaturas e comparações baseadas em BLAST.
4. *Metagenomics Reports* (METAREP - <http://jcv.org/metarep/>) é um navegador aberto bem conhecido para anotação, análise e comparação de lei-

turas curtas ou montagens de dados metagenômico. Para carregar dados de entrada, são necessários apenas conhecimentos básicos de programação e a habilidade de operar a versão independente do METAREP. Os usuários podem vincular, simultaneamente, um mínimo de dois conjuntos de dados em vários níveis funcionais e taxonômicos para análises comparativas através da aplicação de vários métodos de *cluster*. Para cada um desses métodos de *cluster*, o METAREP fornece uma opção de *download* para exportar arquivos delimitados por tabulações para análise *downstream*.

5. MyTaxa (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/mytaxa/>) é a uma plataforma para atribuição taxonômica de sequências metagenômicas com alta precisão. Possui estrutura de bioinformática baseada em homologia para classificar dados metagenômicos e genômicos com precisão extraordinária. MyTaxa emprega todos os genes presentes em uma sequência não identificada como classificadores, ponderando cada gene com base em seu poder de classificação pré-calculado em um nível taxonômico especificado e na frequência de transferência horizontal de genes.

Em 2003, a primeira sequência do genoma completo da bactéria ruminal *Wolinella succinogens* foi montada (Baar *et al.*, 2003) e, depois disso, vários estudos foram conduzidos para compreender e revelar as sequências genômicas completas de microrganismos ruminais. Recentemente, Stewart *et al.* (2018) publicaram 913 esboços de genomas de bactérias e arqueias ruminais que foram obtidos do rúmen de 43 bovinos e montados por metagenoma. Neste trabalho, os autores cunharam a frase “genomas do rúmen não cultivados” ou RUGs (*Rumen Uncultured Genomes*), para se referir a estes genomas, que, em sua maioria, representam cepas e espécies não sequenciadas anteriormente. Dos 913 RUGs, apenas sete foram resolvidos em nível de espécie, sendo o RUG346 uma cepa de *Bacillus licheniformis*, o RUG287 uma cepa de *Kandleria vitulina*, o RUG405 uma cepa de *Acidaminococcus fermentans*, o RUG618 uma cepa de *Megasphaera* sp., o RUG133 uma cepa de *Bifidobacterium merycicum* e o RUG664 uma cepa de *Streptococcus equinus*.

Segundo Stewart *et al.* (2018), *Bacillus licheniformis* codifica enzimas hemielulolíticas e celulolíticas, bem como serina proteases e outras enzimas importantes. *Kandleria vitulina* é um organismo pouco estudado, embora a

família *Erysiopelotrichaceae*, da qual faz parte, tenha sido positivamente correlacionada com produção de leite e negativamente com emissões de  $\text{CH}_4$ . *Acidaminococcus fermentans* é um diplococo Gram-negativo que utiliza citrato como fonte de energia, produzindo hidrogênio e sulfureto de hidrogênio, o que pode explicar sua associação com a produção de  $\text{CH}_4$  em bovinos. *Acidaminococcus fermentans* diminui o acúmulo de tricarbilato, que é um produto tóxico final da fermentação ruminal. *Megasphaera* spp. foi encontrada em bovinos, ovinos e outros ruminantes e a suplementação da dieta de vacas leiteiras com *M. elsdenii* apresenta benefícios potenciais para o balanço energético e a produtividade animal. *Bifidobacterium merycicum* demonstrou fermentar amido com a produção de ácidos acético e láctico e foi relacionado com acidose. *S. equinus* foi isolada primeiro em cavalos, no entanto, a *S. bovis*, relacionada à *S. equinus*, é considerada uma das principais bactérias produtoras de ácido láctico no rúmen, estando também associada à acidose. Finalmente, o RUG422 é uma cepa de *Thermobifida fusca*, um provável contaminante do solo durante o pastejo.

Recentemente, esses mesmos autores descreveram a montagem de 4.941 genomas (rascunhos e genomas quase completos) de bactérias e arqueias ruminais de 282 bovinos, incluindo 4.056 genomas que não estavam presentes no conjunto de dados anterior (Stewart *et al.*, 2018) e 312 genomas atualizados de qualidade superior. Este novo conjunto de dados RUG contém milhares de novos genomas microbianos que codificam milhões de novas proteínas que diferem significativamente dos conjuntos de dados genômicos e metagenômicos do rúmen publicados anteriormente, formando um banco de dados de referência para estudos futuros sobre a estrutura e função do microbioma ruminal. Os autores também apresentaram uma montagem metagenômica de dados de sequenciamento Nanopore de uma das amostras. Este conjunto contém pelo menos três cromossomos bacterianos inteiros como contigs únicos e representa o conjunto metagenômico mais contínuo do rúmen obtido até o momento (Stewart *et al.*, 2019).

Atualmente, o NCBI-Assembly (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly>) abriga 889 sequências genômicas inteiras ou sequências de montagem baseadas em clones de microrganismos ruminais e metagenoma ruminal. Destes, 859 são genomas bacterianos e 29 são genomas de arqueias, sendo que a maioria dos genomas foi submetida pelo Instituto Roslin (886 genomas), dois

genomas vieram da Universidade de Viena e um genoma do DOE - Joint Genome Institute. Entre os 889 microrganismos ruminais sequenciados, apenas nove cepas bacterianas são cultivadas (Kameshwar *et al.*, 2019).

A análise comparativa de genomas anotados pode revelar, principalmente, informações significativas sobre a perda evolutiva de genes e amplo envolvimento desses genes (ou) proteínas em vários mecanismos moleculares. Anotações biológicas como InterPro, GO (*Gene Ontology*), KOG (*EuKaryotic Orthologous Groups*), COG (*Clusters of Orthologous Groups*), CAZy (*Carbohydrate-Active enZymes*), SM (*Secondary Metabolites*), KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e MEROPS (*Database of proteolytic enzymes*) ajudam a comparar os dados genômicos (Kameshwar *et al.*, 2019).

Segundo Dudhagara *et al.* (2015), para decodificar ecossistemas de maneira abrangente, novas ferramentas, estruturas e hipóteses ainda precisam ser desenvolvidas e utilizadas para análise, armazenamento, visualização e compartilhamento de conjunto de dados. Portanto, uma plataforma única não é adequada para a realização de análises metagenômicas holísticas.

## Metagenômica e nutrição animal

O entendimento da riqueza microbiana e dos processos de fermentação dos carboidratos fibrosos e solúveis do rúmen é extremamente importante para o desenvolvimento de abordagens integradas que maximizem a taxa de decomposição dos alimentos ingeridos, melhorem a absorção de nutrientes e minerais pelos ruminantes e mitiguem a emissão de GEE, aumentando, assim, a produtividade dos rebanhos e reduzindo os impactos ambientais.

### Microbioma ruminal e eficiência alimentar

A dieta é, sem dúvidas, o fator que mais influencia o microbioma do rúmen e o processo de fermentação ruminal. Ainda assim, pouco se sabe sobre a associação entre população microbiana ruminal e a eficiência com que a ração é convertida em energia para a manutenção e crescimento do hospedeiro. A microbiota ruminal é altamente responsiva a mudanças na dieta, idade, ge-

nética, uso de antibióticos, aditivos e saúde do animal hospedeiro e varia de acordo com a localização geográfica, estação do ano e regime alimentar (Stewart *et al.*, 1997). Um estudo de comparação global do microbioma ruminal de 742 animais de 32 espécies concluiu que, embora um núcleo comum de bactérias e arqueias seja dominante em quase todas as amostras, as diferenças nas composições da comunidade microbiana foram predominantemente atribuíveis à dieta (Henderson *et al.*, 2015).

Alguns estudos revelaram associações entre os microrganismos ruminais com eficiência alimentar em bovinos de corte (Guan *et al.*, 2008; Myer *et al.*, 2015; Shabat *et al.*, 2016; Li & Guan, 2017) e leite (Jewell *et al.*, 2015), relatando diferenças na abundância relativa de várias espécies microbianas entre indivíduos eficientes e ineficientes. Como uma medida de eficiência alimentar em bovinos foi proposto o consumo alimentar residual (CAR), que é definido como a diferença entre o consumo real de um animal e suas necessidades alimentares esperadas para manutenção e crescimento (Archer *et al.*, 1999; Basarab *et al.*, 2003). O CAR é moderadamente hereditário e independente do crescimento e do tamanho corporal. Os animais mais eficientes, que são bovinos com baixo CAR, devem ter consumo de ração reduzido, mas desempenho semelhante aos animais ineficientes que apresentam alto CAR. Até o momento, a relação entre a composição da microbiota ruminal, os parâmetros de fermentação microbiana e a eficiência alimentar em bovinos foi pouco estudada e relatada.

Em 2008, foi publicado por Guan e colaboradores o primeiro artigo científico que observou possíveis associações entre a microbiota ruminal detectável e seus parâmetros de fermentação com a eficiência alimentar de bovinos nas raças Angus, Charolês e em animais cruzados. Os autores analisaram a digesta ruminal por meio de eletroforese em gel de gradiente desnaturante de PCR independente de cultura (PCR-DGGE) e observaram que os perfis gerados a partir de novilhos eficientes agruparam-se e foram claramente separados daqueles obtidos de novilhos ineficientes, indicando que grupos bacterianos específicos podem habitar apenas o rúmen de novilhos eficientes. Correlações entre as concentrações de ácidos graxos voláteis (AGVs) e as características de eficiência alimentar também foram observadas e concentrações significativamente maiores de butirato ( $P < 0,001$ ) e valerato ( $P = 0,006$ ) foram detectadas nos novilhos eficientes. Além disso, os perfis bac-

terianos foram melhor agrupados dentro de um determinado grupo genético, sugerindo que a genética do hospedeiro pode desempenhar um papel importante na estrutura microbiana ruminal.

A evidência da influência do hospedeiro no microbioma ruminal foi postulada pela primeira vez por Weimer *et al.* (2010) que descobriram que após a troca quase total do conteúdo ruminal entre vacas os indivíduos restauraram sua composição bacteriana de volta às condições existentes no período pré-troca, retornando também os valores do pH ruminal e da concentração de AGVs. Da mesma forma, em outra troca de conteúdo ruminal quase total entre vacas Holandesas de alta e baixa eficiência, Weimer *et al.* (2017) demonstraram a capacidade do hospedeiro de retornar a microbiota ruminal ao estado original, ao mesmo tempo em que associavam o microbioma ruminal à eficiência da produção de leite.

Devido ao pequeno número de animais amostrados e à limitação da amostragem ruminal, os dados obtidos por Guan *et al.*, (2008) podem representar apenas uma diversidade bacteriana parcial no rúmen dos animais testados. Amostras ruminais de um grande número de novilhos e/ou do mesmo novilho em diferentes estágios de crescimento, diferentes momentos de alimentação e diferentes seções da localização ruminal devem ser realizados. A análise PCR-DGGE também pode ter sido influenciada pelos métodos de extração de DNA, amplificação por PCR e limitação das informações de sequência existentes no banco de dados.

Da mesma forma que Guan *et al.*, (2008), outros trabalhos revelaram que os perfis bacterianos no rúmen de bovinos eficientes diferiam daqueles ineficientes, e as abundâncias dos gêneros bacterianos *Butyrivibrio*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Ruminococcus* e *Succinivibrio* foram associadas com características de eficiência alimentar, incluindo consumo alimentar residual (CAR), consumo de matéria seca (CMS), ganho médio diário (GMD) e taxa de conversão alimentar em novilhos de corte (Myer *et al.*, 2015) e novilhas (Carberry *et al.*, 2012). No entanto, esses estudos focaram apenas na composição da comunidade microbiana ruminal e não forneceram informações sobre as funções metabólicas microbianas.

Shabat *et al.* (2016) avaliaram a eficiência alimentar em 146 vacas leiteiras e realizaram análises da composição taxonômica, conteúdo gênico, atividade

microbiana e composição metabólica nos microbiomas ruminais dos 78 animais mais extremos, sendo 40 eficientes e 38 ineficientes. Amostras de DNA metagenômico dos microbiomas desses animais foram submetidas ao sequenciamento do gene 16S rRNA e sequenciamento *shotgun* do genoma completo. Para obter um metagenoma mais abrangente, foi criada uma montagem conjunta de todos os dados das 78 vacas, compensando, assim, a menor profundidade de sequenciamento de cada amostra individual e qualquer viés causado pela montagem de amostras individuais. Como resultado, o metagenoma apresentou 96,72% de sequências bacterianas, 1,73% de sequências de arqueias e 1,34% de sequências eucarióticas.

Uma comparação da riqueza dos microbiomas entre os animais revelou que a menor riqueza do conteúdo de genes e táxons estava intimamente ligada a uma maior eficiência alimentar. Nos microbiomas das vacas eficientes, redes de vias metabólicas mais simples resultam em maior domínio de componentes funcionais específicos, o que leva a maiores concentrações de comunidades que são relevantes para o hospedeiro. Dessa forma, os autores concluíram que os microbiomas eficientes são menos complexos, mas mais especializados para atender às necessidades de energia do hospedeiro. As características funcionais de um pequeno número de espécies podem ter um grande impacto na estrutura da microbiota e no funcionamento do ecossistema ruminal, que, por sua vez, pode alterar a produtividade do hospedeiro. A composição dos táxons e o conteúdo dos genes foram derivados de dois procedimentos diferentes de sequenciamento e análise e, portanto, a concordância entre esses resultados destaca a robustez da observação Shabat *et al.* (2016).

De acordo com Huws *et al.* (2018), os ruminantes são tradicionalmente alimentados com dietas ricas em forragem para diminuir os custos de alimentação e evitar a competição com fontes vegetais que podem ser usadas como alimento para humanos. Em particular, forragem fresca em comparação com feno de forragem promove comunidades metanogênicas e bacterianas mais simplificadas, que foram dominadas por *Bacteroidetes* e *Lactobacillus*; aumento no crescimento bacteriano e na síntese de proteína microbiana (+ 16%); síntese de proteína microbiana mais eficiente (+ 22%); e, menor recuperação metabólica de H e de produção de metano (- 35%), sugerindo uma transferência de H interespecies menos eficiente entre bactérias, protozoários e metanógenos (Belanche *et al.*, 2016).

No entanto, a maioria dos sistemas de produção intensiva de ruminantes, particularmente os sistemas de confinamento de bovinos, usa dietas com alto teor de grãos para maximizar as taxas de crescimento dos animais e a eficiência alimentar (Huws *et al.*, 2018). Como resultado, os animais alimentados com estas dietas tendem a ter menor diversidade bacteriana e fúngica e menores concentrações de microrganismos fibrolíticos, que geralmente estão associados com menor proteólise ruminal e com maior eficiência alimentar. Além disso, a dieta rica em grãos diminui o pH ruminal devido ao alto acúmulo de AGVs e lactato, as concentrações de amônia e as proporções molares de acetato e propionato; provoca distúrbios digestivos, como a acidose ruminal, e afeta a composição da comunidade metanogênica por meio de seu efeito no potencial redox ruminal (Belanche *et al.*, 2012).

Embora a metagenômica tem sido aplicada para estudar associações entre o microbioma ruminal e fenótipos do hospedeiro, como eficiência alimentar e emissão de metano, ela não permite a avaliação do real nível de expressão dos genes microbianos. Para isso, é necessário utilizar uma abordagem metatranscriptômica, que estuda os aspectos funcionais da comunidade microbiana no nível transcricional. Entretanto, até o momento, poucos estudos foram realizados para estudar as características funcionais ativas do microbioma ruminal usando metatranscriptômica.

Em 2017, Li e Guan utilizaram metatranscriptômica para caracterizar os microbiomas ruminais ativos de bovinos de corte com baixa e alta eficiência alimentar usando sequenciamento de RNA total. Foram identificados seis filos bacterianos, oito famílias de bactérias e quatro ordens de arqueias na microbiota do núcleo ativo do rúmen, sugerindo papéis essenciais na ocupação de nichos ecológicos do rúmen porque também foi relatado que habitam o rúmen de novilhas de corte (Petri *et al.*, 2013), vacas em lactação (Jami & Mizrahi, 2012) e outras espécies de ruminantes (Henderson *et al.*, 2015) de acordo com a identificação baseada em DNA. Os autores se surpreenderam com alta abundância relativa (7,6%) da família *Ruminococcaceae* (pertencente ao filo *Firmicutes*) no núcleo ativo da microbiota ruminal sob uma dieta rica em grãos a base de cevada, porque esta família tem sido considerada consistindo, principalmente, de organismos fibrolíticos. No entanto, estudos recentes relataram que membros desta família, como *Ruminococcus bromii* e outras espécies de *Ruminococcus* estão envolvidos na hidrólise do amido

(Klieve *et al.*, 2007; Klieve *et al.*, 2012), e a abundância relativa desta família no rúmen está associada à proporção de cevada grãos na dieta (Xia *et al.*, 2015). Devido à considerável diversidade genética entre os membros desta família (Klieve *et al.*, 2007), é necessário examinar os membros desta família em níveis de gênero, espécie e/ou cepa para compreender melhor as suas funções no rúmen sob diferentes condições alimentares.

Segundo Li e Guan (2017), três famílias de bactérias (*Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae* e *Veillonellaceae*) tenderam a ser mais abundantes em animais de baixa eficiência alimentar (ineficientes) ( $P < 0,10$ ), e o táxon *Methanomassiliicoccales* de arqueias tendeu a ser mais abundante em bovinos de alta eficiência alimentar (eficiente) ( $P < 0,10$ ). Além disso, 32 vias metabólicas microbianas e 12 enzimas ativas de carboidratos (CAZymes) foram diferencialmente expressas entre os dois grupos ( $P > 0,05$ ). Dentre elas, 30 vias metabólicas e 11 CAZymes foram mais abundantes no rúmen de bovinos ineficientes, enquanto duas vias metabólicas e uma CAZyme foram mais abundantes em animais eficientes. Diferentes abundâncias relativas de *Lachnospiraceae* entre os dois grupos avaliados para CAR sugere que a atividade desta família está associada à eficiência alimentar em bovinos de corte, pois alguns membros de *Lachnospiraceae* são os principais produtores de butirato, conforme relatado por Guan *et al.*, 2008. A abundância dessa família no nível do DNA também foi associada à eficiência alimentar em novilhos por Myer *et al.* (2015).

Desta forma, a maior abundância da família *Lachnospiraceae* em animais com alto CAR pode ser acompanhada por aumento no metabolismo do butirato, o que afeta a eficiência alimentar (Li & Guan, 2017). No entanto, a identificação de mais produtores de butirato em animais ineficientes está em conflito com resultados anteriores de que animais com baixo CAR tendem a ter maior concentração de butirato do que animais com alto CAR (Guan *et al.*, 2008). Tal discrepância pode ser devido às abundâncias serem identificadas em nível de família, já que esta família possui 24 gêneros e várias cepas não classificadas com diferentes nichos funcionais (Sayers *et al.*, 2011), e menos da metade de seus membros têm capacidade de produção de butirato (Meehan & Beiko, 2014). Além disso, em um trabalho anterior (Hernandez-Sanabria *et al.* 2010) não foram detectadas diferenças na concentração de butirato no fluido ruminal dos 20 animais analisados por metatranscriptômica (Li & Guan, 2017). Portanto, novos estudos em níveis taxonômicos mais profundos (gênero/espé-

cie) e/ou usando métodos baseados em cultura poderão fornecer mais informações sobre as relações existentes entre a família *Lachnospiraceae*, a produção de butirato e a eficiência alimentar em bovinos de corte.

## Microbioma ruminal e mitigação de metano

Estima-se que a produção de ruminantes seja responsável por aproximadamente 17% do metano antropogênico, um potente gás de efeito estufa, liberado anualmente na atmosfera devido à atividade de metanógenos ruminais (Patra *et al.*, 2017). O CH<sub>4</sub> liberado é um grande problema para o meio ambiente, mas também uma grande preocupação para a produção pecuária, pois cerca de 2 a 18% da energia da dieta pode ser perdida para a produção de CH<sub>4</sub> (Pedreira & Primavesi, 2011; Patra *et al.*, 2017).

Li e Guan (2017) identificaram os dois táxons *Methanomassiliicoccales* e *Methanobrevibacter ruminantium* como os metanógenos mais ativos no rúmen de novilhos alimentados com dieta de cevada. *Methanomassiliicoccales* foi mais abundante nos animais de baixo CAR e os membros desta ordem utilizam metanol e metilaminas como principais fontes de energia e carbono para produzir CH<sub>4</sub>, enquanto *Methanobrevibacter ruminantium* produz CH<sub>4</sub> utilizando CO<sub>2</sub>, formato e H<sub>2</sub> como substratos. Suas altas abundâncias sugerem que a rota de conversão do composto metílico e a rota de redução de CO<sub>2</sub> são as principais vias de metanogênese no rúmen de novilhos alimentados com dieta à base de cevada. Bovinos com alta eficiência alimentar não apenas emitem, aproximadamente, 25% menos CH<sub>4</sub>, como também excretam menos fezes quando comparados com bovinos com baixa eficiência alimentar (Hegarty *et al.*, 2007; Nkrumah *et al.*, 2006). Portanto, melhorar a eficiência da alimentação também poderá diminuir os efeitos ambientais negativos causados pela criação de bovinos de corte.

Como revisado por Sirohi *et al.* (2010), o processo de metanogênese requer sete coenzimas e oito enzimas. O CO<sub>2</sub> e o CH<sub>4</sub> são liberados por eructação na atmosfera, enquanto os ácidos graxos voláteis acetato, propionato e butirato passam pela parede do rúmen até atingir a corrente sanguínea e, finalmente, serem convertidos nos açúcares e lipídios necessários ao animal para energia e construção de tecidos. A síntese de CH<sub>4</sub> contribui para a eficiência de todo o sistema e evita o acúmulo de H<sub>2</sub> no rúmen, o que inibiria a função

normal das enzimas microbianas envolvidas na transferência de elétrons. De fato, se os ruminantes não produzissem  $\text{CH}_4$ , o pH ruminal diminuiria e a digestão das fibras vegetais não seria mais viável.

Um estudo desenvolvido por Martinez-Fernandez *et al.* (2016) examinou os efeitos do clorofórmio como composto anti-metanogênico e os efeitos da inibição da metanogênese no rúmen de novilhos alimentados com uma dieta de feno (volumoso) ou dieta de feno e concentrado, na proporção de 60:40. Os resultados mostraram que, com níveis crescentes de clorofórmio, houve um aumento no  $\text{H}_2$  expelido e a produção de  $\text{CH}_4$  diminuiu. Além disso, os animais do grupo da dieta exclusiva do feno apresentaram um redirecionamento mais eficiente do  $\text{H}_2$  para outros produtos microbianos em comparação ao grupo da dieta de feno e concentrado. Desta forma, os autores concluíram que, embora tenha havido uma redução de 30% na produção de metano, a fermentação ruminal e a degradação das fibras não foram afetadas negativamente, sendo os microrganismos capazes de se adaptar e redirecionar  $\text{H}_2$  para produzir outros produtos finais microbianos em ambas as dietas.

Segundo os autores, estudos metabólicos mostraram que houve um aumento nos níveis de aminoácidos, ácidos orgânicos e nucleicos encontrados na fase líquida do conteúdo ruminal nas duas dietas quando a metanogênese foi inibida. Isto sugere que pode haver uma maior síntese proteica microbiana sob essas condições. Com essas alterações foram observadas modificações na microbiota ruminal, com um aumento na proporção de *Bacteroidetes* e *Firmicutes* e uma diminuição em *Archaea* e *Synergistetes*. No entanto, não foram observadas alterações significativas na abundância de protozoários, fungos ou bactérias fibrolíticas. Embora se acreditasse que sem a formação de metano, a microbiota ruminal seria drasticamente afetada, este estudo mostra que o processo de metanogênese pode se adaptar às mudanças no fluxo de  $\text{H}_2$  e resultar em diferentes produtos finais sem a necessidade de gerar metano, reduzindo, assim, a emissão deste gás pelo animal (Martinez-Fernandez *et al.*, 2016).

Existem na literatura muitos relatos de tentativas de minimizar a perda de energia proveniente da alimentação como resultado da produção de  $\text{CH}_4$  em ruminantes. Alguns estudos exploraram a aplicação de compostos e produtos naturais na dieta antes do consumo pelos animais. Uma abordagem inovadora e promissora é o uso de probióticos. Os probióticos apresentam benefícios

à saúde do hospedeiro quando fornecidos em quantidades suficientes. Neste sentido, Deng *et al.* (2018) exploraram o uso de *Bacillus licheniformis* como um novo probiótico para reduzir as emissões entéricas de CH<sub>4</sub>. Os resultados mostraram que o uso desta bactéria como probiótico inibiu as emissões de CH<sub>4</sub> em ovelhas, aumentou a digestibilidade total no trato e melhorou a eficiência da utilização de nitrogênio. A explicação é que a produção ruminal de propionato compete com a metanogênese pelo H<sub>2</sub> disponível; assim, o aumento da formação de propionato está estequiometricamente associado à diminuição da produção de CH<sub>4</sub>, resultando em uma diminuição na proporção de acetato:propionato no rúmen.

De acordo com Deng *et al.* (2018) este foi o primeiro relato da mitigação das emissões de metano *in vivo* em ovinos por meio de suplementação dietética de *Bacillus*. No entanto, neste trabalho não foi investigado se a suplementação de *B. licheniformis* afeta a abundância, a diversidade ou as atividades metabólicas dos metanógenos ruminais. Assim, estudos microbiológicos *in vivo* e *in vitro* sobre atividades enzimáticas, antimicrobianas e metanogênicas e capacidade de flocculação da cultura são necessários para compreender o mecanismo de ação do *B. licheniformis* na modulação do microbioma ruminal e da metanogênese.

## Microbioma ruminal e genes de resistência antimicrobiana

Conforme já mencionado, outra questão que tem causado enorme preocupação na produção bovina é o uso de antibióticos, pois a aplicação destes nos sistemas de produção animal incentivou o aumento da abundância de genes de resistência antimicrobiana em ambientes agrícolas, sendo, portanto, uma ameaça atual para a saúde humana e animal.

Em um estudo realizado por Auffret *et al.* (2017a), foi examinada a influência da dieta no resistoma (coleção de todos os genes de resistência a antibióticos identificados em um dado metagenoma) ruminal e na abundância de genes de patogenicidade. Os animais utilizados no estudo foram bovinos de corte livres de antibióticos em duas dietas diferentes, consistindo em diferentes níveis de concentrado. Mais de 200 genes associados à resistência antimicrobiana (*Antimicrobial Resistant Gene* - ARG) foram detectados em um conjunto de 4.966 genes obtidos de dados metagenômicos. Os resultados mostraram maior diversidade e abundância desses genes em animais

alimentados com nível mais alto de concentrado do que em animais com níveis mais baixos de concentrado. Estes resultados sugerem que, não apenas a dieta afeta o ecossistema microbiano, como também tem o potencial de afetar a resistência antimicrobiana no intestino.

Também no ano de 2017, Thomas e colaboradores analisaram o microbioma do trato gastrointestinal (TGI) e o resistoma de novilhos cruzados Simental X Angus confinados que receberam na ração os antibióticos monensina e tilosina. A monensina é um ionóforo amplamente utilizado na indústria de confinamento para aumentar a produção. Este aditivo reduz o consumo médio de ração e aumenta o ganho de peso ao aumentar a produção de ácido propiônico no rúmen, resultando em maior eficiência energética. A tilosina também é um agente antimicrobiano que atua contra bactérias gram-positivas, apresentando como principal função a redução da incidência de abscessos hepáticos quando os novilhos são alimentados na fase de acabamento com uma dieta rica em carboidratos de fermentação rápida. Segundo os autores, no rúmen o uso destes aditivos antimicrobianos foi inversamente associado à diversidade e riqueza de espécies. Pesquisas anteriores também mostraram que a monensina diminuiu a diversidade bacteriana no rúmen, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Johnson *et al.*, 2009; Schären *et al.*, 2017).

Ao contrário dos resultados observados no rúmen por Thomas *et al.* (2017), a população microbiana em amostras de cólon e ceco apresentou diversidade semelhante para ambos os grupos, de tratamento e controle. Isso sugere que os aditivos antibióticos para rações tiveram efeito limitado na microbiota intestinal distal de novilhos. Os resultados obtidos estão de acordo com os dados obtidos em vacas holandesas em lactação, nos quais a monensina não alterou o nível de sequências do gene bacteriano 16S rRNA associadas à biblioteca derivada do cólon (McGarvey *et al.*, 2010). Uma razão primária pode ser que a monensina é ativamente absorvida do rúmen, metabolizada no fígado e excretada pela bile, sendo que menos de 10% da monensina não metabolizada atinge o intestino distal (Herberg *et al.*, 1978).

Os autores observaram uma menor proporção de bactérias do filo *Firmicutes* (0,20) no rúmen dos novilhos que receberam os antibióticos quando comparada com a proporção de bactérias do filo *Bacteroidetes* (0,26). Essa mudança na proporção está de acordo com a atividade da monensina e da tilosina, que inibe o crescimento de *Firmicutes* gram-positivos. A proporção observada

neste estudo foi inferior às observadas em outros estudos dietéticos, que analisaram o padrão microbiano no rúmen (Khafipour *et al.*, 2009; Fernando *et al.*, 2010). Isso pode ser devido à diferença na quantidade de concentrado fornecido aos bovinos experimentais, pois os experimentos anteriores usaram uma proporção menor de concentrados (< 80%) na dieta e, portanto, a mudança na dinâmica microbiana poderia ser menos pronunciada do que no presente estudo (Thomas *et al.*, 2017).

Em nível de gênero, *Prevotella* foi o gênero mais comum no rúmen e o segundo gênero mais abundante no ceco e cólon. Estes resultados estão de acordo com vários estudos que descreveram o *Prevotella* como o membro do filo *Bacteroidetes* mais abundante encontrado no rúmen (Fernando *et al.*, 2010; Jami & Mizrahi, 2012; Henderson *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2015). Além disso, a proporção de *Prevotella* no rúmen pode aumentar em até 10 vezes em bovinos alimentados com grãos quando comparados com animais alimentados com forragem (Weimer *et al.*, 2008; Fernando *et al.*, 2010; Henderson *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2015). A monensina e a tilosina reduziram a abundância do gênero *Ruminococcus* no rúmen, podendo este fato ser benéfico para bovinos que são mantidos com uma dieta rica em concentrado devido à diminuição da produção de ácido láctico e ao risco associado de acidose. No entanto, a redução na abundância de bactérias dos gêneros de *Ruminococcus* e *Lachnospira* e da família *Erysipelotrichaceae* em vários compartimentos dos novilhos tratados pode impactar a capacidade de exclusão de patógenos do TGI desses animais. Alguns estudos em humanos relataram que esses táxons são importantes na supressão do crescimento de patógenos entéricos no intestino (Buffie & Pamer, 2013; Pamer, 2016).

Com relação ao resistoma, a análise funcional dos dados indicou que genes envolvidos na desintoxicação foram significativamente aumentados no rúmen de novilhos tratados com antibióticos. No entanto, os resultados não mostraram diferença significativa entre a presença de ARGs na microbiota do TGI e a administração dos aditivos. Uma vez que a duração total do tratamento foi de apenas 74 dias, o perfil de ARGs pode não ser uma representação do efeito de longo prazo de tais aditivos.

Devido a falta de conhecimento sobre microbiomas em interfaces ambientais entre sistemas de produção animal e ambientes urbanos, Zaheer *et al.* (2019) realizaram uma análise comparativa de microbiotas e de resistomas de me-

tagenomas em 12 amostras fecais compostas (*Composite Fecal* - FC) coletadas de bovinos confinados em quatro confinamentos em Alberta, Canadá; 13 amostras de água de bacias hidrográficas adjacentes (*Catchment Basins* - CB); quatro amostras de solo de campos na vizinhança de um dos confinamentos; e, em seis amostras de afluentes de esgoto urbano (*Sewage Influent* - SI) de dois municípios. Os resultados mostraram maior prevalência do filo *Firmicutes* (40%) em amostras FC, enquanto o filo *Proteobacteria* foi mais abundante em CB (64%), solo (60%) e em SI (83%).

Entre os tipos de amostras, SI apresentou a maior diversidade de ARGs e classes de resistência a metais e biocidas (13 e 15, respectivamente), seguido por FC (10 e 8, respectivamente), CB (8 e 4, respectivamente) e solo (6 e 1, respectivamente). A maior abundância de ARGs foi encontrada em FC, enquanto as amostras de solo apresentaram um resistoma muito pequeno, mas único, que não se sobrepôs aos resistomas das amostras FC e CB. Consistente com o uso de antimicrobianos, genes de resistência à tetraciclina e macrolídeo foram predominantes no sistema de produção de carne bovina. Os também autores observaram uma divergência crescente na natureza dos microbiomas e dos resistomas conforme a distância do confinamento aumentou. Um dos confinamentos contribuiu com amostras de baias convencionais (animais criados com antibióticos) e naturais (animais criados sem antibióticos) e, embora as amostras das baias naturais tenham exibido uma composição de microbiota semelhante às amostras das baias convencionais, seu resistoma foi menos complexo. O resistoma das amostras SI foi indicativo de classes de drogas usadas em humanos e continha determinantes de resistência a  $\beta$ -lactama, macrolídeo, tetraciclina, aminoglicosídeo, fluoroquinolona e fosfomicina. A maior abundância de resistência ao mercúrio neste resistoma pode estar associada à contaminação da água municipal com produtos domésticos e industriais (Zaheer *et al.*, 2019).

Curiosamente, um estudo realizado recentemente sobre a microbiota intestinal humana sugere que mesmo compostos não antibióticos, como os anti-inflamatórios, podem alterar a microbiota intestinal. Verificou-se que os mecanismos de resistência a antibióticos e drogas utilizadas em terapia-alvo ou em fármacos direcionados (comum em tratamentos de câncer) se sobrepõem em certo nível (Maier *et al.*, 2018). Tal verificação abre caminho para se investigar se também há impacto de compostos não antibióticos na microbiota intestinal de bovinos.

# Estratégias nanotecnológicas para manipular o microbioma ruminal

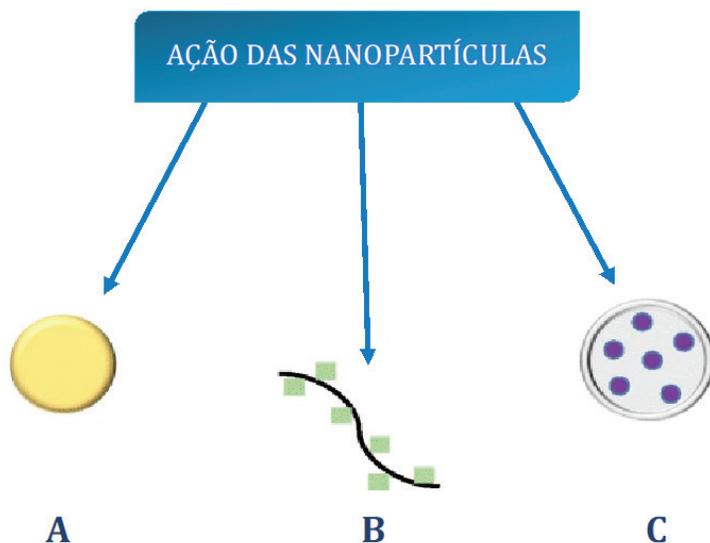
## Nanotecnologia e nanopartículas

A nanotecnologia consiste na habilidade de manipular átomo por átomo na escala compreendida entre 0,1 nm e 100 nm, com o intuito de buscar uma nova organização estrutural para diversos materiais já conhecidos comercialmente, permitindo, assim, o desenvolvimento de novas aplicações para o material original (Oliveira, 2009).

Estudos em nanoescala ou escala nanométrica ( $10^{-9}$  m) são importantes, posto que as propriedades físico-químicas dos materiais tendem a ser diferentes das propriedades do mesmo material em escala micrométrica, devido ao aparecimento de efeitos quânticos de tamanho e de fenômenos de superfície. Assim, um elemento quando reduzido à escala nanométrica pode apresentar propriedades eletrônicas, mecânicas, térmicas e ópticas diversas, quando comparado com seu estado natural (estendido), e aumento da sua área superficial, devido ao aumento significativo da quantidade de átomos superficiais quando comparado com o volume total da partícula, modificando, assim, sua reatividade química e sua funcionalidade (Martinez & Alves, 2013; Loos, 2014).

O aumento da razão entre a área de superfície e o volume permite que as nanopartículas sejam mais versáteis, seja como uma unidade funcional única ou como um transportador para unidades funcionais que podem ser aderidas às suas superfícies ou encapsuladas no seu interior (Figura 4).

Estas propriedades únicas que os materiais apresentam em nanoescala são extremamente importantes para a pesquisa científica, visto que oferecem uma vasta gama de oportunidades para o desenvolvimento de novas aplicações, novos materiais e de novas tecnologias. Além disso, o aumento da área superficial das partículas permite que menos material seja utilizado na síntese de um produto, gerando, desta forma, benefícios para o meio ambiente, com a preservação de recursos naturais, como água e energia, e para a economia, com a redução dos custos de produção (Shatkin, 2013).



**Figura 4.** Representação esquemática dos três mecanismos básicos de ação das nanopartículas. As nanopartículas podem servir como a unidade funcional (A), mas também podem atuar como um veículo de entrega para materiais conjugados à sua superfície (B) ou para materiais encapsulados no seu interior (C). Adaptado de Hill e Li, 2017.

Assim, desde que se tornou possível compreender, modificar e controlar a matéria em escala nanométrica é cada vez mais crescente o número de produtos nanotecnológicos desenvolvidos e disponibilizados em várias áreas, como na indústria médica, farmacêutica, de higiene e beleza, gestão ambiental, nutrição mineral, reprodução, conservação de alimentos, agricultura, engenharia, aparelhos eletrônicos, e outras (Swain *et al.*, 2015).

## Tipos de nanomateriais

Com base em suas propriedades químicas, as nanopartículas podem ser classificadas em três grandes grupos: as nanopartículas inorgânicas, as orgânicas e as híbridas. No grupo das inorgânicas, destacam-se os óxidos metálicos, como dióxido de titânio, um corante de ração que pode ser usado em embalagens como uma barreira aos raios ultravioleta; nanomineirais como

óxido de zinco, óxido de ferro e selênio; as nanopartículas dos metais de transição, como o ouro e a prata; e os pontos quânticos compostos, principalmente, por cádmio e selênio. Além destes, outros exemplos da introdução de nanomateriais na indústria de rações e embalagens envolve o uso de plaquetas de nanoargila, minerais como dióxido de silício, nanopartículas de cálcio, magnésio e prata, usados, principalmente, para purificação de água e em embalagens antimicrobianas (Bunglavan *et al.*, 2014; Costa, 2015).

No grupo das orgânicas, as principais representantes são as nanopartículas formadas pelos átomos de carbono, como o fulereno, os grafenos e as nanofibras de carbono, além de proteínas, moléculas de gordura e polissacarídeos, que são incorporadas nas rações como sistemas de encapsulamento, denominados de micelas e lipossomas. Estas nanoestruturas podem ser algumas vezes referidas como nanocápsulas quando usadas como veículos para o transporte de nutrientes ou produtos farmacêuticos essenciais para o trato gastrointestinal ou a corrente sanguínea, tanto em animais quanto em humanos (Gopi *et al.*, 2017).

Outro termo comumente empregado são as nanoemulsões, que também podem estabilizar e fornecer os componentes ativos, encapsulando os ingredientes funcionais da alimentação na interface físico-química óleo/água ou em uma fase contínua. Nanocápsulas ou nanoemulsões são, então, meios mais eficazes de alterar a funcionalidade de dietas com o objetivo de se obter melhor aproveitamento dos nutrientes que as compõem. Além disso, ingredientes muitas vezes insolúveis em diluições comumente utilizadas podem ter solubilidade aumentada pelas nanoemulsões (Gopi *et al.*, 2017).

As vantagens esperadas para os ingredientes nanoencapsulados são melhor biodisponibilidade, redução na concentração aplicada e interação mais estável com outros componentes. Lembrando que estas características estão diretamente relacionadas à maior área superficial e tamanho das nanoestruturas, favorecendo maior interação destas com as células e os tecidos. Devido à aplicação de doses em menor concentração, os ingredientes nanoencapsulados também podem ser usados como alternativa ao uso de antibióticos como promotores de crescimento, para eliminar resíduos de antibióticos nos produtos de origem animal e para reduzir contaminação ambiental, além de gerar produtos de origem animal livres de contaminantes (Hill & Li, 2017).

Já os nanomateriais híbridos são formados por dois tipos de nanocomponentes com funções complementares ou coesas entre si, como por exemplo, a conjugação de biomoléculas a nanopartículas metálicas e a associação de nanomoléculas orgânicas com matrizes nanopoliméricas com a finalidade de melhorar propriedades térmicas, mecânicas e ópticas (Costa, 2015).

## Nanotecnologia e nutrição animal

No que diz respeito aos animais, as principais aplicações de nanomateriais residem na administração de nutrientes, minerais, suplementos, probióticos e medicamentos; diagnóstico e tratamento de doenças; segurança alimentar; biocidas; nanopurificação e criopreservação de esperma; e uso de imunossensores hormonais no manejo da reprodução (Gopi *et al.*, 2017; Hill & Li, 2017).

Na nutrição animal, a aplicação da nanotecnologia é observada, principalmente, na forma de nanominerais (Thulasi *et al.*, 2013, Bunglavan *et al.*, 2014, Swain *et al.*, 2015). Neste caso, a escala nanométrica ( $10^{-9}$  m) é extremamente importante, pois com este tamanho a absorção de minerais aumenta, reduzindo, assim, o efeito antagônico entre os cátions bivalentes. As interações antagônicas são frequentemente expressas como uma inibição mútua da absorção pelo trato intestinal (Henry & Miles, 2000).

Alguns estudos mostraram que nanopartículas de elementos minerais apresentam maior biodisponibilidade, devido à maior área superficial específica, maior atividade superficial, alta eficiência catalítica e maior capacidade de adsorção quando comparadas com micropartículas, que apresentam diâmetro bem maior ( $10^{-6}$  m) do que a nanoescala (Albanese, 2012; Rajendran *et al.*, 2013). Desta maneira, as propriedades intrínsecas dos nanominerais são determinadas, principalmente, pelo tamanho, forma, composição, estrutura cristalina e morfologia (Guisbiers, 2012). Eles são estáveis mesmo sob alta temperatura e pressão e podem ser facilmente transportados, absorvidos pelo trato gastrointestinal e utilizados pelos animais (Swain *et al.*, 2016).

Os minerais nanoparticulados, geralmente, apresentam efeitos significativos mesmo em doses mais baixas do que aquelas recomendadas pelos fabricantes para o uso de fontes minerais convencionais. Além disso, apresentam

efeitos antibacterianos e de promotores de crescimento mais significativos do que os convencionais, podendo alterar o padrão de fermentação ruminal quando são adicionados à ração animal (Swain *et al.*, 2016).

Trabalhos mostram que o uso de nanominerais, como nano-selênio (nano-Se), nano-cromo (nano-Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ou nano-zinco (nZnO) pode melhorar os parâmetros de produção animal, a saúde dos rebanhos e a qualidade dos produtos obtidos a partir deles. Várias pesquisas têm comprovado que os nanominerais apresentam melhores resultados quando comparados com os sais inorgânicos e quelatos desses elementos, que são, usualmente, utilizados em larga escala na indústria de nutrição animal (Konkol & Wojnarowski, 2018).

Melhores resultados da aplicação de nanominerais estão relacionados com a maior interação das nanopartículas com outras substâncias orgânicas e inorgânicas devido à maior área superficial de contato. Nanopartículas de óxido de zinco (nZnO), por exemplo, tem efeitos adversos mínimos nas células quando comparadas com sua forma particulada ou iônica (Zn) (Swain *et al.*, 2016). Chen *et al.* (2011) estudaram o impacto da suplementação *in vitro* com nZnO no padrão de fermentação ruminal de bovinos. Os autores relataram que a suplementação com estas nanopartículas melhorou o crescimento de microrganismos ruminais, aumentou a síntese proteica microbiana e a eficiência de utilização de energia na fase inicial da incubação (6 a 12 horas). Segundo Arelovich *et al.* (2000), o efeito do zinco nos microrganismos pode ser semelhante ao dos ionóforos, pois no rúmen, a proporção de ácido propiônico é aumentada pela inibição da atividade de certas bactérias gram-negativas e microrganismos produtores de hidrogênio. Assim, o nZnO pode causar alterações na microbiota ruminal de bovinos, afetando a formação de AGCCs.

Com o uso cada vez mais diversificado de nanomateriais, criou-se uma enorme demanda por desenvolvimento de métodos mais eficazes e sensíveis para sintetizar as nanopartículas desejadas. Dessa forma, a produção de nanomateriais em nível laboratorial pode ser realizada por métodos físicos, químicos ou biológicos. Os métodos químicos são os mais utilizados para a nutrição animal, por ser mais barato e por consumir menos tempo para sua fabricação, sendo esta característica particularmente importante para produção em escala de aditivos alimentares (Swain *et al.*, 2015).

Um dos objetivos da nutrição de ruminantes é reduzir a produção de  $\text{CH}_4$  entérico, sem causar efeitos adversos sobre a digestibilidade, a saúde do animal e a produtividade dos rebanhos. Além disso, para obtenção de melhorias na produção da biomassa microbiana ruminal e no nível de antioxidantes dos animais é fundamental o suprimento adequado de nutrientes e de minerais nas dietas (Riazi *et al.*, 2019). Neste sentido, Riazi *et al.* (2019) estudaram os efeitos do nZnO na fermentação ruminal, liberação de  $\text{CH}_4$ , capacidade antioxidante total (CAT) e na produção de biomassa microbiana (PBM), por meio de uma técnica de produção de gás *in vitro*. Os tratamentos incluíram uma dieta controle e dietas contendo 20, 40 ou 60 mg de Zn suplementar (como ZnO ou nZnO) por kg de matéria seca (MS). Como resultado, a suplementação de 20 mg de Zn como nZnO, semelhante ao ZnO, diminuiu a produção de  $\text{CH}_4$  e a quantidade de protozoários; melhorou os parâmetros CAT, PBM, digestibilidade e substrato verdadeiramente degradado (SVD).

Em comparação com o tratamento controle, a adição de Zn suplementar não apresentou efeitos significativos sobre o fator de partição, eficiência de PBM, pH e N-amônia ( $P > 0,05$ ). As dietas contendo 40 e 60 mg de Zn suplementar, como nZnO ou ZnO, não apresentaram vantagem sobre a dieta contendo 20 mg de Zn em termos de declínio de  $\text{CH}_4$  e incrementos de CAT, SVD e PBM. No geral, o nZnO não teve efeito adverso na fermentação ruminal *in vitro*. A adição de 20 mg de Zn na forma de nZnO por kg de MS da dieta foi suficiente para melhorar a fermentação ruminal *in vitro* em termos de liberação de  $\text{CH}_4$ , CAT e PBM. Desta forma, os autores não recomendam o uso de níveis suplementares mais altos do que 20 mg/kg MS de Zn (Riazi *et al.*, 2019).

Outro exemplo vem do estudo de Shi *et al.* (2011), que demonstraram que a suplementação do nanomineral selênio (nano-Se) na dieta basal de ovelhas melhorou a fermentação ruminal e a utilização da ração, alterando o padrão de fermentação ruminal de acetato para propionato e aumentando a concentração ruminal de AGCC. Adicionalmente, a suplementação de selênio (Se) também pode melhorar a eficiência do sistema antioxidante, melhorar a resistência a doenças e a qualidade nutricional do produto final. Os autores verificaram que o pH ruminal médio ficou na faixa ideal para a atividade bacteriana celulolítica e que a população microbiana ruminal incremental com a suplementação de nano-Se aumentou a utilização de N de amônia.

A absorção intestinal de Se em ruminantes é semelhante à de monogástricos e as formas administradas de selenito, selenato e selenometionina (SeMet) são absorvidas por mecanismos diversos. Pouco do Se elementar é absorvido no intestino devido a sua baixa solubilidade e, portanto, passa a ser excretado nessa forma pelas fezes (Gierus, 2007). Em trabalho realizado anteriormente, Kim *et al.* (1997) verificaram que a administração de SeMet aumentou a produção *in vitro* de AGCCs pela microbiota ruminal, entretanto, os efeitos do selenito e do Se elementar sobre as quantidades crescentes desses ácidos não foram significativos. A taxa de fermentação foi mais rápida na presença de SeMet quando comparado ao selênio e selenito; o platô de fermentação do SeMet foi atingido dentro de 30 horas, enquanto nas outras duas formas minerais o platô de fermentação não foi atingido até pelo menos 36 horas. A proporção de acetato:propionato:butirato foi diferente de acordo com a fonte de selênio, sendo que na presença de SeMet, foi observado o aumento da proporção de acetato, o que pode ser explicado pela provável utilização de SeMet pelas bactérias do rúmen como fonte de energia (Kim *et al.*, 1997).

Com relação a entrega de nutrientes, uma estratégia semelhante a que foi aplicada por Haham *et al.* (2012) em humanos poderia ser investigada para auxiliar o desmame de bezerros, que é um período sensível para os animais, pois seus sistemas digestivo e imunológico ainda estão em fase de amadurecimento (Hill & Li, 2017). Micelas de caseínas podem ser manipuladas para incorporar nutrientes hidrofóbicos como veículo nano-capsular natural para nutracêuticos em humanos. Essas micelas são nanopartículas de ocorrência natural no leite, no qual as fosfoproteínas de caseína constituem, aproximadamente, 80% do perfil proteico do leite de vaca. Algumas isoformas de caseína se agrupam em torno de moléculas de cálcio, proteínas e outros nutrientes para permitir o transporte da mãe para o filho. Desta forma, Haham *et al.* (2012) administraram vitamina D em voluntários dentro dessas nanopartículas de caseína, aumentando, assim, a biodisponibilidade desta vitamina *in vivo*, pois as partículas de caseína sofrem clivagem proteolítica no estômago, liberando a vitamina encapsulada.

Na ausência de leite da mãe, bezerros desmamados precisam se adaptar a uma dieta de carboidratos complexos e suporte imunológico reduzido. Esta é uma etapa importante não apenas por razões de bem-estar animal, mas tam-

bém do ponto de vista da produção, pois animais desmamados que mantêm suas taxas de crescimento durante o processo de desmame são mais saudáveis e mais pesados ao abate. Portanto, nanopartículas projetadas para a entrega de nutrientes poderão facilitar a suplementação e impulsionar as taxas de crescimento de bovinos, aumentando a biodisponibilidade de nutrientes específicos (Hill & Li, 2017).

A administração oral de nutrientes adicionais para bovinos por meio da dieta traz desafios inerentes que devem ser considerados ao projetar uma nanopartícula transportadora. Como já mencionado, cada compartimento do trato gastrointestinal dos ruminantes apresenta um ambiente único que inclui seu próprio complemento de enzimas e nível de pH específico. Assim, as nanopartículas devem ser capazes de superar esses obstáculos para entregar sua carga nutricional no local apropriado (Ban *et al.*, 2015). Neste sentido, Akbari e Wu (2016) analisaram nanopartículas feitas a partir da proteína cruciferina da canola e demonstraram que essas nanopartículas podem ser utilizadas para encapsular compostos bioativos hidrofóbicos e hidrofílicos, protegê-los de um ambiente estomacal simulado e liberá-los em um ambiente intestinal simulado.

Depois que os nutrientes são liberados das nanopartículas, eles devem atingir o epitélio intestinal e cumprir sua função como se tivessem se originado da ração. Em seguida, as nanopartículas devem ser absorvidas, degradadas e/ou removidas do corpo, não podendo permanecer no intestino, pois o acúmulo poderá impedir a absorção de outros nutrientes no lúmen. Dependendo do tipo de nanopartícula, a absorção celular pode não ser preferida na indústria de produção animal, onde a segurança alimentar deve ser considerada. Desta forma, antes de serem disponibilizadas no mercado ainda há um longo caminho científico a percorrer, pois há necessidade do desenvolvimento de pesquisas que visem avaliar a ação das nanopartículas na entrega dos nutrientes, os seus efeitos e quaisquer consequências biológicas indesejáveis, como por exemplo, citotoxicidade (Hill & Li, 2017).

De acordo com Hill e Li (2017), embora a entrega de nutrientes em nanoescala possa ocorrer naturalmente ou sinteticamente, as nanopartículas podem estabilizar compostos bioativos e auxiliar na absorção celular. Adicionar um componente bioativo diretamente à ração acarreta um risco de degradação e inacessibilidade que pode ser combatido por meios nanotecnológicos. O

pequeno tamanho das nanopartículas garante um maior nível de biodisponibilidade em comparação com as micropartículas, principalmente, no trato digestivo, uma vez que as nanopartículas podem passar mais facilmente pela mucosa intestinal. Huang *et al.* (2009) usaram carbonato de cálcio e citrato de cálcio em nano e microescalas para testar as diferenças de biodisponibilidade medindo as densidades minerais ósseas de camundongos. Os animais que receberam os dois compostos de cálcio em nanoescala apresentaram os ossos mais densos em comparação com os camundongos dos grupos controle e dos que receberam os compostos de cálcio em microescala.

As nanopartículas também podem representar uma alternativa viável ao uso de antibióticos nos sistemas de produção e podem ajudar a impedir a entrada de patógenos nos locais de criação extensiva de animais. Nanopartículas metálicas com cargas positivas líquidas são atraídas para membranas bacterianas carregadas negativamente, resultando em vazamento e lise bacteriana (Gahlawat *et al.*, 2016). Kim *et al.* (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata (NPsAg) contra levedura isolada de um caso de mastite bovina, a cepa O157: H7 de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Como resultados, levedura e a *E. coli* foram inibidas em baixa concentração de NPsAg, enquanto os efeitos inibidores do crescimento em *S. aureus* foram moderados, sugerindo que estas nanopartículas podem ser utilizadas como inibidores de crescimento eficazes para vários microrganismos, tornando-as aplicáveis a diferentes dispositivos médicos e sistemas de controle antimicrobiano.

Nanopartículas de cobre também podem ser adicionadas à ração por sua capacidade de promover o crescimento e o desempenho dos animais, além de suas propriedades antimicrobianas. No entanto, concentrações excessivas podem causar modificações no rúmen, podendo afetar adversamente populações microbianas, a digestibilidade de nutrientes e os produtos da fermentação (Hill & Li, 2017).

Rai e colaboradores em 2009 propuseram pela primeira vez o uso do termo miconanotecnologia para se referir à fabricação de nanopartículas metálicas por fungos e sua posterior aplicação no desenvolvimento de novas tecnologias. Assim, a miconanotecnologia é uma nova e interessante ciência interdisciplinar aplicada que apresenta um potencial considerável, devido a diversidade de fungos que existem na natureza e a ampla gama de enzimas

que estes microrganismos produzem. De acordo com estes autores, grande parte da pesquisa disponível na literatura sobre a biossíntese extracelular fúngica de nanopartículas metálicas foi realizada com prata, tendo sido alcançada em culturas de *Aspergillus fumigatus* (Bhainsa & D'Souza, 2006); *Aspergillus niger* (Gade *et al.*, 2008); *Fusarium semitectum* (Basavaraja *et al.*, 2007); *Fusarium acuminatum* (Ingle *et al.*, 2008); *Trichoderma asperellum* (Mukherjee *et al.*, 2008); *Penicillium* (Sadowski *et al.*, 2008); entre outras.

Em alguns estudos, também foi investigada a potencial atividade antibacteriana de nanopartículas de prata derivadas de fungos. Gade *et al.* (2008) consideraram a bioatividade de nanopartículas de prata de cerca de 20 nm produzidas por *Aspergillus niger*. Eles testaram o efeito antibacteriano de partículas esféricas contra uma variedade de bactérias e relataram atividade máxima contra *Staphylococcus aureus* e atividade mínima contra *Escherichia coli*. No mesmo ano, Ingle *et al.* (2008) também investigaram as propriedades antibacterianas de partículas esféricas de prata entre 5 nm a 40 nm produzidas por *Fusarium acuminatum* e verificaram que essas nanopartículas foram eficazes contra várias bactérias patogênicas humanas, como *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Escherichia coli*.

Embora, muitas áreas industriais, como produção e processamento de alimentos, de enzimas exógenas, de produtos farmacêuticos e suplementos alimentares, utilizem biomassa fúngica nos seus processos por meio de procedimentos de manuseio deste tipo de material já bem estabelecidos, ainda há uma série de desafios que precisam ser enfrentados antes que o potencial da miconanotecnologia possa ser totalmente avaliado. As pesquisas realizadas até o momento indicam que pode haver uma série de diferentes tipos de agentes redutores envolvidos no mecanismo de biossíntese de nanopartículas metálicas, podendo também afetar as formas finais e o tamanho das nanopartículas. Ainda há necessidade de estudos para elucidar os mecanismos específicos envolvidos na formação de nanopartículas e para determinar se as mesmas ou diferentes vias metabólicas são usadas por fungos de espécies diferentes para sintetizar metais diferentes. Além disso, para que a síntese fúngica de nanopartículas se torne comercialmente viável, também será necessário desenvolver métodos para otimizar as concentrações, os tamanhos e as formas das nanopartículas, e técnicas de recuperação de baixo custo para separar as partículas metálicas do micélio fúngico (Rai *et al.*, 2009).

Entre os diversos materiais nanoestruturados utilizados como agentes antimicrobianos, o ZnO vem recebendo cada vez mais atenção não só devido a sua excelente eficiência bactericida e fungicida, mas também por não ser classificado como um metal pesado, como é o caso da prata. Além de ser um material que apresenta baixíssima toxicidade aos seres humanos, animais e meio ambiente, é seguro e biocompatível (Liu *et al.*, 2009), permitindo, assim, seu uso como agente ativo em medicamentos (Talebian & Zavvare, 2013).

Na forma de nanopartículas, o ZnO é efetivo no controle de uma grande quantidade de microrganismos, pois apresenta a capacidade de alterar os componentes da membrana celular bacteriana, distorcendo-a e rompendo-a, o que leva à perda do componente intracelular e a consequente morte do microrganismo (Bell, 2014). Por esta razão, nZnO vem sendo cada vez mais estudadas e utilizadas em aplicações nas quais propriedades antibacterianas são requeridas, podendo ser aplicadas para controlar o desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos, na desinfecção de águas para o consumo humano e até mesmo em produtos comerciais que, atualmente, usam a prata como bactericida (Porto *et al.*, 2017).

Muitos relatórios mostraram evidências de que probióticos e algumas nanopartículas podem ser melhores alternativas para promoção do crescimento animal e a antimicrobianos. No entanto, Hill e Li (2017), explicaram que, apesar da expansão da resistência aos antibióticos nas bactérias, estes ainda não se tornaram totalmente ineficazes contra elas. Também comentam neste trabalho, que a administração e eficácia dos antibióticos poderiam ser melhoradas pelo uso de nanoestruturas, diminuindo potencialmente a dosagem de antibióticos necessária para o tratamento.

A inclusão de nanomateriais na alimentação dos animais ou na água pode beneficiar a qualidade do produto obtido, bem como o ciclo de produção. Como exemplo pode ser citada a adição de nanopartículas de cromo à ração de aves. Estas nanopartículas não apenas afetaram positivamente o conteúdo de proteína dos músculos da mama e da coxa enquanto, simultaneamente, baixaram o colesterol, mas também aumentaram o ganho médio diário e a eficiência alimentar dos frangos do grupo experimental alimentados com 500 µg/kg de Cr<sup>3+</sup> (Zha *et al.*, 2009). As implicações desses resultados são ciclos de produção mais curtos para carne de melhor qualidade com menos

necessidade de ração para que os frangos atinjam o peso de mercado (Hill & Li, 2017).

Da mesma forma, Wang e Xu (2004) demonstraram que quando suínos em terminação destinados ao mercado receberam nanopartículas de cromo (200 µg/kg) na ração, eles apresentaram 14% mais carne magra no abate do que os suínos do grupo controle que foram alimentados com uma dieta básica de farelo de milho e soja. Um aumento na massa muscular esquelética e uma melhor qualidade da carne suína também foram alcançados com efeitos semelhantes quando animais em terminação foram alimentados com suplementos de nanopartículas de quitosana carregados com cromo (Wang *et al.*, 2014).

Tais colocações dão a dimensão da importância das aplicações de ferramentas nanotecnológicas na nutrição animal, que é crescente à medida que os desafios para aumentar a produtividade exigem soluções mais audaciosas para problemas cada vez mais complexos. E, embora esta tecnologia apresente promessas impactantes para uma melhor produção bovina, os estudos relacionados a modificação da fermentação ruminal em bovinos ainda são bastante limitados (Fraceto *et al.*, 2016).

## Considerações finais

O ecossistema microbiano do rúmen é diverso e complexo, consistindo em microrganismos de diferentes espécies que trabalham simbioticamente para decompor a biomassa vegetal consumida pelos ruminantes. Conforme abordado ao longo desta revisão, esses animais dependem exclusivamente de sua microbiota para seu metabolismo diário. Esta microbiota controla a eficiência da produção animal, por meio de certas vias metabólicas, como por exemplo, as vias associadas à produção de ácidos graxos de cadeia curta e de metano, resultando em perda de energia pelo animal e liberação de gases de efeito estufa no meio ambiente. Desta forma, o microbioma ruminal pode afetar a qualidade do produto final (leite e carne) e a produtividade animal, mas também pode contribuir para o aumento da poluição ambiental.

A identificação de quais microrganismos existem no rúmen e qual a função que exercem pode ser realizada por meio de técnicas baseadas em sequenciamento

to de alto desempenho. Os resultados gerados por estas ferramentas são fundamentais para o fornecimento de condições necessárias ao melhor aproveitamento do processo de digestão, gerando, assim, sistemas de produção mais eficientes. Além disso, estas tecnologias permitem a prospecção de microrganismos ainda não descritos, bem como novas e diferentes moléculas antimicrobianas que poderão ser utilizadas nas mais diferentes abordagens, inclusive na formulação de novos aditivos e medicamentos. Entretanto, ainda existe um longo caminho a ser percorrido para que possamos entender este microbioma complexo e sua real função na fisiologia ruminal e no desempenho animal.

Embora o desenvolvimento das metodologias de sequenciamento de nova geração e de ferramentas de bioinformática tenham aumentado nosso conhecimento sobre o microbioma ruminal, existe uma preocupação da comunidade científica de que essas revoluções tecnológicas estejam facilitando a catalogação de populações microbianas ruminais, em vez de gerar uma compreensão mais ampla de suas funções sobre a fisiologia e o metabolismo ruminal. Para atender este objetivo, é importante considerar abordagens que permitam avaliar o microbioma do rúmen de forma mais abrangente, já que muitos dos estudos recentes focaram apenas nas populações de bactérias e arqueias e ignoraram as populações de eucariotos, bacteriófagos e vírus.

Nos últimos anos, tem havido um número crescente de estudos dedicados a utilização de nanominerais na nutrição animal com a possibilidade de melhorar a composição, qualidade e a produtividade de produtos de origem animal, além da preocupação em reduzir os impactos negativos desta produção. Até o momento, muitos métodos foram desenvolvidos para melhorar a composição e a qualidade dos alimentos, no entanto, um dos mais baratos e mais eficazes é o uso de aditivos alimentares para os animais de produção. Muitos estudos têm demonstrado que nutrientes na forma de nanopartículas podem ser melhor absorvidos pelos animais, melhorando a qualidade dos produtos obtidos.

As nanopartículas já estão disponíveis no mercado e, com o desenvolvimento contínuo de pesquisas, suas propriedades serão otimizadas de forma mais precisa para uma seleção mais ampla de aplicações. O uso da nanotecnologia na produção animal ainda está em sua infância, mas resultados encorajadores de estudos nutricionais, biocidas e reprodutivos estão direcionando outras investigações.

Acreditamos que a verdadeira compreensão do ecossistema ruminal só será alcançada quando todos os aspectos relacionados a este microbioma forem considerados. Assim, espera-se que a integração de abordagens genômicas, metagenômicas, nanotecnológicas e nutricionais permita uma visão mais profunda sobre a complexa rede de interação existente entre os microrganismos do rúmen, o processo de fermentação ruminal e o desempenho do animal hospedeiro. Resultados obtidos com estudos integrados poderão auxiliar no desenvolvimento de estratégias de alimentação mais eficientes, que visem otimizar a taxa de absorção de nutrientes e de minerais pelos ruminantes, melhorar o desempenho e a produtividade animal e contribuir com a sustentabilidade ambiental nos sistemas de produção de proteína animal.

## Referências

ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, p. 1-6, 2012.

AKBARI, A.; WU, J. Cruciferin nanoparticles: preparation, characterization and their potential application in delivery of bioactive compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 107-118, 2016.

ALMEIDA, P. N. M. **População microbiana ruminal e atividade celulolítica de fungos provenientes de bovinos leiteiros alimentados com diferentes forragens**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros, 97p. 2009.

ARCHER, J. A.; RICHARDSON, E. C.; HERD, R. M.; ARTHUR, P. F. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: a review. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, n. 2, p. 147-162, 1999.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. **Microbiologia do rúmen**. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de Ruminantes. 2 ed. Jaboticabal: Funep, p. 115-160, 2011.

ARELOVICH, H. M.; OWENS, F. N.; HORN, G. W.; VIZCARRA, J. A. Effects of supplemental zinc and manganese on ruminal fermentation, forage intake and digestion by cattle fed prairie hay and urea. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 11, p. 2972-2979, 2000.

ATASOGLU, C.; WALLACE, R. J. De novo synthesis of amino acids by the ruminal anaerobic fungi, *Piromyces communis* and *Neocallimastix frontalis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 243-247, 2002.

ATLAS, M.; BARTHA, R. **Microbial evolution and Biodiversity**. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial Ecology. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, 1998. p. 27-57.

AUFFRET, M. D.; DEWHURST, R. J.; DUTHIE, C. A.; ROOKE, J. A.; WALLACE, R. J.; FREEMAN, T. C.; STEWART, R.; WATSON, M.; ROEHE, R. The rumen microbiome as a

reservoir of antimicrobial resistance and pathogenicity genes is directly affected by diet in beef cattle. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 159, 2017a.

AUFFRET, M. D.; STEWART, R.; DEWHURST, R. J.; DUTHIE, C. A.; ROOKE, J. A.; WALLACE, R. J.; FREEMAN, T. C.; SNELLING, T. J.; WATSON, M.; ROEHE, R. 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, n. 2642, p. 1-15, 2017b.

BAAR, C.; EPPINGER, M.; RADDATZ, G.; SIMON, J.; LANZ, C.; KLIMMEK, O.; NANDAKUMAR, R.; GROSS, R.; ROSINUS, A.; KELLER, H.; JAGTAP, P.; LINKE, B.; MEYER, F.; LEDERER, H.; SCHUSTER, S. C. Complete genome sequence and analysis of *Wolinella succinogenes*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 20, p. 11690-11695, 2003.

BALDAUF, S. L.; PALMER, J. D. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 24, p. 11558-11562, 1993.

BAN, C.; PARK, S. J.; LIM, S.; CHOI, S. J.; CHOI, Y. J. Improving flavonoid bioaccessibility using an edible oil-based lipid nanoparticle for oral delivery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 5266-5272, 2015.

BARNES, R. D. **Protozoários**. In: Zoologia dos Invertebrados. São Paulo: Roca, 1990. p. 13-77.

BASARAB, J. A.; PRICE, M. A.; AALHUS, J. L.; OKINE, E. K.; SNELLING, W. M.; LYLE, K. L. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, n. 83, p. 189-204, 2003.

BASAVARAJA, S.; BALAJI, S. D.; LAGASHETTY, A.; RAJASAB, A. H.; VENKATARAMAN, A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. **Materials Research Bulletin**, v. 43, n. 5, p. 1164-1170, 2007.

BELANCHE, A.; DOREAU, M.; EDWARDS, J. E.; MOORBY, J. M.; PINLOCHE, E.; NEWBOLD, C. J. Shifts in the rumen microbiota due to the type of carbohydrate and level of protein ingested by dairy cattle are associated with changes in rumen fermentation. **Journal of Nutrition**, v. 142, p. 1684-1692, 2012.

BELANCHE, A.; KINGSTON-SMITH, A.; NEWBOLD, C. J. An integrated multi-omics approach reveals the effects of supplementing grass or grass hay with vitamin E on the rumen microbiome and its function. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 905, p. 1-17, 2016.

BELL, M. F. **Atividade Antimicrobiana de Cimentos de Ionômero de Vidro Modificados por Nanopartículas de óxido de zinco**. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. 616 p.

BERG, G.; RYBAKOVA, D.; FISCHER, D.; CERNAVA, T.; VERGÈS, M. C. C.; CHARLES, T.; CHEN, X.; COCOLIN, L.; EVERSOLE, K.; CORRAL, G.H.; KAZOU, M.; KINKE, L.; LANGE, L.; LIMA, N.; LOY, A.; MACKLIN, J. A.; MAGUIN, E.; MAUCLINE, T.; MCCLURE, R.; MITTER, B.; RYAN, M.; SARAND, I.; SMIDT, H.; SCHELKLE, B.; ROUME, H.; G. KIRAN, G. S.; SELVIN, J.; CORREA DE SOUZA, R. S.; VAN OVERBEEK, L.; SINGH, B. K.; WAGNER, M.; WALSH,

A.; SESSITSCH, A.; SCHLOTTER, M. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, n. 103, p. 1-22, 2020.

BHAINSA, K. C.; D'SOUZA, S. F. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 47, n. 2, p.160-164, 2006.

BONNEMOY, F.; FONTY, G.; MICHEL, V.; GOUET, P. H. Effect of anaerobic fungi on the ruminal proteolysis in gnotobiotic lambs. **Reproduction Nutrition Development**, v. 33, p. 551-555, 1993.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **Bioessays**, v. 28, n. 8, p. 799-808, 2006.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrados**. Capítulo 5. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003.

BRULC, J. M.; ANTONOPOULOS, D. A.; BERG MILLER, M.; WILSON, M. K.; YANNARELL, A. C.; DINSDALE, E. A.; EDWARDS, R. E.; FRANK, E. D.; EMERSON, J. B.; WACKLIN, P.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; NELSON, K. E.; WHITE, B. A. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 6, p. 1948-1953, 2009.

BUFFIE, C. G.; PAMER, E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 790-801, 2013.

BUNGLAVAN, S. J.; GARG, A. K.; DASS, R. S.; SHRIVASTAVA, S. Use of nanoparticles as feed additives to improve digestion and absorption in livestock. **Livestock Research International**, v. 2, n. 3, p. 36-47, 2014.

CARBERRY, C. A.; KENNY, D. A.; HAN, S.; McCABE, M. S.; WATERS, S. M. 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. 4949-4958, 2012.

CASTILLO-GONZÁLEZ, A. R.; BURROLA-BARRAZA, M. E.; DOMÍNGUEZ-VIVEROS, J.; CHÁVEZ-MARTÍNEZ, A. Rumen microorganisms and fermentation. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 46, p. 349-361, 2014.

CHEN, J.; WANG, W.; WANG, Z. Effect of nano-zinc oxide supplementation on rumen fermentation in vitro. **Chinese Journal of Animal Nutrition**, v. 23, n. 8, p. 1415-1421, 2011.

CHUN, J.; LEE, J. H.; JUNG, Y.; KIM, M.; KIM, S.; KIM, B. K.; LIM, Y. W. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2259-2261, 2007.

COSTA, J. D. S. **Síntese e Caracterização toxicológica de diferentes tipos de nanopartículas de Ouro. Estudos *in vitro* e *in vivo***. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade) - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Universidade do Porto, Porto, Portugal, 150p. 2015.

CREEVEY, C. J.; KELLY, W. J.; HENDERSON, G.; LEAHY, S. C. Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 5, p. 467-479, 2014.

- DEHORITY, B. A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa**. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1993. 325p.
- DEHORITY, B. A. **Rumen microbiology**. Nottingham: Nottingham University Press, UK, 2003. 372p.
- DELWART, E. L. Viral metagenomics. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, p. 115-131, 2007.
- DEMEYER, D. I. **Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut**. In Rumen microbial metabolism and ruminant digestion (ed. JP Jouany), p. 217-237. INRA Editions, Versailles, France, 1991.
- DENG, K. D.; XIAO, Y.; MA, T.; TU, Y.; DIAO, Q. Y.; CHEN, Y. H.; JIANG, J. J. Ruminal fermentation, nutrient metabolism, and methane emissions of sheep in response to dietary supplementation with *Bacillus licheniformis*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 241, p. 38-44, 2018.
- DE ZEN, S.; BARIONI, L. G.; BONATO, D. B. B.; ALMEIDA, M.; RITTL, T. F. **Pecuária de corte brasileira: Impactos ambientais e emissões de gases efeito estufa (GEE)**. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – CEPEA, ESALQ/USP, Piracicaba/SP, 2008. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/documentos/texto/pecuaria-de-corte-brasileira-impactos-ambientais-e-emissoes-de-gases-efeito-estufa-gee.aspx#>> Acesso em: 4 dez. 2020.
- DUDHAGARA, P.; BHAVSAR, S.; BHAGAT, C.; GHELANI, A.; BHATT, S.; PATEL, R. Web resources for metagenomics studies. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 13, n. 5, p. 296-303, 2015.
- DUSKOVA, D.; MAROUNEK, M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 159-163, 2001.
- FARABEE, M. J. **Online Biology Book: The Digestive System**. 2010. Disponível em: <<http://web.archive.org/web/20120307221604/http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/BioBookDIGEST.html>> Acesso em: 10 dez. 2020.
- FERNANDO, S. C.; PURVIS II, H. T.; NAJAR, F. Z.; SUKHARNIKOV, L. O.; KREHBIEL, C. R.; NAGARAJA, T. G.; ROE, B. A.; DESILVA, U. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 7482-7490, 2010.
- FORTALEZA, A. P. S.; MASSARO JÚNIOR, F. L.; SILVA, L. D. F. Microbiologia do rúmen - fauna ruminal. **PUBVET**, v. 3, n. 3, 2009.
- FOX, D. G.; BARRY, M. C.; PITT, R. E.; ROSELER, D. K.; STONE, W. C. Application of the Cornell net carbohydrate and protein model for cattle consuming forages. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 267-277, 1995.
- FRACETO, L. F.; GRILLO, R.; MEDEIROS, G. A.; SCOGNAMIGLIO, V.; REA, G.; BARTOLUCCI, C. Nanotechnology in agriculture: Which innovation potential does it have? **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, p. 1-5, 2016.
- FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. **Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal**. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de Ruminantes. 2 ed. Jaboticabal: Funep, p. 1-27, 2011.

- GADE, A. K.; BONDE, P.; INGLE, A. P.; MARCATO, P. D.; DURAN, N.; RAI, M. K. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, p. 243-247, 2008.
- GAHLAWAT, G.; SHIKHA, S.; CHADDHA, B. S.; CHAUDHURI, S. R.; MAYILRAJ, S.; CHOUDHURY, A. R. Microbial glycolipoprotein-capped silver nanoparticles as emerging antibacterial agents. **Microbial Cell Factories**, v.15, n. 25, p. 1-14, 2016.
- GARCIA-VALLVE, S.; ROMEU, A.; PALAU, J. Horizontal gene transfer of glycosyl hydrolases of the rumen fungi. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 3, p. 352-361, 2000.
- GIERUS, M. Fontes orgânicas e inorgânicas de selênio na nutrição de vacas leiteiras: Digestão, absorção, metabolismo e exigências. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1212-1220, 2007.
- GÔES, R. H. T. B.; MARSON, E. P. **Leveduras e enzimas na alimentação de ruminantes**. In: Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia, Belo horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, n. 43, p. 46-66, 2004.
- GOPI, M.; PEARLIN, B.; KUMAR, R. D.; SHANMATHY, M.; PRABAKAR, G. Role of Nanoparticles in Animal and Poultry Nutrition: Modes of Action and Applications in Formulating Feed Additives and Food Processing. **International Journal of Pharmacology**, v. 13, n. 7, p. 724-731, 2017.
- GORDON, G. L. R.; PHILLIPS, M. W. Removal of anaerobic fungi from the rumen of sheep by chemical treatment and the effect on feed consumption and *in vivo* fibre digestion. **Letters in Applied Microbiology**, v. 17, p. 220-223, 1993.
- GORDON, G. L. R.; PHILLIPS, M. W. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. **Nutrition Research Reviews**, v. 11, p. 133-168, 1998.
- GUAN, L. L.; NKRUMAH, J. D.; BASARAB, J. A.; MOORE, S. S. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. **FEMS Microbiol Letters**, v. 288, p. 85-91, 2008.
- GUISBIERS, G.; MEJÍA-ROSALES, S.; LEONARD DEEPAK, F. Nanomaterial Properties: Size and Shape Dependencies. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1-2, 2012.
- HAHAM, M.; ISH-SHALOM, S.; NODELMAN, M.; DUEK, I.; SEGAL, E.; KUSTANOVICH, M.; LIVNEY, Y. D. Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles. **Food and Function**, v. 3, n. 7, p. 737-744, 2012.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry and Biology**, 5R245-R249, 1998.
- HAWKSWORTH, D. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.
- HEGARTY, R. S. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, p. 1321-1327, 1999.
- HEGARTY, R. S.; GOOPY, J. P.; HERD, R. M.; MCCORKELL, B. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1479-1486, 2007.

HENDERSON, G.; COX, F.; GANESH, S.; JONKER, A.; YOUNG, W.; GLOBAL RUMEN CENSUS COLLABORATORS; JANSSEN, P. H. 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. 14567, p. 1-13, 2015.

HENRY, P. R.; MILES, R. D. Interactions among the trace minerals. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 95-106, 2000.

HERBERG, R.; MANTHEY, J.; RICHARDSON, L.; COOLEY, C.; DONOHO, A. Excretion and tissue distribution of [<sup>14</sup>C]monensin in cattle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, p. 1087-1090, 1978.

HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GUAN, L. L.; GOONEWARDENE, L.A.; LI, M.; MUJIBI, D. F.; STOTHARD, P.; MOORE, S. S.; LEON-QUINTERO, M. C. Correlation of particular bacterial PCR-denaturing gradient gel electrophoresis patterns with bovine ruminal fermentation parameters and feed efficiency traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6338-6350, 2010.

HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R.; KIM, T. W.; CHOKHAWALA, H.; SCHROTH, G.; LUO, S.; CLARK, D. S.; CHEN, F.; ZHANG, T.; MACKIE, R. I.; LEN A PENNACCHIO, L. A.; TRINGE, S. G.; VISEL, A.; WOYKE, T.; WANG, Z.; RUBIN, E. M. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science**, v. 331, p. 463-467, 2011.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHNENDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LUCKING, R.; LUMBSCH, H. T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; McLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERS, J. A.; VILGALYS, R.; AIME, M. C.; APTROOT, A.; ...; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HILL, E. K.; LI, J. Current and future prospects for nanotechnology in animal production. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 26, 2017.

HOOK, S. E.; WRIGHT, A. D. G.; McBRIDE, B. W. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. **Archaea**, v. 2010, n. 945785, p. 1-11, 2010.

HUANG, S.; CHEN, J. C.; HSU, C. W.; CHANG, W. H. Effects of nano calcium carbonate and nano calcium citrate on toxicity in ICR mice and on bone mineral density in an ovariectomized mice model. **Nanotechnology**, v. 20, n. 37, p. e375102, 2009.

HUNGATE, R. E. **The Rumen and its Microbes**. New York: Academic Press; 1966.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal Bacteriology**, v. 180, p. 4765-4774, 1998.

HUWS, S. A.; CREEVEY, C. J.; OYAMA, L. B.; MIZRAHI, I.; DENMAN, S. E.; POPOVA, M.; MUÑOZ-TAMAYO, R.; FORANO, E.; WATERS, S. M.; HESS, M.; TAPIO, I.; SMIDT, H.; KRIZSAN, S. J.; YÁÑEZ-RUIZ, D. R.; BELANCHE, A.; GUAN, L.; GRUNINGER, R. J.; McALLISTER, T. A.; NEWBOLD, C. J.; ROEHE, R.; DEWHURST, R. J.; SNELLING, T. J.; WATSON, M.; SUEN, G.; HART, E. H.; KINGSTON-SMITH, A. H.; SCOLLAN, N. D.; DO PRADO, R. M.; PILAU, E. J.; MANTOVANI, H. C.; ATTWOOD, G. T.; EDWARDS, J. E.; MCEWAN, N. R.; MORRISSON, S.; MAYORGA, O. L.; ELLIOTT, C.; MORGAVI, D.

P. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2161, p. 1-33, 2018.

INGLE, A.; GADE, A.; PIERRAT, S.; SONNICHSEN, C.; RAI, M. K. Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. **Current Nanoscience**, v. 4, p. 141-144, 2008.

ISHLER, V.; HEINRICHS, J.; VARGA, G. **From feed to milk: understanding rumen function**. Willard Building: Penn State Cooperative Extension, 1996. 52p. (Extension Circular, 422).

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. **PLoS One**, v. 7, 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. 3619-3625, 2008.

JEWELL, K. A.; McCORMICK, C. A.; ODT, C. L.; WEIMER, P. J.; SUEN, G. Ruminal bacterial community composition in dairy cows is dynamic over the course of two lactations and correlates with feed efficiency. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 4697-4710, 2015.

JOHNSON, D. E.; WARD, G. M. Estimates of animal methane emissions. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 42, p. 133-141, 1996.

JOHNSON, M. C.; DEVINE, A. A.; ELLIS, J. C.; GRUNDEN, A. M.; FELLNER, V. Effects of antibiotics and oil on microbial profiles and fermentation in mixed cultures of ruminal microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4467-4480, 2009.

KAMESHWAR, A. K. S.; LUIZ PEREIRA RAMOS, L. P.; QIN, W. Metadata Analysis Approaches for Understanding and Improving the Functional Involvement of Rumen Microbial Consortium in Digestion and Metabolism of Plant Biomass. **Journal of Genomics**, v. 7, p. 31-45, 2019.

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

KHAFIPOUR, E., LI, S., PLAIZIER, J. C. & KRAUSE, D. O. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 7115-7124, 2009.

KINGSTON-SMITH, A.; EDWARDS, J.; HUWS, S.; KIM, E.; ABBERTON, M. Plant-based strategies towards minimising 'livestock's long shadow'. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 4, p. 613-620, 2010.

KIM, J.; VAN SOEST, P. J.; COMBS, G. F. Studies on the effects of selenium on rumen microbial fermentation in vitro. **Biological Trace Element Research**, v. 56, n. 2, p. 203-213, 1997.

KINLEY, R. D.; DE, N. R.; VUCKO, M. J.; MACHADO, L.; TOMKINS, N. W. The red macroalgae *Asparagopsis taxiformis* is a potent natural antimethanogenic that reduces methane production during in vitro fermentation with rumen fluid. **Animal Production Science**, v. 56, p. 282-289, 2016.

KLIEVE, A. V.; BAUCHOP, T. Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 637-1641, 1988.

KLIEVE, A. V.; SWAIN, R. A. Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2299-2303, 1993.

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

KLIEVE, A. V.; O'LEARY, M. N.; McMILLEN, L.; OUWERKERK, D. *Ruminococcus bromii*, identification and isolation as a dominant community member in the rumen of cattle fed a barley diet. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2065-2073, 2007.

KLIEVE, A. V.; McLENNAN, S. R.; OUWERKERK, D. Persistence of orally administered *Megasphaera elsdenii* and *Ruminococcus bromii* in the rumen of beef cattle fed a high grain (barley) diet. **Animal Production Science**, v. 52, p. 297-304, 2012.

KONKOL, D.; WOJNAROWSKI, K. The use of nanominerals in animal nutrition as a way to improve the composition and quality of animal products. **Journal of Chemistry**, v. 2018, p. 1-7, 2018.

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

KRAUSE, D. O.; NAGARAJA, T. G.; WRIGHT, A. D. G.; CALLAWAY, T. R. Board-invited review: rumen microbiology: leading the way in microbial ecology. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 1, p. 331-341, 2013.

KRAUSE, D. O.; DENMAN, S. E.; MACKIE, R. I.; MORRISON, M.; RAE, A. L.; ATTWOOD, G. T.; McSWEENEY, C. S. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 663-693, 2003.

KRISTENSEN, D. M.; MUSHEGIAN, A. R.; DOLJA, V. V.; KOONIN, E. V. New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. **Trends in Microbiology**, v. 18, p. 11-19, 2010.

KUNIN, V.; COPELAND, A.; LAPIDUS, A.; MAVROMATIS, K.; HUGENHOLTZ, P. A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 557-578, 2008.

LAZZARETTI, L. L.; HUPFFER, H. M. Nanotecnologia e sua regulamentação no Brasil. **Revista Gestão e Desenvolvimento**, v. 16, n. 3, p. 153-177, 2019.

LEE, S. S.; HA, 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, p. 3807-3813, 2000a.

LEE, S. S.; HA, J. K.; CHENG, K. J. Influence of an anaerobic fungal culture administration on *in vivo* ruminal fermentation and nutrient digestion. **Animal Feed Science and Technology**, v. 88, p. 201-217, 2000b.

LENG, R. A.; NOLAN, J. V. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 5, p.1072-1089, 1984.

LI, F., GUAN, L. L. Metatranscriptomic profiling reveals linkages between the active rumen microbiome and feed efficiency in beef cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 9, p. 1-16, 2017.

LIMA, J. R.; RIBON, A. O. B.; RUSSELL, J. B.; HILÁRIO, C. M. Bovicin HC5 inhibits wasteful amino acid degradation by mixed ruminal bacteria *in vitro*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 292, p. 78, 2009.

LIN, C.; RASKIN, L.; STAHL, D. A. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA -targeted oligonucleotide probes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, n. 28, p. 281-294, 1997.

LIU, Y.; HE, L.; MUSTAPHA, A.; LI, H.; HU, Z. Q.; LIN, M. Antibacterial Activities of Zinc Oxide Nanoparticles Against Escherichia coli O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1193-1201, 2009.

LOOS, M. R. **Nanociência e nanotecnologia: compósitos termofixos reforçados com nanotubos de carbono**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2014.

LURIE-WEINBERGER, M. N.; GOPHNA, U. Archaea in and on the Human Body: Health Implications and Future Directions. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 6, 2015.

McCABE, M. S.; CORMICAN, P.; KEOGH, K.; O'CONNOR, A.; EOIN, O. H.; PALLANDINO, R. A.; KENNY, D. A.; WATERS, S. M. Illumina MiSeq phylogenetic amplicon sequencing shows a large reduction of an uncharacterised succinivibrionaceae and an increase of the *Methanobrevibacter gottschalkii* Clade in feed restricted cattle. **PLoS One**, v. 10, n. 7, 2015.

MACHADO, F. S.; PEREIRA, L. G. R.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; LOPES, F. C. F.; CHAVES, A. V.; CAMPOS, M. M.; MORENZ, M. J. F. **Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2011. 92 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 147).

MACHADO, L.; MAGNUSSON, M.; PAUL, N. A.; DENYS, R.; TOMKINS, N. Effects of marine and freshwater macroalgae on *in vitro* total gas and methane production. **PLoS One**, v. 9, p. e85289, 2014.

MAIER, L.; PRUTEANU, M.; KUHN, M.; ZELLER, G.; TELZEROW, A.; ANDERSON, E. E.; BROCHADO, A. R.; FERNANDEZ, K. C.; DOSE, H.; MORI, H.; PATIL, K.R.; BORK, P.; TYPAS, A. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. **Nature**, v. 555, n. 7698, p. 623–628, 2018.

MANDAL, D.; BOLANDER, M. E.; MUKHOPADHYAY, D.; SARKAR, G.; MUKHERJEE, P. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 485-492, 2006.

MAO, S.; ZHANG, M.; LIU, J.; ZHU, W. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. **Scientific Reports**, v. 5, n. 16116, p. 1-14, 2015.

MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, O. L. Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 32-36, 2013.

MARTINEZ-FERNANDEZ, G.; DENMAN, S. E.; YANG, C.; CHEUNG, J.; MITSUMORI, M.; McSWEENEY, C. S. Methane inhibition alters the microbial community, hydrogen flow, and fermentation response in the rumen of cattle. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-14, 2016.

- MATTHEWS, C.; CRISPIE, F.; LEWIS, E.; REID, M.; O'TOOLE, P. W.; COTTER, P. D. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilization efficiency. **Gut Microbes**, v. 10, n. 2, p. 115-132, 2019.
- MAYORGA, O. L.; KINGSTON-SMITH, A. H.; KIM, E. J.; ALLISON, G. G.; WILKINSON, T. J.; HEGARTY, M. J.; THEODOROU, M. K.; CHARLES J. NEWBOLD, C. J.; HUWS, S. A. Temporal metagenomic and metabolomic characterization of fresh perennial ryegrass degradation by rumen bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n.1854, p. 1-23, 2016.
- McGARVEY, J. A.; HAMILTON, S. W.; DEPETERS, E. J.; MITLOEHNER, F. M. Effect of dietary monensin on the bacterial population structure of dairy cattle colonic contents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1947-1952, 2010.
- McSWEENEY, C.; KANG, S.; GAGEN, E.; DAVIS, C.; MORRISON, M.; DENMAN, S. Recent developments in nucleic acid-based techniques for use in rumen manipulation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 341-351, 2009.
- MEEHAN, C. J.; BEIKO, R. G. A phylogenomic view of ecological specialization in the *Lachnospiraceae*, a family of digestive tract-associated bacteria. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 3, p. 703-713, 2014.
- MELLO BRANDÃO, H.; GERN, J. C. Introdução à nanotecnologia nas práticas veterinárias. **Boletim APAMVET**, v. 9, n. 3, p. 20-22, 2018. Disponível em: <[www.publicacoes.apamvet.com.br](http://www.publicacoes.apamvet.com.br)>. Acesso em: 8 dez. 2020.
- MICHEL, V.; FONTY, G.; MILLET, L.; BONNEMOY, F.; GOUET, P. H. *In vitro* study of the proteolytic activity of rumen anaerobic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 110, p. 5-10, 1993.
- MILLER, M. E. B.; YEOMAN, C. J.; CHIA, N.; TRINGE, S. G.; ANGLY, F. E.; EDWARDS, R. A.; FLINT, H. J.; LAMED, R.; BAYER, E. A.; WHITE, B. A. 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.
- MORGAVI, D. P.; SAKURADA, M.; MIZOKAMI, M.; TOMITA, Y.; ONODERA, R. Effects of ruminal protozoa on cellulose degradation and the growth of an anaerobic ruminal fungus, *Piromyces* sp. strain OTS1, *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3718-3723, 1994.
- MORGAVI, D. P.; FORANO, E.; MARTIN, C.; NEWBOLD, C. J. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1024-1036, 2010.
- MOSONI, P.; MARTIN, C.; FORANO, E.; MORGAVI, D. P. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic *Ruminococci* and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 3, p. 783-791, 2011.
- MOURTHE, M. H. F.; REIS, R. B.; LADEIRA, M. M.; SOUZA, R. C.; COELHO, S. G.; SATURNINO, H. M. Suplemento múltiplo com ionóforos para novilhos em pasto: consumo, fermentação ruminal e degradabilidade *in situ*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.1, p.129-135, 2011.
- MUKHERJEE, P.; ROY, M.; MANDAL, B. P.; DEY, G. K.; MUKHERJEE, P. K.; GHATAK, J.; TYAGI, A K.; KALE, S. P. Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by

a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. **Nanotechnology**, v. 19, p. 103-110, 2008.

MYER, P. R.; SMITH, T. P.; WELLS, J. E.; KUEHN, L. A.; FREELY, H. C. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. **PLoS One**, v. 10, p. e0129174, 2015.

NAM, I. S.; GARNSWORTHY, P. C. Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 3, p. 551-556, 2007.

NKRUMAH, J. D.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; SCHMID, K.; LI, C.; BASARAB, J. A.; PRICE, M.A.; WANG, Z.; MOORE, S. S. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 145-153, 2006.

NOCEK, J. E. In situ and methods to estimated ruminal protein and energy digestibility: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2051, 1988.

OLIVEIRA, D. M. F. **Síntese e caracterização de óxidos metálicos nanoestruturados e sua utilização em nanocompositos com poli (álcool vinílico)**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 153p. 2009.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal (Microbial diversity in the ecosystem ruminal). **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 8, n. 6, p. 1-12, 2007a.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Fisiologia, manejo e alimentação de bezerras de corte. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v. 10, n. 1, p. 39-48, 2007b.

OLIVEIRA, V. S.; SANTOS, A. C. P.; VALENÇA, R. L. Desenvolvimento e fisiologia do trato digestivo de ruminantes. **Ciência Animal**, v. 29, n. 3, p. 114-132, 2019.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. **Ruminal fermentation**. In: CHURCH, D. C. (Ed.). *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. 5. ed. New Jersey: Englewood, Cliffs, p. 145-171, 1993.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J. **The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences**. In: MARSHALL, K. C. (Ed.). *Advances in Microbial Ecology*, v. 9. Springer, Boston, MA, p. 1-55, 1986.

PAMER, E. G. Resurrecting the intestinal microbiota to combat antibiotic-resistant pathogens. **Science**, v. 352, p. 535-538, 2016.

PASTER, B. J.; RUSSEL, J. B.; YANG, C. M.; CHOW, J. M.; WOESE, C. R.; TANNER, R. Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* and *Clostridium aminophilum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 43, p.107, 1993.

PATRA, A.; PARK, T.; KIM, M.; YU, Z. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v. 8, n. 13, p. 1-18, 2017.

PEDREIRA, M. S.; OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T. T.; PRIMAVESI, O. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistemas de produção de bovinos (Ruminal

methane emission related aspects in cattle production systems). **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 24-32, 2005.

PEDREIRA, M. S.; PRIMAVESI, O. **Aspectos ambientais na bovinocultura**. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de Ruminantes. 2 ed. Jaboticabal: Funep, p. 521-535, 2011.

PETRI, R. M.; SCHWAIGER, T.; PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; FORSTER, R. J.; MCKINNON, J. J.; MCALLISTER, T. A. Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e83424, 2013.

PIROZYNSKI, K. A.; HAWKSWORTH, D. L. **Coevolution of fungi with plants and animals: introduction and overview**. In: PIROZYNSKI, K. A.; HAWKSWORTH, D. L. Coevolution of fungi with plants and animals. London: Academic Press, p. 1-29, 1988.

PORTO, R. C. T.; UCHÔA, P. Z.; PESCHEL, L. T.; JUSTI, B.; KOSLOWSKI, L. A. D.; NOGUEIRA, A. L. Nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas pelo método poliol: caracterização e avaliação da atividade antibacteriana. **Revista Matéria**, v. 22, n. 1, p. e11912, 2017.

PURVES, W. K.; SADAVA, D.; ORIAN, G. H.; HELLER, H. C. **Vida: a ciência da biologia**. 6ª ed - Porto Alegre: Artmed, p. 461-465, 2002.

RAI, M.; YADAV, A.; BRIDGE, P.; GADE, A. **Myconanotechnology: a new and emerging science**. In: Applied Mycology. RAI, M.; BRIDGE, P. D. (Eds.). 14ª ed. Publisher: CAB International New York, p. 258-267, 2009.

RAJENDRAN, D.; THULASI, A.; JASH, S.; SELVARAJU, S.; RAO, S. B. **Synthesis and application of nano minerals in livestock industry**. In: Animal Nutrition and Reproductive Physiology (Recent Concepts). Satish Serial Publishing House, Delhi. p. 517-530, 2013.

RANILLA, M. J.; CARRO, M. D. Diet and procedure used to detach particle-associated microbes from ruminal digesta influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Rusitec fermenters. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 2, p. 537-44, 2003.

RESCH, S.; FARINA, M. C. Mapa do Conhecimento em nanotecnologia no setor agroalimentar. **Revista de Administração Mackenzie**, v. 16, n. 3, p. 51-75, 2015.

REZAEIAN, M.; BEAKES, G. W.; PARKER, D. S. Distribution and estimation of anaerobic zoospore fungi along the digestive tracts of sheep. *Mycological Research*, v. 108, n. 10, p. 1227-1233, 2004.

RIAZI, H.; REZAEI, J.; ROUZBEHAN, Y. Effects of supplementary nano-ZnO on *in vitro* ruminal fermentation, methane release, antioxidants, and microbial biomass. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 43, n. 6, p. 737-746, 2019.

NIGRI, A. C. A.; RIBEIRO, I. C. O.; VIEIRA, E. A.; SILVA, M. L. F.; VIRGÍNIO-JÚNIOR, G. F.; ABRÃO, F. O.; GERASEEV, L. C.; DUARTE, E. R. População de protozoários ruminais em novilhos zebuínos alimentados com ou sem volumoso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p.1339-1345, 2017.

RIBOLDI, B. M. **Nanotecnologia: fundamentos e aplicações**. Departamento de Física - Instituto de Geociências e Ciências Exatas Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 22p. 2009.

RICARD, G.; McEWAN, N. R.; DUTILH, B. E.; JOUANY, J. P.; MACHEBOEUF, D.; MITSUMORI, M.; McINTOSH, F. M.; MICHALOWSKI, T.; NAGAMINE, T.; NELSON, N.; NEWBOLD, C. J.; NSABIMANA, E.; TAKENAKA, A.; THOMAS, N. A.; USHIDA, K.; HACKSTEIN, J. H. P.; HUYNEN, M. A. Horizontal gene transfer from bacteria to rumen ciliates indicates adaptation to their anaerobic, carbohydrates-rich environment. **BMC Genomics**, v. 7, n. 22, 2006.

ROBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. ed. 2, p. 523-632, 1997.

ROEHE, R.; DEWHURST, R. J.; DUTHIE, C. A.; ROOKE, J. A.; McKAIN, N.; ROSS, D. W.; HYSLOP, J. J.; WATERHOUSE, A.; FREEMAN, T. C.; MICK WATSON, M.; WALLACE, R. J. 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. 20, 2016.

RUBINO, F.; CARBERRY, C.; WATERS, S. M.; KENNY, D.; McCABE, M. S.; CREEVEY, C. J. Divergent functional isoforms drive niche specialization for nutrient acquisition and use in rumen microbiome. **The ISME Journal**, v. 11, p. 933-944, 2017.

RUFENER, W. H.; NELSON, W.; WOLIN, M. J. Maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. **Journal of Applied Microbiology**, 1962.

RUSSEL, J. B. **Ecology of rumen microorganisms: energy use**. In: DOBSON, A.; DOBSON, M. Aspect of digestive physiology in ruminants. Ithaca: Comstock Publ. Assoc., p. 74-98. 1988.

RUSSELL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; SNIFFEN, C. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3551-3561, 1992.

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.

SADOWSKI, Z.; MALISZEWSKA, I. H.; GROCHOWALSKA, B.; POLOWCZYK, I.; KOZLECKI, T. Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms. **Materials Science - Poland**, v. 26, n. 2, p. 419-425, 2008.

SALMAN, A. K. D.; PAZIANI, S. F.; SOARES, J. P. G. **Utilização de ionóforos para bovinos de corte**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2006. 20p. (Documentos / Embrapa Rondônia, ISSN 0103-9865; 101).

SANTOS, F.; MENEZES JUNIOR, M.; SIMAS, J.; PIRES, A.; NUSSIO, C. Processamento de grãos de milho e sua substituição parcial por polpa cítrica granulada no desempenho, digestibilidade de nutrientes e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, p. 923-931, 2001.

SAYERS, E. W.; BARRETT, T.; BENSON, D. A.; BOLTON, E.; BRYANT, S. H.; CANESE, K.; CHETVERNIN, V.; CHURCH, D. M.; DICUCCIO, M.; FEDERHEN, S.; FEOLO, M.; FINGERMAN, I. M.; GEER, L. Y.; HELMBERG, W.; KAPUSTIN, Y.; LANDSMAN, D.; LIPMAN, D. J.; LU, Z.; MADDEN, T. L.; MADEJ, T.; MAGLOTT, D. R.; MARCHLER-BAUER, A.; MILLER, V.; MIZRACHI, I.; OSTELL, J.; PANCHENKO, A.; PHAN, L.; PRUITT, K. D.; SCHULER, G. D.; SEQUEIRA, E.; SHERRY, S. T.; SHUMWAY, M.; SIROTKIN, K.; SLOTTA, D.; SOUVOROV, A.; STARCHENKO, G.; TATUSOVA, T. A.; WAGNER, L.; WANG, Y.; WILBUR, W. J.; YASCHENKO, E.; YE, J. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. D38-51, 2011.

SCHADER, C.; MULLER, A.; SCIALABBA, N. E. H.; HECHT, J.; ISENSEE, A.; ERB, K. H.; SMITH, P.; MAKKAR, H. P. S.; KLOCKE, P.; LEIBER, F.; SCHWEGLER, P.; STOLZE, M.; NIGGLI, U. Impacts of feeding less food-competing feedstuffs to livestock on global food system sustainability. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 12, n. 113, e:20150891, 2015.

SCHÄREN, M.; DRONG, C.; KIRI, K.; RIEDE, S.; GARDENER, M.; MEYER, U.; HUMMEL, J.; URICH, T.; BREVES, G.; DÄNICKE, S. Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2765-2783, 2017.

SCHMITT, E.; FONTOURA JR., J. A.; ZIGUER, E. A.; MENEZES, L. M.; ROCKENBACH, T.; ROSA, F. T. **Nutrição de Ruminantes**. In: Série NUPEEC Produção Animal - Bovinocultura de Corte, Edition: 2ª, Chapter: Nutrição de Ruminantes, 2011.

SCOLLAN, N. D.; GREENWOOD, P. L.; NEWBOLD, C. J.; YÁÑEZ RUIZ, D. R.; SHINGFIELD, K. J.; WALLACE, R. J.; HOCQUETTE, J. F. Future research priorities for animal production in a changing world. **Animal Production Science**, v. 51, p. 1-5, 2011.

SESHADRI, R.; LEAHY, S. C.; ATTWOOD, G. T.; TEH, K. H.; LAMBIE, S. C.; COOKSON, A. L.; ELOE-FADROSH, E. A.; PAVLOPOULOS, G. A.; HADJITHOMAS, M.; VARGHESE, N. J.; PAEZ-ESPINO, D.; HUNGATE1000 PROJECT COLLABORATORS; PERRY, R.; HENDERSON, G.; CREEVEY, C. J.; TERRAPON, N.; LAPEBIE, P.; DRULA, E.; LOMBARD, V.; RUBIN, E.; KYRPIDES, N. C.; HENRISSAT, B.; WOYKE, T.; IVANOVA, N. N.; KELLY, W. J. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 359-367, 2018.

SHABAT, S. K.; SASSON, G.; DORON-FAIGENBOIM, A.; DURMAN, T.; YAACOBY, S.; BERG MILLER, M. E.; WHITE, B. A.; SHTERZER, N.; MIZRAHI, I. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. **The ISME Journal**, v. 10, p. 2958-2972, 2016.

SHATKIN, J. A. **Nanotechnology: Health and Environmental Risks**. 20 ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2013.

SHI, L.; XUN, W.; YUE, W.; ZHANG, C.; REN, Y.; LIU, Q.; WANG, Q.; SHI, L. Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 163, n. 2-4, p. 136-142, 2011.

SHI, W.; MOON, C. D.; LEAHY, S. C.; KANG, D.; FROULA, J.; KITTELMANN, S.; FAN, C.; DEUTSCH, S.; GAGIC, D.; SEEDORF, H.; KELLY, W. J.; ATUA, R.; SANG, C.; SONI, P.; LI, D.; PINARES-PATINO, C. S.; McEWAN, J. C.; JANSSEN, P. H.; CHEN, F.; VISEL, A.; WANG, Z.; ATTWOOD, G. T.; RUBIN, E. M. Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. **Genome Research**, v. 24, p. 1517-1525, 2014.

SINGH, N. A. Nanotechnology Innovations, Industrial Applications and Patents. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, p. 185-191, 2017.

SIROHI, S. K.; PANDEY, N.; SINGH, B.; PUNIYA, A. K. Rumen methanogens: A review. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 253-262, 2010.

SOUZA, F. O. **Metagenômica de vírus presentes em rúmen de bovinos leiteiros**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2015.

- STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. **The rumen bacteria**. In: The Rumen Microbial Ecosystem. 2 Ed. HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Eds.), London: Blackie Academic, p. 10-72, 1997.
- STEWART, R. D.; AUFFRET, M. D.; WARR, A.; WISER, A. H.; PRESS, M. O.; LANGFORD, K. W.; LIACHKO, I.; SNELLING, T. J.; DEWHURST, R. J.; WALKER, A. W.; ROEHE, R.; WATSON, M. Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic sequencing of the cow rumen. **Nature Communications**, v. 9, n. 870, p. 1-11, 2018.
- STEWART, R. D.; AUFFRET, M. D.; WARR, A.; WALKER, A. W.; ROEHE, R.; WATSON, M. Compendium of 4,941 rumen metagenome-assembled genomes for rumen microbiome biology and enzyme discovery. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 953-961, 2019.
- STEENBAKKERS, P. J. M.; IRVING, J. A.; HARHANGI, H. R.; SWINKELS, W. J. C.; AKHMANOVA, A.; DIJKERMAN, R.; JETTEN, M. S. M.; VAN DER DRIFT, C.; WHISSTOCK, J. C.; OP DEN CAMP, H. J. M. A serpin in the cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. **Mycological Research**, v. 112, n. 8, p. 999-1006, 2008.
- SWAIN, R. A.; NOLAN, J. V.; KLIEVE, A. T. Natural Variability and Diurnal Fluctuations within the Bacteriophage Population of the Rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 994-997, 1996.
- SWAIN, P. S.; RAO, S. B. N.; RAJENDRAN, D.; DOMINIC, G.; SELVARAJU, S. Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: A review. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 134-141, 2016.
- SWAIN, P. S.; RAJENDRAN, D.; RAO, S. B. N.; DOMINIC, G. Preparation and effects of nano mineral particle feeding in livestock: A review. **Veterinary World**, v. 8, n. 7, p. 888-891, 2015.
- TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; SILVA-HUGHES, A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n.6, p. 2351-2382, 2017.
- TALEBIAN, N.; ZAVVARE, H. S. H. Enhanced Bactericidal Action of SnO<sub>2</sub> Nanostructures Having Different Morphologies Under Visible Light: Influence of Surfactant. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, p. 66-73, 2013.
- TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; RUSSEL, J. B. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. **Journal of Animal Science**, v.78, n. 6, p. 1648-1658, 2000.
- TEIXEIRA, J. C. **Nutrição de ruminantes**. Curso de Pós-Graduação *Latu Sensu* (Especialização) à distância: Produção de Ruminantes, Lavras: UFLA/ FAEPE, 182p. 2001.
- THOMAS, M.; WEBB, M.; GHIMIRE, S.; BLAIR, A.; OLSON, K.; FENSKE, G. J.; FONDER, A. T.; CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; BRAKE, D.; SCARIA, J. Metagenomic characterization of the effect of feed additives on the gut microbiome and antibiotic resistome of feedlot cattle. **Scientific Reports**, v. 7, n. 12257, p. 1-13, 2017.
- THULASI, A.; RAJENDRAN, D.; JASH, S.; SELVARAJU, S.; LY, J. U.; JOSE, V.; VELUSAMY, S. **Nanobiotechnology in Animal Nutrition**. In: SAMPATH, K. T.; GHOSH, J.; BHATTA, R. (Eds.). Satish Serial Publishing House, New Delhi, p. 499-515, 2013.

UNITED NATIONS. World Population Prospects 2019: Highlights. Department of Economic and Social Affairs Population Division. United Nations New York, 2019. 46 p. Disponível em: <[https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019\\_Highlights.pdf](https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf)> Acesso em: 17 dez. 2020.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. **Fermentação ruminal**. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de Ruminantes. 2 ed. Jaboticabal: Funep, p. 161-191, 2011.

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

VIDIC, J.; MANZANO, M.; CHANG, C. M.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. **Veterinary Research**, v. 48, n. 1, p. 11, 2017.

VIEIRA, L. M. R. **Classificação taxonômica de procariotas com base em sequências simuladas do gene 16S rRNA**. Dissertação (Mestrado em Bioinformática e Biologia Computacional) - Faculdade de Ciências Departamento de Biologia Animal, Universidade de Lisboa, Portugal, 139p. 2017.

WALLACE, R. J.; ROOKE, J. A.; MCKAIN, N.; DUTHIE, C. A.; HYSLOP, J. J.; ROSS, D. W.; WATERHOUSE, A.; WATSON, M.; ROEHE, R. The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. **BMC Genomics**, v. 16, n. 839, p. 1-14, 2015.

WALSH, D. A.; DOOLITTLE, W. F. The real 'domains' of life. **Current Biology**, v. 15, ed. 7, p. R237-R240, 2005.

WANG, M. Q.; XU, Z. R. Effect of chromium nanoparticle on growth performance, carcass characteristics, pork quality and tissue chromium in finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 17, p. 1118-1122, 2004.

WANG, M. Q.; WANG, C.; DU, Y. J.; LI, H.; TAO, W. J.; YE, S. S.; HE, Y. D.; CHEN, S. Y. Effects of chromium-loaded chitosan nanoparticles on growth, carcass characteristics, pork quality, and lipid metabolism in finishing pigs. **Livestock Science**, v. 161, p. 123-129, 2014.

WEIMER, P. J.; STEVENSON, D. M.; MERTENS, D. R.; THOMAS, E. E. Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 135-145, 2008.

WEIMER, P. J.; STEVENSON, D. M.; MANTOVANI, H. C.; MAN, S. L. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5902-5912, 2010.

WEIMER, P. J. Redundancy, resilience and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. **Frontiers in Microbiology**, n. 6, p. 1-16, 2015.

WEIMER, P. J.; COX, M. S.; VIEIRA DE PAULA, T.; LIN, M.; HALL, M. B.; SUEN, G. 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, p. 7165-7182, 2017.

WFP (2020). **World Food Programme Hunger Map**. Rome, Italy. Disponível em: <<https://www.wfp.org/publications/hunger-map-2020>>. Acesso em: 17 dez. 2020.

WHITEHOUSE, N. L.; OLSON, V. M.; SCHWAB, C. G.; CHESBRO, W. R.; CUNNINGHAM, K. D.; LYKOS, T. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1335-1343, 1994.

WILKINS, R. J.; MINSON, D. J. The effects of grinding, supplementation and incubation period on cellulose digestibility *in vitro* and its relationship with cellulose and organic matter digestibility *in vivo*. **Journal of Agricultural Science**, v. 74, p. 445-451, 1970.

WILLIAMS, A. G. Rumen Holotrich Ciliate Protozoa. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 1, p. 25-49, 1986.

WILLIAMS, A. G.; JOBLIN, K. N.; FONTY, G. **Interactions between the rumen chytrid fungi and other microorganisms**. In: MOUNTFORT, D. O., ORPIN, C. G. (Eds.). Anaerobic fungi: biology, ecology and function. New York: Marcel Dekker, Cap. 7, p. 191-228, 1994.

WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. **The rumen protozoa**. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Eds.). The Rumen Microbial Ecosystem. Springer, Dordrecht, 1997.

WORLDOMETER. **World Population Clock: 7.8 Billion People**. 2020. Disponível em: <<https://www.worldometers.info/world-population/>>. Acesso em: 17 dez. 2020.

YOKOYAMA, M. T.; JOHSON, K. A. **Microbiologia del rumen e intestino**. In: CHURCH, C. D. El Rumiante: Fisiología Digestiva e Nutrición. Zaragoza: Acribia, p.137-157, 1988.

XIA, Y.; KONG, Y.; SEVIOUR, R.; YANG, H. E.; FORSTER, R.; VASANTHAN, T.; McALLISTER, T. In situ identification and quantification of starch-hydrolyzing bacteria attached to barley and corn grain in the rumen of cows fed barley-based diets. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 8, fiv077, p. 1-11, 2015.

ZHA, L. Y.; ZENG, J. W.; CHU, X. W.; MAO, L. M.; LUO, H. J. Efficacy of trivalent chromium on growth performance, carcass characteristics and tissue chromium in heat-stressed broiler chicks. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p.1782-1786, 2009.

ZAHEER, R.; LAKIN, S. M.; POLO, R. O.; COOK, S. R.; LARNEY, F. J.; MORLEY, P. S.; BROOKER, C. W.; HANNON, S. J.; DOMSELAAR, G. V.; READ, R. R.; McALLISTER, T. A. Comparative diversity of microbiomes and Resistomes in beef feedlots, downstream environments and urban sewage influent. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 197, p. 1-17, 2019.





**Embrapa**

---

*Gado de Corte*



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO

