



**ÓLEOS ESSENCIAIS NO METABOLISMO,
NA POPULAÇÃO MICROBIANA E
PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO EM
OVINOS**

JORDANA CARVALHO DE MENEZES

2017

JORDANA CARVALHO DE MENEZES

**ÓLEOS ESSENCIAS NO METABOLISMO, NA POPULAÇÃO
MICROBIANA E PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO EM
OVINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de “Mestre em Zootecnia”.

Orientador
Prof. Dr. Vicente Ribeiro Rocha Júnior

UNIMONTES
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

M543o Menezes, Jordana Carvalho de
Óleos essenciais no metabolismo, na população microbiana e produção de metano entérico em ovinos [manuscrito] / Jordana Carvalho de Menezes. – 2017.
87 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Montes Claros – Janaúba, 2017.
Orientador: Prof. D. Sc. Vicente Ribeiro Rocha Júnior.

1. Filogenia. 2. Metabolismo ruminal. 3. Metano. 4. Ovinos. I. Rocha Júnior, Vicente Ribeiro. II. Universidade Estadual de Montes Claros. III. Título.

CDD. 636.30852


Catálogo: Biblioteca Setorial Campus de Janaúba

JORDANA CARVALHO DE MENEZES

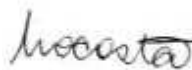
**ÓLEOS ESSENCIAIS NO METABOLISMO, POPULAÇÃO
MICROBIANA RUMINAL E PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO
EM OVINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Montes Claros, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

APROVADA em 13 de MARÇO de 2017.



Profº. Dr. Vicente Ribeiro Rocha Júnior
(Orientador)



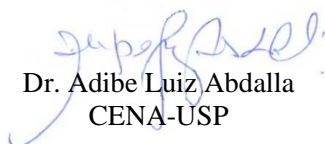
Profª. Dra. Maria Dulcinéia da Costa
UNIMONTES



Profª. Dra. Mary Ana Petersen
Rodriguez
UNIMONTES



Dr. Eduardo Robson Duarte
UFMG



Dr. Adibe Luiz Abdalla
CENA-USP

JANAÚBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar minha vida;

Aos professores Vicente Ribeiro Rocha Júnior, Adibe Luiz Abdalla e Maria Dulcinéia da Costa, pela orientação e pelos conhecimentos transmitidos;

À empresa GRASP (Generally Recognized As Safe Products) pelo fornecimento dos óleos essenciais utilizados neste estudo;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão das bolsas;

Em especial, aos meus pais pela fé que depositaram em mim;

Aos meus irmãos Joel e Hudson pela amizade e apoio;

Às amigas de longa data, Ana Quézia, Cíntia, Heloísa, Laysa, Luíza, Meirielle, Nágila e Natália, pelo incentivo;

A todos os colegas que cruzaram meu caminho durante a graduação e o mestrado, pela ajuda e amizade, sendo fundamentais nas realizações de trabalhos e estudos acadêmicos;

À minha amiga Pilar, por todo o companheirismo e amizade nesses últimos anos;

A meu amigo Valdinei, por todo o auxílio nos momentos de necessidade;

Às minhas avós, tios, tias e primos que sempre se fizeram presentes nos momentos mais difíceis;

A todos os professores e funcionários da UNIMONTES, pelos conhecimentos e força.

“Se pudéssemos ter consciência do quanto nossa vida é efêmera, talvez pensássemos duas vezes antes de jogar fora as oportunidades que temos de ser e de fazer os outros felizes. Muitas flores são colhidas cedo demais. Algumas, mesmo ainda em botão. Há sementes que nunca brotam e há aquelas flores que vivem a vida inteira até que, pétala por pétala, tranquilas, vividas, entregam-se ao vento.

Mas não podemos adivinhar. Não sabemos por quanto tempo estaremos enfeitando esse Éden e tampouco aquelas flores que foram plantadas ao nosso redor. E descuidamos. Cuidamos pouco, de nós, dos outros. Ficamos tristes por coisas pequenas e perdemos um tempo precioso. Perdemos dias, muitas vezes anos. [...]

E passa a noite e chega o dia, o sol nasce e adormece, e continuamos os mesmos, fechados em nós. Reclamamos do que não temos, ou achamos que não temos o suficiente. Cobramos dos outros, da vida, de nós mesmos. E assim nos consumimos...

Costumamos comparar a nossa vida com as daqueles que possuem mais do que nós. E se experimentássemos comparar com aqueles que possuem menos? Isso faria uma grande diferença!

E o tempo passa... Passamos pela vida, mas não vivemos... Sobrevivemos, porque não sabemos fazer outra coisa! Até que, inesperadamente, acordamos e olhamos para trás. E então nos perguntamos: e agora?!

Agora ainda é tempo de reconstruir alguma coisa. Ainda é tempo de voltar-se para Deus e agradecer. Ainda é tempo de apreciar as flores que estão inteiras ao nosso redor. Ainda é tempo de recomeçar...”

Letícia Thompson

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	iii
GENERAL ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. Rebanho de ovinos	3
2.2. Produção entérica de metano e microrganismos ruminais	4
2.3. Perda de energia na forma de metano.....	9
2.4. Efeitos de óleos essenciais no metabolismo ruminal e na produção de metano	12
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO I - DIVERSIDADE MICROBIANA NO RÚMEN DE OVINOS SUPLEMENTADOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS	24
RESUMO	25
ABSTRACT	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Local.....	28
2.2. Animais, tratamentos, período experimental e delineamento estatístico	28
2.3. Coleta do líquido ruminal	30
2.4. Extração e determinação da pureza e concentração de DNA.....	30
2.5. Análise da Reação em Cadeia Polimerase quantitativo (qPCR)	32
2.6. Análises estatísticas	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4. CONCLUSÕES	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

CAPÍTULO II - ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O METABOLISMO RUMINAL E A PRODUÇÃO DE METANO EM OVINOS.....	51
RESUMO	52
ABSTRACT	54
1. INTRODUÇÃO	56
2. MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1. Local	58
2.2. Animais, tratamentos, período experimental e delineamento estatístico	58
2.3. Coleta do líquido ruminal e determinação do pH.....	60
2.4. Determinação dos parâmetros de fermentação ruminal e contagem de protozoários	61
2.5. Determinação da digestibilidade, balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana.....	62
2.6. Mensuração da emissão de metano (CH ₄)	63
2.7. Extração e determinação da pureza e concentração de DNA.....	64
2.8. Análise da Reação em Cadeia Polimerase quantitativo (qPCR)	65
2.9. Análises estatísticas	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4. CONCLUSÕES	82
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

RESUMO GERAL

MENEZES, Jordana Carvalho de. **Óleos essenciais no metabolismo, na população microbiana e produção de metano entérico em ovinos.** 2017. 87 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG¹.

Objetivou-se avaliar o efeito de uma mistura de óleos essenciais sobre o metabolismo ruminal, a população microbiana e a produção de metano entérico em ovinos. Foram utilizados nove ovinos canulados da raça Santa Inês ($55 \pm 11,1$ kg), alimentados com três níveis de inclusão da mistura de óleos essenciais (MSOE): zero (controle), 200 (baixa) e 400 (alta) mg MSOE / kg MS consumida. O período experimental teve duração de 69 dias, dividido em três períodos de 23 dias, sendo os primeiros 15 dias para adaptação dos animais e os 8 últimos dias para coleta de dados e amostras. O delineamento experimental foi o quadrado latino 3x3, com três quadrados simultâneos. Para a mensuração de ácidos graxos, nitrogênio amoniacal e população microbiana, foram realizadas quatro coletas de líquido ruminal por período: Tempo 0; Tempo 24, Tempo 168 e Tempo 360 horas após o início do tratamento. As concentrações de ácidos graxos de cadeia curta foram determinadas utilizando-se um cromatógrafo gasoso. O nitrogênio amoniacal foi determinado por destilação a vapor. Além disso, foi determinada a digestibilidade dos nutrientes (matéria seca e orgânica, fibra insolúvel em detergente neutro e ácido, celulose, hemicelulose e proteína bruta). O balanço de nitrogênio microbiano foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência. A abundância relativa dos diferentes grupos de microrganismos, como Bactérias totais, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp., *Fibrobacter succinogenes*, Fungos anaeróbicos, *Ruminococcus flavefaciens* e *Selenomonas ruminatium*, foi estimada por meio da amplificação das sequências do gene 16S rDNA com *primers* específicos pela técnica qPCR. Para as *Archae* metanogênicas foi utilizado um *primer* funcional (*mcrA*). A contagem do número de protozoários foi realizada por microscopia óptica. Para a mensuração da emissão de metano, os animais foram mantidos individualmente em câmaras respirométricas. Não houve efeito do nível de inclusão da MSOE sobre a digestibilidade dos nutrientes. Para consumo de matéria seca, peso vivo dos animais e produção de metano, foi observado efeito

¹**Comitê de Orientação:** Prof. Dr. Vicente Ribeiro Rocha Júnior – Departamento de Ciências Agrárias/UNIMONTES (Orientador); Prof. Dr. Maria Dulcineia da Costa – Departamento de Ciências Agrárias/UNIMONTES (Coorientador); Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla – Laboratório de Nutrição Animal/CENA-USP (Coorientador)

de tratamento no qual, a dieta com 400 mg MSOE/kg MS consumida apresentou menor produção de metano, com peso vivo e consumo de matéria seca inferiores aos demais. A população de protozoários foi maior na dieta com 400 mg MSOE/kg MS consumida. Já para o nitrogênio microbiano, foi observado aumento na dieta controle. Não houve efeito de tratamento sobre a expressão relativa de Bactérias totais, *Clostridium sp.*, *Fibrobacter succinogenes*, Fungos anaeróbicos totais, *Archeae* metanogênicas e *Ruminococcus flavefaciens*. A população de *Butyrivibrio fibrisolvens* apresentou efeito quadrático, com aumento na expressão relativa, em relação ao controle, no tratamento com 200 mg MSOE/kg MS consumida. As populações de *Selenomonas ruminantium* e protozoários apresentaram aumento com a ingestão de 400 mg MSOE/kg MS consumida. No tempo 0, independentemente do tratamento, há uma maior população microbiana, com maior produção de ácidos graxos de cadeia curta e da produção de nitrogênio amoniacal. A mistura de óleos essenciais utilizada foi capaz de aumentar as populações de *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Selenomonas ruminantium* e protozoários. Com isso, a dieta com 400 mg MSOE/kg MS consumida parece ser capaz de diminuir a produção de metano dos ovinos em decorrência do aumento de propionato.

Palavras-chave: análise multivariada, fermentação ruminal, filogenia, mitigação de metano, qPCR

GENERAL ABSTRACT

MENEZES, Jordana Carvalho de. **Effect of essential oils on metabolism and rumen microbial population of ovine.** 2017. 87 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG².

The objective of this study was to evaluate the effect of a mixture of essential oils on ruminal metabolism, microbial population and methane production in sheep. Nine cannulated sheep of the Santa Inês breed (55 ± 11.1 kg) were used, which received a basal diet containing three levels of inclusion of essential oils (MSOE): zero (control), 200 (low) and 400 (high) mg MSOE / kg MS consumed. The experimental period lasted 69 days, divided into three periods of 23 days, the first 15 days for adaptation of the animals and the last 8 days for data and sample collection. The experimental design was the Latin square 3x3, with three squares simultaneously. For the measurement of fatty acids, ammoniacal nitrogen and microbial population, four collections of ruminal liquid were performed per period: Time 0; Time 24, Time 168 and Time 360. The concentrations of short chain fatty acids were determined using a gas chromatograph. Ammoniacal nitrogen was determined by steam distillation. In addition, nutrient digestibility (dry and organic matter, insoluble fiber in neutral and acid detergent, cellulose, hemicellulose and crude protein) was determined. The microbial nitrogen balance was analyzed by high performance liquid chromatography. The quantification of the different groups of microorganisms, such as total bacteria, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp., *Fibrobacter succinogenes*, Anaerobic fungi, *Ruminococcus flavefaciens* and *Selenomonas ruminatum* was estimated by the amplification of 16S rDNA gene sequences with specific primers by the qPCR technique. A functional primer (mcrA) was used for the *Archaea* methanogenic. The counting of the number of protozoa was performed by light microscopy. For the measurement of methane emission, the animals were kept individually in respiratory chambers. There was no effect of the level of inclusion of MSOE on nutrient digestibility. As for dry matter intake, live weight of animals and methane production, a treatment effect was observed, in which treatment with 400 mg MSOE / kg DM consumed showed lower methane production, with live weight and dry matter consumption lower

²**Guidance committee:** Prof. Dr. Vicente Ribeiro Rocha Júnior – Department of Agrarian Sciences /UNIMONTES (Adviser); Prof. Dr. Maria Dulcineia da Costa – Department of Agrarian Sciences/UNIMONTES (Co-adviser); Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla – Animal Nutrition Laboratory/CENA-USP (Co-adviser)

than the others. The protozoan population was higher in the treatment with 400 mg MSOE / kg MS consumed. As for microbial nitrogen, an increase in the control treatment was observed. There was no treatment effect on the microorganisms Total bacteria, *Clostridium* sp., *Fibrobacter succinogenes*, Total anaerobic fungi, *Archaea* methanogenic and *Ruminococcus flavefaciens*. The population of *Butyrivibrio fibrisolvens*, presented a quadratic effect, with an increase in the relative expression, relative to the control treatment, in the treatment with 200 mg MSOE / kg MS consumed. The population of *Selenomonas ruminantium* and protozoa presented an increase for the treatment with 400 mg MSOE / kg MS consumed. When time is taken into account, it can be seen that at time 0, regardless of the treatment, there is a larger microbial population, with a higher production of short-chain fatty acids and ammoniacal nitrogen production. In general, the mixture of essential oils was not able to significantly alter the studied microbial population, except for the increase of the populations *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Selenomonas ruminantium* and protozoa. Thus, treatment with 400 mg MSOE / kg DM seems to be able to decrease the methane production of sheep due to the increase of propionate.

Keywords: multivariate analysis, ruminal fermentation, phylogeny, methane mitigation, qPCR

1. INTRODUÇÃO GERAL

Existe uma unanimidade por parte das comunidades científicas e políticas mundiais com relação à influência humana sobre o impacto do aquecimento global e à necessidade urgente da mitigação dos gases do efeito estufa. Entre os gases que compõem o chamado grupo “Gases do Efeito Estufa”, o metano é responsável pela emissão global de 16%, dos quais 40% são oriundos da fermentação entérica (FAO, 2014).

Os principais produtos da fermentação entérica que podem ser aproveitados pelo ruminante são os ácidos graxos voláteis e amônia. Além disso, existem os compostos indesejáveis tanto para o hospedeiro, como para os microrganismos ruminais, tais como gás carbônico, hidrogênio, metano e nitrato (CHURCH, 1993; SCHOFIELD, 2000). A metanogênese é um processo importante para o perfeito funcionamento do rúmen, pois retira os produtos (CO_2 e H_2) que, quando em excesso, são tóxicos a algumas espécies de microrganismos, provocando distúrbios metabólicos. Assim, a redução ou eliminação da produção de metano pode exigir o estabelecimento de uma rota que evite o acúmulo de H_2 e permita o adequado funcionamento do rúmen (WEIMER, 1998), como por exemplo, a via de produção do propionato.

A partir da homologação do Protocolo de Kioto, em 2002, maiores investimentos para pesquisas no setor agropecuário relacionadas às emissões dos gases do efeito estufa foram firmados pelos países de clima tropical. O sistema de pastejo constitui a principal forma de alimentação dos ruminantes adaptados ao ambiente tropical, entretando a composição química da dieta acaba influenciando a produção de metano entérico. Além disso, a temperatura ambiental também tem influência, podendo atuar de forma indireta, interferindo na composição química das plantas, ou de forma direta, alterando o comportamento ingestivo do animal e, conseqüentemente, as características da

digestão (HOOK *et al.*, 2010). Reduzir a produção de metano no rúmen dos animais pode trazer benefícios econômicos aos produtores, pois aumenta a eficiência do uso da energia e a produtividade. Uma das alternativas que já vem sendo estudada é a adição de óleos essenciais na dieta dos ruminantes.

A adição de óleos essenciais na dieta pode contribuir para a redução da metanogênese, pois atuam como agentes defaunadores (MOSS *et al.*, 2000). Além disso, a quantidade suplementada (FIEVEZ *et al.*, 2003) e a característica química ditam a magnitude do efeito produzido. Os óleos essenciais selecionam algumas espécies microbianas e podem ser utilizados como substrato para a biohidrogenação (WADA *et al.*, 2008).

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de óleos essenciais sobre metabolismo ruminal, população microbiana e produção de metano em ovinos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Rebanho de ovinos

O agronegócio move a economia do Brasil, com setores que possuem forte potencial de crescimento. No âmbito nacional, mesmo com as dificuldades enfrentadas, observa-se um avanço na ovinocultura. Dados do levantamento de 2015, segundo o Instituto Nacional de Geografia e Estatística, quantificaram o contingente do rebanho ovino em 18,41 milhões de cabeças, aproximadamente 4,5% maior que em 2014. A região do país com maior rebanho é o Nordeste com 60,6%; seguida da região Sul, com 26,5%; Centro-Oeste, com 5,6%; Sudeste, com 3,8% e Norte, com 3,6% do total de ovinos (IBGE, 2015).

A região Sul do país destaca-se pela criação de raças lanadas, sendo que em 2015 a região respondeu por 98,0% das tosquiadas realizadas em ovinos no país. A produção de lã teve uma queda em relação a 2014, porém o valor da lã aumentou 15% e atingiu R\$ 96,87 milhões. Já a região Nordeste destaca-se pela produção de carne ovina (IBGE, 2015).

A carne passou a ter uma significância maior em termos de valor de mercado quando comparada à lã, que no passado era o produto de maior relevância da agroindústria da ovinocultura (MDIC/ARCO, 2010). No Brasil, o consumo de carne ainda é modesto, cerca de 700 gramas *per capita* (MAPA, 2015). O que se observa na prática é que os produtores não têm aderido à ovinocultura devida à falta de conhecimento sobre a estruturação da cadeia e por falta de abatedouros especializados, o que trava o maior crescimento desse setor. A produção de carne ovina acaba sendo insuficiente para manter o mercado interno de forma madura, sendo necessárias importações, principalmente do Uruguai, maior produtor mundial. A ovinocultura passa a ser, então, um mercado promissor do agronegócio nacional, levando-se em consideração a

importação para atender ao consumo interno, com comercialização praticamente garantida (SNA, 2015).

2.2. Produção entérica de metano e microrganismos ruminais

O rúmen é caracterizado por ser uma câmara fermentativa colonizada por microrganismos e é o local onde é digerida a maior parte dos alimentos fibrosos. Os microrganismos ruminais sobrevivem em anaerobiose por um processo de consórcio e são classificados como eubactérias, protozoários, fungos, vírus bacteriófagos (KAMRA, 2005) e *Archaea* metanogênicas (BAKER, 1999).

O alimento que chega ao rúmen é fermentado pela microbiota presente, onde a matéria orgânica é convertida em ácidos graxos de cadeia curta (COTTLE *et al.*, 2011), amônia (NH₃), proteína microbiana, vitaminas do complexo B e vitamina K, que serão usados pelos ruminantes para o crescimento, reprodução e produção. Além disso, no processo de fermentação também são liberados produtos indesejáveis como nitrato, gás carbônico (CO₂), metano (CH₄) e gás hidrogênio (OWENS e GOESTSCH, 1993), que são retirados do ambiente ruminal para mantê-lo em condições favoráveis ao contínuo crescimento da população de microrganismos.

A produção de metano está intimamente relacionada com o metabolismo ruminal de carboidratos, na qual a proporção dos principais ácidos graxos liberados (ácido acético, propiônico e butírico) indica maior ou menor produção desse gás (CH₄). A composição química do alimento determina a quantidade e tipo de ácidos graxos voláteis (AGV), que são responsáveis por até 70% da exigência diária da energia bruta dos ruminantes (BERGMAN, 1990), bem como a quantidade de gás hidrogênio produzido (KEBREAB *et al.*, 2009). Dietas ricas em carboidratos fibrosos (CF) produzem proporções molares de

ácidos acético:propiónico:butírico com valores de 75:15:10 e dietas ricas em carboidratos não fibrosos (CNF), até 40:40:20 (GOULART *et al.*, 2011).

A via acetogênica possui potencial de produção de metano maior que as demais vias que liberam os principais AGVs no rúmen, pois, a partir do metabolismo de uma molécula de glicose, são geradas duas moléculas de acetato, duas de gás carbônico (CO₂) e quatro de gás hidrogênio (H₂). Esses gases são substratos para a formação do gás metano (CH₄). Quando a glicose é utilizada para a produção de butirato, são liberados 1 mol de butirato, dois de CO₂ e dois de H₂. Em contrapartida, para a formação do ácido propiónico, não são liberados CO₂ e H₂, pelo contrário, nas duas vias (succinato e acrilato) são retirados 2 mol de H₂ do ambiente ruminal, sendo liberados 2 mol de propionato (MOSS *et al.*, 2000).

Existem interações (relações sintróficas) bastante complexas entre os microrganismos no processo de digestão no rúmen que vêm sendo estudadas há vários anos (BRYANT *et al.*, 1967; MIURA *et al.*, 1980; PHELPS *et al.*, 1985). Essas interações mostram que o produto da digestão de um microrganismo é o substrato utilizado por outro. A conhecida “transferência de interespecies de hidrogênio” foi relatada por Wolin (1974) como importante fator de interferência sobre a quantidade e os tipos de ácidos graxos voláteis liberados no rúmen em função da mudança nos produtos finais de fermentação.

As *Archaea* metanogênicas formam um grupo de microrganismos ruminais bastante funcional, mesmo representando apenas 0,5 a 3% do total (LIN *et al.*, 1997), pois utilizam o gás hidrogênio (H₂) para reduzir o gás carbônico (CO₂), produtos da fermentação de outros microrganismos, a metano (COTTLE *et al.*, 2011), reduzindo a pressão parcial de hidrogênio e mantendo os padrões de equilíbrio redox.

Methanobrevibacter ruminantium, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanobacterium*

bryanti, *Methanoculleus olentangyi* e *Methanobacterium formicicum* representam as principais metanogênicas encontradas no rúmen de diferentes espécies animais (JOBLIN *et al.*, 1990; JARVIS *et al.*, 2000). São conhecidas pela importância no processo de metanogênese e diferem entre si pela preferência de substrato. A *Methanobrevibacter ruminantium* tem maior preferência por H⁺ e CO₂, mas também utiliza o formato quando o meio ruminal possui altas concentrações deste. Já a *Methanobrevibacter smithii* utiliza apenas o formato e CO₂. A *Methanosarcina barkeri* utiliza o H⁺, CO₂, acetato, metanol e metilaminas para o crescimento (MOSS, 1993).

Ruminococcus flavefaciens é uma bactéria celulolítica e produz principalmente succinato e acetato, H₂ e CO₂, com pequenas quantidades de formato. O succinato é o principal produto da fermentação dissipador de elétrons, ou seja, durante a glicólise, moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) são formadas como um intermediário na produção de piruvato, sendo reoxidadas principalmente por reações que levam à conversão de piruvato a CO₂ e succinato (WOLIN, 1974). *Ruminococcus flavefaciens* possui a enzima hidrogenase, que é altamente sensível ao acúmulo de hidrogênio. Na presença de *Archaeas* metanogênicas, a pressão de hidrogênio é menor e a regeneração da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) será feita principalmente pela via de produção de acetato. Nessas situações, ocorre maior liberação de ATP, à custa do succinato, que será utilizado para o crescimento microbiano (REILLY, 1998).

A *Fibrobacter succinogenes* é a bactéria mais abundante no rúmen, seguida pelo gênero *Ruminococcus* (FORSBERG *et al.*, 1997), e são essenciais no metabolismo de propionato, competindo com as metanogênicas por H₂. Quando a dieta fornecida aos animais é rica em carboidratos fibrosos (CF), as *F. succinogenes* utilizam a via succinato (MOSS *et al.*, 2000), podendo liberar fumarato ou succinato, dependendo da disponibilidade energética do meio.

Selenomonas ruminantium ssp. *ruminantium* é outra espécie que também utiliza o fumarato como aceptor final de elétrons para oxidar o hidrogênio (ASANUMA *et al.*, 1999).

Quando a dieta é rica em carboidratos não fibrosos (CNF), a via acrilato é utilizada por *Fibrobacter succinogenes*, liberando o lactato, que é o principal produto intermédio na conversão do amido em propionato. Ao contrário das bactérias celulolíticas e metanogênicas, bactérias lácticas, como *Selenomonas ruminantium* ssp., são conhecidas por serem tolerantes ao pH baixo, o que as torna capazes de utilizar H₂ e serem competitivas com bactérias metanogênicas, mesmo em condições desfavoráveis de pH (MOSS *et al.*, 2000).

Os protozoários entram no ecossistema ruminal como grandes produtores de hidrogênio, podendo ser responsáveis por até 50% da atividade fibrolítica do rúmen (COLEMAN, 1986). Além disso, existe associação física entre as células de protozoários e metanogênicas que favorece a transferência interespecie de hidrogênio. As metanogênicas que são encontradas anexas à parede celular (ecto-simbiontes) e no interior das células (endo-simbiontes) de protozoários ciliados contribuem entre 9% e 37% da metanogênese ruminal (FINLAY *et al.*, 1994; NEWBOLD *et al.*, 1995). Quando ocorre grande população de protozoários no rúmen, os microrganismos da família *Methanobacteriaceae*, como por exemplo, *Methanobrevibacter ruminantium*, são dominantes (UNGERFELD *et al.*, 2004), enquanto que *Methanomicrobium mobile* tem sua população reduzida (SHARP *et al.*, 1999).

Os fungos anaeróbios apresentam várias características que resultam na fisiologia anaeróbica obrigatória. A geração de energia ocorre em hidrogenosomas em que o ATP é formado por descarboxilação do malato para formar acetato, CO₂ e H₂ (VAN DER GIEZEN, 2009). Algumas espécies de fungos são importantes na degradação da lignina, a qual ocorre por um processo multienzimático, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas intra e

extracelulares, do grupo das oxidoreduções (representadas por peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio) e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular (LEONOWICZ *et al.*, 2001). A observação de que populações de metanogênicas podem ser encontradas unidas às superfícies externas dos protozoários levou à especulação de que exista relação semelhante entre os fungos anaeróbios e *Archeae* metanogênicas. Os esporângios com seus hidrogenosomas geralmente projetam-se na fase fluida do rúmen, onde as metanogênicas estão localizadas (GORDON e PHILLIPS, 1998).

A bactéria fibrolítica *Butyrivibrio fibrisolvens* foi uma das primeiras a serem identificadas por hidrogenar ácidos graxos insaturados, exceto no passo final para produzir estearato. *Butyrivibrio fibrisolvens* competem com as metanogênicas no processo de biohidrogenação, utilizando o hidrogênio livre para incorporação nas moléculas de ácidos graxos. A bio-hidrogenação do ácido linoleico por *Butyrivibrio* sp. não produz os isômeros trans-10, causadores da síndrome de depressão da gordura do leite, liberando apenas os isômeros cis-9, trans-11 (KEPLER *et al.*, 1966; KEPLER e TOVE, 1967; KIM *et al.*, 2000).

Clostridium spp. é um gênero amplo, chega a representar 20% da população microbiana do rúmen (DOWD *et al.*, 2008), influenciando de forma positiva e/ou negativa o animal hospedeiro. Os efeitos estão associados com espécies específicas. *Clostridium perfringens*, *C. tetani*, *C. botulinum* e *C. difficile* são conhecidos pela interferência negativa que causam à saúde animal e pelas perdas significativas na produtividade, como a redução da disponibilidade de proteína (bactérias hiperprodutoras de amônia) em dietas com forragem fresca (REILLY e ATTWOOD, 1998; SONGER, 2004; ATTWOOD *et al.*, 2006). Por outro lado, espécies como *C. butyricum*, *C. cellulolyticum*, *C. stercorarium* e *C. thermocellum* podem ser benéficas para melhorar a digestibilidade da matéria orgânica (celulose) (DESVAUX *et al.*, 2000).

2.3. Perda de energia na forma de metano

A principal função do alimento é fornecer nutrientes, dentre eles a energia, que é liberada a partir de processos bioquímicos que envolvem a digestão dos nutrientes, sendo utilizada no metabolismo pós-absortivo dos animais para a manutenção, crescimento, reprodução e produção.

Durante o metabolismo dos nutrientes, ocorrem perdas energéticas, que devem ser levadas em consideração, principalmente pelo produtor que deseja melhorar a relação custo/benefício em seu empreendimento. A primeira perda energética ocorre com a eliminação das fezes, em que a porção da energia bruta (EB) do alimento que poderá ser aproveitada é chamada de energia digestível (ED). Porém, ainda ocorrem perdas com a eliminação da urina e dos gases (carbônico, metano e traços de hidrogênio), liberando a energia metabolizável (EM) que indica a estimativa da energia disponível para o animal (NRC, 1985). Por fim, existe a energia líquida (EL) do alimento que representa a porção da EM, descontadas as perdas pelo incremento calórico, que realmente será aproveitada pelo animal (NRC, 1981).

Nesse contexto, as perdas decorrentes dos gases liberados devem ser levadas em consideração, principalmente nos ruminantes, devido à grande quantidade produzida e ao alto valor energético embutido, que, no caso do metano, um grama contém 13,344 quilocalorias (MAYNARD *et al.*, 1984). Assim, uma vaca de leite com o peso vivo em torno dos 600 kg chega a produzir até 630 litros de metano por dia, dependendo do sistema de manejo alimentar adotado, o que seria suficiente para produzir 7,65 kg de leite corrigido para 4% de gordura (KAHARABATA *et al.*, 2000). Ou seja, se considerarmos o preço do litro de leite a R\$1,10 (um real e dez centavos), o produtor estaria deixando de ganhar, ao final de um mês, R\$252,45 (duzentos e cinquenta e dois reais, quarenta e cinco centavos) com esse animal.

De acordo com o Nutrition Research Council, para ovinos, a perda de metano varia de 3 a 10% da energia bruta consumida, variando devido ao tipo de dieta e ao nível de alimentação (NRC, 1985). Um estudo realizado por Murray *et al.* (1976) com ovinos, com o objetivo de avaliar a produção de metano (CH₄), mostrou uma taxa média de 18 mL de CH₄/minuto, representando 87% da produção total. Já Johnson *et al.* (1994) avaliaram bovinos em diferentes estágios de maturidade e observaram que novilhos produziram 256 L/dia de metano (9,1% da EB ingerida), novilhas, 193,9 L/dia (5,6% da EB) e vacas em lactação, 548,2 litros/dia (5,7% da EB).

Com a homologação do Protocolo de Kioto, em 2002, os países de clima tropical se prontificaram a destinar maiores investimentos para pesquisas no setor agropecuário relacionadas às emissões dos gases do efeito estufa. Os ruminantes adaptados ao ambiente tropical são criados preferencialmente em sistemas de pastejo, no qual a composição química do alimento influencia a produção de metano entérico. Além disso, a temperatura ambiental também tem influência, podendo atuar de forma indireta pela interferência na composição química das plantas, ou de forma direta, alterando o comportamento ingestivo do animal e, conseqüentemente, as características da digestão (HOOK *et al.*, 2010).

As diferenças na composição química da parede celular e a relação de parede celular/conteúdo celular das forrageiras do clima temperado (C₃) e do clima tropical (C₄) geram diferenças na fermentação ruminal e, portanto, na produção de metano (PEDREIRA *et al.*, 2009). Plantas C₄ apresentam maiores proporções de fibra (NELSON e MOSER, 1994), favorecendo a fermentação acética e a produção de metano. Além disso, essa fibra possui baixa digestibilidade, influenciando negativamente a velocidade da fermentação. Comparativamente às plantas C₃, a menor velocidade na fermentação das plantas C₄ significa um menor aporte de nutrientes disponíveis para os microrganismos, podendo diminuir a produção de metano (BERCHIELLI *et al.*, 2012). A

suplementação em dietas com forragens de alta qualidade aumenta o aporte de nutrientes para os microrganismos, melhora a eficiência da fermentação, seleciona algumas espécies de bactérias fermentadoras de carboidratos e, conseqüentemente, aumenta a produção de CH₄ por animal (COTTLE *et al.*, 2011).

As diferenças raciais dos ruminantes também podem influenciar na produção de metano entérico. Em um estudo foi realizado por Pedreira *et al.* (2009) com o objetivo de avaliar as diferenças de raças de vacas leiteiras, os autores observaram que vacas puro sangue (Holandês) tendem a produzir mais metano do que as mestiças (3/4 Holândes \times 1/4 Gir). Ainda segundo esses autores, a produção de CH₄ varia de acordo com a categoria animal e o sistema de produção. As novilhas produziram menos metano, seguidas das vacas secas e das vacas em lactação, que apresentaram a maior produção. A maior produção de metano foi observada nas novilhas mantidas em pastagens adubadas (sistema intensivo), resultado maior do que o verificado quando animais dessa categoria se encontravam em pastagens não adubadas.

A eficiência produtiva dos animais é outro fator estudado quanto à produção de metano. Eugene *et al.* (2008), em estudo de meta-análise utilizando sete publicações, relataram que a produção de metano era inferior quando os animais recebiam a dieta com maior teor de extrato etéreo. Os suplementos lipídicos utilizados nos estudos foram sementes oleaginosas, óleos de canola, soja e algodão. Quando as vacas eram suplementadas com lipídeos, produziam menor teor de CH₄/kg de leite corrigido para 4% de gordura do que as vacas que haviam recebido a dieta controle. O mesmo efeito da suplementação lipídica foi observado quando a produção de metano foi expressa em relação ao rendimento de proteína no leite, no qual as vacas que eram suplementadas com lipídeos, produziam menor teor de CH₄/kg de proteína no leite do que as vacas que haviam recebido a dieta controle. De acordo com esses resultados, o aumento da

eficiência produtiva, ocasionado pelo aumento na eficiência alimentar, é observado em dietas com a suplementação de lipídeos, diminuindo a produção de metano (cerca de 9%).

2.4. Efeitos de óleos essenciais no metabolismo ruminal e na produção de metano

Uma variedade de compostos e substâncias tem sido avaliada quanto à capacidade de reduzir a produção de metano nos ruminantes (HRISTOV *et al.*, 2013). Porém, em concentrações que são eficazes na mitigação do metano, a maior parte deles é tóxica para os animais hospedeiros ou possuem potencial de toxicidade para os produtos de origem animal (MARTIN *et al.*, 2010; BUDDLE *et al.*, 2011; PATRA, 2012). Os óleos essenciais representam alternativa de aditivo de origem vegetal para a alimentação animal por melhorar o metabolismo microbiano ruminal e não transferir a toxicidade para os produtos de origem animal, aumentando a eficiência de fermentação e inibindo a metanogênese (CALSAMIGLIA *et al.*, 2007; ARAÚJO, 2010; PATRA, 2011).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos no crescimento, desenvolvimento ou reprodução normal da planta. Esses metabólitos são frequentemente envolvidos na defesa da planta e, portanto, podem possuir propriedades antimicrobianas (FRAENKEL, 1959; TAJKARIMI *et al.*, 2010). Os óleos essenciais (OE) são compostos complexos, produzidos durante o metabolismo secundário por todos os órgãos de plantas aromáticas (sementes, brotos, folhas, flores, frutas, raízes, caules ou casca) e armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. A composição pode variar de acordo com a localização, ou ainda, quando obtida do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar consideravelmente de acordo com as condições climáticas e de solo. Os

grupos funcionais e o tamanho das moléculas definem as características físicas, químicas e biológicas desses óleos (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais são formados por dois grupos de moléculas principais: terpenos ou terpenoides e compostos aromáticos ou alifáticos. Os fenilpropanoides são compostos aromáticos e ocorrem com menor frequência que os terpenos. As vias biossintéticas, em matéria de terpenos e compostos aromáticos, geralmente são separadas em plantas, mas podem coexistir em algumas espécies, como é o caso dos óleos de cravo, erva-doce e canela. Os monoterpenos (C₁₀) são os mais comuns nas cadeias de terpenos (chegando a representar até 90% da composição) e, por apresentar baixo peso molecular, são os responsáveis pela característica de volatilidade (BAKKALI *et al.*, 2008).

A atividade antimicrobiana está fortemente associada à hidrofobicidade (DORMAN e DEANS, 2000; LAMBERT *et al.*, 2001; TURGIS *et al.*, 2009). As paredes celulares das bactérias Gram-positivas são constituídas predominantemente por peptídeoglicanos ligados a outras moléculas, tais como proteínas ou ácido teicoico (NAZZARO *et al.*, 2013). Por outro lado, as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos hidrofílicos, o que cria uma barreira a compostos hidrofóbicos, encontrados nos óleos essenciais (NIKAIDO, 1994; NIKAIDO, 2003). Assim, as bactérias Gram-negativas são consideradas menos suscetíveis aos efeitos de óleos essenciais do que as bactérias Gram-positivas (TROMBETTA *et al.*, 2005). No entanto, os constituintes hidrofóbicos dos óleos essenciais são capazes de obter acesso ao periplasma de bactérias Gram-negativas por meio das porinas da membrana externa (HELANDER *et al.*, 1998).

Além disso, estudos mostraram que os óleos essenciais exercem ação esgotando rapidamente o *pool* de ATP intracelular, com redução da síntese de ATP e aumento da hidrólise de ATP (HELANDER *et al.*, 1998; ULTEE *et al.*, 1999; NIKAIDO, 2003; FISHER e PHILLIPS, 2009). O óleo essencial também

reduz o potencial elétrico transmembrana, força motriz da síntese de ATP utilizado para funções vitais das células (ULTEE *et al.*, 2002; VELDHUIZEN *et al.*, 2006; BOUHDID *et al.*, 2010), aumenta a permeabilidade de prótons da membrana, e diminui o pH interno de bactérias Gram-positivas, de acordo com gradientes de íons da membrana celular (ULTEE *et al.*, 1999, FISHER e PHILLIPS, 2009). O óleo essencial ainda diminui o conteúdo de proteína celular, utilizando o potássio (K^+) de células bacterianas, em um curto período de tempo (5 minutos). O potássio desempenha papel na ativação de enzimas citoplasmáticas, na manutenção da pressão osmótica e na regulação do pH celular. O vazamento de potássio para fora da célula é uma indicação clara de que a membrana está danificada (ULTEE *et al.*, 1999).

Benchaar *et al.* (2007) investigaram os efeitos *in vitro* de óleos essenciais na fermentação microbiana no rúmen. Observaram que apenas os compostos fenólicos, carvacrol, timol e eugenol, alteraram a fermentação ruminal, aumentando o pH e a concentração de butirato e diminuindo a concentração de propionato, indicando que a atividade antibacteriana desses óleos não seria nutricionalmente benéfica. No entanto, Busquet *et al.* (2006) observaram que o eugenol diminuiu a concentração total de ácidos graxos voláteis, porém, a proporção molar de propionato foi aumentada. Estudos realizados com uma mistura de óleos essenciais, contendo cinamaldeído e eugenol, mostraram redução no consumo de ração em bovinos de corte (BUSQUET *et al.*, 2003; CARDOZO *et al.*, 2006; CALSAMIGLIA *et al.*, 2007). Essa redução da ingestão pode estar relacionada a problemas de palatabilidade, sugerindo que o produto precisa ser encapsulado (CALSAMIGLIA *et al.*, 2007). Os benefícios potenciais de eugenol na fermentação microbiana do rúmen foram testados *in vitro* por Castillejos *et al.* (2006), que confirmaram que eugenol reduziu o nitrogênio amoniacal e as concentrações de ácidos graxos de cadeia ramificada, sugerindo que deaminação

foi inibida. Isso indica que o eugenol pode melhorar o perfil de ácidos graxos voláteis, bem como a utilização de nitrogênio no rúmen.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, R. C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal *in vitro***. 2010. 181 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura/USP – SP, 2010.

ASANUMA, N.; IWAMOTO, M.; HINO, T. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 82, n. 4, p. 780-787, 1999.

ATTWOOD, G. *et al.* Production of indolic compounds by rumen bacteria isolated from grazing ruminants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1261-1271, 2006.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BAKER, S. K. Rumen methanogens and inhibition of methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 50, n. 8, p. 1293-1298, 1999.

BENCHAAR, C. *et al.* Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 87, p. 413-419, 2007.

BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D.; CANESIN, R. C. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 4, p. 954-968, 2012.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Baltimore, v.10, p.567-589, 1990.

BRYANT, M. P. *et al.* "*Methanobacillus omelianskii*," a symbiotic association of two species of bacteria. **Archives of Microbiology**, Berlim, v. 59, p. 20-31, 1967.

BUDDLE, B. M. *et al.* Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 1, p. 11-17, 2011.

BUSQUET, M. *et al.* Efecto del extracto de ajo y el cinemaldehído sobre la producción, composición y residuos en leche en vacas de alta producción. **ITEA**, v. Extra, p. 756-758. 2003.

BUSQUET, M. *et al.* Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 761-771, 2006.

CALSAMIGLIA, S. *et al.* Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CARDOZO, P. W. *et al.* Effects of alfalfa extract, anise, capsicum and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high concentrate diet. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2801-2808, 2006.

CASTILLEJOS, L. *et al.* Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2649-2658, 2006.

CHURCH, D. C. **The ruminant animal, digestive physiology and nutrition**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 641 p, 1993.

COLEMAN, G. S. The distribution of carboxymethylcellulase between fractions taken from the rumen of sheep containing no protozoa or one of five different protozoal populations. **The Journal of Agricultural Science**, v. 106, p. 121-127, 1986.

COTTLE, D. J.; NOLAN, J. V.; WIEDEMANN, S. G. Ruminant enteric methane mitigation: a review. **Animal Production Science**, Melbourne, v.51, p.491-514, 2011.

DESVAUX, M.; GUEDON, E.; PETITDEMANGE, H. Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2461-2470, 2000.

DORMAN, H. J. D.; DEANS S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.

DOWD, S. E. *et al.* Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2008.

EUGENE, M. *et al.* Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 88, n. 2, p. 331-337, 2008.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Agriculture, forestry and other land use emissions by sources and removals by sinks**. ESS Working Paper, n. 2, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 20 janeiro 2017.

FIEVEZ, V. *et al.* Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation in vitro and in vivo. **Animal Feed Science and Technology**, v. 104, p. 41-58, 2003.

FINLAY, B. J. *et al.* Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 117, p. 157–162, 1994.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1343-1349, 2009.

FORSBERG, C. W. *et al.* Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In: MACKIE, R. I.; WHITE, B. A (Eds.). **Gastrointestinal microbiology: Gastrointestinal Ecosystems and fermentations**. New York, Chapman and Hall, p. 319-379, 1997.

FRAENKEL, G. S. The raison d'être of secondary plant substances. **Science**, v. 129, p. 1466-1470, 1959.

GOULART, S. R. *et al.* Ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas alimentadas com diferentes teores de concentrado na dieta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 6, p. 1479-1486, 2011.

GORDON, G. L. R.; PHILLIPS, M. W. The role of anaerobic gut fungi ruminants. **Nutrition Research Reviews**, v. 11, n. 1, p. 133-168, 1998.

HELANDER, I. M. *et al.* Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

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

HRISTOV, A. N. *et al.* Special Topics - Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 5045-5069, 2013.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 43, 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/default.shtm>>. Acesso em: 20 janeiro 2017.

JARVIS, G. N. *et al.* Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. **Current Microbiology**, New York, v.4, n. 5, p. 327-332, 2000.

JOBLIN, K. N.; NAYLOR, G. E.; WILLIAMS, A. G. Effect of *Methanobrevibacter smithii* on xylanolytic activity of anaerobic ruminal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 56, n. 8, p. 2287-2295, 1990.

JOHNSON, K. *et al.* Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. **Environmental Science and Technology**, v.28, p.359- 362, 1994.

KAHARABATA, S. K. *et al.* Estimating methane emissions from dairy cattle housed in a barn and feedlot using an atmospheric tracer. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 15, p. 3296-3302, 2000.

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

KEBREAB, E. *et al.* Advances in modeling ruminant nutrient utilization. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.87, E Supplement, p.E111-E122, 2009.

KEPLER, C. R. *et al.* Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 1350-1354, 1996.

KEPLER, C. R.; TOVE, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 242, p. 5686-5692, 1997.

KIM, Y. J. *et al.* Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5226-5230, 2000.

LAMBERT, R. J. W. *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.

LEONOWICZ, A. *et al.* Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, n. 3-4, p. 185-227, 2001.

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, p. 281-294, 1997.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Mercado Interno**. Brasília, 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno>>. Acesso em: 20 janeiro 2017.

MARTIN, C.; MORGAVI, D. P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v. 4, n. 3, p. 351-365, 2010.

MAYNARD, L. A. *et al.* **Nutrição animal**. 3 ed. São Paulo: Freitas Bastos, 726 pag., 1984.

MDIC/ARCO – MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRI E COMÉRCIO EXTERIOR/ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE OVINOS. **Estudo do mercado externo de produtos derivados da ovinocaprinocultura**. Passo Fundo: Méritos, 168 p., 2010.

MIURA, H.; Horiguchi, M.; MATSUMOTO, T. Nutritional interdependence among rumen bacteria, *Bacteroides amylophilus*, *Megasphaera elsdenii* and *Ruminococcus albus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 40, n. 2, p. 294-300, 1980.

MOSS, A. R. **Methane**: Global warming and production by animals. Canterbury: Chalcombe Publications, 105 p, 1993.

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

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, p. 382-388, 1994.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 593-656, 2003.

NAZZARO, F. *et al.* Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1451-1474, 2013.

NELSON, C. J.; MOSER, L. E. Plant factors affecting forage quality. In: FAHEY JUNIOR, G. C. (Ed). **Forage quality, evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p. 115-154, 1994.

NEWBOLD, C. J. *et al.* The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 230-234, 1995.

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutritional energetics of domestic animals. 2 ed. Washington, D. C.: **National Academy Press**, 54 p., 1981.

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrients requirements of sheep. 6.ed. Washington, D.C.: **National Academy Press**, 112 p., 1985.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. Long Grove, Walveland Press, p. 145-171, 1993.

PATRA, A. K. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, n. 5, p. 416-428, 2011.

PATRA, A. K. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 4, p. 1929-1952, 2012.

PEDREIRA, M. S. *et al.* Ruminant methane emission by dairy cattle in southeast Brazil. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 6, p. 742-750, 2009.

PHELPS, T. J.; CONRAD, R.; ZEIKUS, J. G. Sulfate-dependent interspecies H₂ transfer between *Methanosarcina barkeri* and *Desulfovibrio vulgaris* during the coculture metabolism of acetate of methanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 50, n.3, p. 589-594, 1985.

REILLY, P. E. B. **Rumen biochemistry**. Brisbane: The University of Queensland, 1998. Disponível em: <<http://www.vet.ed.ac.uk/clive/cal/RUMENCAL/vetcal.html>>. Acesso em: 20 janeiro 2017.

REILLY, K.; ATTWOOD, G. T. Detection of *Clostridium proteoclasticum* and closely related strains in the rumen by competitive PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 907-913, 1998.

SCHOFIELD, P. Gas production methods. In: D'MELLO, J. P. F. **Farm animal metabolism and nutrition**. Wallingford: CABI Publishing, 2000. cap. 10, p. 209- 232.

SHARP, M. *et al.* Widespread bacterial populations at glacier beds and their relationship to rock weathering and carbon cycling. **Geology**, Boulder, v. 27, p. 107-110, 1999.

SNA – SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Produção de carne ovina pode ser mais rentável que a bovina**. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://sna.agr.br/producao-de-carne-ovina-pode-ser-mais-rentavel-que-a-bovina/>>. Acesso em: 11 abril 2017.

SONGER, J. G. The emergence of *Clostridium difficile* pathogen of food animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, n. 2, p. 321-326, 2004.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p. 1199-1218, 2010.

TROMBETTA, D. *et al.* Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2474-2479, 2005.

TURGIS, M. *et al.* Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. **Food Control**, v. 20, p. 1073-1079, 2009.

UNGERFELD, E. M. *et al.* Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 520-526, 2004.

ULTEE, A. *et al.* Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, 1999.

ULTEE, A. *et al.* The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied of Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1561-1568, 2002.

VAN DER GIEZEN, M. Hydrogenosomes and mitosomes: Conservation and evolution of functions. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 221-231, 2009.

WADA, F.Y. *et al.* Grãos de linhaça e canola sobre o desempenho, digestibilidade aparente e característica de carcaça de novilhas nelore terminada em confinamento. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 883- 895, 2008.

WEIMER, P.J. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. **Journal of Animal Science**, v.76, p.3114-3122, 1998.

WOLIN, M. J. Metabolic interactions among intestinal microorganisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 27, p. 1320-1328, 1974.

CAPÍTULO I

DIVERSIDADE MICROBIANA NO RÚMEN DE OVINOS SUPLEMENTADOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS

RESUMO

MENEZES, Jordana Carvalho de. **Diversidade microbiana no rúmen de ovinos suplementados com óleos essenciais**. 2017. Cap. 1. p. 27-50. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG³.

Objetivou-se avaliar o efeito de uma mistura de óleos essenciais sobre a população microbiana do rúmen. Foram utilizados nove ovinos canulados, suplementados com três níveis de inclusão da mistura de óleos essenciais (MSOE): 0 (controle), 200 e 400 mg MSOE/kg MS consumida. Foram realizadas coletas de líquido ruminal às 0, 24, 168 e 360 horas após adição dos óleos. O período experimental teve duração de 69 dias, em delineamento experimental de quadrado latino 3x3. A quantificação dos microrganismos Bactérias totais, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp., *Fibrobacter succinogenes*, Fungos anaeróbicos totais, *Archaeae* metanogênicas, *Ruminococcus flavefaciens* e *Selenomonas ruminantium* foi estimada por meio da amplificação das sequências do DNA ribossomal com *primers* específicos pela técnica qPCR. A população de *B. fibrisolvens* apresentou efeito quadrático, com aumento na abundância relativa, em relação à dieta controle, na adição de 200 mg MSOE/kg MS consumida. A população de *S. ruminantium* apresentou maior abundância relativa na dieta com 400 mg MSOE/kg MS consumida. Já para *Clostridium* sp. e *Fibrobacter succinogenes* foi observado aumento na população às 24 e 360 horas após o início do fornecimento da MSOE, respectivamente. A mistura de óleos essenciais utilizada é capaz de alterar significativamente a população de *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Selenomonas ruminantium*.

³**Comitê de Orientação:** Prof. Dr. Vicente Ribeiro Rocha Júnior – Departamento de Ciências Agrárias/UNIMONTES (Orientador); Prof. Dr. Maria Dulcineia da Costa – Departamento de Ciências Agrárias/UNIMONTES (Coorientador); Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla – Laboratório de Nutrição Animal/CENA-USP (Coorientador)

ABSTRACT

MENEZES, Jordana Carvalho de. **Microbe diversity on rumen of sheeo supplied with essential oils**. 2017. Chapter 1. p. 27-50. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) - State University of Montes Claros, Janaúba, MG⁴.

The objective of this study was to evaluate the effect of a mixture of essential oils on the microbial population on rumen. Nine cannulated sheep were used, supplemented with three levels of inclusion of the essential oils mixture (MSOE): 0 (control), 200 and 400 mg MSOE / kg DM consumed. Ruminal fluid samples were collected at 0, 24, 168 and 360 hours after addition of the oils. The experimental period lasted 69 days, in a 3x3 Latin square experimental design. The quantification of total bacteria, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp., *Fibrobacter succinogenes*, Total anaerobic fungi, *Archeae* metanogenic, *Ruminococcus flavefaciens* and *Selenomonas ruminantium* was estimated by the amplification of the sequences of ribosomal DNA with specific primers through the qPCR technique. The population of *B. fibrisolvens* presented a quadratic effect, with an increase in relative abundance compared to the control diet, at the addition of 200 mg MSOE/kg DM consumed. The population of *S. ruminantium* presented greater relative abundance for the diet with 400 mg MSOE/kg MS consumed. As for *Clostridium* sp. and *Fibrobacter succinogenes*, an increase in the population was observed at 24 and 360 hours after the start of delivery of MSOE, respectively. The mixture of essential oils is capable of significantly altering the population of *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Selenomonas ruminantium*.

⁴**Guidance Committee:** Prof. Dr. Vicente Ribeiro Rocha Júnior - Department of Agrarian Sciences / UNIMONTES (Advisor); Prof. Dr. Maria Dulcineia da Costa - Department of Agrarian Sciences / UNIMONTES (Co-adviser); Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla - Laboratory of Animal Nutrition / CENA-USP (Co-adviser)

1. INTRODUÇÃO

A produção agropecuária é um forte setor da economia nacional e é a atividade produtiva que ocupa maior área do território brasileiro. Dentro desse contexto, a atividade passou a ser um dos principais responsáveis pelas emissões de gases, notadamente o dióxido de carbono (CO₂), o metano (CH₄) e o óxido nitroso (N₂O), chamados de Gases de Efeito Estufa (GEE), por serem taxados como os gases responsáveis pelo aquecimento global. Existem controvérsias entre os estudiosos quanto ao assunto, porém, o fato é que as emissões acompanham o crescimento do setor, que aumentou em área e produtividade.

Para atenuar o impacto negativo sobre as alterações climáticas provocadas pela emissão de CH₄ em ruminantes e melhorar a eficiência alimentar, estratégias vêm sendo estudadas, sendo elas a manipulação genética dos microrganismos metanogênicos do rúmen e a manipulação da dieta (HRISTOV *et al.*, 2013). O conhecimento gerado a partir dos estudos relacionados ao metabolismo ruminal dos nutrientes e ao efeito que seu produto tem sobre os microrganismos presentes torna possível uma tomada de decisão mais eficiente acerca da mitigação do metano entérico.

Uma variedade de compostos e substâncias tem sido avaliada quanto à sua capacidade de reduzir a produção de metano nos ruminantes (ZHOU *et al.*, 2011; ABECIA *et al.*, 2012). Os óleos essenciais podem representar alternativa de aditivo de origem vegetal para a alimentação animal por melhorarem o metabolismo microbiano ruminal, aumentando a eficiência de fermentação e inibindo a metanogênese (PATRA e YU, 2015; METWALLY, 2016).

Objetivou-se, com este estudo avaliar o efeito de uma mistura de óleos essenciais sobre a população microbiana do rúmen de ovinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local

O experimento foi realizado no Centro de Energia Nuclear em Agricultura (CENA, USP), localizado na cidade Piracicaba, São Paulo, situado a uma latitude e longitude de $-22,72528^{\circ}$ e -47.649167° , respectivamente. O protocolo, que incluiu a amostragem de líquido ruminal, foi aprovado pela Comissão Interna de Ética em Experimentação Animal do CENA/USP (CIEEA / CENA 001/2011).

2.2. Animais, tratamentos, período experimental e delineamento estatístico

Foram utilizados nove ovinos canulados da raça Santa Inês ($55 \pm 11,1$ kg) que nunca tiveram contato com óleos essenciais. Foi utilizada uma dieta basal contendo três níveis de inclusão da mistura de óleos essenciais (MSOE): zero (controle), 200 (baixa) e 400 (alta) mg MSOE / kg MS ingerida. A mistura de óleos essenciais (MSOE) foi um produto comercial, microencapsulado contendo, em iguais proporções, Carvacrol, Cinamaldeído, Eugenol e Oleoresina de pimenta (Activo Premium, GRASP Ind. e Com. LTDA, Curitiba, Paraná - Brasil).

A dieta basal foi constituída por 500 g de feno de capim Bermuda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers., híbrido do “Tifton-85”) e 500 g de concentrado, a qual foi formulada em kg de matéria seca para atender ou exceder as recomendações (NRC, 2007) para energia e proteína de ovinos em terminação. A composição da dieta basal e a análise química são mostradas na Tabela 1.

TABELA 1. Composição da dieta basal experimental e composição química, dadas em g/kg MS

Itens	Dieta experimental
Ingredientes	
Feno de Tifton	500
Milho moído	327
Farelo de soja	173
Composição química	
Matéria Orgânica	898
Proteína Bruta	158
Fibra indigestível em Detergente Neutro	541
Fibra indigestível em Detergente Ácido	251
Lignina	52,6
Extrato Etéreo	48

Todos os animais foram alimentados duas vezes por dia em sistema de dieta completa, às 9h e 16h, e tiveram acesso livre a mistura mineral (8,5% P; 16,5% Ca; 1% Mg, 2,5% S; 12% Na; 350 mg/kg F; 756 mg/kg Cu; 2,800 mg/kg Zn; 2,180 mg/kg Mn; 66 mg/kg I; 44 mg/kg Co; 14 mg/kg Se) e água fresca. O grão de milho e o feno de Bermuda foram moídos usando-se peneiras com poros de 4,7 e 10 mm (moinho DPM1, Nogueira, Itapira, SP, Brasil), respectivamente, para minimizar o desperdício de ração. Para a mistura dos ingredientes do concentrado, utilizou-se um misturador horizontal de 500 kg (MAP Equipamentos Agropecuários e Industriais LTDA, Londrina, PR, Brasil). As dietas ofertadas diariamente foram pesadas em balança digital, e o fornecimento foi ajustado de forma que as sobras representassem 10% da quantidade de matéria seca fornecida. Os alimentos foram amostrados durante todo o período experimental e congelados a -20 °C para análises posteriores.

O período experimental teve duração de 69 dias, divididos em três períodos de 23 dias, sendo os primeiros 15 dias de cada período para adaptação dos animais às dietas contendo a MSOE e os 8 últimos dias para ensaio de metabolismo e quantificação da produção de metano entérico. Antes de cada

período experimental, os animais recebiam a dieta base, sem MSOE, por 5 dias. As coletas de conteúdo ruminal para avaliação da microbiota ruminal ocorreram nos 15 dias de adaptação dos animais à dieta com MSOE. O delineamento experimental foi o quadrado latino triplo 3x3, com três quadrados simultâneos, compostos, cada um, com três animais, três tratamentos e três períodos experimentais.

2.3. Coleta do líquido ruminal

As amostras de líquido ruminal (30 mL) foram coletadas, sempre, três horas após o fornecimento da dieta da manhã, utilizando-se uma sonda de aço inoxidável (2,5 mm) ligada a uma seringa de grande capacidade. A sonda era inserida via cânula ruminal e o líquido ruminal era coletado em diferentes partes do rúmen, perfazendo um total de aproximadamente 200 mL. Foram realizadas quatro coletas de líquido ruminal por período: Tempo 0 (15º dia) - três horas após o fornecimento da dieta no primeiro período; Tempo 24 (16º dia) - 24 horas após o Tempo 0; Tempo 168 (22º dia) - 168 horas após o Tempo 0; Tempo 360 (30º dia) - 360 horas após o Tempo 0.

Para avaliar a população microbiana do rúmen as amostras foram congeladas e mantidas a -20 °C sem conservantes.

2.4. Extração e determinação da pureza e concentração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se um método modificado (DENMAN e MCSWEENEY, 2006). Uma alíquota de 1,5 mL, retirada da amostra de líquido ruminal após o descongelamento à temperatura ambiente, foi colocada em um tubo de microcentrífuga com capacidade para 2 mL com tampa de rosca contendo 250 mg de bolinhas de zircônio e uma esfera de vidro. Esse

material foi centrifugado por 5 minutos a 14000 x g para posterior retirada do sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensionado com 1 mL do tampão de lise celular (0,2% de SDS, 100 mM de Tris-HCl, 5 mM de EDTA e 200 mM de NaCl), 100 µL da solução de acetato (29,44 g de acetato de potássio e 11,5 mL de ácido acético glacial) e 100 µL de água mΩ. Os tubos foram então colocados em *ultrafreezer* a -80 °C por 15 minutos, descongelados à temperatura ambiente e agitados em vórtex por dois minutos. As etapas de congelamento, descongelamento e agitação foram repetidas duas vezes para melhorar a eficiência da extração do DNA.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C, por 15 minutos, a 14000 x g. O sobrenadante (300 µL) foi transferido para um tubo de eppendorf com capacidade de 1,5 ml que continha 600 µL da solução complexante, com pH 6,0-6,5 (5 g de dióxido de sílica e 50 mL de solução de isotiocianato de guanidina 3 M – 17,73 g de isotiocianato de guanidina 3 M e 50 mL de água mΩ). Os tubos foram agitados por 5 minutos para permitir a ligação do DNA à sílica e centrifugados a 10000 x g por 1 minuto.

Todo o sobrenadante foi descartado e 500 µL da solução de etanol frio (70 mL de etanol e 30 mL de água mΩ) foi utilizada para a lavagem do *pellet*. Os tubos foram centrifugados a 10000 x g duas vezes, por 1 minuto e 20 segundos, para retirar todo o etanol presente. O DNA aderido à sílica foi eluído em 110 µl de água mΩ, e os tubos foram centrifugados a 10000 x g por 1 minuto. Por fim, 80 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de eppendorf, devidamente identificado e armazenado em *freezer* de -20°C.

A pureza e a concentração de DNA extraído de cada amostra foram determinadas por espectrofotometria (A_{260} nm, NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). A integridade foi determinada em gel de agarose (0,5% p/vol) por eletroforese (30 minutos a 100 V), usando-se como marcador de peso molecular o SYBER®.

2.5. Análise da Reação em Cadeia Polimerase quantitativo (qPCR)

As amostras de DNA obtidas foram diluídas a 10 ng/μL, a fim de se padronizar a concentração de DNA antes da utilização nos ensaios de qPCR. A quantificação dos diferentes grupos de microrganismos, como Bactérias totais, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp., *Fibrobacter succinogenes*, Fungos anaeróbicos, *Ruminococcus flavefaciens* e *Selenomonas ruminantium* foi estimada por meio da amplificação das sequências do gene ribossomal com *primers* específicos pela técnica qPCR. Para as *Archaeae* metanogênicas foi utilizado um *primer* funcional (*mcrA*), que marca o gene responsável pela produção da metil-coenzima M redutase, crucial no último passo da metanogênese (Tabela 2).

TABELA 2. *Primers* utilizados no ensaio de qPCR

Micror- organismo	Sequência dos <i>primers</i> (5' e 3')	Referência
<i>Archaeae</i> metano- gênicas	F, TTCGGTGGATCDCARAGRGC R, GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	Denman <i>et al.</i> , 2007
Bactérias totais	F, CGGCAACGAGCGCAACCC R, CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	Denman e McSweeney, 2006
<i>B. fibri- solvens</i>	F, TCTGGAAACGGATGGTA R, CCTTTAAGACAGGAGTTTACAA	Foster <i>et al.</i> , 1996
<i>Clostri- dium</i> sp.	F, GCACAAGCAGTGGAGT R, AACTGTTTTGCCCTCCTTC	Matsuki <i>et al.</i> , 2004
<i>F. succi- nogenes</i>	F, GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA R, CGCCTGCCCCTGA ACTATC	
Fungos anaeró- bicos totais	F, GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC R, CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	Denman e McSweeney, 2006
<i>R. flave- faciens</i>	F, CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG R, CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	
<i>S. rumi- nantium</i>	F, TGCGAATAGTTTTTMMGCAA R, CTCAATGTCAAGCCCTGG	Asanuma <i>et al.</i> , 2002

A amplificação do DNA foi realizada no equipamento *StepOnePlus™* *Real-Time PCR System* (Life Technologies), em solução contendo 5 µL de *SYBER Green ROX* (Invitrogen), 1 µL de cada *primer* (2 pmol), 2 µL de água ultrapura (Mili-Q) e 1 µL do DNA molde. As condições da termociclagem foram ajustadas seguindo a metodologia descrita na literatura (FOSTER *et al.*, 1996; ASANUMA *et al.*, 2002; MATSUKI *et al.*, 2004; DENMAN e MCSWEENEY, 2006; DENMAN *et al.*, 2007), nas quais se diferenciam apenas na fase do emparelhamento dos *primers* às fitas molde e alongação do DNA resultante:

1 – Para os *primers* de Bactérias totais, *Fibrobacter succinogenes*, Fungos anaeróbicos totais e *Ruminococcus flavefaciens*: 40 ciclos a 60 °C por 30 segundos e a 72 °C por 30 segundos.

2 – Para os *primers* de *Buthirivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp. e *Selenomonas ruminantium*: 45 ciclos a 50 °C por 30 segundos e a 72 °C por 30 segundos.

3 – Para o *primer* funcional das *Archaeae* metanogênicas: 50 ciclos a 60 °C por 45 segundos e a 72 °C por 30 segundos.

Para todos os *primers* foi utilizado um ciclo a 95 °C por 10 minutos e a 95 °C por 15 segundos para a desnaturação inicial. A análise de dissociação dos produtos da qPCR foi realizada a 95 °C por 15 segundos, seguida do resfriamento até 60 °C por 1 minuto.

Cada amostra, em triplicata (réplicas técnicas), foi incluída em todas as placas além do controle negativo usando água ultrapura como molde. A detecção da fluorescência ocorre ao findarem as etapas de alongação do DNA. O número mínimo de ciclos que são necessários para que a fluorescência torne-se detectável é chamado de Ct (*Cycle threshold*), os quais ocorrem durante a fase

exponencial da reação do PCR e são utilizados nos estudos de quantificação microbiana do rúmen (DENMAN e MCSWEENEY, 2005).

A abundância relativa (AbR) dos microrganismos *Archeae* metanogênicas, *B. fibrosolvens*, *Clostridium* sp., *F. succinogenes*, Fungos anaeróbicos totais, *R. flavefaciens* e *S. ruminantium* foi calculada por meio da equação a seguir, usando-se como normalizador o gene 16S rDNA de Bactérias totais (DENMAN e MCSWEENEY, 2006):

$$AbR = 100/2^{\Delta Ct}$$

Onde:

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{gene alvo})} - Ct_{(\text{normalizador})}$$

2.6. Análises estatísticas

Os dados do ensaio de qPCR foram submetidos a análise de variância usando-se o procedimento modelo misto (PROC MIXED) do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.4). As médias dos tratamentos foram submetidas a análise de contrastes, tendo-se considerado $\alpha = 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito significativo ($P>0,05$) do nível de inclusão da mistura de óleos essenciais sobre a população microbiana de Bactérias totais (Tabela 3). Porém, foi observado o efeito do tempo ($P<0,05$) sobre essa população.

TABELA 3. Número mínimo de ciclos (Ct) do gene 16S rDNA da comunidade de Bactérias totais do rúmen de ovinos suplementados com uma mistura de óleos essenciais

População microbiana	Tempo (h)	Nível de MSOE (mg/kg MS)			Média ¹	EP	P _{tempo}	P _{trat / tempo}
		0	200	400				
Bactérias totais	0	19,102	19,207	18,740	19,016b	0,305	0,03	0,62
	24	18,327	18,388	19,406	18,707b	0,299		
	168	17,544	18,235	17,868	17,882a	0,299		
	360	19,329	18,932	18,776	19,013b	0,305		
Média		18,576	18,691	18,697				
EP		0,2577	0,2577	0,2691				
P _{tratamento}	x		0,7449					
	x ²		0,8655					

MSOE = Mistura de Óleos Essenciais; 0 = Controle; 200 = Baixo; 400 = Alto

EP = Erro Padrão; x = Efeito linear; x² = Efeito quadrático

¹Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pela análise de contrastes a 5% de probabilidade

Para as Bactérias totais foi observado que às 168 horas após o início do fornecimento da dieta ocorreu aumento de 5,96% na abundância relativa (AbR) dessa população em relação ao tempo 0 h (Tabela 3). Na população de *Clostridium* sp., foi observado aumento de 60,56% na abundância relativa (AbR) às 24 horas após o início do fornecimento da dieta, em relação ao tempo 0 h (Tabela 3).

Os estudos que avaliam o efeito de óleos essenciais na diversidade bacteriana arcaica do rúmen foram pouco documentados. Algumas espécies

arcaicas podem dominar outras quando expostas a óleos essenciais por um tempo (PATRA e YU, 2012). A diferença observada nos resultados de Bactérias totais (Tabela 3) evidencia o dinamismo que ocorre com a população microbiana do rúmen durante o tempo. Contrariamente, pesquisadores estudaram o efeito do óleo de alho, carvacrol e timol sobre a adaptação microbiana do rúmen e não constataram nenhum efeito de tempo e de tratamento nas bactérias totais (MBIRIRI *et al.*, 2016).

Houve efeito significativo ($P < 0,05$) do nível de inclusão da mistura de óleos essenciais sobre a população microbiana de *Butyrivibrio fibrisolvens* (Tabela 4).

TABELA 4. Abundância Relativa (AbR) da comunidade de *Butyrivibrio fibrisolvens* expressa como proporção de genes de Bactérias totais do rúmen de ovinos suplementados com uma mistura de óleos essenciais

População microbiana	Tempo (h)	Nível de MSOE (mg/kg MS)			Média	EP	P _{tempo}	P _{trat / tempo}
		0	200	400				
<i>B. fibrisolvens</i>	0	0,0007	0,0013	0,0007	0,0009	0,0002	0,54	0,74
	24	0,0004	0,0012	0,0011	0,0009	0,0002		
	168	0,0007	0,0011	0,0004	0,0007	0,0002		
	360	0,0004	0,0006	0,0007	0,0006	0,0002		
Média ¹		0,0006b	0,0010a	0,0008ab				
EP		0,0002	0,0002	0,0002				
P _{tratamento}	x		0,3774					
	x ²		0,0525					

MSOE = Mistura de Óleos Essenciais; 0 = Controle; 200 = Baixo; 400 = Alto

EP = Erro Padrão; x = Efeito linear; x² = Efeito quadrático

¹Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pela análise de contrastes a 5% de probabilidade

Para a população de *Butyrivibrio fibrisolvens*, mesmo o coeficiente de probabilidade sendo ligeiramente maior que 0,05, o erro padrão da média dá a base necessária para assumir a diferença encontrada nos resultados (Tabela 4).

Assim, de acordo com a análise de contraste, nota-se um comportamento quadrático, no qual a inclusão de 200 mg MSOE / kg MS ingerida apresentou um aumento de 66,67% na abundância relativa em relação à dieta controle; bem como posterior diminuição de 20% na abundância relativa (AbR) da comunidade de *Butyrivibrio fibrisolvens*. Já para a população de *Selenomonas ruminantium* a inclusão com 400 mg MSOE / kg MS ingerida apresentou aumento de 151,72% na abundância relativa (AbR) em relação à dieta controle. Não foi observado efeito do tempo ($P>0,05$) sobre essa população (Tabela 4).

Estudo realizado para avaliar o efeito de uma mistura de óleos essenciais (timol, eugenol, vanilina e limoneno) sobre a cultura pura de microrganismos de vacas Holandesas determinou que a concentração de 112,5 ppm dessa mistura no líquido ruminal seria suficiente para reduzir 50% da densidade de células da bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens* (MCINTOCH *et al.*, 2003). Dose adicional de óleos essenciais, densidade dos microrganismos ruminais, quantidade de substrato e taxa do fluxo da digesta são fatores que podem induzir essas diferenças (LIN *et al.*, 2013). A bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens* é fibrolítica e foi uma das primeiras bactérias a ser identificada por hidrogenar ácidos graxos insaturados, exceto no passo final para produzir estearato. A bio-hidrogenação do ácido linoleico por *Butyrivibrio* sp. não produz os isômeros trans-10, causadores da síndrome de depressão da gordura do leite, liberando apenas os isômeros cis-9, trans-11 (KEPLER *et al.*, 1966; KEPLER e TOVE, 1967; KIM *et al.*, 2000).

Houve efeito significativo ($P<0,05$) do nível de inclusão da mistura de óleos essenciais sobre a população microbiana de *Selenomonas ruminantium* (Tabela 5). Porém, não foi observado efeito do tempo ($P>0,05$) sobre essa população (Tabela 5).

TABELA 5. Abundância Relativa (AbR) da comunidade de *Selenomonas ruminantium* expressa como proporção de genes de Bactérias totais do rúmen de ovinos suplementados com uma mistura de óleos essenciais

População microbiana	Tempo (h)	Nível de MSOE (mg/kg MS)			Média	EP	P _{tempo}	P _{trat / tempo}
		0	200	400				
<i>S. ruminantium</i>	0	0,0021	0,0044	0,0072	0,0046	0,0019	0,63	0,36
	24	0,0024	0,0045	0,0121	0,0063	0,0019		
	168	0,0051	0,0027	0,0051	0,0043	0,0019		
	360	0,0021	0,0055	0,0048	0,0042	0,0019		
Média ¹		0,0029b	0,0043ab	0,0073a				
EP		0,0018	0,0018	0,0018				
P _{tratamento}	x		0,0084					
	x ²		0,5568					

MSOE = Mistura de Óleos Essenciais; 0 = Controle; 200 = Baixo; 400 = Alto

EP = Erro Padrão; x = Efeito linear; x² = Efeito quadrático

¹Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pela análise de contrastes a 5% de probabilidade

Os resultados verificados sobre a população de *Selenomonas ruminantium* (Tabela 5) estão de acordo com estudos anteriores que reportaram que concentrações de óleos essenciais de 100 a 400 ppm resultam no aumento da produção de propionato. Isso ocorre porque as bactérias *S. ruminantium* parecem ser mais sensíveis ao timol do que *S. bovis*. Assim, ocorrerá acúmulo maior de ácido láctico, porque a produção de lactato por *S. bovis* (um grande produtor de ácido láctico) pode não ser metabolizada suficientemente rápido por *S. ruminantium* (um grande utilizador de ácido láctico). Um objetivo de modificar a fermentação ruminal seria provavelmente o contrário, reduzir *S. bovis* e aumentar *S. ruminantium* para tentar controlar a concentração de ácido láctico no rúmen (CALSAMIGLIA, 2007). As bactérias *Selenomonas ruminantium* utilizam o fumarato como aceptor final de elétrons para oxidar o hidrogênio (ASANUMA *et al.*, 1999). Ao contrário das bactérias celulolíticas e metanogênicas, bactérias lácticas, como as *Selenomonas ruminantium*, são

conhecidas por serem tolerantes a um pH baixo, o que as torna capazes de utilizar o H₂ e serem competitivas com as bactérias metanogênicas mesmo em condições desfavoráveis de pH (MOSS *et al.*, 2000).

TABELA 6. Abundância Relativa (AbR) da comunidade de *Clostridium* sp. expressa como proporção de genes de Bactérias totais do rúmen de ovinos suplementados com uma mistura de óleos essenciais

População microbiana	Tempo (h)	Nível de MSOE (mg/kg MS)			Média ¹	EP	P _{tempo}	P _{trat / tempo}
		0	200	400				
<i>Clostridium</i> sp.	0	1,990	2,389	1,724	2,035b	0,363	<0,01	0,99
	24	3,239	3,367	3,196	3,267a	0,358		
	168	1,310	1,116	0,910	1,112c	0,358		
	360	1,473	1,465	1,427	1,455c	0,363		
Média		2,003	2,084	1,814				
EP		0,318	0,318	0,329				
P _{tratamento}	x	0,639						
	x ²	0,608						

MSOE = Mistura de Óleos Essenciais; 0 = Controle; 200 = Baixo; 400 = Alto

EP = Erro Padrão; x = Efeito linear; x² = Efeito quadrático

¹Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pela análise de contrastes a 5% de probabilidade

Não foi observado efeito da mistura de óleos essenciais sobre a população de *Clostridium* sp. (Tabela 6), possivelmente porque o *primer* utilizado detectava todas as espécies desse gênero. Existem algumas espécies de *Clostridium* sp. que podem ser mais resistentes que outras (MCINTOCH *et al.*, 2003). Foram necessários 35 ppm da mistura de óleos essenciais (timol, eugenol, vanilina e limoneno) para reduzir a população de *C. sticklandii* pela metade. Já para a espécie *C. aminophilum*, foram necessários 262,5 ppm. Outro fator que influencia o efeito do óleo essencial sobre a comunidade bacteriana do rúmen é a natureza química. Compostos com estrutura fenólica, como o óleo de hortelã-pimenta, demonstraram uma atividade antibacteriana ao diminuir a abundância do gênero *Clostridium* sp. (PATRA e YU, 2015). *Clostridium* sp. é um gênero

amplo, chega a representar 20% da população microbiana do rúmen (DOWD *et al.*, 2008), influenciando de forma positiva e/ou negativa o animal hospedeiro. Os efeitos estão associados com espécies específicas. *Clostridium perfringens*, *C. tetani*, *C. botulinum* e *C. difficile* são conhecidos pela interferência negativa que causam à saúde animal e pelas perdas significativas na produtividade, como a redução da disponibilidade de proteína (bactérias hiperprodutoras de amônia) em dietas com forragem fresca (REILLY e ATTWOOD, 1998; SONGER, 2004; ATTWOOD *et al.*, 2006). Já espécies como *C. butyricum*, *C. cellulolyticum*, *C. stercorarium* e *C. thermocellum* podem ser benéficas para melhorar a digestibilidade da matéria orgânica (celulose) ou agindo como probióticos benéficos (DESVAUX *et al.*, 2000; BURRELL *et al.*, 2004).

Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) do nível de inclusão da mistura de óleos essenciais sobre a população microbiana *Fibrobacter succinogenes* (Tabela 7).

TABELA 7. Abundância Relativa (AbR) da comunidade de *Fibrobacter succinogenes* expressa como proporção de genes de Bactérias totais do rúmen de ovinos suplementados com uma mistura de óleos essenciais

População microbiana	Tempo (h)	Nível de MSOE (mg/kg MS)			Média ¹	EP	P _{tempo}	P _{trat / tempo}
		0	200	400				
<i>F. succinogenes</i>	0	0,7932	0,8351	0,3357	0,6547b	0,218	<0,01	0,94
	24	0,2875	0,2387	0,1639	0,2300c	0,216		
	168	0,7235	0,7942	0,4409	0,6529b	0,216		
	360	1,2922	1,5552	1,1594	1,3356a	0,218		
Média		0,7741	0,8558	0,5250				
EP		0,2078	0,2078	0,2103				
P _{tratamento}	x	0,0965						
	x ²	0,1061						

MSOE = Mistura de Óleos Essenciais; 0 = Controle; 200 = Baixo; 400 = Alto

EP = Erro Padrão; x = Efeito linear; x² = Efeito quadrático

¹Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pela análise de contrastes a 5% de probabilidade

Foi observado apenas efeito do tempo ($P < 0,05$) sobre a população supracitada (Tabela 7). A população de *Fibrobacter succinogenes* aumentou 104% às 360 horas após o início do fornecimento da dieta em comparação ao tempo 0 h (Tabela 7).

Não foi observado efeito dos níveis de inclusão da mistura de óleos essenciais sobre a população de *Fibrobacter succinogenes* (Tabela 7), possivelmente pela concentração utilizada. Pesquisas anteriores (LIN *et al.*, 2012, 2013) mostraram que uma mistura de óleos essenciais foi capaz de diminuir a população de *F. succinogenes*, em uma dose de 500 mg/L e 0,5 g/dia, respectivamente, ou seja, a concentração final em ambos os estudos foi de 500 ppm. *Fibrobacter succinogenes* é a bactéria mais abundante no rúmen, sendo essencial no metabolismo de propionato, competindo com as metanogênicas por H_2 . Quando a dieta fornecida aos animais é rica em carboidratos fibrosos (CF), as *F. succinogenes* utilizam a via, podendo liberar fumarato ou succinato, dependendo da disponibilidade energética do meio (MOSS *et al.*, 2000).

Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) do nível de inclusão da mistura de óleos essenciais sobre a população microbiana de Fungos anaeróbicos. Porém, foi observado o efeito do tempo ($P < 0,05$) sobre essa população. Observou-se que às 168 e 360 horas após o início do fornecimento da dieta houve queda de 85,14 e 93,50%, respectivamente, na expressão relativa (AbR) em relação ao tempo 0 h (Tabela 8).

TABELA 8. Abundância Relativa (AbR) da comunidade de Fungos anaeróbicos totais expressa como proporção de genes de Bactérias totais do rúmen de ovinos suplementados com uma mistura de óleos essenciais

População microbiana	Tempo (h)	Nível de MSOE (mg/kg MS)			Média ¹	EP	P _{tempo}	P _{trat / tempo}
		0	200	400				
Fungos anaeróbicos totais	0	5,473	2,4045	1,3189	3,0654a	1,357	0,002	0,29
	24	1,9101	3,7375	3,5412	3,0629a	1,351		
	168	0,5628	0,4644	0,3397	0,4556b	1,351		
	360	0,1524	0,4867	-0,041	0,1994b	1,357		
Média		2,0246	1,7733	1,2897				
EP		1,3080	1,3080	1,3206				
P _{tratamento}	x	0,3788						
	x ²	0,87						

MSOE = Mistura de Óleos Essenciais; 0 = Controle; 200 = Baixo; 400 = Alto

EP = Erro Padrão; x = Efeito linear; x² = Efeito quadrático

¹Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pela análise de contrastes a 5% de probabilidade

Os resultados observados com a população de Fungos anaeróbicos totais (Tabela 8) estão de acordo com a literatura (LIN *et al.*, 2013). Contrariamente, um estudo mostrou que uma mistura de óleos essenciais (timol, eugenol, vanilina e limoneno em um veículo orgânico) influenciou a atividade do fungo *Neocallimastix frontalis*, com a produção de H₂ totalmente inibida a uma concentração de 1000 ppm (MCINTOCH *et al.*, 2003). A divergência encontrada nos resultados também pode ser explicada pela dose da mistura de óleos essenciais utilizada em cada estudo. Além disso, o *primer* utilizado no presente estudo amplifica a região do DNA que está presente em todos os fungos ruminais já conhecidos, não apenas a espécie *N. frontalis*. Os fungos anaeróbicos possuem várias características que resultam na fisiologia anaeróbica obrigatória. A geração de energia ocorre em hidrogenosomas em que o ATP é formado por descarboxilação do malato para formar acetato, CO₂ e H₂ (VAN DER GIEZEN, 2009). Algumas espécies de fungos são importantes na degradação da lignina que ocorre por um processo multienzimático, resultante da ação coordenada de

uma série de enzimas intra e extracelulares, do grupo das oxidoredutases (representadas por peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio) e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular (LEONOWICZ *et al.*, 2001).

Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) do nível de inclusão da mistura de óleos essenciais e nem do tempo sobre a população de *Archaeae* metanogênicas (Tabela 9).

TABELA 9. Abundância Relativa (AbR) das comunidades de *Archaeae* metanogênicas expressa como proporção de genes de Bactérias totais do rúmen de ovinos suplementados com uma mistura de óleos essenciais

População microbiana	Tempo (h)	Nível de MSOE (mg/kg MS)			Média	EP	P _{tempo}	P _{trat / tempo}
		0	200	400				
<i>Archaeae</i> metanogênicas	0	0,0208	0,0173	0,0716	0,0366	0,0109	0,15	0,466
	24	0,0074	0,0149	0,0146	0,0123	0,0107		
	168	0,0115	0,0114	0,0051	0,0093	0,0107		
	360	0,0032	0,0186	0,0056	0,0091	0,0109		
Média		0,0107	0,0156	0,0243				
EP		0,0095	0,0095	0,0099				
P _{tratamento}	x	0,2666						
	x ²	0,8507						

MSOE = Mistura de Óleos Essenciais; 0 = Controle; 200 = Baixo; 400 = Alto

EP = Erro Padrão; x = Efeito linear; x² = Efeito quadrático

¹Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pela análise de contrastes a 5% de probabilidade

Estudo avaliando o efeito *in vitro* de óleos de cravo, eucalipto, alho, orégano e hortelã-pimenta sobre a abundância da população de *Archaea* mostrou que todos os óleos essenciais foram capazes de reduzir significativamente a população de metanogênicas, mas em diferentes graus. O óleo de orégano mostrou a maior redução, seguido pelos óleos de hortelã-pimenta, alho, cravo e eucalipto, em ordem decrescente de magnitude (PATRA e YU, 2012). O efeito

do óleo de alho, carvacrol e timol foi estudado sobre a adaptação *in vitro* da população microbiana do rúmen e mostrou que apenas o tratamento que continha timol foi capaz de reduzir a população de metanogênicas do rúmen (MBIRIRI *et al.*, 2016). As divergências dos resultados (Tabela 9) evidenciam que a sensibilidade dos microrganismos ao óleo essencial é diferente nas condições *in vitro* e *in vivo*. As *Archaea* metanogênicas formam um grupo de microrganismos ruminais bastante funcional, mesmo representando apenas 0,5 a 3% do total (REILLY, 1998), pois utilizam o gás hidrogênio (H₂) para reduzir o gás carbônico (CO₂), produtos da fermentação de outros microrganismos, a metano (COTTLE *et al.*, 2011), reduzindo a pressão parcial de hidrogênio e mantendo os padrões de equilíbrio redox.

Não houve efeito significativo (P>0,05) do nível de inclusão da mistura de óleos essenciais e nem do tempo sobre a população de *Ruminococcus flavefaciens* (Tabela 10).

TABELA 10. Abundância Relativa (AbR) da comunidade de *Ruminococcus flavefaciens* expressa como proporção de genes de Bactérias totais do rúmen de ovinos suplementados com uma mistura de óleos essenciais

População microbiana	Tempo (h)	Nível de MSOE (mg/kg MS)			Média	EP	P _{tempo}	P _{trat/ tempo}
		0	200	400				
<i>R.flavefaciens</i>	0	0,0566	0,0831	0,0463	0,062	0,0142	0,14	0,227
	24	0,017	0,0694	0,0254	0,0373	0,0139		
	168	0,023	0,0205	0,0096	0,0177	0,0139		
	360	0,0558	0,0614	0,0379	0,051	0,0142		
Média		0,0376	0,0586	0,0298				
EP		0,012	0,012	0,0125				
P _{tratamento}	x	0,655						
	x ²	0,0948						

MSOE = Mistura de Óleos Essenciais; 0 = Controle; 200 = Baixo; 400 = Alto

EP = Erro Padrão; x = Efeito linear; x² = Efeito quadrático

¹Médias seguidas de letras distintas, diferem entre si pela análise de contrastes a 5% de probabilidade

O presente estudo não constatou efeito da mistura de óleos essenciais sobre a população de *Ruminococcus flavefaciens* (Tabela 10), possivelmente pela dose utilizada em uma pesquisa *in vivo*. Apenas um óleo essencial apresenta diferentes efeitos quando se considera uma família de microrganismos (PATRA e YU, 2015). Por exemplo, dentro da família *Ruminococcaceae* existem espécies de microrganismos que ainda não tinham sido nomeados. Pesquisadores perceberam que o óleo de orégano diminuiu o *Ruminococcaceae*-20 e o *Ruminococcaceae*-49, e aumentou significativamente a população de *Ruminococcaceae*-132. Portanto, os óleos essenciais podem diminuir a diversidade de uma família de microrganismos, sem necessariamente diminuir a população como um todo, pois acaba selecionando determinadas espécies dentro dessa família. Um estudo *in vitro* realizado pelos mesmos autores, em 2012, mostrou que a inibição de *R. flavefaciens* foi maior para o óleo de cravo-da-índia, seguido pelos óleos de menta e orégano, óleo de alho e óleo de eucalipto (PATRA e YU, 2012). *Ruminococcus flavefaciens* é celulolítica e produz principalmente succinato e acetato, H₂ e CO₂, com pequenas quantidades de formato. O succinato é o principal produto da fermentação dissipador de elétrons (WOLIN, 10974). A *Ruminococcus flavefaciens* possui a enzima hidrogenase, que é altamente sensível ao acúmulo de hidrogênio. Na presença de *Archeas* metanogênicas, a pressão de hidrogênio é menor e ocorre maior liberação de ATP, à custa do succinato, que será utilizado para o crescimento microbiano (REILLY, 1998).

4. CONCLUSÕES

A mistura de óleos essenciais utilizada foi capaz de alterar significativamente as populações *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Selenomonas ruminantium*. Muitos produtos comerciais combinam um ou mais óleos essenciais, mas há poucas pesquisas disponíveis sobre as possíveis sinergias entre eles. Os papéis de diferentes espécies de microrganismos do rúmen e suas interações com diferentes tipos e doses de óleos essenciais devem ser elucidados em estudos *in vitro* e *in vivo*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECIA, L. *et al.* Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats. **Journal Animal Science**, v. 95, p. 2027-2036, 2012.

ASANUMA, N. *et al.* Numbers of nitrate-reducing bacteria in the rumen as estimated by competitive polymerase chain reaction. **Animal Science Journal**, v. 73, p. 199-205, 2002.

ASANUMA, N.; IWAMOTO, M.; HINO, T. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 780-787, 1999.

ATTWOOD, G. *et al.* Production of indolic compounds by rumen bacteria isolated from grazing ruminants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1261-1271, 2006.

BURRELL, P. C. *et al.* Identification, detection, and spatial resolution of Clostridium populations responsible for cellulose degradation in a methanogenic landfill leachate bioreactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2414-2419, 2004.

CALSAMIGLIA, S. *et al.* Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580-2595, 2007.

COTTLE, D. J.; NOLAN, J. V.; WIEDEMANN, S. G. Ruminant enteric methane mitigation: a review. **Animal Production Science**, v. 51, p. 491-514, 2011.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Quantitative (real-time) PCR. *In*: MAKKAR, H. P. S.; MCSWEENEY, C. S. (Ed). **Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants**. Netherlands: Springer, p. 105-115, 2005.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 58, p. 572-582, 2006.

DENMAN, S. E.; TOMKINS, N. W.; MCSWEENEY, C. S. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the

antimethanogenic compound bromochloromethane. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 62, p. 313-322, 2007.

DESVAUX, M.; GUEDON, E.; PETITDEMANGE, H. Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. **Appl Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2461-2470, 2000.

DOWD, S. E. *et al.* Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). **BMC Microbiology**, v. 8, p.1-8, 2008.

FOSTER, R. J. *et al.* 16S rDNA analysis of *Butyrivibrio fibrisolvens*: Phylogenetic position and relation to butyrate producing anaerobic bacteria from the rumen of white-tailed deer. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 218-222, 1996.

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

KEPLER, C. R. *et al.* Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 1350-1354, 1966.

KEPLER, C. R.; TOVE, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, p. 5686-5692, 1967.

KIM, Y. J. *et al.* The effect of linoleic acid concentration on the conjugated linoleic acid (CLA) production of *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5226-5230, 2000.

LEONOWICZ, A. *et al.* Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, p. 185-227, 2001.

LIN, B. *et al.* The effects of combined essential oils along with fumarate on rumen fermentation and methane production *in vitro*. **Journal of Animal Feed Science**, v. 21, p. 198-210, 2012.

LIN, B. *et al.* Effects of essential oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate included. **Animal Feed Science Technology**, v. 184, p. 24-32, 2013.

MATSUKI, T. *et al.* Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for Real-Time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 7220-7228, 2004.

MBIRIRI, D. T. *et al.* Assessment of rumen microbial adaptation to garlic oil, carvacrol and thymol using the consecutive batch culture system. **Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, v. 4, p. 1-7, 2016.

MCINTOSH, F. M. *et al.* Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5011-5014, 2003.

METWALLY, A. *et al.* Effects of a specific blend of essential oil on rumen degradability, total tract digestibility and fermentation characteristics in rumen fistulated cows. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 3, p. 1-10, 2016.

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

NRC – National Research Council. **Nutritional requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington, D. C.: NRC National Academies, p. 244-270. 2007.

PATRA, A. K.; YU, Z. Essential oils affect populations of some rumen bacteria *in vitro* as revealed by microarray (Rumen Bact Array) analysis. **Frontiers Microbiology**, v. 6, p. 1-13, 2015.

PATRA, A. K.; YU, Z. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4271-4280, 2012.

REILLY, K.; ATTWOOD, G. T. Detection of *Clostridium proteoclasticum* and closely related strains in the rumen by competitive PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 907-913, 1998.

REILLY, P. E. B. **Rumen biochemistry**. Brisbane: The University of Queensland, 1998. Disponível em: <<http://www.vet.ed.ac.uk/clive/cal/RUMENCAL/vetcal.html>>. Acesso em: 25 janeiro 2017.

SONGER, J. G. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, p. 321-326, 2004.

VAN DER GIEZEN, M. Hydrogenosomes and mitosomes: Conservation and evolution of functions. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, p. 221-231, 2009.

WOLIN, M. J. Metabolic interactions among intestinal microorganisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 27, p. 1320-1328, 1974.

ZHOU, Z.; MENG, Q.; YU, Z. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria in in vitro ruminal cultures. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, p. 2634-2639, 2011.

CAPÍTULO II

ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O METABOLISMO RUMINAL E A PRODUÇÃO DE METANO EM OVINOS

RESUMO

MENEZES, Jordana Carvalho de. **Óleos essenciais sobre o metabolismo ruminal e a produção de metano em ovinos**. 2017. Cap. 2. p. 56-87. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG⁵.

Objetivou-se avaliar o efeito de uma mistura de óleos essenciais sobre o metabolismo ruminal e a produção de metano em ovinos. Foram utilizados nove ovinos canulados, suplementados com três níveis de inclusão da mistura de óleos essenciais (MSOE): 0 (controle), 200 e 400 mg MSOE/kg MS consumida. Foram realizadas coletas de líquido ruminal às 0, 24, 168 e 360 horas após adição dos óleos. O período experimental teve duração de 69 dias, em delineamento experimental de quadrado latino 3x3. Para a mensuração dos parâmetros ruminais e da população microbiana, foram realizadas quatro coletas de líquido ruminal por período: Tempo 0; Tempo 24, Tempo 168 e Tempo 360 horas. As concentrações de ácidos graxos de cadeia curta foram determinadas utilizando-se cromatógrafo gasoso. O nitrogênio amoniacal foi determinado por destilação a vapor. Além disso, foi determinada a digestibilidade dos nutrientes (matéria seca e orgânica, fibra em detergente neutro e em detergente ácido, celulose, hemicelulose e proteína bruta). A produção de nitrogênio microbiano foi quantificada pela determinação dos derivados de purina na urina por cromatografia líquida de alta eficiência. A quantificação dos microrganismos Bactérias totais, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp., *Fibrobacter succinogenes*, Fungos anaeróbicos totais, *Archaeae* metanogênicas, *Ruminococcus flavefaciens* e *Selenomonas ruminatum* foi estimada por meio da amplificação das sequências do DNA ribossomal com *primers* específicos pela técnica qPCR. A contagem do número total de protozoários foi realizada por microscopia óptica. Para a mensuração da emissão de metano, os animais foram mantidos individualmente em câmaras respiratórias. Não houve efeito do nível de inclusão da MSOE sobre a digestibilidade dos nutrientes. Já para consumo de matéria seca, peso vivo dos animais e produção de metano, a suplementação com 400 mg MSOE/kg MS consumida apresentou menor produção de metano, peso vivo e consumo de matéria seca. A população de protozoários totais foi maior na dieta com 400 mg MSOE/kg MS consumida. Já para o nitrogênio

⁵**Comitê de Orientação:** Prof. Dr. Vicente Ribeiro Rocha Júnior – Departamento de Ciências Agrárias/UNIMONTES (Orientador); Prof. Dr. Maria Dulcineia da Costa – Departamento de Ciências Agrárias/UNIMONTES (Coorientador); Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla – Laboratório de Nutrição Animal/CENA-USP (Coorientador)

microbiano, foi observado maior valor na dieta sem MSOE. Não houve efeito dos níveis de MSOE sobre a abundância relativa de *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp., *Archaea* metanogênicas e *Ruminococcus flavefaciens*. Entretanto, as populações de *Selenomonas ruminantium* e protozoários ruminais apresentaram aumento na dieta com maior inclusão de MSOE. Percebeu-se que no tempo 0, independentemente do tratamento, houve maior população microbiana, com maior produção de ácidos graxos de cadeia curta e de nitrogênio amoniacal. A mistura de óleos essenciais utilizada foi capaz de aumentar as populações *Selenomonas ruminantium* e protozoários. Com isso, a dieta com 400 mg MSOE/kg MS consumida parece ser capaz de diminuir a produção de metano dos ovinos em decorrência do aumento de propionato.

Palavras-chave: abundância relativa, análise multivariada, fermentação ruminal, mitigação de metano, qPCR

ABSTRACT

MENEZES, Jordana Carvalho de. **Essential oils on ruminal metabolism and methane production in sheep**. 2017. Chapter 2. p. 56-87. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) - State University of Montes Claros, Janaúba, MG⁶.

The objective of this study was to evaluate the effect of a mixture of essential oils on ruminal metabolism and methane production in sheep. Nine cannulated sheep were used, supplemented with three levels of inclusion of the essential oils mixture (MSOE): 0 (control), 200 and 400 mg MSOE / kg DM consumed. Ruminal fluid samples were collected at 0, 24, 168 and 360 hours after addition of the oils. The experimental period lasted 69 days, in a 3x3 Latin square experimental design. For the measurement of the ruminal parameters and the microbial population, four collections of ruminal liquid were performed per period: Time 0; Time 24, Time 168 and Time 360 hours. The concentrations of short chain fatty acids were determined using gas chromatograph. Ammoniacal nitrogen was determined by steam distillation. In addition, nutrient digestibility (dry and organic matter, neutral detergent fiber and acid detergent, cellulose, hemicellulose and crude protein) was determined. Microbial nitrogen production was quantified by the determination of the purine derivatives in unrina by high performance liquid chromatography. The quantification of the total bacteria, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp., *Fibrobacter succinogenes*, Total anaerobic fungi, *Archeae* methanogenic, *Ruminococcus flavefaciens* and *Selenomonas ruminatium* was estimated by the amplification of the sequences of ribosomal DNA with specific *primers* through the qPCR technique. The counting of the total number of protozoa was performed by light microscopy. For the measurement of methane emission, the animals were kept individually in respiratory chambers. There was no effect of the inclusion level of MSOE on nutrient digestibility. For dry matter intake, live weight of animals and methane production, supplementation with 400 mg MSOE / kg DM showed lower methane production, live weight and dry matter consumption. The total protozoal population was higher for the diet with 400 mg MSOE / kg MS consumed. For microbial nitrogen, higher values were observed for the diet without MSOE. There was no effect of MSOE levels on the relative abundance of *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp., *Archeae* methanogenic and

⁶**Guidance Committee:** Prof. Dr. Vicente Ribeiro Rocha Júnior - Department of Agrarian Sciences / UNIMONTES (Advisor); Prof. Dr. Maria Dulcineia da Costa - Department of Agrarian Sciences / UNIMONTES (Co-adviser); Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla - Laboratory of Animal Nutrition / CENA-USP (Co-adviser)

Ruminococcus flavefaciens. However, the population of *Selenomonas ruminantium* and ruminal protozoa showed an increase for the diet with higher inclusion of MSOE. It was observed that at time 0, regardless of the treatment, there was a larger microbial population, with a higher production of short chain fatty acids and ammoniacal nitrogen. The mixture of essential oils was able to increase the *Selenomonas ruminantium* and protozoan populations. Thus, the diet with 400 mg MSOE / kg DM seems to be able to decrease the methane production of sheep due to the increase of propionate.

Keywords: relative abundance, multivariate analysis, ruminal fermentation, methane mitigation, qPCR

1. INTRODUÇÃO

Existe uma preocupação, cada vez maior, por parte da população sobre a influência humana no aquecimento global e da necessidade urgente da mitigação dos gases do efeito estufa. Dentro desse contexto, a agropecuária é um dos principais setores da economia mundial e passou a ser taxada como um dos responsáveis pelas emissões. Dos gases que compõem o chamado grupo “Gases do Efeito Estufa”, o metano é responsável pela emissão global de 16%, dos quais 40% são oriundos da fermentação entérica (TUBIELLO *et al.*, 2014).

Os principais produtos da fermentação entérica que podem ser aproveitados pelo ruminante são os ácidos graxos voláteis e amônia. Além disso, existem os compostos indesejáveis tanto para o hospedeiro, como para os microrganismos ruminais, como gás carbônico, hidrogênio, metano e nitrato (CHURCH, 1993; SCHOFIELD, 2000). A metanogênese é um processo importante para o perfeito funcionamento do rúmen, pois retira os produtos (CO₂ e H₂) que, quando em excesso, são tóxicos a algumas espécies de microrganismos, provocando distúrbios metabólicos. Assim, a redução ou eliminação da produção de metano pode exigir o estabelecimento de uma rota que evite o acúmulo de H₂ e permita o adequado funcionamento do rúmen (WEIMER, 1998), como por exemplo, a via de produção do propionato.

A manipulação dos microrganismos do rúmen e da dieta vem sendo estudada com o intuito de atenuar o impacto negativo que a emissão de metano entérico provoca nas alterações climáticas (MCALLISTER e NEWBOLD, 2008; HRISTOV *et al.*, 2013). Pesquisas relacionadas ao metabolismo ruminal dos nutrientes e aos possíveis efeitos que os produtos gerados têm sobre os microrganismos tornam possível uma tomada de decisão mais eficiente para promover a mitigação do metano.

Estudos recentes vêm sendo realizados com o uso de compostos e substâncias visando avaliar sua capacidade de modificar a produção de metano nos ruminantes (ZHOU *et al.*, 2011; ABECIA *et al.*, 2012). Entretanto, a maioria, quando em concentrações que são eficazes na mitigação do metano, é tóxica para os animais hospedeiros ou possui o potencial de toxicidade para os produtos finais (MARTIN *et al.*, 2010; BUDDLE *et al.*, 2011; PATRA, 2012). A utilização de óleos essenciais representa alternativa de aditivo de origem vegetal para a alimentação animal por não transferir toxicidade para os produtos finais, pois tais óleos propiciam metabolismo microbiano ruminal mais eficiente, aumentando a eficiência de fermentação e inibindo a metanogênese (CALSAMIGLIA *et al.*, 2007; ARAÚJO, 2010; PATRA, 2011).

Portanto, objetivou-se avaliar o efeito de óleos essenciais sobre o metabolismo ruminal e a produção de metano em ovinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local

O experimento foi realizado no Centro de Energia Nuclear em Agricultura (CENA, USP), em Piracicaba, São Paulo, Brasil. O protocolo para utilização de animais que incluiu a amostragem de líquido ruminal, foi aprovado pela Comissão Interna de Ética em Experimentação Animal (CIEEA / CENA 001/2011).

2.2. Animais, tratamentos, período experimental e delineamento estatístico

Foram utilizados nove ovinos canulados da raça Santa Inês ($55 \pm 11,1$ kg) que nunca tiveram contato com óleos essenciais. Foi utilizada uma dieta basal contendo três níveis de inclusão da mistura de óleos essenciais (MSOE): zero (controle), 200 (baixa) e 400 (alta) mg MSOE / kg MS ingerida. A mistura de óleos essenciais (MSOE) foi um produto comercial, microencapsulado contendo, em iguais proporções, Carvacrol, Cinamaldeído, Eugenol e Oleorresina de pimenta (Activo Premium, GRASP Ind. e Com. LTDA, Curitiba, Paraná - Brasil).

A dieta basal foi constituída por 500 g de feno de capim Bermuda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers., híbrido do “Tifton-85”) e 500 g de concentrado, a qual foi formulada em kg de matéria seca para atender ou exceder as recomendações do NRC (2007) para energia e proteína do gado em crescimento. A composição da dieta basal e a análise química são mostradas na Tabela 1.

TABELA 1. Composição da dieta basal experimental e composição química, dadas em g/kg MS

Itens	Dieta experimental
Ingredientes	
Feno de Tifton	500
Milho moído	327
Farelo de soja	173
Composição química	
Matéria Orgânica	898
Proteína Bruta	158
Fibra indigestível em Detergente Neutro	541
Fibra indigestível em Detergente Ácido	251
Lignina	52,6
Extrato Etéreo	48

Todos os animais foram alimentados duas vezes ao dia em sistema de dieta completa, às 9h e 16 h, e tiveram acesso livre a uma pré-mistura mineral (8,5% P; 16,5% Ca; 1% Mg, 2,5% S; 12% Na; 350 mg/kg F; 756 mg/kg Cu; 2,800 mg/kg Zn; 2,180 mg/kg Mn; 66 mg/kg I; 44 mg/kg Co; 14 mg/kg Se) e água fresca. O grão de milho e o feno de Bermuda foram moídos usando-se peneiras com poros de 4,7 e 10 mm (moinho DPM1, Nogueira, Itapira, SP, Brasil), respectivamente, para minimizar o desperdício de ração. Para a mistura dos ingredientes do concentrado, utilizou-se um misturador horizontal de 500 kg (MAP Equipamentos Agropecuários e Industriais LTDA, Londrina, PR, Brasil). As dietas ofertadas diariamente foram pesadas em balança digital, e o fornecimento foi ajustado de forma que as sobras representassem 10% da quantidade de matéria seca fornecida. Os alimentos foram amostrados durante todo o período experimental e congelados a -20 °C para análises posteriores.

O período experimental teve duração de 69 dias, divididos em três períodos de 23 dias, sendo os primeiros 15 dias de cada período para adaptação dos animais às dietas contendo a MSOE e os 8 últimos dias para ensaio de metabolismo e quantificação da produção de metano entérico. Antes de cada

período experimental, os animais recebiam a dieta base sem MSOE, por 5 dias. As coletas de conteúdo ruminal para avaliação da microbiota ruminal ocorreram nos 15 dias de adaptação dos animais à dieta com MSOE. O delineamento experimental foi o quadrado latino triplo 3x3, com três quadrados simultâneos, compostos, cada um, com três animais, três tratamentos e três períodos experimentais.

2.3. Coleta do líquido ruminal e determinação do pH

As amostras de líquido ruminal (30 mL) foram coletadas, sempre, três horas após o fornecimento da dieta da manhã, utilizando-se uma sonda de aço inoxidável (2,5 mm) ligada a uma seringa de grande capacidade. A sonda era inserida via cânula ruminal e o líquido ruminal era coletado em diferentes partes do rúmen, perfazendo um total de aproximadamente 200 mL. Foram realizadas quatro coletas de líquido ruminal por período: Tempo 0 (15º dia) - três horas após o fornecimento da dieta no primeiro período; Tempo 24 (16º dia) - 24 horas após o Tempo 0; Tempo 168 (22º dia) - 168 horas após o Tempo 0; Tempo 360 (30º dia) - 360 horas após o Tempo 0.

O pH ruminal foi mensurado imediatamente após a coleta usando um peagâmetro portátil (modelo DM21; Digimed, São Paulo, SP, Brasil). Para contagem do número de protozoários, 2 mL de líquido ruminal foram imediatamente diluídos em 4 mL de solução salina de metil-verde-formalina, armazenados em frascos de vidro à temperatura ambiente num local escuro. Para determinar as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e do nitrogênio amoniacal, bem como avaliar a população microbiana do rúmen as amostras foram congeladas e mantidas a -20 °C sem conservantes.

2.4. Determinação dos parâmetros de fermentação ruminal e contagem de protozoários

A contagem do número de protozoários foi realizada por microscopia óptica utilizando-se um hemocitador Improved Neubauer Bright-Line (Labor Optik, Lancing, Reino Unido), seguindo a metodologia descrita por Dehority (1993).

As amostras de líquido ruminal foram descongeladas e centrifugadas a $15000 \times g$ (RC 5B mais; Sorvall, Wilmington, DE) durante 20 minutos a 4°C . As concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foram determinadas seguindo-se as condições do fabricante (Hewlett-Packard, 1998), com algumas modificações utilizando-se um cromatógrafo gasoso (HP 7890A, Injector Automático HP 7683B, Agilent Technologies, Palo Alto, CA), equipado com coluna acapilar HP-FFAP (19091F -112, 0,320 mm, 0,50 μm .d. e 25 m de comprimento; J & W Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA). Uma alíquota de 1 μL foi injetada utilizando-se uma proporção de separação de 20:1 com 31,35 mL/min de fluxo de H_2 (63,432 Pa). As temperaturas de injeção e ionização do detector foram mantidas a 260°C . A inclinação de aquecimento do forno foi de 80°C (1 min), 120°C ($20^\circ\text{C}/\text{min}$ durante 3 min) e 205°C ($10^\circ\text{C}/\text{min}$ durante 2 min), com 16,5 minutos do tempo analítico total. O gás transportador era o hidrogênio a 1,35 mL/min. O hidrogênio do detector, o ar sintético e os fluxos de nitrogênio (maquilhagem) foram mantidos a 40, 400 e 40 mL/min, respectivamente.

O nitrogênio amoniacal (N-NH_3) do rúmen foi determinado por destilação a vapor utilizando-se um aparelho micro Kjeldahl (modelo TE-036/1, Tecnal Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba, SP), seguido de coleta em solução de ácido bórico e titulação com solução de ácido sulfúrico 0,01 N (PRESTON, 1995).

2.5. Determinação da digestibilidade, balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana

Durante sete dias dos períodos de coleta, os ovinos foram mantidos em gaiolas metabólicas (1,57 × 0,71 × 1,67 m), onde foi realizada a coleta diária individual de sobras, fezes e urina para medir a digestibilidade dos nutrientes e o balanço de N. As amostras obtidas diariamente (10% da quantidade total) foram armazenadas a -20 °C, e posteriormente misturadas para cada animal. As porções representativas foram secas em estufa de ventilação forçada, a 50 °C durante 48 horas, e moídas para passar por um crivo de 1 mm e armazenadas a -20 °C até a análise.

As amostras de urina foram acidificadas com 100 mL de ácido sulfúrico 1 M (pH final da urina <3), amostradas (duas amostras com 10% do volume total) e mantidas congeladas a -20° C antes da análise. Foram centrifugadas a 2000 x g durante 20 minutos e, as subamostras foram analisadas para N ou para derivados de purina (creatinina, alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina), de acordo com a International Atomic Energy Agency (1997), por cromatografia líquida de alta eficiência. A quantidade de purinas microbianas absorvidas a partir do intestino delgado foi calculada de acordo com Chen e Gomes (1992), da seguinte forma:

$$DP_a \text{ (mmol / ovino e dia)} = 0,84 \times DP_e + (0,15 \times BW^{0,75} \times e^{(-0,25 \times DP_e)})$$

Em que:

DP_a (mmol / ovino / dia) = Quantidade de purina absorvidas pelo intestino delgado;

Índice 0,84 = Representa a recuperação de purinas absorvidas na urina;

DP_e = Total de purina excretada na urina (mmol / ovino / dia), calculado com a soma da excreção urinária diária de alantoína e ácido úrico (a xantina e a hipoxantina permaneceram abaixo do limite de detecção);

$(0,15 \times BW^{0,75} \times e^{(-0,25 \times DP_e)})$ = Representa a contribuição endógena dos derivados de purina total após a correção da utilização das purinas microbianas pelo animal; e,

$BW^{0,75}$ = Tamanho corporal metabólico do animal (kg^{0,75}).

A conversão da excreção renal diária total de derivados de purina (DP_e) para fluxo duodenal diário de N microbiano foi:

$$NM_{DP} = (DP_a \times 70) / (0,116 \times 0,83 \times 1000)$$

Onde:

NM_{DP} = Fluxo duodenal diário de N microbiano (g / N dia);

Índice 70 = Teor de N de purinas (mg N / mmol);

Índice 0,116 = Relação de N-purina para N-total em microrganismos ruminais;

Índice 0,83 = Digestibilidade de purinas microbianas.

2.6. Mensuração da emissão de metano (CH₄)

No final do estudo de digestibilidade em cada período, os animais foram mantidos individualmente durante dois dias consecutivos em câmaras respirométricas para a mensuração da emissão de metano. Essas câmaras, tal como descrito por Abdalla *et al.* (2012) e Soltan *et al.*, (2013), apresentavam 167 cm de altura, 157 cm de comprimento e 71 cm de largura, resultando em um volume total de 1,9 m³. As câmaras foram cobertas em todos os lados com folhas de polietileno de 0,3 mm de espessura, com exceção do fundo. Havia uma entrada com orifício de 5 cm na frente e uma saída com orifício de 5 cm na parte traseira. Uma bomba de exaustão foi conectada ao orifício traseiro para renovação do ar em um fluxo de 168 L/min, medido com um anemômetro (modelo AD-250, Instrutherm Instrumentos de Medição Ltda., São Paulo, SP). As amostras foram colhidas na saída de ar a 100 mL/min em um balão de 5-1

revestido com película de alumínio utilizando-se uma bomba peristáltica (IPC-N-8 V1,34, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Suíça).

Durante dois dias consecutivos, a temperatura, a umidade e o fluxo de ar foram medidos em intervalos de duas horas de cada câmara, para condições de temperatura e pressão padrão (TPP). O metano contido no ar retirado do interior das câmaras foi determinado usando-se o cromatógrafo gasoso (Modelo 2014, Shimadzu, Tokyo, Japão) equipado com um Shincarbon ST 100/120 microcoluna (1,5875 mm DE, 1,0 mm DI, 1 m de comprimento; Ref. nº 10809; Restek, Bellefonte, PA, USA). Na parte da manhã, a dieta foi oferecida quando as câmaras foram abertas 30 minutos antes da operação do sistema, enquanto na parte da tarde a dieta foi oferecida na entrada frontal o mais rápido possível.

2.7. Extração e determinação da pureza e concentração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se um método modificado de Denman e McSweeney (2006). Resumidamente, uma alíquota (1,5 mL), retirada da amostra de líquido ruminal após o descongelamento, foi colocada em um tubo de microcentrífuga com capacidade para 2 mL com tampa de rosca contendo 250 mg de bolinhas de zircônio e uma esfera de vidro. Esse tubo com a amostra foi levado à centrífuga por 5 minutos, a 14000 x g para posterior retirada do sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensionado com 1 mL do tampão de lise celular (0,2% de SDS, 100 mM de Tris-HCl, 5 mM de EDTA e 200 mM de NaCl), 100 µL da solução de acetato (29,44 g de acetato de potássio e 11,5 mL de ácido acético glacial) e 100 µL de água mΩ. Os tubos foram então colocados em *freezer* a uma temperatura de -80 °C, por 15 minutos, descongelados à temperatura ambiente e agitados em vórtex por dois minutos. As etapas de congelamento, descongelamento e agitação foram repetidas duas vezes para melhorar a eficiência da extração do DNA.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, por 15 minutos, a 14000 x g. O sobrenadante (300 µL) foi transferido para um tubo de eppendorf com capacidade de 1,5 mL, que continha 600 µL da solução complexante, com pH 6,0-6,5 (5 g de dióxido de sílica e 50 mL de solução de isotiocianato de guanidina 3 M – 17,73 g de isotiocianato de guanidina 3 M e 50 mL de água mΩ). Os tubos foram agitados por 5 minutos para permitir a ligação do DNA à sílica e levados à centrífuga a 10000 x g, por 1 minuto.

Todo o sobrenadante foi descartado e 500 µL da solução de etanol frio (70 mL de etanol e 30 mL de água mΩ) foi utilizada para a lavagem do *pellet*. Os tubos foram levados à centrífuga a 10000 x g duas vezes, por 1 minuto e 20 segundos, para retirar todo o etanol presente. O DNA aderido à sílica foi eluído em 110 µL de água mΩ, e os tubos foram levados à centrífuga a 10000 x g por 1 minuto. Por fim, 80 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo de eppendorf, devidamente identificado e levado ao *freezer* de -20 °C para armazenagem.

A pureza e a concentração de DNA extraído de cada amostra foram determinadas por espectrofotometria (A_{260} nm, NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). A integridade foi determinada em gel de agarose (0,5% p/vol), por eletroforese (30 minutos a 100 V), usando-se como marcador de peso molecular o SYBER®.

2.8. Análise da Reação em Cadeia Polimerase quantitativo (qPCR)

As amostras de DNA obtidas foram diluídas para uma concentração de 10 ng/µl, antes da utilização nos ensaios de PCR. A quantificação dos diferentes grupos de microrganismos, como Bactérias totais, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp., *Fibrobacter succinogenes*, Fungos anaeróbicos, *Ruminococcus flavefaciens* e *Selenomonas ruminatium*, foi estimada por meio da amplificação

das sequências do gene 16S rDNA com *primers* específicos pela técnica qPCR. Para as *Archeae* metanogênicas, foi utilizado um *primer* funcional (*mcrA*), que marca o gene responsável pela produção da metil-coenzima M redutase, crucial no último passo da metanogênese (Tabela 2).

TABELA 2. *Primers* utilizados no ensaio de qPCR

Micror- ganismo	Sequência dos <i>primers</i> (5' e 3')	Referência
<i>Archeae</i> metano- gênicas	F, TTCGGTGGATCDCARAGRGC R, GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	Denman <i>et al.</i> , 2007
Bactérias totais	F, CGGCAACGAGCGCAACCC R, CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	Denman e McSweeney, 2006
<i>B. fibri- solvens</i>	F, TCTGGAAACGGATGGTA R, CCTTTAAGACAGGAGTTTACAA	Foster <i>et al.</i> , 1996
<i>Clostri- dium</i> sp.	F, GCACAAGCAGTGGAGT R, AACTGTTTTGCCTCCTTC	Matsuki <i>et al.</i> , 2004
<i>F. succi- nogenes</i>	F, GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA R, CGCCTGCCCCTGAACTATC	
Fungos anaeró- bicos totais	F, GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC R, CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	Denman e McSweeney, 2006
<i>R. flave- faciens</i>	F, CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG R, CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	
<i>S. rumi- nantium</i>	F, TGCGAATAGTTTTTGMCAA R, CTCAATGTCAAGCCCTGG	Asanuma <i>et al.</i> , 2002

A amplificação do DNA foi realizada no equipamento *StepOnePlus™* *Real-Time PCR System* (Life Technologies), em solução contendo 5 µL de *SYBER Green ROX* (Invitrogen), 1 µL de cada *primer* (2 pmol), 2 µL de água ultrapura (Mili-Q) e 1 µL do DNA molde. As condições do termociclador foram ajustadas seguindo-se a metodologia descrita na literatura (FOSTER *et al.*, 1996; ASANUMA *et al.*, 2002; MATSUKI *et al.*, 2004; DENMAN e MCSWEENEY,

2006; DENMAN *et al.*, 2007), nas quais se diferenciam apenas na fase do emparelhamento dos *primers* às fitas molde e alongação do DNA resultante:

1 – Para os *primers* de Bactérias totais, *Fibrobacter succinogenes*, Fungos anaeróbicos totais e *Ruminococcus flavefaciens*: 40 ciclos a 60 °C por 30 segundos e a 72 °C por 30 segundos.

2 – Para os *primers* de *Buthirivibrio fibrisolvens*, *Clostridium* sp. e *Selenomonas ruminantium*: 45 ciclos a 50 °C por 30 segundos e a 72 °C por 30 segundos.

3 – Para o *primer* funcional das *Archae* metanogênicas: 50 ciclos a 60 °C por 45 segundos e a 72 °C por 30 segundos.

Para todos os *primers* foi utilizado um ciclo a 95 °C por 10 minutos e a 95 °C por 15 segundos para a desnaturação inicial. A análise de dissociação dos produtos da qPCR foi realizada a 95 °C por 15 segundos, seguido pelo resfriamento até 60 °C por 1 minuto.

Cada amostra, em triplicata (réplicas técnicas), foi incluída em todas as placas além do controle negativo usando-se água ultrapura como molde. A detecção da fluorescência ocorre ao findarem as etapas de alongação do DNA. O número mínimo de ciclos que são necessários para que a fluorescência torne-se detectável é chamado de Ct (*Cycle threshold*), os quais ocorrem durante a fase exponencial da reação do PCR e são utilizados nos estudos de quantificação microbiana do rúmen (DENMAN e MCSWEENEY, 2005).

A abundância relativa (AbR) dos microrganismos *Archae* metanogênicas, *B. fibrosolvens*, *Clostridium* sp., *F. succinogenes*, Fungos anaeróbicos totais, *R. flavefaciens* e *S. ruminantium* foi calculada por meio da equação a seguir, usando-se como normalizador o gene 16S rDNA de Bactérias totais (DENMAN e MCSWEENEY, 2006):

$$\text{AbR} = 100/2^{\text{ACT}}$$

Onde:

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{gene alvo})} - Ct_{(\text{normalizador})}$$

2.9. Análises estatísticas

Para as variáveis medidas apenas no Tempo 360 tais como consumo de MS, digestibilidade da MS e dos nutrientes, nitrogênio microbiano, peso vivo, população de microrganismos e produção de metano foi realizada a análise multivariada de componentes principais, utilizando-se o pacote Vegan do programa estatístico R (versão 3.3.2). Para as variáveis medidas ao longo do tempo (0, 24, 168 e 360), tais como nitrogênio amoniacal, população de microrganismos, produção dos ácidos graxos de cadeia curta e relação acetato:propionato foi realizada a análise multivariada de redundância, utilizando-se o pacote Vegan do programa estatístico R (versão 3.3.2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ponto de partida para a análise de componentes principais foi a matriz de correlação (Tabela 3), em que as variáveis em estudo foram primariamente padronizadas para terem média zero e variância igual a um. A matriz de correlação é indicada em uma análise multivariada quando as variáveis são medidas em escalas muito diferentes entre si, pois essa matriz é equivalente à matriz das variáveis não padronizadas.

De acordo com a literatura, as correlações que variam de 40 a 60% são consideradas moderadas (FRANZBLAU, 1958). No geral, observa-se que as correlações existentes entre as variáveis de abundância relativa (AbR) dos microrganismos estudados foram consideradas fracas ou moderadas. Porém, as correlações entre as populações de *F. succinogenes* e Fungos anaeróbicos totais ($r=0,739$), Fungos anaeróbicos totais e *Archeae* metanogênicas ($r=0,795$), Fungos anaeróbicos totais e *S. ruminantium* ($r=0,708$), *Archeae* metanogênicas e *S. ruminantium* ($r=0,867$), fogem do padrão de correlação supracitado por serem consideradas variáveis altamente correlacionadas (Tabela 3). Roger *et al.* (1993) estudaram a degradação da fibra por fungos em associação com bactérias celulolíticas ruminais e concluíram que houve maior digestão da fibra quando a digesta estava exposta à presença de *Neocallimastix* e *F. succinogenes*. Além disso, existe uma relação de simbiose de *Archeae* metanogênicas com os fungos, semelhante à encontrada com os protozoários. Os esporângios dos fungos, geralmente, projetam-se na fase fluida do rúmen, com seus hidrogenosomas, onde as metanogênicas estão localizadas (GORDON e PHILLIPS, 1998). Também existem interações benéficas entre as bactérias *Selenomonas ruminantium* e algumas espécies de fungos, nas quais ajudam a melhorar a atividade celulolítica (BERNALIER *et al.*, 1991).

TABELA 3. Coeficientes de correlação de Pearson entre população microbiana ruminal, consumo de matéria seca, peso vivo, digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes e o metabolismo ruminal de ovinos alimentados com uma mistura de óleos essenciais

	BUTY	CLOST	FIBRO	FUNGI	METAN	RUMIN	SELEN	PROTO	COMS	PV
BUTY	1,000									
CLOST	0,230	1,000								
FIBRO	-0,149	0,100	1,000							
FUNGI	-0,265	0,296	0,739	1,000						
METAN	-0,177	0,290	0,473	0,795	1,000					
RUMIN	0,318	0,670	0,065	0,064	0,066	1,000				
SELEN	-0,208	0,338	0,465	0,708	0,867	0,066	1,000			
PROTO	0,197	-0,164	-0,054	-0,038	0,157	-0,185	-0,047	1,000		
COMS	-0,047	-0,182	-0,077	-0,311	-0,594	-0,124	-0,484	-0,073	1,000	
PV	0,001	-0,002	0,134	-0,105	-0,314	-0,083	-0,220	0,033	0,870	1,000
DMS	0,145	-0,266	-0,534	-0,682	-0,884	-0,111	-0,705	-0,256	0,648	0,322
DMO	0,147	-0,267	-0,534	-0,695	-0,890	-0,115	-0,697	-0,262	0,636	0,312
DFDN	0,158	-0,217	-0,546	-0,663	-0,857	-0,108	-0,671	-0,250	0,602	0,288
DFDA	-0,004	-0,211	-0,431	-0,364	-0,558	-0,137	-0,399	-0,309	0,532	0,230
DCEL	0,002	-0,252	-0,451	-0,461	-0,665	-0,148	-0,491	-0,346	0,594	0,289
DHEM	0,183	-0,221	-0,558	-0,750	-0,932	-0,084	-0,745	-0,215	0,598	0,296
DPB	0,148	-0,251	-0,511	-0,685	-0,906	-0,106	-0,693	-0,264	0,653	0,328
NMIC	-0,404	-0,045	0,258	0,003	0,173	-0,025	0,277	0,010	-0,010	0,087
LD	-0,023	-0,007	0,111	-0,104	-0,229	-0,160	-0,071	0,168	0,702	0,869
LMS	-0,048	0,020	0,083	-0,134	-0,226	-0,185	-0,021	0,137	0,639	0,808
LMO	-0,049	0,019	0,084	-0,133	-0,226	-0,185	-0,020	0,135	0,638	0,808

“...continua...”

TABELA 3. Cont.

	DMS	DMO	DFDN	DFDA	DCEL	DHEM	DPB	NMIC	LD	LMS	LMO
BUTY											
CLOST											
FIBRO											
FUNGI											
METAN											
RUMIN											
SELEN											
PROTO											
COMS											
PV											
DMS	1,000										
DMO	0,999	1,000									
DFDN	0,992	0,991	1,000								
DFDA	0,854	0,842	0,872	1,000							
DCEL	0,909	0,901	0,919	0,986	1,000						
DHEM	0,980	0,984	0,978	0,756	0,828	1,000					
DPB	0,983	0,986	0,965	0,780	0,847	0,978	1,000				
NMIC	-0,356	-0,341	-0,401	-0,420	-0,369	-0,328	-0,292	1,000			
LD	0,188	0,189	0,174	0,097	0,153	0,200	0,218	0,242	1,000		
LMS	0,206	0,211	0,206	0,127	0,180	0,227	0,233	0,260	0,979	1,000	
LMO	0,206	0,211	0,206	0,127	0,180	0,227	0,233	0,262	0,979	1,000	1,000

BUTY = *B. fibrisolvens* (AbR); CLOST = *Clostridium* sp. (AbR); FIBRO = *F. succinogenes* (AbR); FUNGI = Fungos anaeróbicos totais (AbR); METAN = *Archaeae* metanogênicas (AbR); RUMIN = *R. flavefaciens* (AbR); SELEN = *S. ruminantium* (AbR); PROTO = Protozoários ($\times 10^5$); COMS = Consumo de Matéria Seca (g/dia); PV = Peso Vivo (kg); DMS, DMO, DFDN, DFDA, DCEL, DHEM e DPB = Coeficiente (%) de Digestibilidade da Matéria Seca, Matéria Orgânica, Fibra em Detergente Neutro, Fibra em Detergente Ácido, Celulose, Hemicelulose e da Proteína Bruta, respectivamente; NMIC = Nitrogênio Microbiano (g N/dia); LD, LMS e LMO = Produção de metano em L/dia, L/g de MS consumida e L/g de MO consumida

Ao considerar o consumo de matéria seca, observou-se uma fraca correlação com os microrganismos *B. fibrisolvans* ($r=-0,047$), *Clostridium sp.* ($r=-0,182$), *F. succinogenes* ($r=-0,077$), Fungos anaeróbicos totais ($r=-0,311$), *R. flavefaciens* ($r=-0,124$) e Protozoários ($r=-0,073$) (Tabela 3). Já para *Archeae* metanogênicas ($r=-0,594$) e *S. ruminantium* ($r=-0,484$), as correlações evidenciam possíveis microrganismos que podem estar relacionados à regulação do consumo animal (Tabela 2). O aumento da população de microrganismos que utilizam o excesso de H^+ disponível no rúmen (*Archeae* metanogênicas e *S. ruminantium*, por exemplo) pode indicar uma possível condição de acidose, fato que leva o animal a diminuir o consumo. Esses resultados estão de acordo com estudos que também observaram correlação negativa entre o consumo de matéria seca e as populações de *Archeae* metanogênicas e *Selenomonas ruminantium* (CARBERRY *et al.*, 2014; DERAKHSHANI *et al.*, 2017). Ainda para o consumo de matéria seca, nota-se uma alta correlação positiva ($r=0,702$) com a produção de metano dada em L/dia (Tabela 3). Um estudo realizado em 2014 mostrou que o consumo de matéria seca apresentou alta correlação positiva com a produção de metano, mas, em relação ao rendimento de metano, apresentou fraca correlação. Ou seja, ao considerar o rendimento de metano como estratégia de mitigação, possivelmente não haverá nenhum impacto sobre o consumo do animal (HERD *et al.*, 2014).

O coeficiente de correlação do peso vivo com o consumo de matéria seca ($r=0,870$), com a produção de metano dada em L/dia ($r=0,869$), em L/g de MS consumida ($r=0,808$) e em L/g de MO consumida ($r=0,808$) (Tabela 3), evidencia o fato de que, geralmente, animais mais pesados consomem mais e, conseqüentemente, produzem mais metano. Bell *et al.* (2016), com o objetivo de construir um modelo empírico que explicasse melhor a produção de metano de pequenos e grandes ruminantes, também observaram alta correlação positiva entre peso vivo, consumo de matéria seca e produção de metano.

As variáveis de digestibilidade dos nutrientes apresentaram fraca correlação com os microrganismos *B. fibrisolvens*, *Clostridium* sp. e *R. flavefaciens*. O aumento da abundância relativa (AbR) das *Archeae* metanogênicas parece ser prejudicial às digestibilidades da matéria seca ($r=-0,884$), da matéria orgânica ($r=-0,890$), da fibra em detergente neutro ($r=-0,857$), da hemicelulose ($r=-0,932$) e da proteína bruta ($r=-0,906$). Isso também pode ser observado com a população de *S. ruminantium* e as digestibilidades da matéria seca ($r=-0,705$) e da hemicelulose ($r=-0,745$). Esses resultados também podem explicar a correlação negativa entre essas populações microbianas e o consumo de matéria seca. O aumento da abundância relativa (AbR) de Fungos anaeróbicos totais parece influenciar, com maior intensidade, apenas a digestibilidade da hemicelulose ($r=-0,750$). Os coeficientes de correlações entre digestibilidade dos nutrientes, consumo de matéria seca e peso vivo dos animais confirmam a relação entre essas variáveis (Tabela 3).

O coeficiente de correlação entre o nitrogênio microbiano e a bactéria *B. fibrisolvens* foi negativo ($r=-0,404$), e o mesmo comportamento foi observado entre o nitrogênio microbiano e a digestibilidade dos nutrientes (Tabela 3). A taxa do fluxo de nitrogênio microbiano depende da concentração de bactérias associadas às partículas dos alimentos e as que estão presentes no fluido. A concentração de bactérias em ambas as fases depende da taxa de crescimento dos microrganismos, morte e/ou decomposição por diversas razões, incluindo o engolfamento pelos protozoários e a taxa de fluxo da digesta (LENG e VOLAN, 1984). A digestibilidade dos nutrientes é diretamente proporcional ao fluxo da digesta, ou seja, quanto maior a digestibilidade dos nutrientes, mais rápido o fluxo da digesta e, conseqüentemente, menor o teor de nitrogênio microbiano detectado na excreta dos animais.

A análise de componentes principais agrupou as 21 variáveis estudadas em cinco componentes principais, os quais explicam, juntos, 87,77% da variação

dos dados. Para facilitar a interpretação dos resultados, foi escolhido um valor mínimo ($\pm 0,237$) dos escores obtidos das variáveis responsáveis pelos componentes principais.

O Componente Principal 1 é formado pelo contraste entre as variáveis de digestibilidade dos nutrientes e a abundância relativa ($\Delta\Delta Ct$) da população de *Archaeae* metanogênicas ($Z_1 = 0,315DMS + 0,315DMO + 0,311DFDN + 0,260DFDA + 0,282DCEL + 0,312DHEM + 0,311DPB - 0,291METAN$). Tal componente explica 46,17% da variação total dos dados (Figura 1). Os pontos no gráfico mostram que, para o componente em questão, não houve influência da dieta sobre as variáveis de digestibilidade dos nutrientes e a população de *Archaeae* metanogênicas.

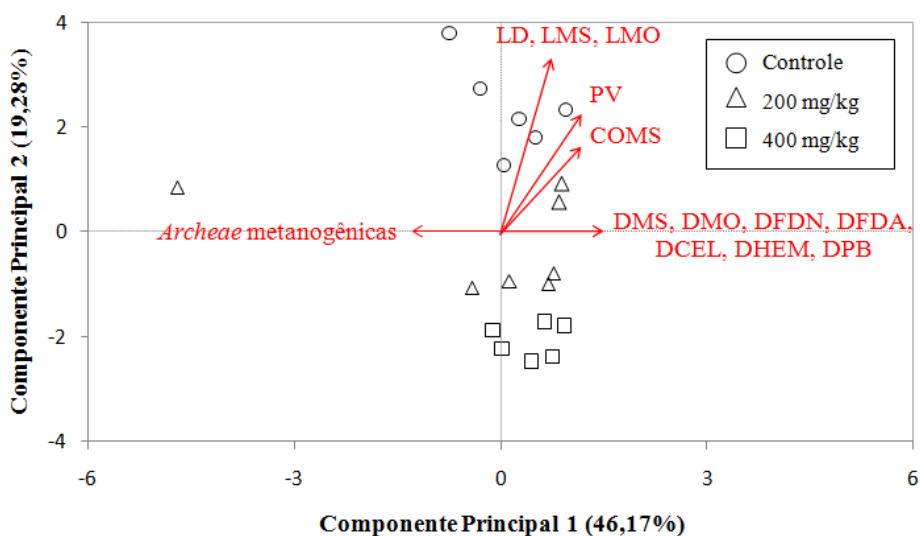


FIGURA 1. Análise de componentes principais da comunidade microbiana e do metabolismo ruminal de ovinos. COMS = Consumo de Matéria Seca (g/dia); DMS, DMO, DFDN, DFDA, DCEL, DHEM e DPB = Coeficiente de Digestibilidade (%) da Matéria Seca, Matéria Orgânica, Fibra em Detergente Neutro, Fibra em Detergente Ácido, Celulose, Hemicelulose e da Proteína Bruta; LD, LMS e LMO = Produção de metano em L/dia, L/g de MS consumida e L/g de MO consumida; PV = Peso Vivo (kg).

O Componente Principal 2 é formado pelas variáveis consumo de MS, peso vivo e produção de metano ($Z_2 = 0,269\text{COMS} + 0,397\text{PV} + 0,455\text{LD} + 0,445\text{LMS} + 0,445\text{LMO}$). Tal componente explica 19,28% da variação total dos dados (Figura 1).

Os escores das observações plotados próximos do valor 0 do eixo x mostram que não houve efeito de tratamentos sobre a digestibilidade dos nutrientes e a população de metanogênicas (Figura 1), exceto para um animal que recebeu a dieta contendo 200 mg/kg de MS consumida ($\Delta = -4,7142$). O referido animal destacou-se por apresentar a maior população de *Archeae* metanogênicas, em termos de abundância relativa de microrganismos (AbR). A digestibilidade dos nutrientes no rúmen é um índice importante a ser levado em consideração para a avaliação dos efeitos de óleos essenciais. Os resultados observados na digestibilidade dos nutrientes (Figura 1) corresponderam àqueles encontrados na produção de ácidos graxos, os quais, também, não tiveram influência dos tratamentos. Contrariamente, Lin *et al.* (2013) estudaram o efeito de combinações de óleos essenciais com a inclusão de fumarato sobre a fermentação ruminal e digestibilidade dos nutrientes, e observaram que as misturas de óleos essenciais utilizadas promoveram influência negativa sobre a digestibilidade da matéria seca e da fibra insolúvel em detergente neutro, com consequente diminuição dos ácidos graxos voláteis.

O Componente Principal 2 dividiu os tratamentos ao longo do eixo (Figura 1). Nos dois primeiros quadrantes, observa-se prevalência de pontos do tratamento controle, evidenciando que esses animais produziram mais metano e apresentaram consumo de matéria seca e peso vivo superior aos demais tratamentos. Nos dois últimos quadrantes, observa-se a prevalência de pontos referentes à dieta contendo 400 mg/kg de MS consumida, evidenciando a menor produção de metano, com peso vivo e consumo de matéria seca inferiores aos demais. Os resultados de produção de metano estão de acordo com Patra e Yu

(2012), que observaram menor produção de metano, diminuindo linearmente com doses crescentes de óleos essenciais.

O Componente Principal 3 é formado pela variável de abundância relativa (AbR) dos microrganismos *B. fibrisolvens*, *Clostridium* sp. e *R. flavefaciens* ($Z_3 = -0,436BUTY - 0,610CLOST - 0,601RUMIN$). Tal componente explica 8,88% da variação nos dados (Figura 2). De acordo com a figura observa-se que não houve efeito do tratamento sobre a abundância das populações em questão.

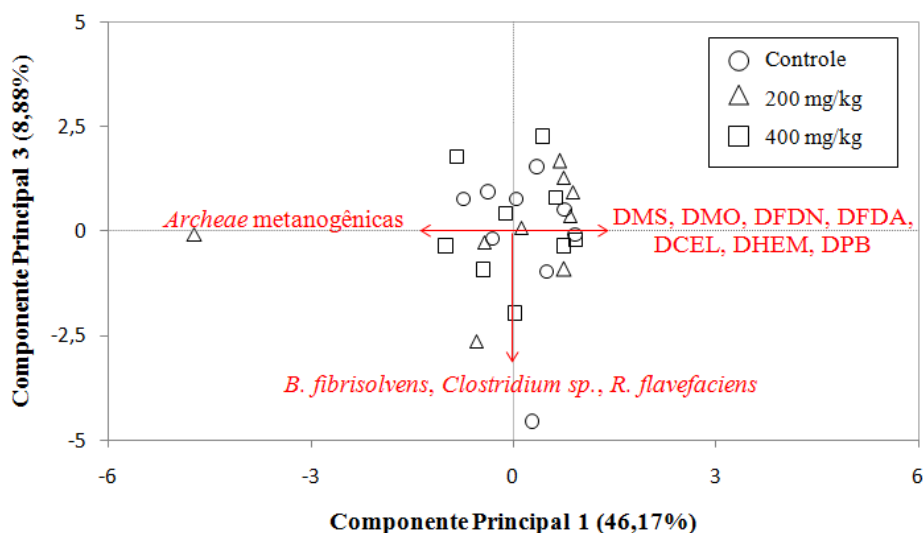


FIGURA 2. Análise de componentes principais da comunidade microbiana e do metabolismo ruminal de ovinos. DMS, DMO, DFDN, DFDA, DCEL, DHEM e DPB = Coeficiente de Digestibilidade (%) da Matéria Seca, Matéria Orgânica, Fibra em Detergente Neutro, Fibra em Detergente Ácido, Celulose, Hemicelulose e da Proteína Bruta.

Os três pontos que aparecem na extremidade inferior do eixo y ($\bigcirc = -4,583$; $\triangle = -2,638$ e $\square = -1,996$) mostram que tais animais apresentaram uma maior abundância relativa (AbR) dos microrganismos *B. fibrisolvens*, *Clostridium* sp. e *R. flavefaciens* (Figura 2). Em contrapartida, o ponto que

aparece na extremidade superior do segundo quadrante ($\square = 2,234$) é referente ao animal que recebeu a dieta contendo 400 mg/kg de MS consumida da mistura de óleos essenciais e que apresentou menor abundância relativa desses microrganismos. Patra e Yu (2015) realizaram estudo *in vitro* para avaliar o efeito de óleos essenciais sobre a população de algumas bactérias do rúmen. Observaram que o óleo de alho e de menta foram capazes de aumentar a abundância relativa de *Clostridium* sp. e espécies bacterianas não classificadas da família *Ruminococcaceae*, respectivamente. Todos os óleos estudados foram capazes de reduzir a população do gênero *Butyrivibrio*.

O Componente Principal 4 é formado pelo contraste das variáveis de população de protozoários e abundância relativa (AbR) dos microrganismos *F. succinogenes*, Fungos anaeróbicos totais e *S. ruminantium* ($Z_4 = + 0,554\text{PROTO} - 0,237\text{FIBRO} - 0,382\text{FUNGI} - 0,294\text{SELEN}$). Tal componente explica 7,83% da variação nos dados (Figura 3).

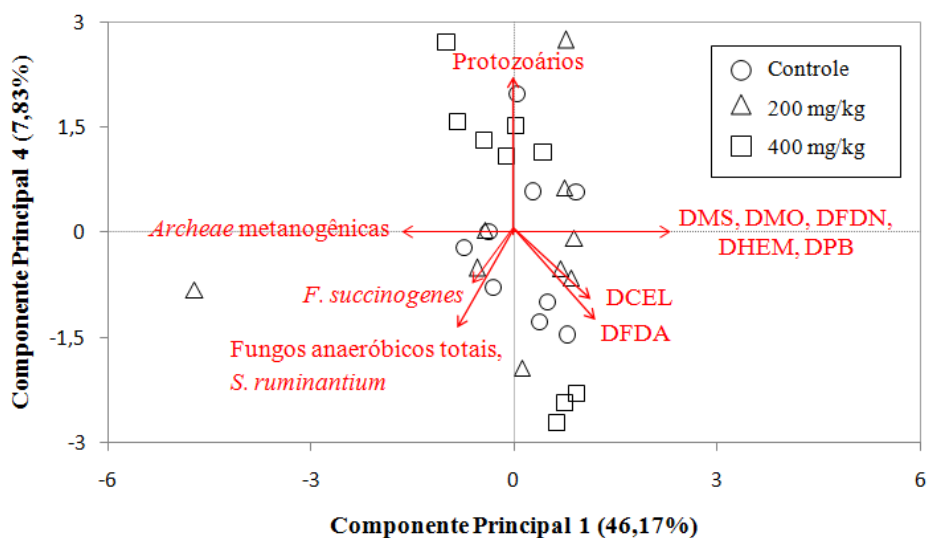


FIGURA 3. Análise de componentes principais da comunidade microbiana e do metabolismo ruminal de ovinos. DMS, DMO, DFDN, DFDA, DCEL, DHEM e DPB = Coeficiente de Digestibilidade (%) da Matéria Seca, Matéria Orgânica,

Fibra em Detergente Neutro, Fibra em Detergente Ácido, Celulose, Hemicelulose e da Proteína Bruta.

Essa figura certamente é bastante significativa em termos do que é conhecido sobre os microrganismos responsáveis pelo metabolismo do propionato no rúmen. A dieta que continha 400 mg/kg de MS consumida da mistura de óleos essenciais apresentou altos escores, tanto positivos quanto negativos, para o Componente Principal 4, evidenciando que os animais que receberam essa inclusão mostraram aumento nas populações de protozoários ou *S. ruminantium* (Figura 3). Esses microrganismos são conhecidamente responsáveis pela produção do ácido propiônico no rúmen. A via de produção desse ácido compete por H^+ com a via de produção do gás metano. Portanto, a menor produção desse gás no tratamento com a inclusão de 400 mg MSOE/kg de MS consumida da mistura de óleos essenciais, que foi observada na Figura 1, pode ser explicada pela seleção de protozoários e *S. ruminantium* (Figura 3). Contrariamente, Patra e Yu (2014) estudaram o efeito de óleos de cravo, orégano e hortelã-pimenta e observaram que a inclusão desses óleos reduziu a população de *S. ruminantium* e protozoários.

O Componente Principal 5 é formado pela variável nitrogênio microbiano ($Z5 = -0,656NMIC$). Tal componente explica 5,61% da variação nos dados (Figura 4). A dieta que não tinha a inclusão da mistura de óleos essenciais (controle) apresentou altos escores negativos, mesmo sentido em que se encontra o nitrogênio microbiano, evidenciando que, para essa dieta, houve um aumento para a variável em questão (Figura 4).

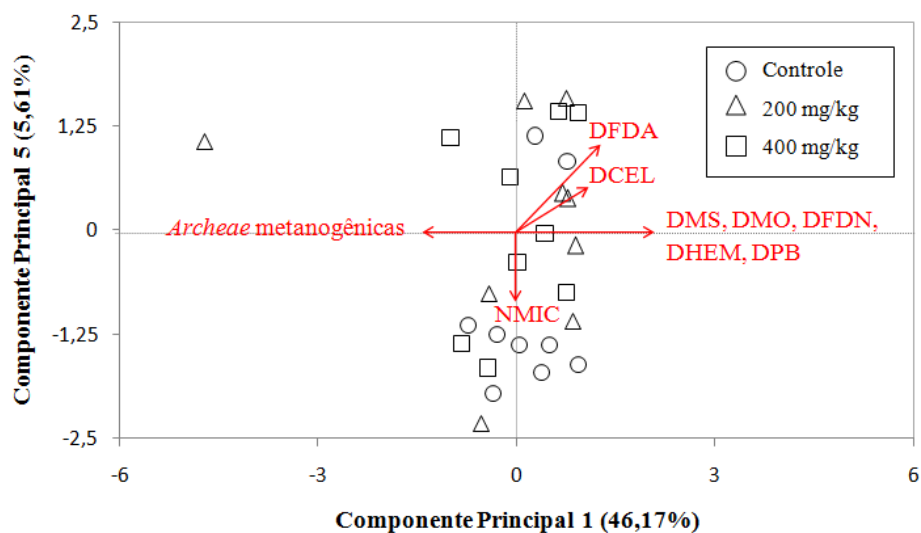


FIGURA 4. Análise de componentes principais da comunidade microbiana e do metabolismo ruminal de ovinos. DMS, DMO, DFDN, DFDA, DCEL, DHEM e DPB = Coeficiente de Digestibilidade (%) da Matéria Seca, Matéria Orgânica, Fibra em Detergente Neutro, Fibra em Detergente Ácido, Celulose, Hemicelulose e da Proteína Bruta; NMIC = Nitrogênio Microbiano (g N/dia).

O maior fluxo de nitrogênio microbiano proveniente da dieta controle pode ser explicado pela maior disponibilidade do amido presente no milho, o que pode ter proporcionado mais energia aos microrganismos do rúmen e aumentado a eficiência da síntese de proteína microbiana. Estudos que utilizaram misturas de óleos essenciais à base de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno não indicaram efeito da adição dessa mistura sobre o nitrogênio microbiano (NEWBOLD *et al.*, 2004; BENCHAAAR *et al.*, 2007).

Além disso, a digestibilidade da celulose e da porção dietética que é insolúvel em detergente ácido foi levemente prejudicada na dieta sem a inclusão da mistura de óleos essenciais (Figura 4). Esses resultados podem ser explicados pelo fato de a taxa de crescimento das bactérias que degradam carboidratos não estruturais (*Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Lactobacillus sp.*,

Prevotella sp.) ser relativamente mais alta (OLIVEIRA *et al.*, 2007; CABRAL *et al.*, 2011). Esrss resultados divergem dos verificados na literatura, com estudos que utilizaram misturas de óleos essenciais e não contataram efeito de adição na digestibilidade da celulose e da fibra indigestível no detergente ácido (LIN *et al.*, 2013; METWALLY *et al.*, 2016).

O suporte bidimensional usando a ordenação pela Análise de Redundância explica 93,61% da variação total dos dados (Figura 5), com intervalo de confiança maior que 99%.

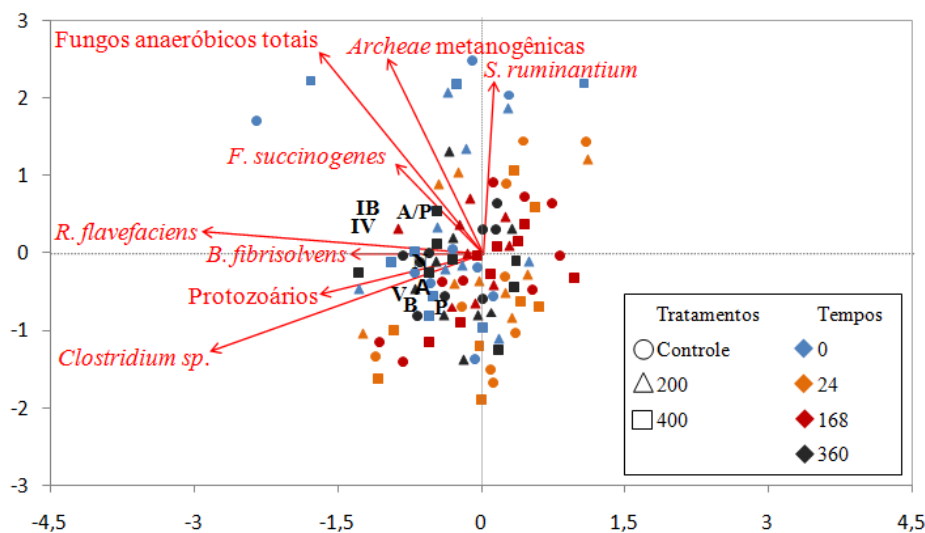


FIGURA 5. Análise de redundância da comunidade microbiana e do metabolismo ruminal de ovinos alimentados com uma mistura de óleos essenciais. A = Ácido Acético; B = Ácido Butírico; P = Ácido Propiônico; V = Ácido Valérico; IB = Ácido Isso-Butírico; IV = Ácido Isso-Valérico; A/P = Acetato/Propionato; N = Nitrogênio Amoniacal.

Os resultados mostram que não houve efeito da dieta sobre a população microbiana do rúmen. Nos primeiro e terceiro quadrantes, verifica-se maior prevalência de pontos referentes ao Tempo 0, evidenciando que, independentemente do tratamento, observa-se uma maior abundância relativa

(AbR) dos microrganismos estudados no referido tempo, exceto para *S. ruminantium*. Além disso, parece que tais microrganismos estão envolvidos com uma maior produção dos ácidos graxos voláteis, com o aumento da relação acetato:propionato e da produção de nitrogênio amoniacal (Figura 5).

A inclusão da mistura de óleos essenciais parece não ter efeitos significativos sobre a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta. Tal fato concorda com estudos *in vivo* que avaliaram os efeitos de óleos essenciais no metabolismo ruminal (NEWBOLD *et al.*, 2004; CHAVES *et al.*, 2008; CHAVES *et al.*, 2011). Entretanto, estudos prévios verificaram que os óleos essenciais foram capazes de influenciar a fermentação ruminal, reduzindo o total de ácidos graxos voláteis, com aumento linear na proporção de propionato (VARGA *et al.*, 2004; BUSQUET *et al.*, 2006).

Além disso, o presente estudo indicou que a inclusão de óleos essenciais na dieta não apresentou efeito sobre o nitrogênio amoniacal. Entretanto, McIntoch *et al.* (2003) observaram redução na taxa de produção de nitrogênio amoniacal quando ovelhas foram alimentadas com 100 mg/dia com óleo essencial. Esses autores sugeriram que o óleo essencial reduziu a produção de amônia, inibindo a atividade de bactérias hiperprodutoras de amônia.

De acordo com Benchaar *et al.* (2006), as discrepâncias de resultados encontrados nos diferentes estudos com óleos essenciais pode ser devida à dieta utilizada, à dose do óleo essencial, ao tempo de exposição das bactérias ruminais e ao procedimento utilizado (*in vivo* ou *in vitro*).

4. CONCLUSÕES

A maior dose de inclusão da mistura de óleos essenciais (400 mg/MS consumida) aumentou a população de Protozoários e *Selenomonas ruminantium*, e reduziu a produção de metano.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A. L. *et al.* In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, p. 953-964, 2012.

ABECIA, L. *et al.* Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2027-2036, 2012.

ARAÚJO, R. C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal *in vitro***. 2010. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP - SP. 181 p. 2010.

BELL, M. *et al.* Modelling the effect of diet composition on enteric methane emissions across sheep, beef cattle and dairy cows. **Animals**, v. 6, p. 1-16, 2016.

BENCHAAAR, C. *et al.* Effects of addition os essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4352-4364, 2006.

BENCHAAAR, C. *et al.* Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production and milk composition in dairy cows fed alfafa silage or corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 886-897, 2007.

BERNALIER, A.; FONTY, G.; GOUET, P. H. Cellulose degradation by two rumen anaerobic fungi in monoculture or in coculture with rumen bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v. 32, p. 131-136, 1991.

BUDDLE, B. M. *et al.* Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. **Veterinary Journal**, v. 188, p. 11-17, 2011.

BUSQUET, M. *et al.* Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 761-771, 2006.

CABRAL, L. S. *et al.* Cinética ruminal das frações de carboidratos, produção de gás, digestibilidade *in vitro* da matéria seca e NDT estimado da silagem de milho com diferentes proporções de grãos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 2332-2339, 2002.

CALSAMIGLIA, S. *et al.* Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580-2595, 2007.

CARBERRY, C. A. *et al.* Quantitative analysis of ruminal methanogenic microbial populations in beef cattle divergent in phenotypic residual feed intake (RFI) offered contrasting diets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, p. 1-9, 2014.

CHAVES, A. V. *et al.* Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. **Livestock Science**, v. 117, p. 215-224, 2008.

CHAVES, A. V. *et al.* A dose–response of cinnamaldehyde supplementation on intake, ruminal fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. **Livestock Science**, v. 141, p. 213-220, 2011.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details**. Aberdeen: International Feed Research Unit, Rowett Research Institute, UK (Occasional publication), 21p., 1992.

CHURCH, D. C. **The ruminant animal, digestive physiology and nutrition**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 641p., 1993.

DEHORITY, B. A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa**. Florida: CRC Press Inc, 96p., 1993.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Quantitative (real-time) PCR. *In*: MAKKAR, H. P. S.; MCSWEENEY, C. S. (Ed). **Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants**. Netherlands: Springer, p. 105-115, 2005.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 58, p. 572-582, 2006.

DERAKHSHANI, H. *et al.* Linking periparturient dynamics of ruminal microbiota to dietary changes and production parameters. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-13, 2017.

FRANZBLAU, A. N. **A primer of statistics for nonstatisticians**. New York: Harcourt, Brace & World, 1958.

GORDON, G. L. R.; PHILLIPS, M. W. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. **Nutrition Research Reviews**, v. 11, p. 133-168, 1998.

HERD, R. M. *et al.* Measures of methane production and their phenotypic relationships with dry matter intake, growth, and body composition traits in beef cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5267-5274, 2014.

HRISTOV, A. N. *et al.* SPECIAL TOPICS - Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 5045-5069, 2013.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Estimation of rumen microbial protein production from purine derivatives in urine**. IAEA-TECDOC-945. Vienna: IAEA; p. 22-24, 1997.

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

LIN, B. *et al.* Effects of essential oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate included. **Animal Feed Science and Technology**, v. 184, p. 24-32, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MARTIN, C.; MORGAVI, D. P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v. 4, p. 351-365, 2010.

MCALLISTER, T. A.; NEWBOLD, C. J. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, p. 7-13, 2008.

MCINTOSH, F. M. *et al.* Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5011-5014, 2003.

METWALLY, A. *et al.* Effects of a specific blend of essential oil on rumen degradability, total tract digestibility and fermentation characteristics in rumen

fistulated cows. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 3, p. 1-10, 2016.

NEWBOLD, C. J. *et al.* Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, p. 105-112, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutritional requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington DC.: NRC National Academies, p. 244-270, 2007.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Processo fermentativo, digestivo e fatores antinutricionais de nutrientes para ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 8, p. 1-13, 2007.

PATRA, A. K. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, p. 1-13, 2011.

PATRA, A. K. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: A synthesis of current research and future directions. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, p. 1929-1952, 2012.

PATRA, A. K.; YU, Z. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4271-4280, 2012.

PATRA, A. K.; YU, Z. Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 897-905, 2014.

PATRA, A. K.; YU, Z. Essential oils affect populations of some rumen bacteria in vitro as revealed by microarray (RumenBactArray) analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-13, 2015.

PRESTON, T. R. Biological and chemical analytical methods. *In*: PRESTON, T. R. (Ed). **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, p. 191-264, 1995.

ROGER, V. *et al.* Degradation of wheat straw and maize stem by a monocentric and a polycentric rumen fungi, alone or in association with rumen cellulolytic bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v. 42, p. 69-82, 1993.

SCHOFIELD, P. Gas production methods. *In*: D'MELLO, J. P. F. (Ed.) **Farm animal metabolism and nutrition**. Wallingford: CABI Publishing; p. 209-232, 2000.

SOLTAN, Y. A. *et al.* Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by feeding *Leucaena leucocephala*. **Archives of Animal Nutrition**, v. 63, p. 169-184, 2013.

TUBIELLO, F. N. *et al.* **Agriculture, forestry and other land use emissions by sources and removals by sinks**. Rome: FAO, 89 p., 2014.

VARGA, G. *et al.* Effect of Crina ruminants, a mixture of essential oil components, on continuous culture fermentation and milk production of lactating cows. **Journal of Animal Science**, v. 82(Suppl 1), p. 334-340, 2004.

WEIMER, P. J. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3114-3122, 1998.

ZHOU, Z.; MENG, Q.; YU, Z. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria *in vitro* ruminal cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 2634-2639, 2011.