

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

Bárbara Cunha Padilha Antonio

“COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA DA MICROBIOTA DE FEZES DE BOVINOS DE CORTE (*BOS INDICUS*) E SUAS IMPLICAÇÕES SOBRE O GANHO DE PESO: UMA COMPARAÇÃO ENTRE CONDIÇÕES DE PASTO E CONFINAMENTO.”

Orientadora: Luciana Correia de Almeida Regitano

Coorientadora: Tainã Figueiredo Cardoso da Cruz

São Carlos

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

Bárbara Cunha Padilha Antonio

“COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA DA MICROBIOTA DE FEZES DE BOVINOS DE CORTE (*BOS INDICUS*) E SUAS IMPLICAÇÕES SOBRE O GANHO DE PESO: UMA COMPARAÇÃO ENTRE CONDIÇÕES DE PASTO E CONFINAMENTO.”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientação: Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano

Coorientação: Dra. Tainã Figueiredo Cardoso

São Carlos

2024

FOLHA DE APROVAÇÃO

BÁRBARA CUNHA PADILHA ANTONIO

COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA DA MICROBIOTA DE FEZES DE BOVINOS DE CORTE (*BOS INDICUS*) E SUAS IMPLICAÇÕES SOBRE O GANHO DE PESO: UMA COMPARAÇÃO ENTRE CONDIÇÕES DE PASTO E CONFINAMENTO.

Dissertação de mestrado apresentada junto ao programa de pós-graduação de genética evolutiva e biologia molecular para obtenção do título de Mestre.

Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 30 de agosto de 2024.

Orientadora:

**Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano
EMBRAPA Pecuária Sudeste**

Coorientadora:

**Dra. Tainã Figueiredo Cardoso
EMBRAPA Pecuária Sudeste**

Examinadora:

**Dra. Jéssica Moraes Malheiros
Instituto de Zootecnia - Sertãozinho**

Examinadora:

**Dra. Priscila Silva Neubern de Oliveira
Universidade Federal de São Carlos/ EMBRAPA Pecuária Sudeste**

Dedico este trabalho a Dona Terezinha, que, mesmo após cinco anos, se faz presente todos os dias, permitindo que eu alcance meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano e Dra. Tainã Figueiredo Cardoso da Cruz, cuja sabedoria e paciência lapidaram este sonho. Em suas palavras e auxílio encontrei meu caminho e o convite ao novo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAPESP e ao CNPq, pelo auxílio necessário para a obtenção de todos os dados utilizados neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e à Universidade Federal de São Carlos pelo conhecimento. À EMBRAPA Pecuária Sudeste por fornecer a estrutura necessária para realização da pesquisa.

À Associação Brasileira de Criadores de Zebu e todos os colaboradores da prova intitulada “Carne de qualidade”, que nos permitiram a realização da pesquisa.

À minha mãe, Ana Carolina Cunha Padilha, que sustentou e nutriu cada passo desse sonho comigo. Seus gestos e incentivo foram terra fértil para eu persistir. Devo a você a força que me fez avançar quando o cansaço pesou.

À minha tia, Dra. Adriana Cunha Padilha, minha maior inspiração enquanto profissional e pessoa, a qual teceu em mim a vontade de trilhar meu caminho junto à ciência e ao conhecimento.

Às minhas primas, Beatriz Padilha, Maria Ligia e minha tia Amanda Padilha, que viveram cada passo comigo desde pequenas e podem hoje, mesmo às vezes de longe, compartilhar realizações. Ao Nelson que me possibilita todos os dias me especializar e investir na minha carreira.

Aos amigos Jéssica Perboni, Julia Scanavachi, Lucas Tomazella, Gabriel Caetano, Vitor Muzel, Lorryni Barbosa, Fernanda Siani e Flávia Joele, companheiros de caminhada desde a graduação, que compartilharam risos, lágrimas, desafios e conquistas. Nos encontros e desencontros, no calor das conversas e no apoio mútuo, encontrei conforto e renovação.

Aos amigos Jacqueline Cardoso, Nathan Eugeni, Gianluca Pugliese, Tiago Botassin, Milena Ghidini, Milena Vieira, Sabrina Marques, Giovanna Silva e Isabela Freitas, os quais estiveram

comigo em muitos momentos de felicidade, dores ao longo dessa jornada e tornaram tudo mais leve e tranquilo. A vida é bem melhor com vocês.

Aos meus companheiros de laboratório, amigos que dividem no dia a dia esse desejo comigo, Wanderson Anjos, Jiannine, Gabriel Alexander, Juliana Virginio, Liliane Conteville, Adriana Ibelli, Jennifer Bruscadin, Juliana Afonso, Aline e Priscila. Com vocês tudo se tornou mais fácil.

À vida e a natureza, que me acolheram em suas entranhas e em seus ciclos, onde vi refletidos os ritmos da vida e da ciência. Entrelaçaram os fios do destino, me banharam de alguns dias incertos, lembrando-me sempre de onde reside a força para prosseguir: o amor.

Com isso, faço meu final e maior agradecimento à Dona Terezinha Catarina Cunha Padilha, o grande e maior amor da minha vida. Lembro-me e celebro todos os dias dos quais pude estar em sua presença. Espero que de onde ela estiver, ela possa se orgulhar de mim. Meu amor por você é eterno, Dona Terezinha.

Que minha jornada continue, guiada pelo conhecimento, embalada pela serenidade e enraizada no amor.

A todos, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Este projeto visou investigar a diversidade e abundância de microrganismos nas fezes de zebuínos brasileiros em dois momentos: de recria a pasto e ao término do confinamento, bem como sua associação com o fenótipo de ganho médio diário (GMD). Para isso, foram utilizadas amostras fecais de 85 tourinhos Nelores, as quais foram coletadas, maceradas e extraídas para posterior sequenciamento (plataforma Illumina PE250). Pares de conjuntos de primers específicos para amplificação da região 16S, v3-v4 (metabarcoding) de Bactéria e Archaea foram usados. Para processamento e análise de dados, o QIIME 2 foi utilizado. As sequências brutas foram agrupadas em Amplicon Sequence Variants (ASVs), usando o plugin DADA2, e foram anotadas e comparadas. A base de dados SILVA versão 138.1 foi utilizada para atribuição taxonômica. Os dados foram analisados estatisticamente para identificar diferenças na estrutura e na diversidade microbiana ao longo dos tempos em estudo e analisar seu impacto no fenótipo de ganho médio diário. Segundo o índice de Shannon, a diversidade bacteriana foi significativamente maior durante o período de pastejo na estação seca em comparação com a estação chuvosa e período de confinamento (valor de $p \leq 0,05$, teste de Wilcoxon). Já a diversidade de Archaea foi maior durante as estações seca e chuvosa em comparação ao período de confinamento (valor de $p \leq 0,05$, teste de Wilcoxon). A análise de escala multidimensional não métrica (NMDS), usando a distância de Bray-Curtis, revelou uma separação distinta de amostras de cada período para bactérias, tendo o período da estação chuvosa apresentado maior semelhança com o período de confinamento. Em contraste, para Archaea, a análise de diversidade beta mostrou um maior agrupamento e maior similaridade de amostras em todos os três períodos. Os filos dominantes na comunidade Archaea foram *Euryarchaeota*, *Thermoplasmatota* e *Halobacterota*, sendo *Euryarchaeota* o único filo presente no período de confinamento. Os filos bacterianos mais abundantes foram *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria* e *Actinobacteriota*. Notavelmente, houve uma diferença significativa na abundância de *Proteobacteria* e *Bacteroidota* entre a estação seca e outros períodos, sendo *Bacteroidota* mais abundante e *Proteobacteria* menos abundante durante a estação seca. Na análise de associação, obtiveram-se seis ASVs de Archaea e quatro de Bactérias no período de águas associadas com o baixo GMD, enquanto para alto GMD foram dez ASVs de Bactérias e uma de Archaea. No confinamento, oito ASVs de bactérias foram associadas a baixo GMD, enquanto treze ASVs de Bactérias e duas de Archaea foram associadas a alto GMD. No período de seca, quatro ASVs de Bactérias e uma de Archaea foram relacionadas com o baixo GMD, enquanto seis ASVs de Bactérias e seis de Archaea

estiveram associadas com o alto GMD. Esses resultados destacam a abundância relativa dos táxons mais frequentes, alinhada ao conceito de microbioma *core*, e maior diversidade alfa durante a seca. As análises de associação das ASVs com o GMD identificaram *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae* e *Rikenellaceae* como principais bactérias associadas, e *Methanobrevibacter* como principal táxon de Archaea, com efeitos positivos e negativos no fenótipo.

Palavras - chave: microbioma, ganho médio diário, diversidade, pastejo, manejo alimentar.

ABSTRACT

This project aimed to investigate the diversity and abundance of microorganisms in the feces of Brazilian zebu cattle at two time points: during pasture rearing and at the end of confinement, as well as their association with the average daily gain (ADG) phenotype. To achieve this, fecal samples from 85 Nelore bulls were collected, homogenized, and extracted for subsequent sequencing (Illumina PE250 platform). Pairs of specific primer sets were used for the amplification of the v3-v4 region (metabarcoding) of Bacteria and Archaea. QIIME 2 was employed for data processing and analysis. The raw sequences were grouped into Amplicon Sequence Variants (ASVs) using the DADA2 plugin and were annotated and compared with the QIIME2 software. The SILVA database version 138.1 was used for taxonomic assignment. The data were statistically analyzed to identify differences in microbial structure and diversity over the study periods and to examine their impact on the average daily gain phenotype. According to the Shannon index, bacterial diversity was significantly higher during the dry season grazing period compared to the rainy season and confinement period ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test). In contrast, Archaea diversity was higher during the dry and rainy seasons compared to the confinement period ($p \leq 0.05$, Wilcoxon test). Non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis, using Bray-Curtis distance, revealed a distinct separation of samples from each period for bacteria, with the rainy season showing greater similarity to the confinement period. In contrast, for Archaea, beta diversity analysis showed a higher clustering and greater similarity of samples across all three periods. The dominant phyla in the Archaea community were Euryarchaeota, Thermoplasmata, and Halobacterota, whilst Euryarchaeota was the only phylum present during the confinement period. The most abundant bacterial phyla were Firmicutes, Bacteroidota, Proteobacteria, and Actinobacteriota. Notably, there was a significant difference in the abundance of Proteobacteria and Bacteroidota between the dry season and other periods, with Bacteroidota being more abundant and Proteobacteria less abundant during the dry season. In the association analysis, six ASVs of Archaea and four of Bacteria were associated with low ADG during the rainy season, while ten ASVs of Bacteria and one of Archaea were associated with high ADG. In confinement, eight ASVs of Bacteria were associated with low ADG, while thirteen ASVs of Bacteria and two of Archaea were associated with high ADG. During the dry season, four ASVs of Bacteria and one of Archaea were related to low ADG, while six ASVs of Bacteria and six of Archaea were associated with high ADG.

Keywords: *Bos indicus*, microbiome, average daily gain, pasture rearing, confinement.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Descrição geral da metodologia empregada.....	19
Figura 2. Comparação da Alfa diversidade de Bactérias (A) e Archaea (B) identificadas nas fezes de bovinos Nelore (<i>Bos indicus</i>) coletadas em três períodos (Pastagem-seca(Dry); Pastagem-águas(Rainy); Confinamento(Feedlot) baseada no índice de Shannon -Wiener e na diversidade observada. ns, não significativa; ***P < 0.001, ****P < 0.0001.....	26
Figura 3. Beta diversidade de bactérias em que se compara a dissimilaridade entre os três períodos (seca, águas e confinamento).....	27
Figura 4. Beta diversidade de Archaea em que se compara a dissimilaridade entre os três períodos (seca, águas e confinamento).....	27
Figura 5. PCoA plot da beta diversidade (Weighted Unifrac) de Bactérias em que se compara a dissimilaridade entre os três períodos (seca, águas e confinamento).....	28
Figura 6. PCoA plot da beta diversidade (Weighted Unifrac) de Archaea em que se compara a dissimilaridade entre os três períodos (seca, águas e confinamento).....	28
Figura 7. Abundância relativa de bactérias por filos.....	30
Figura 8. Abundância relativa de Archaea.....	31
Figura 9. Abundância diferencial de Archaea ao nível de Filo utilizando Wilcoxon test. ns, não significativa; ***P < 0.001, ****P < 0.0001.....	32
Figura 10. Abundância diferencial de Bactérias ao nível de Filo aplicando-se Wilcoxon test. ns, não significativa; ***P < 0.001, ****P < 0.0001.....	33
Figura 11. Associação do ganho médio diário (GMD) de bovinos Nelore com as variantes de sequências de amplicons (ASVs) de Archaea das fezes no período de Águas. Apenas ASVs que tiveram associações significativas com o referido fenótipo (FDR < 0,05) são apresentadas. Baixo e Alto GMD correspondem a valores de beta negativos e positivos, respectivamente.....	34
Figura 12. Associação do ganho médio diário (GMD) de bovinos Nelore com as variantes de sequências de amplicons (ASVs) de Archaea das fezes no período de confinamento. Apenas ASVs que tiveram associações significativas com o referido fenótipo (FDR < 0,05) são	

representadas. Baixo e Alto GMD correspondem a valores de beta negativos e positivos, respectivamente.....34

Figura 13. Associação do ganho médio diário (GMD) de bovinos Nelore com as variantes de sequências de amplicons (ASVs) de Archaea das fezes no período de seca. Apenas ASVs que tiveram associações significativas com o referido fenótipo ($FDR < 0,05$) são representadas. Baixo e Alto GMD correspondem a valores de beta negativos e positivos, respectivamente..35

Figura 14. Associação do ganho médio diário de bovinos Nelore com as variantes de sequências de amplicons (ASVs) de bactérias das fezes no período de águas. Apenas ASVs que tiveram associações significativas com o referido fenótipo ($FDR < 0,05$). Baixo e Alto GMD correspondem a valores de beta negativos e positivos, respectivamente.....36

Figura 15. Associação do ganho médio diário de bovinos Nelore com as variantes de sequências de amplicons (ASVs) de Bactérias das fezes no período de Confinamento. Apenas ASVs que tiveram associações significativas com o referido fenótipo ($FDR < 0,05$). Baixo e Alto GMD correspondem a valores de beta negativos e positivos, respectivamente.....36

Figura 16. Associação do ganho médio diário de bovinos Nelore com as variantes de sequências de amplicons (ASVs) de Bactérias das fezes no período de Seca. Apenas ASVs que tiveram associações significativas com o referido fenótipo ($FDR < 0,05$). Baixo e Alto GMD correspondem a valores de beta negativos e positivos, respectivamente.....37

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
SUMÁRIO.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 A bovinocultura no Brasil e os bovinos da raça Nelore (Bos indicus).....	14
2.2 A diferença da produção de bovinos a pasto, confinamento e suas implicações.....	16
2.3 O microbioma: conceitos e aplicações.....	17
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	18
3.1 Hipótese.....	19
3.2 Objetivos.....	19
3.2.1 Geral.....	19
3.2.2 Específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Delineamento experimental, manejo dos animais e as características analisadas.....	20
4.2 Coleta de amostras.....	22
4.3 Metabarcoding.....	22
4.3.1 Extração e amplificação de DNA.....	22
4.4. Análises de diversidades e abundância.....	24
5. RESULTADOS.....	26
5.1 Diversidade Alfa e beta.....	26
5.2 Abundância relativa e diferencial entre os períodos estudados.....	29
5.3 Associação com o fenótipo de ganho médio diário por modelo de regressão linear misto.....	33
6. DISCUSSÃO.....	37
6.1 Variação da estrutura do microbioma frente a condições ambientais distintas.....	37
6.2 A associação do ganho médio diário com os diferentes períodos de coleta.....	39
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

O microbioma é composto por uma vasta comunidade de microrganismos, que interagem de forma complexa, desempenhando um papel primordial na saúde, no desempenho e na adaptação de *Bos indicus* a diferentes ambientes. O entendimento de como a microbiota pode variar em diferentes condições ambientais e de nutrição pode fornecer importantes esclarecimentos sobre as tais interações entre a comunidade microbiana intestinal desses ruminantes, o ambiente que estão expostos e com seu hospedeiro. Para tal, este trabalho buscou analisar a diversidade da microbiota fecal em bovinos Nelore, os quais estiveram envolvidos na Programa “ZEBU CARNE DE QUALIDADE”, organizado pela Associação Brasileiro de Criadores de Zebu de 2020 a 2021, em três diferentes períodos de estudo, sendo esses: a pasto na época de seca, a pasto na época de águas e em confinamento. É essencial salientar que a maioria dos estudos com bovinos é feito em confinamento, tipo de manejo em que as variáveis e a coleta de dados são notoriamente mais controláveis, portanto esta pesquisa apresenta como diferencial os dados de períodos em que os animais estavam a pasto e em três períodos distintos.

Sendo assim, a proposta desse trabalho almeja impactar a pecuária de corte e os programas de melhoramento genético animal, visto que pode facilitar as análises de microbioma de forma mais rotineira, com uso das mostras fecais. Para acessar a comunidade microbiana dos animais, o uso de amostras de fezes mostra-se efetiva, além de ser de mais fácil acesso e menos invasivo que outros métodos, tal como a fistulação ruminal.

O microbioma foi associado ao fenótipo de ganho médio diário (GMD) porque essa foi a característica que pôde ser obtida nas três diferentes condições ambientais, diferente de outros fenótipos que temos sua medição apenas no confinamento como, por exemplo, o consumo alimentar residual.

Com tais dados, pôde-se traçar o perfil taxonômico da microbiota desses animais desde o período pós-desmama até o término em confinamento, possibilitando explorar tais interações e buscar biomarcadores de desempenho a pasto e indicadores precoces do desempenho em confinamento para medida de ganho de peso. Para traçar tal perfil da microbiota fecal, utilizou-se o sequenciamento “metabarcoding”.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A bovinocultura no Brasil e os bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*)

O Brasil possui o segundo maior rebanho de bovinos do mundo (18% do rebanho efetivo mundial) e o maior rebanho comercial. Desta forma, a bovinocultura ocupa lugar de destaque no contexto do agronegócio (MALAFAIA *et al*, 2019), sendo responsável por cerca de 10% do PIB do país em 2023 (ABIEC, 2023).

Grande parte do rebanho encontra-se na região Centro-Oeste (35%), seguida, nessa ordem, pelas regiões Norte, Sul, Nordeste e Sudeste, ocupando uma área de pastagem de cerca de 169 milhões de hectares (MALAFAIA *et al*, 2019). O gado de corte no Brasil é composto, primordialmente, por raças zebuínas (*Bos indicus*), sendo aproximadamente 80% composto por Nelore e anelorados, segundo dados da ABCZ (Associação Brasileira dos Criadores de Zebu) (ABCZ, 2024).

No final do século XIX e início do século XX, os primeiros bovinos da raça Nelore chegaram ao Brasil, sendo os critérios para escolha dessa raça: o acabamento de carcaça, a necessidade de mercado e a agilidade de crescimento em período menor (SANTOS, 2017). Dessa forma, os atuais objetivos da produção de Puros de Origem (PO) estão relacionados conforme as demandas do mercado, sendo necessário o trabalho em conjunto a programas de melhoramento genético, com intuito de melhorar o desempenho nas características produtivas e reprodutivas dos animais.

Como tratado por Euclides Filho (2007), a maior exigência dos consumidores, o aumento da preocupação com o bem-estar animal e com a conservação ambiental, assim como as disputas de mercado pressionam o setor da agropecuária a uma maior eficiência, particularmente no âmbito da produção de carne bovina. Nesse cenário, reduzir o tempo do abate e aumentar a velocidade de ganho em peso são características essenciais na produção do Nelore (MARQUES, 2018). Para oferecer carne de qualidade e em demanda suficiente, a fim de suprir as necessidades do mercado, têm sido implantados projetos de melhoramento cada vez mais avançados, resultando em sistemas produtivos altamente técnicos (SOUZA, *et al* 2011).

Atualmente, o conceito de produto de qualidade no mercado não é vinculado apenas por propriedades intrínsecas ao produto final, mas sim a um produto com qualidade observável em todas as suas fases, assim como na cadeia produtiva, sendo mais eficaz, mais competitivo, produzido de forma sustentável, de modo que haja o respeito perante o meio

ambiente e todas as suas consequências, além de ser uma atividade justa e economicamente viável (EUCLIDES FILHO, 2007).

Indo ao encontro das novas demandas contemporâneas, historicamente pode-se observar diversos esforços advindos de programas de melhoramento genético animal, os quais, aliados com o avanço da tecnologia e da ciência, auxiliaram no enriquecimento genético dos bovinos de corte, possibilitando distinguir e realçar características alvo para melhoramento como: ganho em peso, habilidade materna e precocidade sexual (MARQUES, 2018). Também pode-se considerar importante nesse sentido a seleção de características como número de filhos por reprodutor, resistência a parasitas e qualidade da carne, também de interesse para os programas de melhoramento animal (EUCLIDES FILHO, 2009). Tendo em vista a diversidade de fenótipos a serem melhorados, faz-se importante que diferentes áreas do conhecimento trabalhem em conjunto para o desenvolvimento e tragam soluções, as quais fomentem uma seleção que viabilize: a alteração na curva de crescimento, na ingestão de alimentos, aumente a taxa de maturidade e diminua a taxa metabólica.

Nesse sentido, a Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ) instituiu um programa intitulado “Carne de qualidade”, o qual almeja avaliar o sistema nacional de produção de carne bovina por meio da medição do diferencial econômico do uso da genética zebuína na cadeia produtiva. Tal projeto é conduzido na Fazenda Experimental da ABCZ - Orestes Prata Tibery Júnior, no município de Uberaba–MG (ABCZ, 2024).

Tais aspectos avaliados devem contribuir para uma maior eficiência dos sistemas de produção, considerando que atualmente a nutrição animal pode representar cerca de 80% dos gastos dos produtores, o que influencia diretamente na rentabilidade. Dessa forma, dependendo do sistema praticado, a alimentação pode ser determinante para a eficiência da produção (MAGNABOSCO *et al*, 2020).

No contexto da eficiência alimentar, torna-se importante salientar que os ruminantes possuem um dos maiores ecossistemas estudados, o microbioma, responsável pela digestão da matéria orgânica no trato gastrointestinal desses animais. Os microrganismos possuem papel fundamental na eficiência alimentar, ganho de peso, desempenho fisiológico e produção de gases de efeito estufa (PUNIYA *et al*, 2015). Assim, a capacidade de degradação e absorção dos nutrientes pode variar dependendo de quais microrganismos compõem o microbioma, o que pode impactar na produtividade dos animais e pode ser levado em conta por programas de melhoramento (WALLACE *et al*, 2015).

2.2 A diferença da produção de bovinos a pasto, confinamento e suas implicações.

Quando se refere à pecuária de corte, pode-se dividir sua produção em três fases: cria, recria e engorda ou terminação. A cria compreende a reprodução e o crescimento de bezerras até a desmama. A recria ocorre da desmama até o momento em que se inicia o período de reprodução ou a engorda dos machos (MALAFAIA *et al*, 2019). Ademais, a pecuária é dividida em sistemas de produção, os quais são caracterizados conforme os níveis tecnológicos e o grau de investimento utilizado, sendo: o intensivo - onde se tem o maior emprego de recursos e tecnologias como uso de concentrados, minerais, manejo mais complexo e uso maior do confinamento; o semi-intensivo - onde se adotam alguns recursos como alimentação balanceada e sal mineral; e o extensivo - onde se usam grandes áreas e há pouca adoção de tecnologias (BATISTELLI *et al*, 2022). Em relação ao confinamento, prática de manejo muito utilizada na terminação dos animais, mas também podendo ser utilizada como estratégia de recria, é uma prática que se dá a partir da delimitação dos bovinos em lotes com determinada área por animal e provimento de alimentação em cochos (BATISTELLI *et al*, 2022).

Sobre o ganho de peso, os bovinos em confinamento ganham peso mais rapidamente, visto que recebem uma dieta balanceada à base de grãos e suplementos, o que garante um ciclo de engorda mais curto, porém este manejo apresenta alguns desafios como: custos mais altos, dependência de insumos, geração de resíduos e emissão de metano (ARAUJO FILHO *et al*, 2019). Em termos de qualidade de carne, os animais terminados em confinamento têm um melhor rendimento porque possuem carcaças com mais acabamento. Além disso, animais advindos da terminação em pastejo possuem uma coloração mais escura, por conta da quantidade de exercício físico, que aumenta a mioglobina em seu músculo e também sofrem menos estresse pré-abate por serem habituados ao manejo, o que torna sua carne diferente dos animais terminados a pasto, os quais possuem a carne de cor escura, textura firme e que retém muita água (BRIDI, 2011).

No entanto, a pecuária nacional está baseada na criação de bovinos em áreas de pastagem de gramíneas tropicais, caracterizadas por menor valor nutricional do que as pastagens de clima temperado (SBRISSIA *et al*, 2017), sendo que cerca de 86% dos animais abatidos em 2019 eram provenientes de criação a pasto (ABIEC, 2020), contudo a maioria das informações sobre microbioma de bovinos se refere às condições de confinamento, onde a alimentação possui alto valor energético. Dessa forma, o presente trabalho traz uma inovação que é os dados provenientes de animais criados a pasto.

2.3 O microbioma: conceitos e aplicações

É primordial ao se tratar de ruminantes o entendimento da fisiologia e anatomia do trato gastrointestinal desses animais. Os ruminantes são mamíferos herbívoros com vários compartimentos gástricos (poligástricos), onde encontramos três pré-estômagos (rúmen, retículo e omaso) e o estômago verdadeiro (abomaso). Nos primeiros compartimentos, temos a predominância da “digestão microbiana”, de forma que, por uma relação simbiótica com microrganismos fermentadores, os animais conseguem obter energia e compostos nitrogenados a partir de carboidratos fibrosos (DE OLIVEIRA, 2007).

O rúmen é um ambiente favorável ao crescimento de microrganismos, possibilitando, por meio deste processo, a utilização de diversos alimentos para geração de nutrientes. Sabe-se que este local é dinâmico, podendo sofrer interferência de mudanças ambientais e de dieta. Ao mesmo tempo, tem-se grande estabilidade na população, já que o meio possui parâmetros equilibrados, os quais favorecem a adaptação de certas bactérias, fungos e protozoários, formando a chamada microbiota ruminal (DE OLIVEIRA, 2007).

Em relação às bactérias, essas representam os organismos que possuem a maior diversidade e atividade no metabolismo. São classificadas consoante os produtos e os substratos utilizados no processo de fermentação, sendo a degradação da celulose um dos seus principais papéis (MONÇÃO *et al.*, 2013). Essas podem ser: celulolíticas, amilolíticas, pectinolíticas, metanogênicas, proteolíticas, lipolíticas e lácticas. Em sua maioria, as bactérias celulolíticas degradam a celulose por meio da hidrólise por enzimas celulasas e, ao formar acetato e H₂, garantem o substrato para as outras bactérias, como as metanogênicas (GILIOLI *et al.*, 2017).

O microbioma de ruminantes é responsável pela produção de metano, que é um gás de efeito estufa, o qual advém da fermentação ruminal por meio da redução do substrato H₂ e sua produção causa a perda de parte da energia ingerida pelos animais, podendo representar cerca de 18% da energia bruta. (BRUNES, L., COUTO, V., 2017).

Consoante ao citado anteriormente, sabe-se da importância central do microbioma, visto que, a literatura recente mostra os múltiplos papéis dos microrganismos em seus hospedeiros nas diferentes espécies, estando relacionados com funções fisiológicas, de digestão, como, por exemplo, na degradação de aminoácidos de cadeia curta, de modulação do desenvolvimento pós-natal do sistema imune e neurológico (KHANAL *et al.*, 2021; SABORÍO-MONTERO *et al.*, 2020). Nesse sentido, a comunidade microbiana do rúmen tem predominância dos filos Bacteroidetes, das famílias Prevotellaceae e Rikenellaceae; e

Firmicutes, sendo as famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae as mais representativas (STEWART *et al*, 2019).

É conhecido que os organismos exibem plasticidade fenotípica causada pelas mudanças na expressão gênica, as quais podem ser respostas a mudanças ambientais e nutricionais, possibilitando modificações fenotípicas. Um conhecido fator de alteração nesses padrões é a metilação do DNA, que pode afetar o transcriptoma. Evidências sustentam que os nutrientes podem causar alterações na metilação do DNA (ZHANG, 2015), dessa forma é possível que a microbiota de ruminantes, por estar relacionada com a digestão, ao sofrer variações tenha impacto em tal plasticidade. Isto poderá ser observado neste trabalho, de modo que com a disponibilidade nutricional e a variação causada pela sazonalidade, espera-se que ocorram alterações na microbiota dos animais nos diferentes períodos.

Com o dito anteriormente, pode-se então associar a microbiota com características complexas de interesse do hospedeiro alvo, como eficiência alimentar e emissão de metano, evidenciando, com isso, o conceito de hologenoma, em que se observa que a relação entre o conjunto de microrganismos e seus hospedeiros afeta a aptidão geral, devendo ser considerada para seleção dos fenótipos de interesse (REGITANO; OLIVEIRA; ANDRADE, 2021).

Abordagens meta-ômicas têm permitido o estudo dessas populações de microrganismos, visto que seu cultivo em laboratório é impraticável, devido às condições tão específicas para o desenvolvimento de uma comunidade tão complexa e equilibrada. Entre as abordagens meta-ômicas, a amplificação e o sequenciamento de regiões hipervariáveis do gene codificador de RNA ribossomal - 16S (*metabarcoding*) permite a identificação taxonômica de bactérias e archaea (HEBERT *et al*, 2003), possibilitando a identificação desses microrganismos e sua associação com dietas, períodos e/ou fenótipos de interesse, sendo que neste caso, essa metodologia nos permitiu um número maior de sequenciamento das amostras, considerando que outras abordagens como metagenômica e metatranscriptômica possuem um elevado custo.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Este trabalho buscou, por meio de abordagem meta-ômica, estudar as populações de microrganismos presentes nas fezes de bovinos Nelore (*Bos indicus*) em três períodos de coleta. Os dados metaômicos foram obtidos mediante a amplificação e sequenciamento de regiões hipervariáveis do gene codificador de RNA ribossomal - 16S (*metabarcoding*), permitindo a identificação de táxons de bactérias e archaeas, tendo como hipótese e objetivos:

3.1 Hipótese

A diversidade e a abundância de microrganismos do trato digestivo variam conforme o tipo de manejo nutricional, as diferentes condições ambientais dos bovinos da raça Nelore e possuem influência na característica fenotípica de ganho médio diário.

2.2 OBJETIVOS

3.2.1 Geral

Caracterizar a diversidade e abundância taxonômica de fezes de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) entre dois períodos de recria a pasto (período da seca e das águas) e confinamento e seus efeitos sobre o fenótipo de ganho médio diário, a partir de dados do Experimento “Carne de qualidade” da ABCZ.

3.2.2 Específicos

- Estimar as diversidades alfa e beta do microbioma (Bactérias e archaea) das fezes em dois momentos de recria a pasto e no final do acabamento em confinamento;
- Estimar a abundância relativa e diferencial do microbioma (Bactérias e Archaea) das fezes em dois momentos de recria a pasto e no final do acabamento em confinamento;
- Testar as diferenças entre os componentes do microbioma das fezes em dois momentos da recria a pasto e ao final da terminação em confinamento.
- Associar medidas de abundância relativa à característica de ganho médio diário (GMD).

4. MATERIAL E MÉTODOS

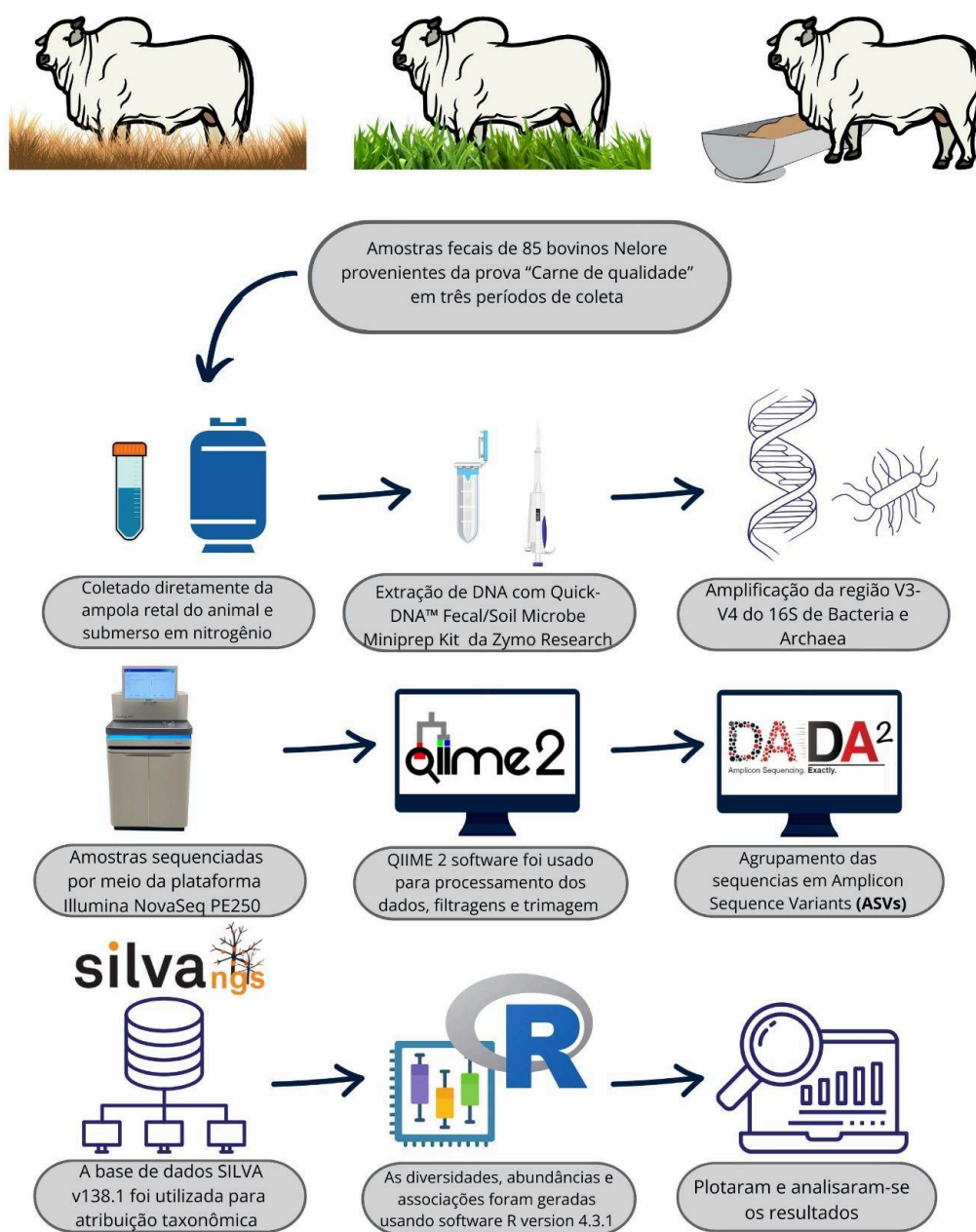


Figura 1: Descrição geral da metodologia utilizada.

4.1 Delineamento experimental, manejo dos animais e as características analisadas

Foram utilizados 85 novilhos Nelore oriundos da prova intitulada “Carne de qualidade” organizada pela ABCZ, desenvolvida no período de Junho de 2020 a Julho de 2021. Os animais possuíam Registro Genealógico de Nascimento na categoria Puro de Origem (PO), ou eram aptos a recebê-lo. Os animais possuíam entre seis e oito meses, tendo peso ajustado a no mínimo 200 quilos aos 210 dias e a avaliação visual que descreve o animal (EPMURAS®) com resultado de no mínimo “Bom”.

Ocorreu também a seleção a partir dos critérios:

1. Bovinos DECA 1 (os 10% melhores animais nas avaliações genéticas) em função da Diferença Esperada na Progenie (DEP) para o peso ao sobreano (18 meses).
2. Bovinos DECA 1 a DECA 4 (os 40% melhores) em função da Diferença Esperada na Progenie para área de olho de lombo (AOL) e acabamento de carcaça (ACAB).

Suplementos proteicos-energéticos específicos foram ofertados a esses animais, para possibilitar os desempenhos planejados. Nos diferentes períodos, a pasto na estação de seca (de 05/08/2020 a 25/11/2020), a pasto na estação de águas (de 23/12/2020 a 17/03/2021) e no confinamento (14/04/2021 a 09/06/2021), as concentrações foram diferentes, destacando que, no período da seca, o suplemento foi de 0,5% do peso animal em matéria seca e o concentrado calculado para proporcionar ganho de peso de 0,6 a 0,7 kg/animal/dia, enquanto no período das águas, foi de 0,4% do peso animal em matéria seca e o concentrado calculado para proporcionar ganho de peso de 0,8 a 0,9 kg/animal/dia. Houve uma adaptação de aproximadamente vinte e oito dias para cada mudança de período. O pasto durante os períodos de seca e águas no qual os animais se alimentaram era composto por gramíneas da espécie *Brachiaria brizantha* (Syn. *Urochloa brizantha*) cv. BRS Paiaguás (GERMIPASTO, 2024). O programa “ZEBU CARNE DE QUALIDADE” da ABCZ, consistiu em uma prova com três etapas, sendo elas:

- 1^a - Prova de ganho de peso a pasto.
- 2^a - Prova de ganho de peso em confinamento e eficiência alimentar.
- 3^a - Abate técnico.

Foram realizadas avaliações para acompanhar o desempenho desses animais, medindo-se o ganho de peso diário (kg/animal/dia), por área (kg PV/ha) e pelo custo de produção da arroba, realizando as pesagens a cada mês (30 dias). Controles de ecto e endoparasitas, além das vacinações de rotina, foram feitos. Neste mesmo período, os animais sujeitaram-se à prova de ganho de peso seguindo a prova zootécnica adotada pela ABCZ. Esta consiste na obtenção de dados de pesagens, ultrassonografia e cálculo de índices descritos a seguir:

1. Escore de Avaliação Visual (tipo) pelo método EPMURAS®, aplicando-se estrutura corporal, precocidade, musculabilidade e aprumos traseiros (EPM (AT));
2. Peso Calculado aos 550 dias de idade (PC550);

3. Ganho em Peso Diário (GPD);
4. Ganho em Peso (GP);
5. Ganho Médio Diário (GMD);
6. Área de Olho de Lombo (AOL);
7. Espessura de Gordura Subcutânea entre a 12^a e 13^a costela (EGS);
8. Na picanha (P8).

Por fim, na terceira e última etapa, no final do confinamento, todos os animais foram submetidos ao abate técnico. Esse procedimento foi realizado em frigorífico comercial juntamente com profissionais da área, seguindo protocolo indicado com adoção de procedimentos antiestresse na condução dos animais do curral de espera à sala de abate e procedimentos de abate humanitário, seguindo as normas do RIISPOA (Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal, 1971).

Para o presente trabalho, apenas dados de GMD foram utilizados, sendo os demais fenótipos objetos de outros estudos conduzidos pelo grupo de pesquisa.

4.2 Coleta de amostras

Amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de cada animal, ao final dos dois períodos de recria a pasto (seca e águas) e ao final do período de confinamento, e foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a – 80 °C.

4.3 Metabarcoding

4.3.1 Extração e amplificação de DNA.

Utilizando-se do kit Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep, extraiu-se o DNA conforme o protocolo padrão Zymo Research¹. Adicionando ≤ 150 mg de amostras fecais aos tubos de lise **ZR BashingBead™ Lysis Tube (0.1 & 0.5 mm)**, as células são quebradas pelo batimento de esferas sem a necessidade da aplicação de proteinases ou desnaturantes orgânicos. O lisado foi submetido a sucessivas filtrações, o DNA, então, lavado, eluído e removido, remanescendo o DNA total ultra-puro. A estrutura da comunidade microbiana fecal desses animais foi acessada utilizando o sequenciamento de Metabarcoding do sinal

¹ Protocolo padrão ZYMO RESEARCH, para acesso:
<http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/91/d6010i.pdf>

filogenético do gene codificante do RNA ribossomal (rRNA) de Bactérias e Archaea (porção 16S). Um fragmento do gene rRNA (regiões V3-V4) por volta de 420 pares de bases, incluindo os primers, foi amplificado. As amplificações foram feitas em triplicatas e homogeneizadas para que distorções de amplificação fossem evitadas (HENDERSON et al., 2015). Foram utilizadas as sequências de primers, apresentadas na Tabela 1.

Para a quantificação da concentração de DNA, usou-se Qubit High Sensitivity dsDNA Assay (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 1. Iniciadores utilizados na amplificação dos genes codificadores de RNA ribossomal 16S.

Iniciador	Alvo	Sequência	Referências
Bakt_341F	Bactérias	5' CCTACGGGNGGCWGCAG 3'	Herlemann <i>et al.</i> , 2011
Bakt_805R	Bactérias	5' GACTACHVGGGTATCTAATCC 3'	Herlemann <i>et al.</i> , 2011
Parch 519f	Archaea	5' CAGCCGCCGCGGTAA 3'	Ovreås <i>et al.</i> , 1997
Arch915r	Archaea	5' GTGCTCCCCCGCCAATTCCT 3'	Coolen <i>et al.</i> , 2004

4.3.2 Preparo de bibliotecas e sequenciamento

A preparação e o sequenciamento das bibliotecas de DNA foram realizados pela AllGenetics & Biology SL (www.allgenetics.eu). Para a construção de bibliotecas multiplexadas de *amplicons* do gene codificador 16s rRNA (Bactéria e Archaea), seguiram-se as recomendações do padrão descrito pelo kit *Illumina* para bibliotecas de sequências *paired-end*. As amostras foram sequenciadas no equipamento NovaSeq PE250. Os dados brutos gerados consistiram em leituras diretas (R1) e reversas (R2) e foram armazenados em arquivos separados no formato FASTQ.

4.3.3 Processamento e pré-análise de sequências

Para processamento das sequências, um arquivo manifesto foi criado contendo o ID da exemplar e o caminho para as sequências forward e reverse de cada amostra, possibilitando importar os dados para o software QIIME 2 (BOLYEN et al., 2018), o qual foi utilizado para

todo o processamento das sequências. As sequências passaram por trimagem para retirar os primers forward e reverse por meio do plugin Cutadapt versão 2023.9.0 (Martin, 2011), e a qualidade (>Q25) dessas foi avaliada pelo pipeline do software DADA2 (*Divisive Amplicon Denoising Algorithm*) (CALLAHAN et al., 2016), que utiliza as sequências para a construção de bins de alta qualidade, combinando e agrupando as sequências brutas em Amplicon Sequence Variants (ASVs). Por outro lado, as sequências quiméricas e singletons foram excluídas utilizando este mesmo algoritmo.

As ASVs são unidades taxonômicas de *amplicons*, sendo definidas por sequências únicas obtidas por sequenciamento do DNA, e representam a sequência mais precisa de um *amplicon*, sem utilizar a similaridade como fator de agrupamento. Foram geradas mediante o DADA2, que usa a relação entre as taxas de erro nas leituras de sequenciados pela Illumina e a qualidade das sequências para mesclar as *reads*, permitindo maior precisão na análise (CALLAHAN et al., 2016).

4.3.4 Identificação taxonômica de ASVs

As ASVs foram atribuídas a grupos taxonômicos, por meio de um classificador treinado especificamente para região alvo frente ao banco de dados SILVA 138.1 para sequências de 16s rRNA de Bactérias e de Archaea (QUAST et al., 2012). Utilizando esse classificador dentro do software QIIME2, obtiveram-se como arquivos de saída: as sequências, as tabelas com informações sobre estas e a taxonomia atribuída às sequências. Tais arquivos foram baixados e migrados para ambiente R, utilizando o *software* RStudio versão +386, para que as etapas posteriores fossem executadas em tal ambiente, por meio dos pacotes QIIME2R e Phyloseq (MCMURDIE, Paul J.; HOLMES, Susan, 2012). Tais pacotes facilitaram a manipulação dos dados, permitindo gerar curvas de rarefação para cada conjunto de dados (Bactéria e Archaea) e utilizá-las para a padronização (normalização) dos dados.

4.4. Análises de diversidades e abundância

A tabela total das ASVs identificadas foi utilizada em análises posteriores, como, por exemplo, a determinação de diversidades Alfa (Observada e índice de Shannon - Wiener), Beta (Weighted Unifrac), abundância relativa, abundância diferencial e análises de associação.

A diversidade observada é a contagem de espécies presente em uma comunidade, quanto maior o número de espécies maior a diversidade. Já diversidade Alfa medida pelo índice de Shannon, utiliza-se tanto a riqueza (número de espécies) quanto a distribuição das espécies (equitabilidade) o valor aumenta a medida que a contagem de espécies aumenta e sua distribuição se torna mais equilibrada (LEMOS, 2011).

Em relação à Beta diversidade, a qual mede a diversidade entre habitats (dissimilaridade) foram utilizados dois índices: distância de Bray-Curtis, a qual mede a diferença na abundância de espécies entre duas comunidades e a distância Weighted Unifrac, que compara as diferenças entre comunidades considerando a presença ou ausência de táxons incorporando dados filogenéticos, medindo por meio da proporção das ramificações filogenéticas únicas em cada comunidade (BECK, J., HOLLOWAY, J., SCHWANGHART, W.; 2013).

As diferenças na estrutura da comunidade microbiana ao longo do tempo (períodos) foram identificadas pelo contraste das diversidades alfa e beta empregando o teste estatístico Wilcoxon pareado. Análises de componentes principais (PCoA) com a distância Weighted Unifrac foram feitas com o pacote phyloseq, além de também utilizarmos a Escala Multidimensional Não Métrica (NMDS) com a distância Bray-curtis, visando identificar variáveis que estratificam as amostras.

A abundância relativa ao nível de filo e família também foi gerada, além da abundância diferencial ao nível de família, empregando o Wilcoxon teste para certificar a significância estatística das diferenças taxonômicas entre os períodos de coleta. Para a abundância diferencial, apenas os oito filos bacterianos mais abundantes foram considerados, porque quando analisados mais filos, foi visto que eram filos pouco abundantes e dificultava a análise.

4.4.2 Análise de associação entre os componentes do microbioma nos três períodos de produção com o fenótipo de ganho médio diário

Para análise de associação com o fenótipo de ganho médio diário (GMD, kg), foi utilizado um filtro de prevalência, considerando apenas as ASVs presentes em mais de 20% dos animais. A associação entre a razão logarítmica centrada (CLR) das contagens das ASVs e dos fenótipos de GMD foi realizada por meio do pacote do R lme4qtl (ZIYATDINOV et al. 2018), por meio do teste de modelos. O modelo simples (m1) incluiu a idade como efeito

fixo. O modelo completo (m2) incluiu, além dos fatores descritos no modelo simples, a razão logarítmica centrada (CLR) das contagens de cada ASV:

m1: Fenótipo (GMD) ~ Idade + erro residual

m2: Fenótipo (GMD) ~ CLR (ASV) + Idade + erro residual

Para contraste dos modelos m1 e m2 foi feito um teste de verossimilhança, permitindo investigar a influência das ASVs na variação do fenótipo estudado, e o limite de significância para os modelos foi ajustado usando correção para múltiplos testes por meio da taxa de descoberta falsa (FDR).

5. RESULTADOS

Os dados geraram saída de 32 gigabases de dados brutos, representando uma média de 170.000 reads brutos por amostra para Archaea e 112.000 para Bactérias. Na maior parte dos casos, 100.000 sequências de *amplicons* são o suficiente para a caracterização satisfatória de um microbioma, que possibilita a identificação dos organismos presentes e as diversidades (MYER et al., 2015a; SHANKS et al., 2011).

5.1 Diversidade Alfa e beta

Para Bactérias (Figura 2A), a diversidade alfa observada mostrou-se significativamente diferente entre os períodos de seca e águas e os períodos de seca e confinamento ($p\text{-value} \leq 0.05$, Wilcoxon test). Entre o período de águas e confinamento não houve diferença significativa. A diversidade alfa observada mostrou-se significativamente diferente ($p\text{-value} \leq 0.05$, Wilcoxon test) entre os três períodos para as Archaea (Figura 2B).

Baseado no índice de diversidade de Shannon-Wiener pode-se observar uma maior diversidade de bactérias (Figura 2A) durante o período de pastejo na estação seca em comparação com a estação chuvosa e com o período de confinamento ($p\text{-value} \leq 0.05$, Wilcoxon test). Com relação as Archaea, o índice de diversidade de Shannon revelou que a diversidade (Figura 2B) foi maior durante as fases a pasto, estações seca e chuvosa, em relação ao confinamento ($p\text{-value} \leq 0.05$, Wilcoxon test).

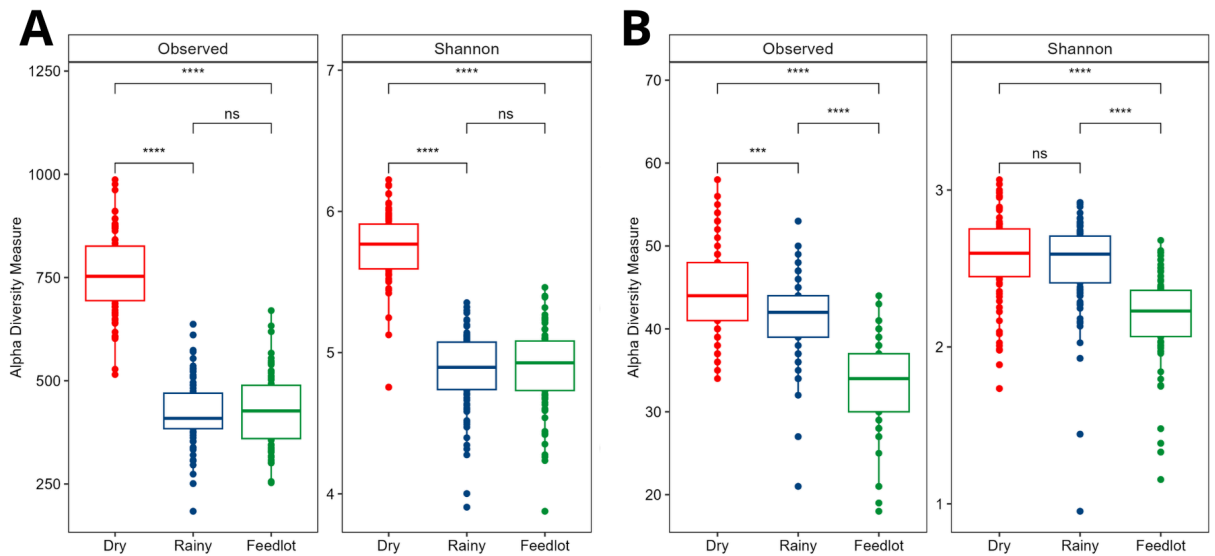


Figura 2. Comparação da Alfa diversidade de Bactérias (A) e Archaea (B) identificadas nas fezes de bovinos Nelore (*Bos indicus*) coletadas em três períodos (Pastagem-seca (Dry); Pastagem-águas (Rainy); Confinamento (Feedlot) baseada no índice de Shannon -Wiener e na diversidade observada. ns, não significante; ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

A diversidade beta de Bactérias (Figura 3), utilizando a Escala Multidimensional Não Métrica (NMDS) e a distância de Bray-Curtis, mostrou uma separação do período de seca em relação aos outros períodos, com o período de águas e o confinamento clusterizando mais próximos. No que se refere a Archaea (Figura 4), houve um maior agrupamento e proximidade entre as amostras, estando as amostras dos períodos de pastejo (seca e águas) sobrepostas.

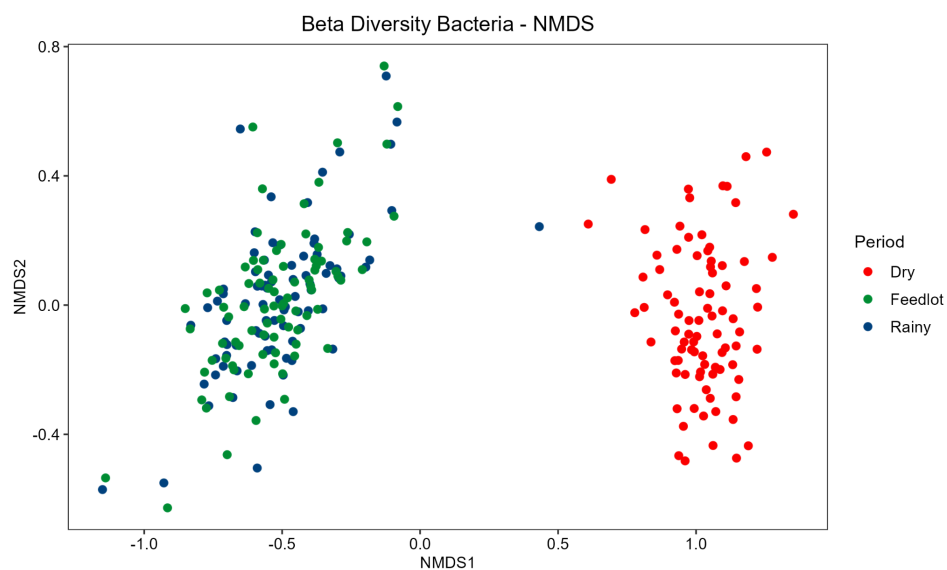


Figura 3. Beta diversidade de bactérias em que se compara a dissimilaridade entre os três períodos (Pastagem-seca (Dry); Pastagem-águas (Rainy); Confinamento (Feedlot)).

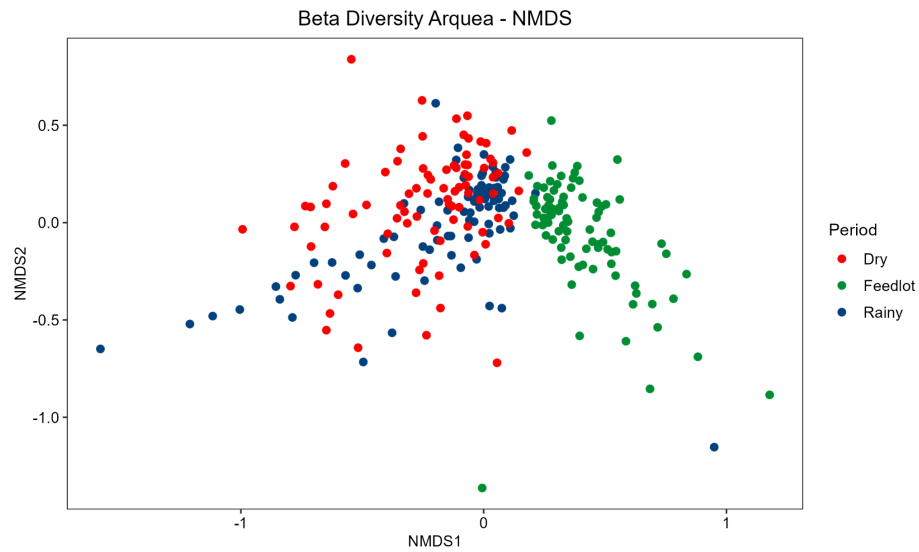


Figura 4. Beta diversidade de Archaea em que se compara a dissimilaridade entre os três períodos (Pastagem-seca (Dry); Pastagem-águas (Rainy); Confinamento (Feedlot)).

A diversidade Beta de Bactérias (Figura 5), utilizando a Análise de Coordenadas Principais e a distância Weighted Unifrac, revelou uma separação entre o período de seca em relação aos outros dois períodos, sendo que as amostras de águas e confinamento ficaram sobrepostas. Já para Archaeas (Figura 6), temos a separação das amostras em grupos distintos, porém com sobreposição entre os três períodos. O confinamento foi o período que apresentou maior clusterização entre suas amostras em relação aos outros.

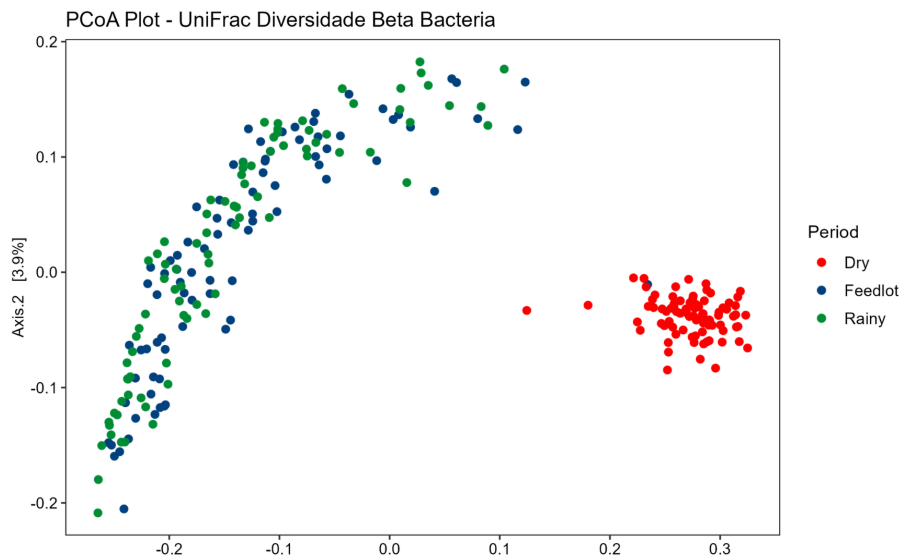


Figura 5. PCoA plot da beta diversidade (Weighted Unifrac) de Bactérias em que se compara a dissimilaridade entre os três períodos (Pastagem-seca (Dry); Pastagem-águas (Rainy); Confinamento (Feedlot)).

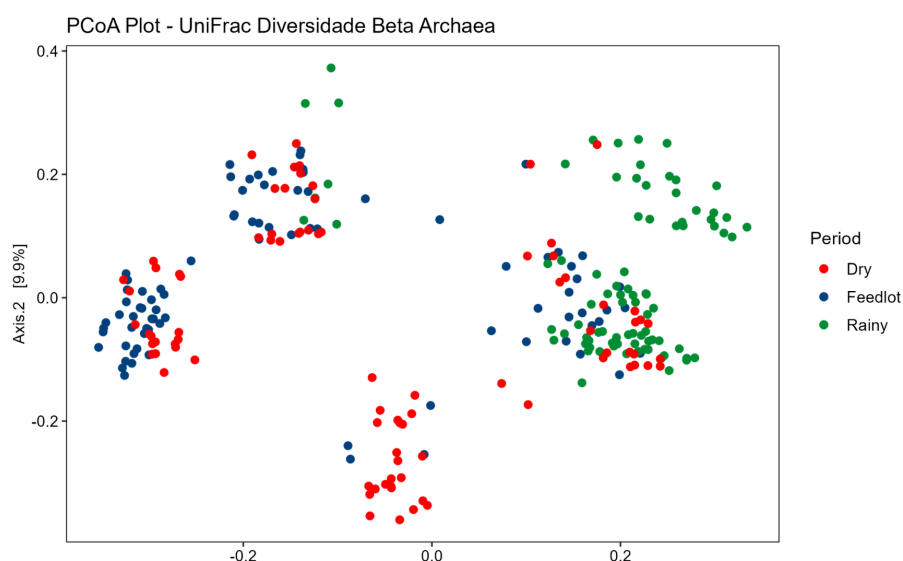


Figura 6. PCoA plot da beta diversidade (Weighted UniFrac) de Archaea em que se compara a dissimilaridade entre os três períodos (Pastagem-seca (Dry); Pastagem-águas (Rainy); Confinamento (Feedlot)).

5.2 Abundância relativa e diferencial entre os períodos estudados

Em relação à abundância relativa de bactérias (Figura 7), temos que os filos mais abundantes nas amostras são: *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria*, *Actinobacteriota* e *Verrucomicrobiota*. Entre os períodos, vê-se uma maior diferença em relação à *Proteobacteria* e *Bacteroidota* no período de seca, em que há maior abundância de *Bacteroidota* e menor de *Proteobacteria* (Figura 7).

Já em relação às Archaea (Figura 8), temos que os filos mais abundantes são: *Euryarchaeota*, *Halobacteriota*, *Thermoplasmatota*. O confinamento é o período mais homogêneo, demonstrando predominância de *Euryarchaeota*. O período de seca possui abundância relativa de *Halobacteriota* maior do que o período de águas, sendo que o período de águas possui maior abundância relativa de *Thermoplasmatota*.

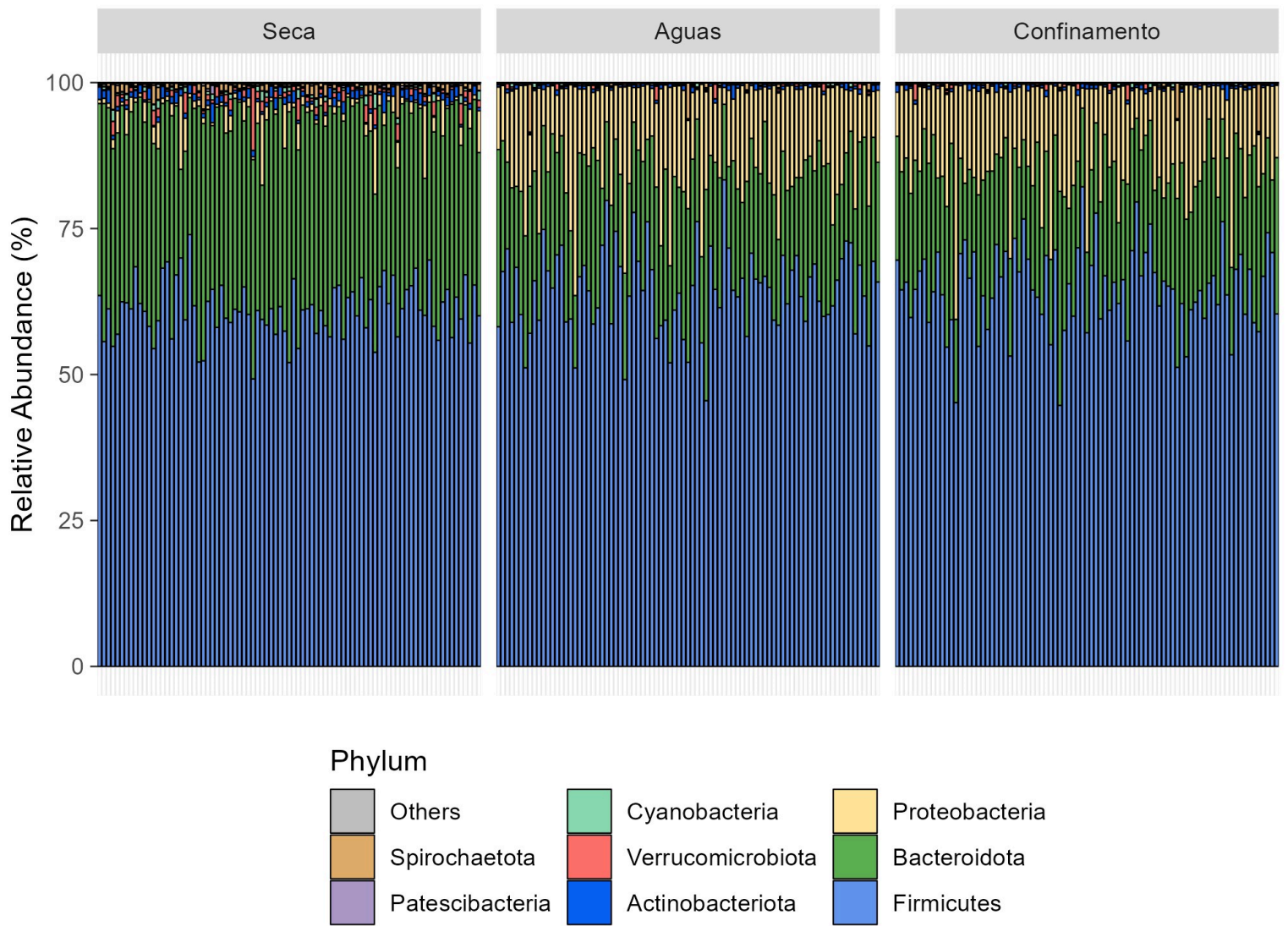


Figura 7. Abundância relativa de Bactérias por filos.

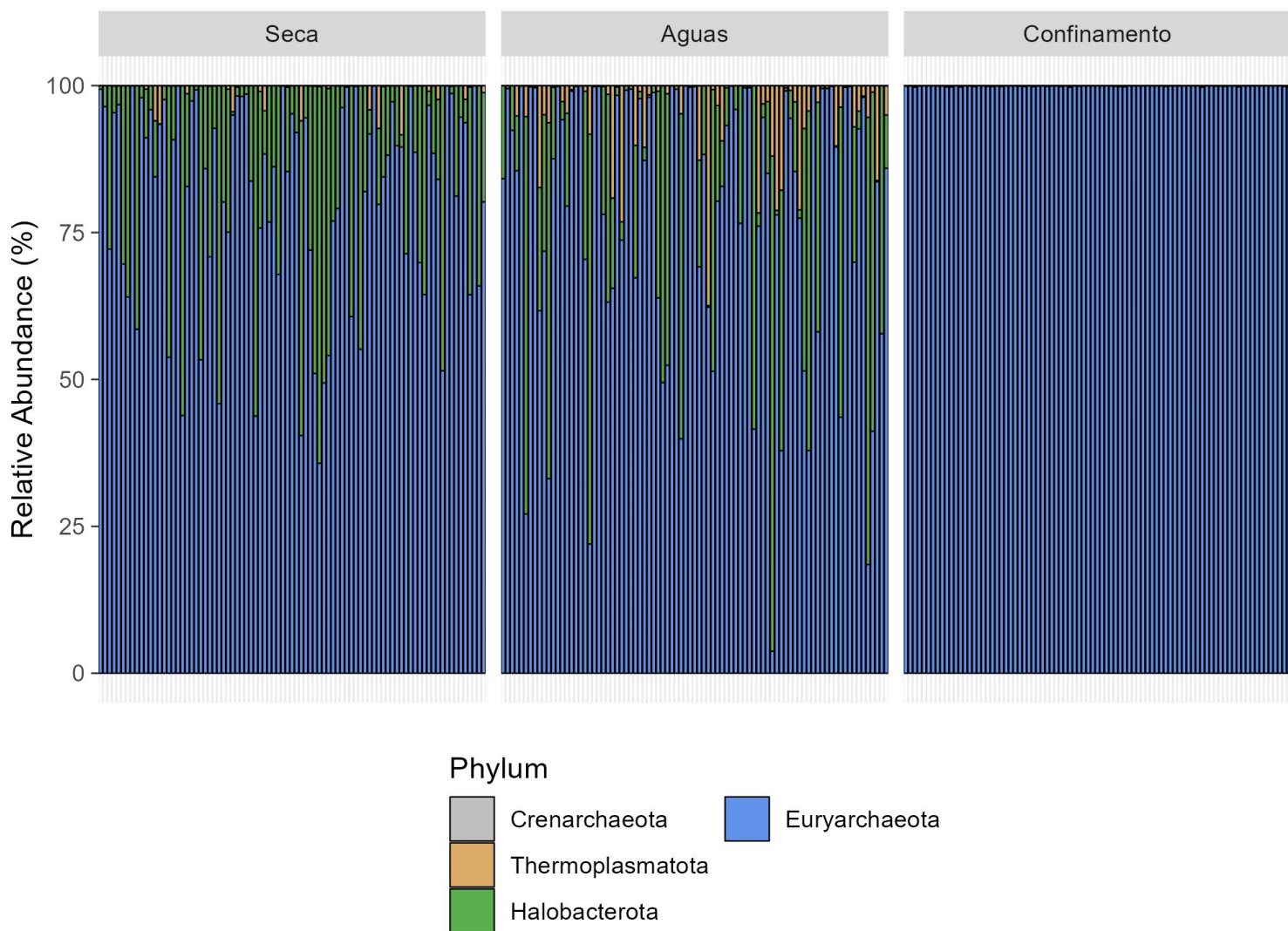


Figura 8. Abundância relativa de Archaea.

Considerando a abundância diferencial de Archaea ao nível de filo (Figura 9), vê-se que houve diferença significativa do filo *Euryarchaeota* entre os períodos de águas e confinamento, e entre seca e confinamento ($p\text{-value} \leq 0.05$, Wilcoxon test). Em relação a *Thermoplasmatota* e *Halobacterota*, houve diferença significativa entre os três períodos ($p\text{-value} \leq 0.05$, Wilcoxon test).

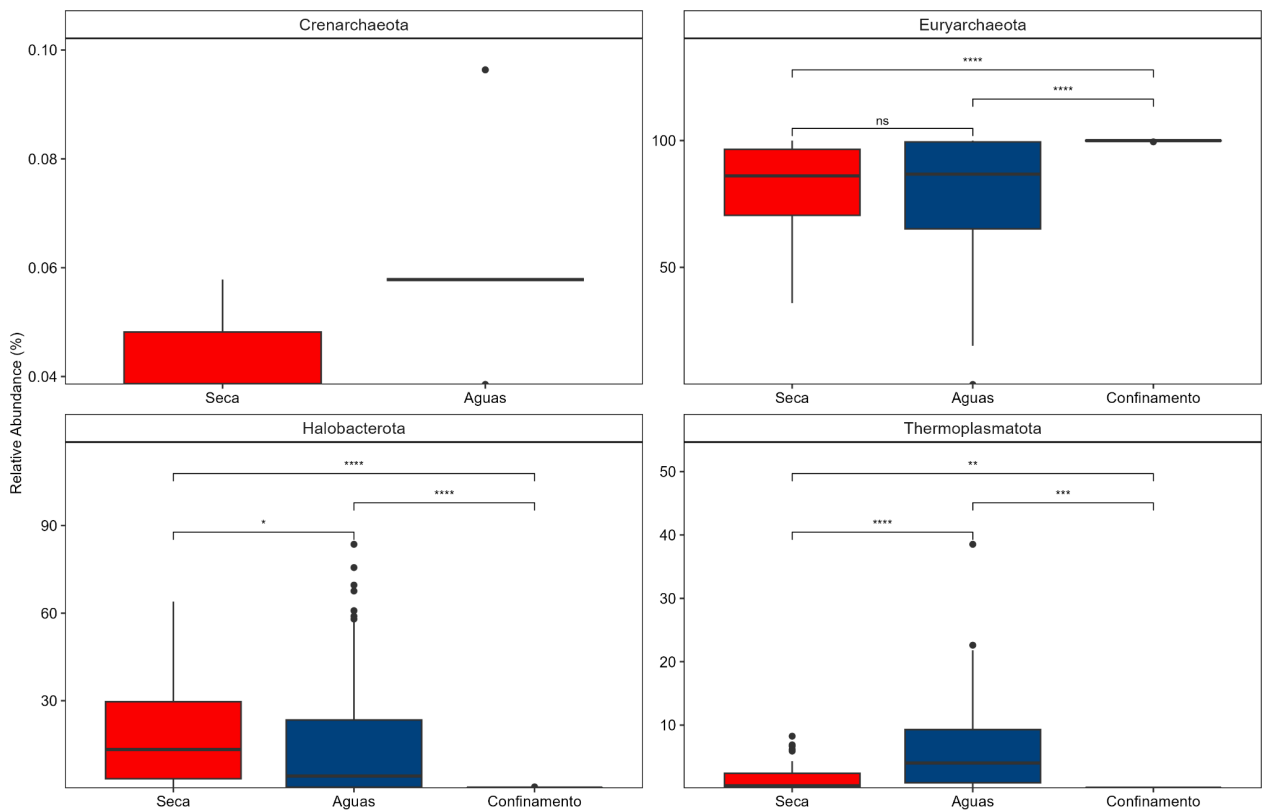


Figura 9. Abundância diferencial de Archaea ao nível de Filo utilizando Wilcoxon test. ns, não significante; ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

Em contrapartida, a abundância diferencial de Bactérias mostrou-se significativamente diferente, ao nível de filo (Figura 10) para *Firmicutes*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetota* e *Verrucomicrobiota* entre os períodos de seca e os outros dois períodos (p-value ≤ 0.05 , Wilcoxon test). Não houve diferença significativa entre os períodos para *Desulfobacterota*, e *Fibrobacterota* esteve presente apenas no período da seca.

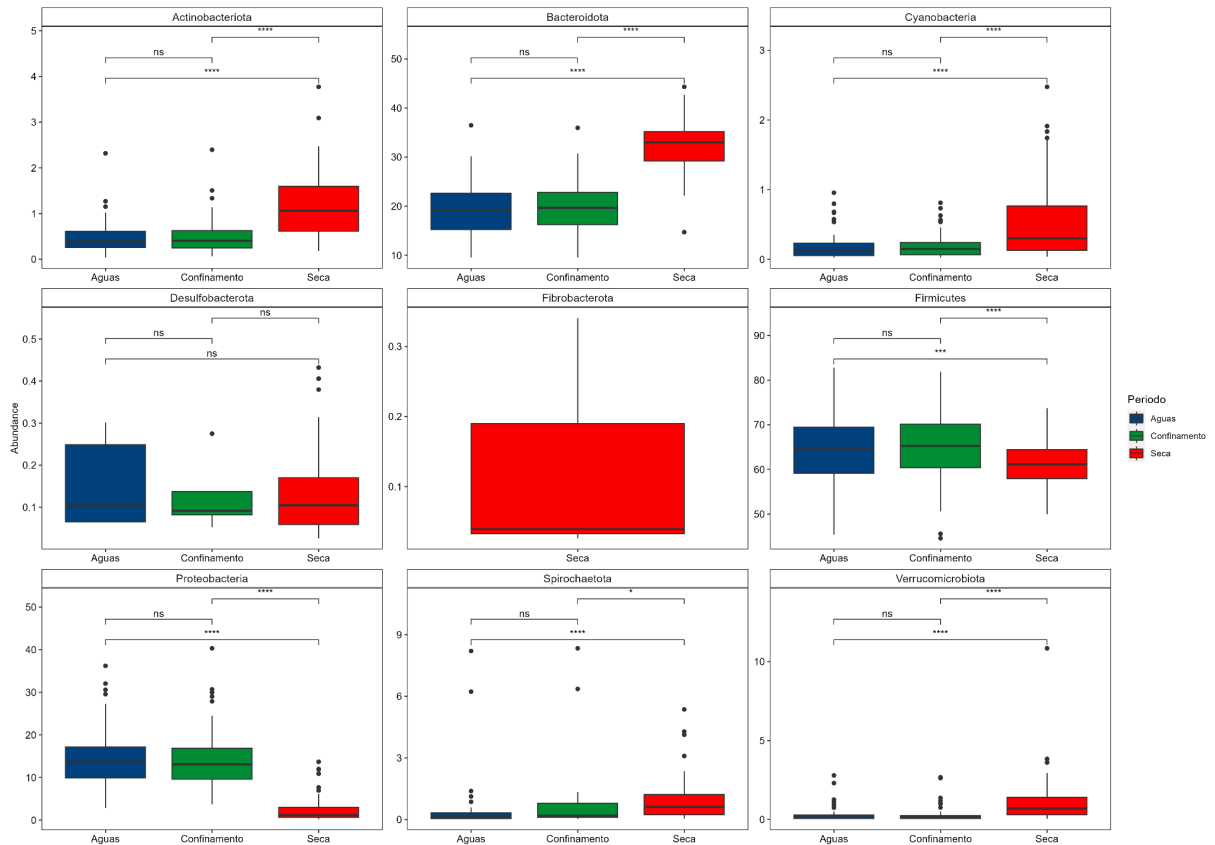


Figura 10. Abundância diferencial de Bactérias ao nível de Filo aplicando-se Wilcoxon test. ns, não significante; ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

5.3 Associação com o fenótipo de ganho médio diário por modelo de regressão linear misto

A análise de associação entre o ganho médio diário e cada ASV de bactérias e archaea foi feita separadamente para cada período, utilizando dados dos 85 animais. A análise para Archaea, no período de águas a pasto, revelou seis ASVs relacionadas à redução do GMD e uma ASV relacionada ao aumento do GMD (Figura 11). No período de confinamento (Figura 12), obteve-se como resultado apenas duas ASVs relacionadas ao aumento do GMD, e para o período de seca foram seis ASVs associadas com maior GMD e uma associada ao menor GMD (Figura 13).

Salienta-se que diferentes ASVs do táxon *Methanobrevibacter* estiveram associadas com a característica de interesse nos três períodos, com efeitos variando entre positivo e negativo para GMD. Já o táxon *Methanosphaera* esteve relacionado com incremento do GMD no período de confinamento e de seca. No período de seca o táxon *Methanoplasma* esteve relacionado com menor GMD e *Methanocorpusculum* com maior GMD.

A ASV_50, do táxon *Methanobrevibacter*, foi associada à redução do GMD tanto nas águas quanto no confinamento.

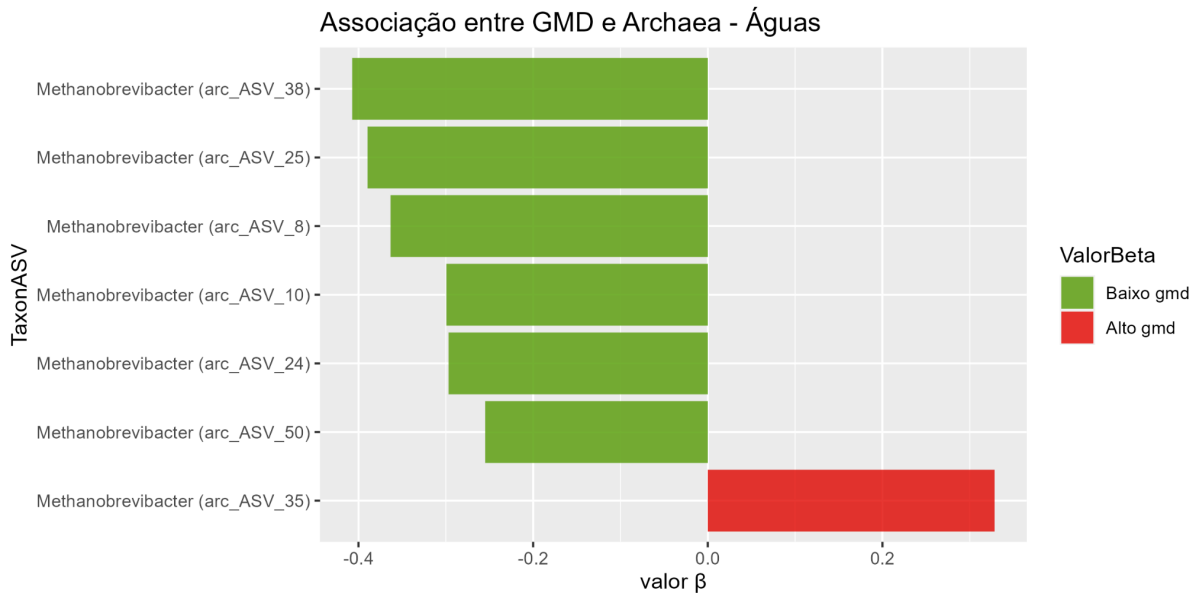


Figura 11: Associação do ganho médio diário (GMD) de bovinos Nelore com as variantes de sequências de amplicons (ASVs) de Archaea das fezes no período de Águas. Apenas ASVs que tiveram associações significativas com o referido fenótipo ($FDR < 0,05$) são apresentadas. Baixo e Alto GMD correspondem a valores de beta negativos e positivos, respectivamente.

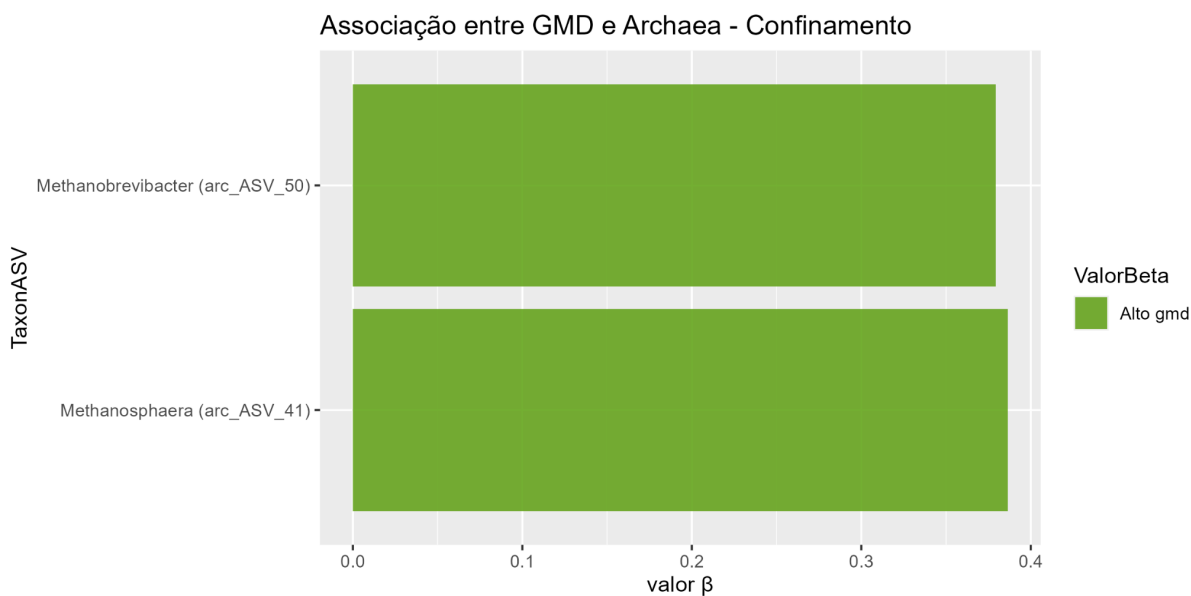


Figura 12. Associação do ganho médio diário (GMD) de bovinos Nelore com as variantes de sequências de amplicons (ASVs) de Archaea das fezes no período de confinamento. Apenas ASVs que tiveram associações significativas com o referido fenótipo ($FDR < 0,05$) são representadas. Baixo e Alto GMD correspondem a valores de beta negativos e positivos, respectivamente.

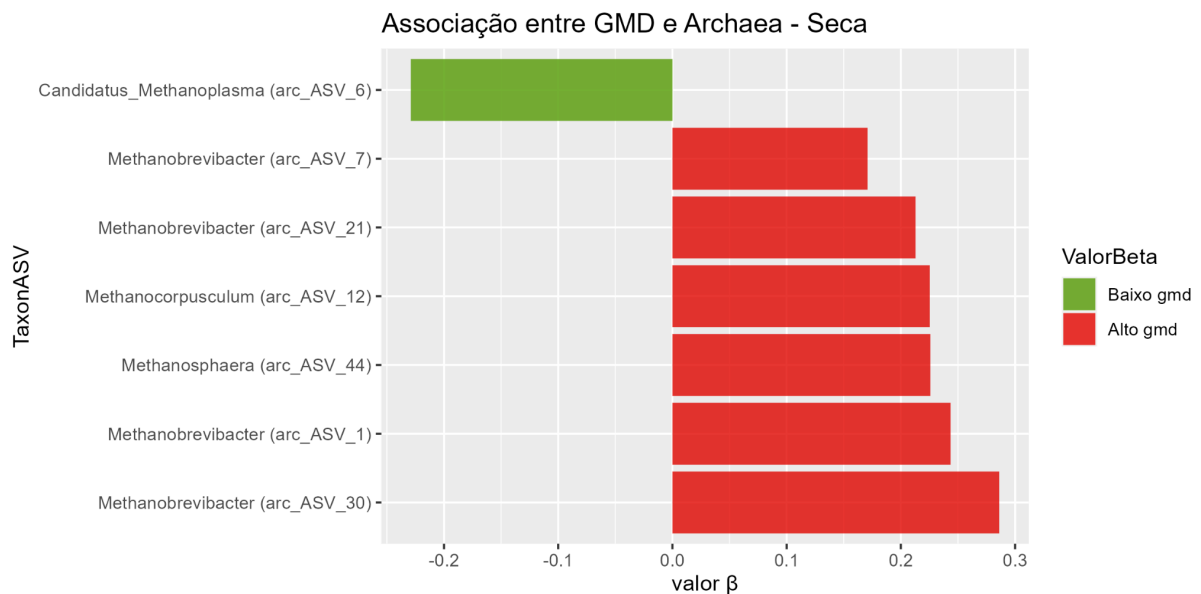


Figura 13: Associação do ganho médio diário (GMD) de bovinos Nelore com as variantes de sequências de amplicons (ASVs) de Archaea das fezes no período de seca. Apenas ASVs que tiveram associações significativas com o referido fenótipo ($FDR < 0,05$) são representadas. Baixo e Alto GMD correspondem a valores de beta negativos e positivos, respectivamente.

Em relação à associação com as ASVs de bactérias, obteve-se como resultado quatro ASVs associadas à redução do GMD no período de águas (Figura 14), oito no período de confinamento (Figura 15) e quatro no período de seca (Figura 16). Para aumento do GMD, no período de águas, dez táxons foram associados (Figura 14), no confinamento, treze (Figura 15) e no período de seca, seis ASVs de bactérias (Figura 16). Para o período de águas (Figura 14), as ASVs do táxon *Oscillospiraceae*, *Gastranaerophilales* e *Lachnospiraceae* estiveram associadas com o baixo GMD. Já ASVs dos táxons *Lachnospiraceae*, *Erysipelatoclostridiaceae*, *Anaerolineacea*, *Bifidobacteriaceae* e *Coprostanoligenes* foram associados ao alto GMD.

No período de confinamento (Figura 15), ASVs dos táxons *Lachnospiraceae* foram relacionadas tanto com o alto quanto com o baixo GMD. Os táxons *Rikenellaceae*, *Peptococcaceae*, *Christensenellaceae*, UCG-010 e *Coprostanoligenes* estiveram associados com o baixo GMD. Com o alto GMD, os seguintes grupos foram associados: UCG-010, *Oscillospiraceae*, *Muribaculaceae* e *Prevotellaceae*.

Para o período de seca (Figura 16), os táxons *Selenomodaceae* e *Lachnospiraceae* estiveram relacionados com o baixo GMD, já ASVs dos táxons *Rikenellaceae* e *Bacteroidales* estiveram associados ao alto GMD.

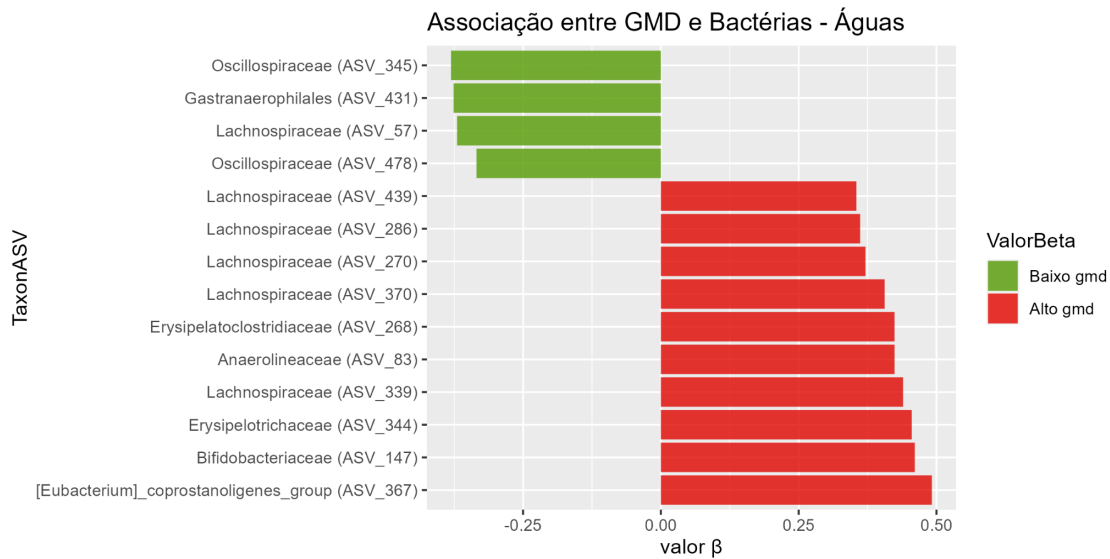


Figura 14. Associação do ganho médio diário de bovinos Nelore com as variantes de sequências de amplicons (ASVs) de bactérias das fezes no período de águas. Apenas ASVs que tiveram associações significativas com o referido fenótipo ($FDR < 0,05$). Baixo e Alto GMD correspondem a valores de beta negativos e positivos, respectivamente.

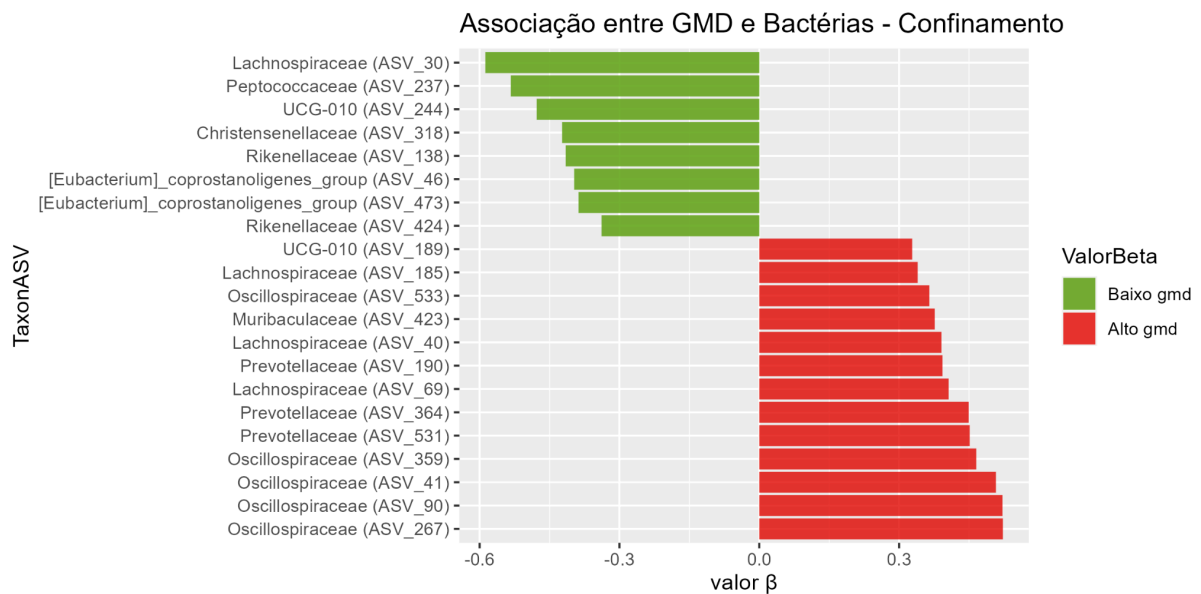


Figura 15. Associação do ganho médio diário de bovinos Nelore com as variantes de sequências de amplicons (ASVs) de Bactérias das fezes no período de Confinamento. Apenas ASVs que tiveram associações significativas com o referido fenótipo ($FDR < 0,05$). Baixo e Alto GMD correspondem a valores de beta negativos e positivos, respectivamente.

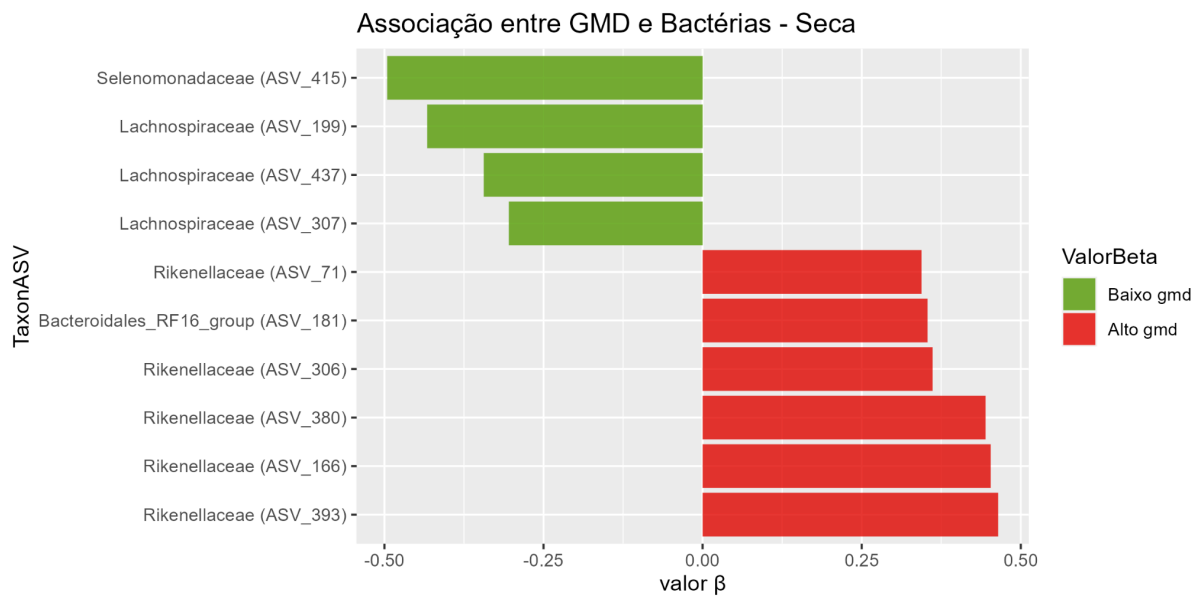


Figura 16. Associação do ganho médio diário de bovinos Nelore com as variantes de sequências de amplicons (ASVs) de Bactérias das fezes no período de Seca. Apenas ASVs que tiveram associações significativas com o referido fenótipo ($FDR < 0,05$). Baixo e Alto GMD correspondem a valores de beta negativos e positivos, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

6.1 Variação da estrutura do microbioma frente a condições ambientais distintas

Este estudo identificou diferenças nas comunidades microbianas de fezes de Nelore em três períodos de coleta distintos, a pasto (seca e águas) e no confinamento. Salienta-se que diversos estudos (Tapio et al. 2016; Indugu et al. 2017; Malmuthuge e Guan 2017; Wirth et al. 2018) demonstraram que o microbioma ruminal possui uma estabilidade populacional, aspecto que corrobora para o conceito de microbioma *core* (NEU, A., ALLEN, E., ROY, K.; 2021), que representa o conjunto central de táxons comuns às comunidades microbianas em diversos ambientes.

Nesse sentido, os principais Filos bacterianos envolvidos no processo de digestão dos bovinos são *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (STEWART et al, 2019), bem como as Archaea metanogênicas do Filo *Euryarchaeota*, mais especificamente da classe *Methanobacteria* (WIRTH et al, 2018), o que condiz com os resultados de abundância relativa para bactérias e Archaea mais abundantes nos três períodos.

O filo de Archaea *Euryarchaeota*, dominante nos achados para abundância relativa, participa da degradação da matéria orgânica, redução do nitrato, fixação do nitrogênio e oxidação do metano. Já os filis bacterianos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, também os mais abundantes em nossos resultados, estão relacionados com o metabolismo de carboidratos e

são mais resistentes as mudanças nutricionais e aos ambientes ácidos (ALVES, 2019), afetando a absorção de energia e sendo correlacionados com o aumento de gordura. O período de seca possui uma abundância relativa maior de *Bacteroidetes* que os outros períodos, grupo o qual está diretamente relacionado com a produção de ácidos graxos voláteis (RIBEIRO, 2015). Os outros períodos (pasto-águas e confinamento) possuem uma maior abundância do filo *Proteobacteria*, em relação ao período de seca, o qual desempenha diversas funções, sendo relacionado na literatura com microbiota fecal de mamíferos saudáveis (MARCILLI, 2019).

As variações da estrutura do microbioma são amplamente estudadas, já que podem ser alteradas conforme as condições ambientais e da disponibilidade de recursos. Segundo Guan e Malmuthuge (2017), a diversidade da microbiota ruminal está intimamente relacionada à dieta, já que depende do substrato que será fermentado. O ambiente ruminal necessita de diversos parâmetros específicos e equilibrados para seu funcionamento, como o pH, a temperatura, umidade, osmolaridade e a ausência total ou quase total de oxigênio (anaerobiose). Durante todo o processo fermentativo, são gerados produtos de interesse para os animais como proteínas, ácidos graxos de cadeia curta e vitaminas do complexo B. Ocorre nesse processo também a síntese de gases, como o gás carbônico e metano (OLIVEIRA, 2019). Dessa forma, a sazonalidade e disponibilidade de recursos pode causar alteração nos substratos, por consequência gerando modificações na microbiota.

Pode-se observar este fato nos resultados de diversidade e abundância diferencial de bactérias, que mostraram algumas diferenças significativas para o período de seca em relação aos outros períodos. Mostrou-se uma maior diversidade Alfa, baseada no número de táxons observados e no índice de Shannon-Wiener, que também leva em consideração a abundância de cada táxon para o período de seca, o que pode estar ligado ao fato de pastagens mais fibrosas estarem relacionadas a uma maior diversidade (ZHANG *et al*, 2024).

O Brasil é um país que passa por longos períodos de seca, o que gera obstáculos inerentes à nutrição dos bovinos, sendo necessária a suplementação para impedir a redução do ganho de peso, imprescindível para que se atinja o peso ideal de abate em um período razoável, ou seja, que não comprometa a qualidade do produto em função da idade avançada do animal. A produção de carne bovina sofre interferência direta dessa sazonalidade, com um crescimento maior dos animais durante as estações chuvosas, enquanto durante o período de seca apresentam dificuldade de ganhar ou mesmo manter o peso (BATISTELLI *et al*, 2022).

A diversidade Alfa de Archaea mostrou-se significativamente diferente entre os dois períodos a pasto e o confinamento, sendo esse último período de menor diversidade. Isso pode

estar relacionado com o fato da abundância relativa de Archaea no confinamento apenas apresentar Archaea de um táxon, visto que o índice de Shannon considera também a distribuição dos táxons.

Considerando a diversidade Beta, o período de seca demonstrou maior dissimilaridade em relação aos outros dois períodos (águas e confinamento). Quando consideramos a recria a pasto de bovinos no período de seca, as gramíneas das pastagens apresentam maior dificuldade em serem digeridas, devido à maior lignificação da fração fibrosa insolúvel e dos baixos níveis de nitrogênio, que acabam sendo insuficientes para suprir as necessidades dos microrganismos (PAULINO *et al*, 2008), prejudicando não apenas a digestibilidade, mas também a produção de ácidos graxos por parte do microbioma. Nessa situação, a diversificação do microbioma pode garantir a melhor digestibilidade, como no estudo de ZHANG *et al* 2024, o qual demonstrou que dietas ricas em fibra detergente neutra proveniente de forragem (FNDF), que é um componente essencial das dietas fibrosas, favorece o crescimento de uma diversidade maior de microrganismos. Isso ocorre porque dietas com menos fibras criam um ambiente ruminal mais ácido. Dessa forma, dietas com mais fibras auxiliam a estabilidade do pH, o que favorece a diversidade microbiana.

Já no período das águas a disponibilidade de nitrogênio para os microrganismos não está limitada. Quando se fala sobre o confinamento, sabe-se que essa é uma prática de manejo que se dá a partir da delimitação dos bovinos em lotes com determinada área por animal (redução do gasto de energia para busca de alimentos) e provimento de alimentação concentrado em cochos, (BATISTELLI *et al*, 2022) muito utilizada na terminação dos animais, mas também podendo ser utilizada como estratégia de recria, podendo encurtar o período até o abate e aumentar os ganhos.

Salienta-se que os resultados entre as métricas de diversidade Beta divergiram para Archaea, resultado que pode estar relacionado com o uso da filogenia para delimitar a distância Weighted Unifrac, mostrando que considerar ramificações únicas para delimitar as ASVs em seus táxons torna as amostras entre os períodos diferentes mais próximas, impossibilitando uma separação clara entre os períodos. A árvore filogenética utilizada para essa análise, permite uma maior confiabilidade na atribuição taxonômica, já que ASVs que foram atribuídas para um mesmo táxon, formam um grupo monofilético (ramo final da árvore).

6.2 A associação do ganho médio diário com os diferentes períodos de coleta

O ganho médio diário foi o fenótipo que pôde ser avaliado no mesmo animal nos três períodos distintos, o que permitiu observar, a partir da sua associação com as ASVs de

Bactérias e Archaea, as diferenças do microbioma e o manejo nutricional sobre o fenótipo de interesse. O período de confinamento revelou-se o período com menor número de táxons de Archaea associados à característica de interesse, o que pode ter relação com o fato dos animais durante o confinamento serem alimentados com alimento concentrado e, nos outros períodos, estarem a pasto, sendo suplementados. Nesse período obteve-se apenas ASVs de Archaea associadas com o aumento do GMD. As ASVs de Archaea do táxon *Methanobrevibacter* estiveram associadas com o GMD nos três períodos, tanto com efeitos positivos, quanto negativos.

Em relação às bactérias, obteve-se um número maior de ASVs relacionadas com o aumento do GMD, sendo que o período de seca foi o que revelou menos ASVs associadas à característica. É importante salientar que o período de seca foi o que apresentou maior diversidade de bactérias, segundo o índice de Shannon, e maior distanciamento em relação aos outros períodos, considerando a beta diversidade. Porém, quando se vê a associação com o fenótipo, tem-se que há menos táxons bacterianos influenciando no aumento ou diminuição da característica. Este fato pode estar relacionado com a idade dos animais, considerando que o período de seca foi a primeira etapa do experimento, na qual os animais eram mais jovens, pós-desmama e vieram de diferentes criadores. Porém, como o experimento foi caracterizado por medidas temporais no mesmo indivíduo, não se pode afirmar de forma concreta essa relação. Os principais táxons bacterianos envolvidos tanto no aumento do GMD quanto na sua diminuição foram *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae* e *Rikenellaceae*.

O táxon *Lachnospiraceae* foi encontrado em maiores proporções no estudo de Myer et al. (2015) em animais com maior ganho de peso diário, o que pode estar relacionado com o fato deste táxon ser associado na literatura com a processo de degradação da celulose, juntamente com o táxon *Rikenellaceae*, de forma que a quebra da molécula da celulose permite a conversão dos açúcares liberados em ácidos orgânicos voláteis, os quais são absorvidos e constituem a principal fonte de energia de bovinos (OLIVEIRA, 2013). Além disso, *Oscillospiraceae* aparece na literatura tendo impacto na saúde intestinal, provavelmente pelo fato desse grupo, produtor de acetato, gerar ácidos graxos de cadeia curta (UDDIN et al., 2024). No período de seca, diferentes ASVs bacterianas atribuídas ao táxon *Rikenellaceae* foram associadas com efeitos positivos no fenótipo de ganho diário, variando em valores entre 0,25 a 0,50 no fenótipo, enquanto o táxon *Lachnospiraceae* teve mais ASVs com efeitos negativos, variando também em valores entre de -0,25 a -0,50. Considerando o período de águas, diferentes ASVs bacterianas atribuídas ao táxon *Lachnospiraceae* estiveram relacionadas com efeitos positivos no fenótipo de ganho diário, variando em valores de mais

de 0,37 a 0,50 no fenótipo. No confinamento, ASVs dos táxons *Lachnospiraceae* e *Oscillospiraceae* tiveram efeitos positivos com valores de 0,30 a próximo de 0,60.

De modo geral, as associações de táxons do microbioma com a característica GMD sugerem uma interação com manejo nutricional, uma vez que foram específicas para período amostral (pasto-seca, pasto-águas e confinamento), tendo sido observada apenas uma ASV (Archaea) associada a GMD em mais de um período, e nesse caso, o efeito foi contrário.

O táxon de Archaea *Methanobrevibacter* é composto por organismos metanogênicos, os quais são sensíveis às mudanças nas condições da ração do animal, podendo causar aumento da taxa de fermentação, diminuição da ruminação ou do pH (acidificação), que diminuem a quantidade de H² disponível para formação do metano, aumentando a energia disponível para o animal (NEVES, 2008). No período de pasto na seca, o táxon de Archaea *Methanobrevibacter* foi associado no aumento da característica com valores entre 0,20 e 0,30. No período de águas, o táxon foi associado tanto a diminuição quanto no aumento da característica, com valores positivos de 0,30 e negativos de -0,20 a -0,40. Por fim, no confinamento, ocorreu associação com valores positivos de 0,4 no fenótipo.

É importante salientar que o fato de os mesmos táxons possuírem efeitos tanto positivos quanto negativos no fenótipo deve-se ao fato de trabalharmos com ASVs, as quais nos permitem chegar em alguns casos até o nível de gênero, então não se consegue explorar ao nível de espécie, dessa forma, por mais que seja o mesmo táxon, as ASVs são diferentes.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que ao final deste trabalho permitiu-se traçar um perfil taxonômico do microbioma frente a diferentes condições ambientais. Este pôde ser utilizado para análise de associação com o fenótipo de ganho médio diário, permitindo explorar as Bactérias e Archaea relacionadas com o aumento ou diminuição de tal característica.

Foi possível também explorar a possível relação entre as condições ambientais, a nutrição e as alterações dos táxons, por meio das diversidades e abundância, ao longo dos três períodos de estudo: pasto na estação seca, pasto na estação de águas e no confinamento.

Como considerações centrais, elenca-se os resultados de abundância relativa, que corroboram para o conceito de microbioma *core*, em que se observou que os táxons mais abundantes nas amostras estão descritos na literatura como táxons mais abundantes frequentemente. Salienta-se também que a diversidade alfa é maior no período de seca, e há maior dissimilaridade das amostras nesse período, podendo estar relacionado com o fato das

pastagens nesse período estarem mais fibrosas. Elenca-se também como aspectos importantes as análises de associação das ASVs com o GMD, em que os principais táxons bacterianos envolvidos tanto no aumento da característica quanto em sua diminuição são: *Lachnospiraceae*, *Oscillospiraceae* e *Rikenellaceae*, enquanto o principal táxon de Archaea envolvido foi *Methanobrevibacter*, com efeitos positivos e negativos no fenótipo.

Os resultados do trabalho podem auxiliar na compreensão da relação entre o microbioma e a característica, a qual é de grande importância no campo do desempenho na cadeia produtiva, podendo auxiliar em estudos posteriores no desenvolvimento de bioinsumos ou de manejo nutricional que permita impactar no aumento do ganho médio diário dos animais em diferentes estratégias de recria e engorda.

REFERÊNCIAS

- ABCZ. Associação Brasileira de Criadores de Zebuínos. **Raças Zebuínas**. Disponível em: <https://www.abcz.org.br/>. Acesso em: jul. 2024.
- ABCZ. Associação Brasileira de Criadores de Zebuínos. **Produção de carne de qualidade com eficiência e sustentabilidade**. Disponível em: <https://www.abcz.org.br/pmgz/programa-carne-de-qualidade/apresentacao>. Acesso em: jul. 2024.
- ABIEC. (2020). Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de carne. **Perfil da pecuária no Brasil**. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/>.
- ABIEC. (2023). Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de carne. **Perfil da Pecuária no Brasil. 2023**. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023/>.
- ALVES, Kênia Larissa Gomes Carvalho. Diversidade bacteriana ruminal e eficiência de utilização de nitrogênio em novilhos Nelore alimentados com diferentes teores e fontes de proteína na dieta. 2019.
- ARAÚJO FILHO, HJ de et al. Avaliação econômica da terminação de bovinos de corte a pasto, semiconfinados ou em confinamento com dieta de alto grão. **Custos e Agronegócio**, v. 15, p. 374-401, 2019.
- BATISTELLI, I. J. C.; BATISTELLI, J. C. de O. R. .; BESS, B. L. .; MENEZES, F. L. de .; MORAES, K. A. K. de .; MORAES, E. H. B. K. de . **Intensive rearing in confinement as a management strategy in beef cattle: literature review**. Research, Society and Development, [S. l.], v. 11, n. 2, p. e1611225179, 2022.
- BECK, Jan; HOLLOWAY, Jeremy D.; SCHWANGHART, Wolfgang. Undersampling and the measurement of beta diversity. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 370-382, 2013.
- BOLYEN, E. et al. **QIIME 2**: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. PeerJ , p. 9–10, 2018.
- BRIDI, Ana Maria; CONSTANTINO, Camila; TARSITANO, Marina Avena. Qualidade da carne de bovinos produzidos em pasto. **Simpósio de produção animal à pasto**, v. 1, p. 311-332, 2011.
- BRUNES, L. C.; COUTO, V. R. M. Balanço de gases de efeito estufa em sistemas de produção de bovinos de corte. **Archivos de zootecnia**, v. 66, n. 254, p. 287-299, 2017.
- CALLAHAN, B. J. et al. **DADA2**: High -resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.
- COOLEN, M.J., HOPMANS, E.C., RIJPSTRA, W.I.C., MUYZER, G., SCHOUTEN, S., VOLKMAN, J.K., DAMSTÉ, J.S.S., 2004. Evolution of the methane cycle in ice lake (antarctica) during the holocene: Response of methanogens and methanotrophs to environmental change. Organic Geochemistry 35, 1151–1167.

DE OLIVEIRA, J. H. F.; MAGNABOSCO, C. de U.; BORGES, AM de SM. **Nelore**: base genética e evolução seletiva no Brasil. 2002.

DE OLIVEIRA, J. S.; DE MOURA ZANINE, A.; SANTOS, E. M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **REDVET. Revista electrónica de Veterinaria**, v. 8, n. 6, p. 1-12, 2007.

EUCLIDES FILHO, K. Bovinocultura de corte no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v. 16, n. 4, p. 121-128, 2007.

EUCLIDES FILHO, K. Evolução do melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, n. 5, p. 620-626, 2009.

GERMIPASTO. BRS Paiaguás. Disponível em:
<https://www.germipasto.agr.br/produtos/ver/23/>. Acesso em: julho de 2024.

GILIOLI, D. et al. Microbiota ruminal: diversidade, importância e caracterização. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 18, n. 11, p. 1-20, 2017.

HEBERT, Paul DN et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

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

HERLEMANN, D. P., LABRENZ, M., JÜRGENS, K., BERTILSSON, S., WANIEK, J. J.; ANDERSSON, A. F. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. **The ISME Journal** 5, 1571–1579, 2011.

INDUGU, N., VECCHIARELLI, B., BAKER, L. D. et al. Comparison of rumen bacterial communities in dairy herds of different production. **BMC Microbiology**, ed. 17, 2017.

KHANAL, P. et al. Microbiability of meat quality and carcass composition traits in swine. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 138, n. 2, p. 223-236, 2021.

LEMOS, Leandro N. et al. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of microbiological methods**, v. 86, n. 1, p. 42-51, 2011.

MAGNABOSCO, C. de U. et al. Ferramentas genéticas e genômicas na avaliação da eficiência alimentar de bovinos de corte. **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECAE)**, 2020.

MALAFIA, G. et al. A sustentabilidade na cadeia produtiva da pecuária de corte brasileira. Embrapa Gado de Corte-Capítulo em livro científico (ALICE), 2019.

MALLICK, H. et al. Multivariable Association Discovery in Population-scale Meta-omics Studies. **BioRxiv**, 2021.

MALMUTHUGE, N.; GUAN, L. L. Understanding host-microbial interactions in rumen: searching the best opportunity for microbiota manipulation. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 8, p. 1-7, 2017.

MARCILLI, Gabriela Marques. **Avaliação da associação entre microbioma fecal e eficiência alimentar em bovinos da raça Angus**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MARQUES, E. Evolução Fenotípica da Raça Nelore na Associação Brasileira dos Criadores de Zebu. 2018.

MCMURDIE, PAUL J.; HOLMES, Susan. Phyloseq: a bioconductor package for handling and analysis of high-throughput phylogenetic sequence data. In: *Biocomputing 2012*. 2012. p. 235-246.

MONÇÃO, F. P. et al. Desenvolvimento da microbiota ruminal de bezerros: revisão de literatura. **Revista Unimontes Científica**, v. 15, n. 1, p. 76-89, 2013.

MYER, P. R. et al. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–17, 2015a.

NEU, Alexander T.; ALLEN, Eric E.; ROY, Kaustuv. Defining and quantifying the core microbiome: challenges and prospects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 51, p. e2104429118, 2021.

NEVES, Marta de Campos. Produção in vitro de metano e análise da diversidade genética das Archaea metanogênicas do rúmen de bovinos. 2008.

OLIVEIRA, Marcelo Nagem Valério de. Microbioma no trato gastrointestinal de bovino da raça Nelore. 2013.

OLIVEIRA, V. da S.; SANTOS, A. C. P.; VALENÇA, R. de L. Desenvolvimento e fisiologia do trato digestivo de ruminantes. **Ci. Anim.**, p. 114-132, 2019.

OVREÅS, L., FORNEY, L., DAAE, F.L., TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3367–3373, 1997.

PAULINO, M. F. et al. Nutrição de bovinos em pastejo. **Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem**, v. 4, n. 2008, p. 131-169, 2008.

PUNIYA, Anil Kumar et al. (ed.). *Rumen microbiology: from evolution to revolution*. 2015.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, nov. 2012.

REGITANO, L. C. de A.; OLIVEIRA, P. N. de; ANDRADE, B. G. de. Hologenoma ruminante: caracterização da população de microrganismos do trato digestivo de ruminantes e seu impacto sobre o genoma funcional do hospedeiro, desempenho, qualidade do produto e

impacto ambiental. **Embrapa Pecuária Sudeste-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2021.

RIBEIRO, Lucas Daniel. Prospecção de genes na microbiota do rúmen bovino com propriedades degradadoras da biomassa vegetal. 2015.

SABORÍO-MONTERO, A. et al. Structural equation models to disentangle the biological relationship between microbiota and complex traits: Methane production in dairy cattle as a case of study. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 137, n. 1, p. 36-48, 2020.

SANTOS, P. M.. Evolução da raça Nelore no Brasil. Curso de Zootecnia, Universidade Federal de Goiás/Regional Jataí, Jataí, 2017.

SBRISSIA, A. F. et al. Produção animal em pastagens cultivadas em regiões de clima temperado da América Latina. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 25, n. 1-2, p. 47-60, 2017.

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

SHANKS, O. C. et al. Community Structures of Fecal Bacteria in Cattle from Different Animal Feeding Operations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 2992–3001, 2011.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498–504, nov. 2003.

SOUZA, J. C. et al . Parâmetros e tendência genética de peso de bovinos criados a pasto no Brasil. Arch. zootec., **Córdoba** , v. 60, n. 231, p. 457-465, set. 2011.

STEWART, Robert D. et al. Compendium of 4,941 rumen metagenome-assembled genomes for rumen microbiome biology and enzyme discovery. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 953-961, 2019.

TAPIO, I.; SHINGFIELD, K. J.; MCKAIN, N. et al. Oral Samples as Non-Invasive Proxies for Assessing the Composition of the Rumen Microbial Community. **PLOS ONE**, v. 11, n. 0151220, 2016.

UDDIN, Muhammed Salah et al. The respiratory and fecal microbiota of beef calves from birth to weaning. **mSystems**, p. e00238-24, 2024.

VANRADEN, P. M. **Efficient Methods to Compute Genomic Predictions**. J. Dairy Sci. v. 91, n. 4414–4423, 2008.

WALLACE, R. John et al. The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. **BMC genomics**, v. 16, p. 1-14, 2015.

WIRTH, R.; KÁDÁR, G.; KAKUK, B. et al. The Planktonic Core Microbiome and Core Functions in the Cattle Rumen by Next Generation Sequencing. **Frontiers in Microbiology** 9, 2018.

XIA, J.; WISHART, D. S. Web -based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nature Protocols**, v. 6, p. 743-760, 2011.

ZHANG, Zhian et al. Effects of dietary forage neutral detergent fiber and rumen degradable starch ratios on chewing activity, ruminal fermentation, ruminal microbes and nutrient digestibility of Hu sheep fed a pelleted total mixed ration. *Journal of Animal Science*, v. 102, p. skae100, 2024.

ZIYATDINOV, Andrey et al. lme4qtl: linear mixed models with flexible covariance structure for genetic studies of related individuals. *BMC bioinformatics*, v. 19, p. 1-5, 2018.