

JANAINA ROSA DE LIMA

Efeito de bovicina HC5 na produção *in vitro* de amônia pela microbiota ruminal.

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

RESUMO

LIMA, Janaina Rosa de, M.S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro 2005. **Efeito de bovicina HC5 na produção *in vitro* de amônia pela microbiota ruminal.** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Conselheiros: Célia Alencar de Moraes e Rogério de Paula Lana.

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos que têm sido propostos como alternativa aos antibióticos utilizados na nutrição de ruminantes como promotores de crescimento. *Streptococcus bovis* HC5, uma bactéria isolada do rúmen de bovinos, produz uma bacteriocina (bovicina HC5) com amplo espectro de atividade. Estudos anteriores demonstraram que esta bacteriocina inibiu a produção *in vitro* de amônia por culturas puras de bactérias do rúmen, porém, seus efeitos sobre a produção de amônia com culturas mistas não foram testados. Amostras de líquido de rúmen foram coletadas a partir de bovinos fistulados e alimentados com silagem de cana-de-açúcar e 10% de concentrado. Amostras de microrganismos ruminais contendo células lavadas e ressuspendidas em meio mineral anaeróbico (DO 600nm de aproximadamente 1,6), foram capazes de desaminar triptona em concentrações de até 32 g/l. Entretanto, quando a concentração de triptona no meio foi menor que 2 g/l, a quantidade de proteína microbiana após 24 horas de incubação a 39° C diminuiu em até 60%. A atividade específica de produção de amônia na suspensão de células lavadas e incubadas com 16 g/l de triptona obedeceu à cinética de primeira ordem em função do tempo até

aproximadamente 10 horas de incubação. Quando células de *S. bovis* HC5 foram adicionadas na suspensão de microrganismos, a produção de amônia diminuiu. Quando o inóculo de *S. bovis* HC5 foi de 10% a produção de amônia e a atividade específica de produção de amônia diminuíram em 51% e 39%, respectivamente. Esse nível de inibição foi similar ao efeito da monensina (5 M). Quando o extrato livre de células de bovicina HC5 foi adicionado à suspensão de células contendo microrganismos ruminais a atividade de desaminação foi inibida. A produção de amônia diminuiu em aproximadamente 41% quando a concentração de bovicina HC5 foi de 40 AU/ml. Amostras de microrganismos ruminais que foram transferidas sucessivamente (50% de inóculo, v/v) em meio básico contendo triptona mantiveram os níveis de produção de amônia por quatro transferências. A adição de bovicina HC5 (12,5 AU/ml) ou monensina (5 M) em cada transferência diminuiu a produção de amônia. O nível de inibição variou de 27% a 53% para bovicina HC5 e 20% a 66% para monensina, quando comparado aos tratamentos controle. A inoculação de *S. bovis* HC5 (5% de inóculo, v/v) no primeiro dia de transferência, ao meio contendo a suspensão de células também inibiu a produção de amônia, porém, os níveis de inibição foram menores do que aqueles obtidos com o extrato celular. Esses resultados indicam que a bovicina HC5 pode inibir a produção de amônia em culturas mistas de microrganismos ruminais e possui potencial para ser utilizado na diminuição da produção de amônia *in vivo*.

ABSTRACT

LIMA, Janaina Rosa de, M.S. Universidade Federal de Viçosa, February 2005. **Effect of bovicin HC5 on ammonia production by ruminal microorganisms *in vitro*.** Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Committee members: Célia Alencar de Moraes and Rogério de Paula Lana.

Bacteriocins are antimicrobial peptides that have been suggested as an alternative to antibiotics used in ruminant nutrition for growth promotion. *Streptococcus bovis* HC5, a bacterium isolated from the bovine rumen, produces a bacteriocin (bovicin HC5) with a broad spectrum of activity. This bacteriocin has been previously shown to inhibit ammonia production by hyper-ammonia producing bacteria *in vitro*, but its effect on ammonia production in ruminal fluid had not been tested. When ruminal fluid samples were collected from fistulated cows fed sugarcane silage and 10 % concentrate, the washed cell suspensions (DO 600 nm of approximately 1,6) deaminated tryptone even at concentrations as high as 32 g/l. However, if the tryptone concentration was less than 2 g/l there was a decrease in microbial cell protein after 24h of incubation at 39°C. The specific activity of ammonia production by washed cell suspensions incubated with 16 g/l tryptone followed a first order kinetics for up to 10 h of incubation. If *S. bovis* HC5 cells were added to the cell suspensions, ammonia production decreased. When the level of *S. bovis* HC5 inoculum was 10 %, ammonia production and the specific activity

of ammonia production decreased 51 % and 39 %, respectively. This level of inhibition was similar to the effect of monensina (5 μ M). When increasing amounts of the bovicin HC5 cell-free extracts were added to cell suspensions containing rumen microorganisms, the deamination activity decreased. Ammonia production was inhibited approximately 41 % when the concentration of bovicin HC5 extract was 40 AU/ml. Samples of rumen microorganisms that were transferred successively (50 % inoculum, v/v) into basal media containing tryptone maintained the level of ammonia production for at least four transfers. The addition of bovicin HC5 (12,5 AU/ml) or monensina (5 μ M) to each transfer, decreased ammonia production. The level of inhibition varied from 27 % to 53 % for bovicin HC5 and 20 % to 66 % to monensina, when compared to control treatments. Addition of *S. bovis* HC5 cells (5 % inoculum, v/v) to the cell suspensions during the first transfer also inhibited ammonia production thereafter, but the level of inhibition was not as great as the cell-free extract. These results indicate that bovicin HC5 can inhibit ammonia production by mixed cultures of rumen microorganisms and could have potential application for decreasing ammonia production *in vivo*.