

ELSA FERNANDES DA SILVA

**PREFERÊNCIAS DE SUBSTRATOS POR BACTÉRIAS
HIPERPRODUTORAS DE AMÔNIA DO RÚMEN BOVINO E EFEITOS DA
SUPLEMENTAÇÃO PROTEICA E ENERGÉTICA NA COLONIZAÇÃO DE
FARELO DE SOJA EM NOVILHAS NELORE**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586p
2018

Silva, Elsa Fernandes, 1977-

Preferências de substratos por bactérias hiperprodutoras de amônia do rúmen bovino e efeitos da suplementação proteica e energética na colonização de farelo de soja em novilhas Nelore / Elsa Fernandes Silva. – Viçosa, MG, 2018.
x, 71f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Nelore (Bovino) - Alimentação e rações. 2. Rúmen.
3. Amônia na nutrição animal. 4. Proteínas na nutrição animal.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

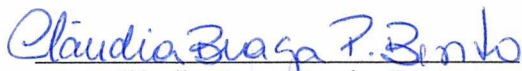
CDD 22. ed. 636.20855

ELSA FERNANDES DA SILVA

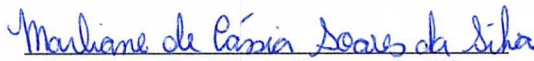
**PREFERÊNCIAS DE SUBSTRATOS POR BACTÉRIAS
HIPERPRODUTORAS DE AMÔNIA DO RÚMEN BOVINO E EFEITOS DA
SUPLEMENTAÇÃO PROTEICA E ENERGÉTICA NA COLONIZAÇÃO DE
FARELO DE SOJA EM NOVILHAS NELORE**


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


APROVADA: 20 de dezembro de 2017.


Cláudia Braga Pereira Bento
(Coorientadora)


Erick Darlisson Batista


Marliane de Cássia Soares da Silva


Cláudia Batista Sampaio


Hilário Cuquetto Mantovani
(Orientador)

*A Deus por ser infinito com seu amor,
graça e presença constante em minha
vida e por me ajudar a vencer
mais esta etapa.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar esse sonho com a conclusão do doutorado.

A CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao Departamento de Microbiologia pelo suporte durante a pós-graduação.

Ao Departamento de Zootecnia por sempre contribuir com a coleta das amostras para realização deste trabalho.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani, pelos ensinamentos, orientação, direcionamentos e disponibilidade. A sua confiança a mim depositada me fez acreditar que seria capaz. Minha eterna gratidão, admiração e respeito.

A minha Coorientadora professora Claudia Braga Pereira Bento, pelos seus ensinamentos e sugestões que contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho e crescimento profissional. Minha eterna gratidão.

Ao Professor Edenio Detmann, pela parceria e por abrir as portas do seu laboratório de Nutrição Animal para realização do experimento, e pelos seus ensinamentos, sugestões, meu muito obrigada.

A todos os meus professores pelos ensinamentos, conselhos, críticas, compreensão, amizade, e por contribuir com meu crescimento intelectual e pessoal.

Aos meus pais Salustiano Fernandes e Maria Moreira pelo amor infinito, por serem meu sustento de vida, pelos ensinamentos que tanto contribuíram para o meu crescimento como ser humano.

Aos meus irmãos Rosane, Rosária, Silvio e Mônica por serem a razão da minha existência e pela torcida, sempre infinita, e pelas alegrias em cada vitória compartilhada.

Aos meus sobrinhos Gilciane, Matheus, Thiago e Davi por todo amor, carinho e por entenderem a minha ausência durante tantos momentos de alegria partilhados em família.

Aos meus cunhados Gilmar e Adriana por fazerem parte da minha família.

A minha avó Maria Isabel, que sempre perguntava se estava próximo de voltar para casa, sei que está junto de Deus intercedendo por mim. Amor eterno.

Aos meus amigos do Laboratório de Anaeróbios: Analice, Bianquinha, Cláudia, Fernanda, Fábria, Déborah, Isabela, Sofia, Juliana, Wemerson, Marcílio, Camila,

Raiane, Ana Julia, Julia, Letícia, Yasmin pela amizade, pelos bons momentos juntos, principalmente, por todo empenho e contribuição os quais foram imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

À Deboráh e Sofia pela amizade, companheirismo, força e ajuda na realização de uma etapa deste trabalho, vocês foram fundamentais. Meu muito OBRIGADA!

Aos meus amigos do Laboratório de Alimentos Felipe, Fábio, Leonardo, Gabriel, Mayara, Deisy e Leandro, pelos bons momentos e dos almoços do RU que mesmo nos momentos difíceis estávamos rindo e descontraindo tornando nossa estadia e os experimentos mais leves, e com força e determinação para vencer. Serão levados comigo para sempre.

Aos amigos do departamento de Zootecnia Willian, Malber, Tadeu, Hugo, João, Felipe, Amanda, Cristiane, Larissa e Gisele pela ajuda e colaboração durante a fase de coleta das amostras dos animais e pela convivência, alegria e disposição durante o período experimental que será inesquecível.

Aos muitos amigos viçosenses, que fiz durante o mestrado e doutorado com os quais aprendi tanto e pela boa convivência. Obrigada pela amizade e bons momentos de descontração e força, vocês fizeram de Viçosa meu lar e a distância e a saudade de casa ser apenas um detalhe.

As amigas de república Juliana, Josi, Jaqueline e Mariana com as quais dividia meus momentos de felicidade, cansaço, estresse nos quais sabíamos respeitar cada momento vivido juntas, sentirei saudades.

A minha grande amiga Raquel Ligeiro que nunca mediu esforços para me ajudar, pelas nossas aventuras de estrada e sempre me dando forças para eu seguir em frente. Gratidão!

Aos meus amigos João Paulo, Tâmara e Hugo, pela acolhida e companhia nos meus últimos meses em Viçosa!

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia pela colaboração e ajuda necessária para a realização deste trabalho. Em especial a Aline, Raquel, José Carlos, Cesário, Sandra, Gabriel e Letícia. Muito obrigada pelas inúmeras ajudas.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Agradeço!

BIOGRAFIA

ELSA FERNANDES DA SILVA, filha de Salustiano Fernandes da Silva e Maria Moreira da Silva, nasceu em Vermelho Novo, Estado de Minas Gerais, em 02 de março de 1977.

Graduou-se em dezembro de 2006 em Licenciatura em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Caratinga.

Em agosto de 2011, iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa com término em julho de 2013.

Em agosto de 2013, iniciou o curso de doutorado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a tese em dezembro de 2017.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1.....	3
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
CAPÍTULO 2.....	10
2.1 INTRODUÇÃO	10
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.3 RESULTADOS.....	14
2.4 DISCUSSÃO.....	31
2.5 CONCLUSÕES	34
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO 3.....	38
3.1 INTRODUÇÃO.....	38
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.3 RESULTADOS.....	48
3.4 DISCUSSÃO.....	63
3.5 CONCLUSÕES	66
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
7 MATERIAL SUPLEMENTAR.....	71

RESUMO

SILVA, Elsa Fernandes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2017. **Preferências de substratos por bactérias hiperprodutoras de amônia do rúmen bovino e efeitos da suplementação proteica e energética na colonização de farelo de soja em novilhas Nelore.** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Coorientadora: Cláudia Braga Pereira Bento.

A suplementação proteica da dieta de novilhas alimentadas com forragens com baixo conteúdo de proteína é importante para garantir o balanço de nitrogênio e a fermentação adequada dos alimentos no rúmen. Bactérias que degradam proteínas e aminoácidos possuem papel essencial no metabolismo de nitrogênio no rúmen e as bactérias hiperprodutoras de amônia (HAB) parecem influenciar a taxa de produção de amônia nesse ecossistema. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a utilização de diferentes fontes de substratos nitrogenados e/ou carboidratos por bactérias hiperprodutoras de amônia isoladas do rúmen visando entender as funções desse grupo bacteriano no metabolismo de nitrogênio no rúmen e avaliar os parâmetros ruminais e a diversidade bacteriana *in vivo*, em novilhas Nelore suplementadas com proteína e energia. Quando os isolados bacterianos foram cultivados em meio suplementado com substratos nitrogenados, foram observadas diferenças na velocidade específica de crescimento entre os substratos analisados. O isolado C116 apresentou maior ($P < 0,05$) velocidade específica de crescimento em Trypticase quando comparado aos demais substratos, porém a cultura com maior densidade óptica neste substrato foi o isolado R96. O isolado C118 apresentou maior ($P < 0,05$) atividade específica de desaminação (AED), entre 713,88 e 872,11 nmol de $\text{NH}_3 \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, quando cultivado em meio contendo casaminoácidos e peptona de caseína, respectivamente. No entanto, a maior ($P < 0,05$) concentração de amônia (42,18 mmol/L) foi obtida para o isolado R96 quando cultivado em meio com Trypticase e peptona de caseína como fonte de carbono e energia. Todos os isolados apresentaram produção de ácidos orgânicos totais acima de 50,48 mmol/L quando cultivados em meio contendo Trypticase, casaminoácidos ou peptona de caseína. Os isolados cultivados em meio contendo glicose apresentaram maior velocidade específica de crescimento e densidade óptica $> 1,0$. O isolado C114 foi a cultura mais versátil em metabolizar os carboidratos glicose, maltose e celobiose. Os principais produtos finais do metabolismo de carboidratos foram: ácido acético, ácido propiônico e ácido láctico. O consumo da glicose esteve associado com a produção de ácido láctico para todos os isolados testados. Os animais que receberam

suplementos proteico e energético apresentaram maiores ($P < 0,05$) concentrações de amônia no líquido ruminal quando comparados ao controle sem suplementação. Animais suplementados e não suplementados com proteína e energia apresentaram concentrações semelhantes de proteína microbiana no líquido ruminal. Observou-se efeito do dia de suplementação sobre a concentração final de ácidos orgânicos totais e de acetato no rúmen. A concentração final ruminal de butirato foi maior ($P < 0,05$) nos animais que receberam suplementação. A taxa de degradação da matéria seca foi maior que 90% em todos os animais que receberam diferentes níveis de suplementação de proteína e energia. A concentração de DNA microbiano extraído do farelo de soja nos animais que receberam suplementação de proteína frequente, proteína e energia frequente e proteína infrequente foram acima de 1000 ng/ μ L/g matéria seca. A análise da diversidade bacteriana avaliada por meio da amplificação do gene do rRNA 16S utilizando oligonucleotídeos específicos para os filos Bacteroidetes e Firmicutes revelaram baixa similaridade entre os tratamentos e os tempos de coleta das amostras do farelo de soja. Esses resultados indicam que a composição dos substratos afeta a atividade de desaminação de bactérias hiperprodutoras de amônia e que carboidratos são utilizados preferencialmente pelas HABs como fonte de carbono e energia em meio contendo mistura dos substratos. Além disso, os resultados demonstram que, nas condições avaliadas neste trabalho, a suplementação proteica e energética aumenta a concentração de amônia no rúmen, porém os efeitos sobre os demais parâmetros bioquímicos e sobre a microbiota que participa da degradação das fontes de proteína no rúmen são limitados.

ABSTRACT

SILVA, Elsa Fernandes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2017. **Substrate preferences by bovine rumen hyper-ammonia-producing bacteria and effects of protein and energy supplementation on colonization of soybean meal in Nellore steers.** Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-adviser: Cláudia Braga Pereira Bento.

Protein supplementation of the diet of cattle fed with low protein content forages is important to ensure nitrogen balance and adequate fermentation of feedstuffs in the rumen. Bacteria that degrade proteins and amino acids play an essential role in the metabolism of nitrogen in the rumen and the hyper-ammonia-producing bacteria (HAB) appear to influence the rate of ammonia production in this ecosystem. The objective of this work was to evaluate the use of different sources of nitrogenous substrates and/or carbohydrates by hyper-ammonia-producing bacteria isolated from the rumen to understand the functions of this bacterial group in the metabolism of nitrogen in the rumen and to evaluate ruminal parameters and bacterial diversity *in vivo* in Nellore steers supplemented with protein and energy. When bacterial isolates were grown in medium supplemented with nitrogen substrates, differences in the specific growth rate were observed between the substrates analyzed. The isolate C116 presented higher ($P<0.05$) specific growth rate in Trypticase when compared to the other substrates, but the culture with the highest optical density in this substrate was the isolate R96. The isolate C118 showed a higher ($P<0.05$) specific activity of deamination (AED), between 713.88 and 872.11 nmol of $\text{NH}_3 \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, when grown in media containing casamino acids and casein peptone, respectively. However, the highest ($P<0.05$) ammonia concentration was 42.18 mmol/L obtained for the isolate R96 when growing in media containing Trypticase or casein peptone as sole carbon and energy sources. All isolates presented total organic acid concentrations above 50.48 mmol/L when growing with Trypticase, casamino acids or casein peptone. The isolates cultured in glucose presented higher specific growth rate and optical density > 1.0 . The isolate C114 was the most versatile strain in metabolizing the carbohydrates glucose, maltose and cellobiose. The main end products of carbohydrate metabolism were: acetic acid, propionic acid and lactic acid. Glucose consumption was associated with lactic acid production among all isolates. Animals that received proteic and energetic supplements had higher ($P<0.05$) ammonia concentrations in their ruminal fluid when compared to the controls without supplementation. Animals

fed diets that were supplemented or non-supplemented with protein and energy showed similar concentrations of microbial protein in ruminal fluid. The day of supplementation affected the concentration of total organic acids and acetate in the rumen. The final concentration of butyrate in the rumen was higher ($P < 0.05$) in animals receiving supplementation. The rate of dry matter degradation was greater than 90% in all animals that received different levels of protein and energy supplementation. The concentration of microbial DNA extracted from soybean meal in animals receiving frequent protein, frequent energy and protein supplementation and infrequent protein were above 1000 ng/ μ L/g dry matter. The analysis of the bacterial diversity evaluated by amplification of the 16S rRNA gene using oligonucleotides specific for the Bacteroidetes and Firmicutes phyla revealed low similarity between the treatments and the time of collection of the soybean meal samples. These results indicate that the composition of the substrates affects the deamination activity of hyper-ammonia-producing bacteria and that carbohydrates were used preferentially by the HABs as carbon and energy sources in media containing mixed substrates. In addition, these results demonstrate, under the conditions evaluated in this work, that protein and energy supplementation increases the concentration of ammonia in the rumen, but the effects on the other biochemical parameters and on the microbiota that participates in the degradation of protein sources in the rumen are limited.

INTRODUÇÃO GERAL

Os ruminantes são colonizados no rúmen por um consórcio complexo de microrganismos anaeróbios estritos e facultativos considerados indispensáveis para a nutrição e fisiologia do hospedeiro. Essa microbiota converte os alimentos ingeridos pelo animal, tais como carboidratos, proteínas e lipídeos, em compostos que são utilizados como fonte de energia e proteína para os ruminantes. Diversos substratos são utilizados para a produção de biomassa microbiana no rúmen, entretanto as demandas por carboidratos e proteína são maiores. Tais substratos, advindos das dietas fornecidas aos animais, interferem na atividade metabólica dos microrganismos, influenciando na natureza e na quantidade dos produtos finais da fermentação, além de alterar a composição da microbiota ruminal.

A maior parte das espécies bacterianas apresenta baixa capacidade de desaminação e, desse modo, raramente usam aminoácidos como fontes de energia. As espécies bacterianas do filo Bacteroidetes são abundantes no rúmen e participam da hidrólise de proteína dietética, porém apresentam baixa capacidade de desaminar aminoácidos. No entanto, algumas espécies de bactérias apresentam alta capacidade de desaminação e são capazes de usar aminoácidos como fonte de energia, sendo consideradas importantes produtoras de amônia no rúmen. A caracterização dessas populações de bactérias resultou no isolamento e identificação de linhagens com alta atividade específica de desaminação. Essas bactérias foram classificadas como espécies do filo Firmicutes e apresentam atividade específica de produção de amônia cerca de 10 a 20 vezes maior do que outras espécies de bactérias mais abundantes no ecossistema ruminal.

Durante décadas, todas as bactérias hiperprodutoras de amônia (HAB) isoladas de ruminantes foram caracterizadas como sendo espécies não-sacarolíticas e que dependiam da fermentação de aminoácidos para obter energia. Recentemente, um grupo de bactérias isoladas do rúmen de novilhas Nelore foi caracterizado como HAB capazes de fermentar carboidratos (HAB-CB), sugerindo novas funções bioquímicas e nichos ecológicos alternativos para as HAB, ampliando assim, a possível influência desse grupo de bactérias no metabolismo de nitrogênio no rúmen. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo investigar as características fisiológicas das HAB-CB quanto à utilização de diferentes substratos; caracterizar a influência dessas bactérias

na desaminação de aminoácidos *in vitro* e avaliar a diversidade bacteriana *in vivo* em novilhas Nelore suplementadas com proteína e energia.

CAPÍTULO 1

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

O ambiente ruminal apresenta características físico-químicas peculiares que o torna um ecossistema microbiano anaeróbio propício para o desenvolvimento das diferentes espécies de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários, arqueas e bacteriófagos (Kamra, 2005; Kim et al., 2011; Creevey et al., 2014). Esses microrganismos exercem importantes funções, como fermentação de carboidratos estruturais e não estruturais, proteínas e lipídeos com produção de ácidos orgânicos voláteis e proteína microbiana, que são disponibilizados para os ruminantes como fonte de energia e aminoácidos para a produção de carne e leite (Hungate, 1966; Hess, 2011; Li et al., 2012; Creevey et al., 2014).

Em estudo realizado por Henderson et al. (2015) foi demonstrado que alguns grupos microbianos de bactérias, arqueas e protozoários são encontrados em diferentes espécies de ruminantes, independente da dieta, região geográfica, raça ou idade do animal, sendo reconhecidos como membros do microbioma central (core microbiome) desses animais (Henderson et al., 2015). As bactérias são as principais responsáveis pela conversão dos alimentos ingeridos pelos animais em ácidos orgânicos e proteína microbiana que são utilizados pelos ruminantes como fonte de energia e aminoácidos (Creevey et al., 2014). Os filos Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria correspondem aproximadamente a 95% da diversidade microbiana no rúmen de novilhas. Embora, estudos evidenciem a diversidade filogenética do ecossistema ruminal, a diversidade funcional das populações de microrganismos que colonizam o rúmen ainda é pouco conhecida (Creevey et al., 2014; Jami e Mizrahi et al., 2012).

A evolução do estudo da diversidade microbiana do rúmen resultou na utilização de técnicas moleculares independentes de cultivo que complementam os estudos convencionais com base em espécies cultiváveis de microrganismos ruminais. As técnicas moleculares são baseadas nos genes que codificam o RNA ribossomal (rRNA) 16S e 18S presentes nos genomas dos microrganismos do rúmen para análises quantitativas (Koike et al., 2003; Sylvester et al., 2004) e qualitativas (Kocherginskaya et al., 2001). Com isso, procedimentos para construir bibliotecas de clones dos genes

de rRNA 16S de bactérias tem sido utilizado para demonstrar a diversidade desses microrganismos presentes no rúmen (Deng et al., 2008).

As bactérias presentes no rúmen podem transformar proteínas de baixa qualidade em proteínas de alta qualidade para os animais (proteína microbiana). As proteínas, juntamente com os carboidratos são os nutrientes essenciais requeridos para maximizar o crescimento dos microrganismos ruminais (Casper et al., 1999). Dessa forma, as proteínas dietéticas melhoram a eficiência do crescimento microbiano no rúmen mediante a disponibilidade de carboidratos a serem fermentados pelos microrganismos ruminais (Canesin et al., 2014).

A suplementação proteica é uma prática comumente utilizada pelos pecuaristas em regiões tropicais (Paulino et al., 2010; Souza et al., 2010; Detmann et al., 2014a). O metabolismo das proteínas no rúmen é uma das áreas mais estudadas na nutrição dos ruminantes, objetivando-se maximizar a utilização do nitrogênio pelo animal, aumentar o fluxo de nitrogênio dietético para o intestino delgado, e reduzir as perdas para o meio ambiente (Calsamiglia et al., 2010; Chanthakhoun et al., 2012).

No rúmen, diferentes espécies de microrganismos se associam às partículas de alimentos, e podem atuar em simbiose para degradar nutrientes essenciais como proteínas. Devido à ação sinérgica e coordenada de diferentes proteinases, peptidases e desaminases produzidas por esses microrganismos, são gerados peptídeos, aminoácidos e amônia no rúmen, respectivamente (Bach et al., 2005). As fontes de proteínas que chegam ao intestino dos ruminantes são as proteínas de origem microbiana, além da proteína não degradada no rúmen e a proteína endógena, sendo que os aminoácidos provenientes dessas fontes são prontamente utilizados como proteína metabolizável pelos ruminantes (Valadares Filho et al., 2006).

As enzimas proteolíticas estão intimamente associadas ao envelope celular bacteriano, sinalizando a necessidade de adsorção inicial da partícula proteica para iniciar o processo de proteólise (Owens e Zinn, 1988; Bach et al., 2005). Durante a proteólise, as proteínas são hidrolisadas em peptídeos e aminoácidos. A amônia proveniente da desaminação dos aminoácidos pode ser utilizada como fonte de nitrogênio pelas bactérias ruminais, sendo que a proteína microbiana do rúmen, fornece até 90 % do nitrogênio demandado pelo hospedeiro. No entanto, quando ocorre aumento excessivo da concentração de amônia no rúmen (por exemplo, no caso de desbalanço entre o fornecimento de proteína e carboidratos na dieta), a mesma pode

ser absorvida através da parede do rúmen sendo convertida no fígado em uréia e excretada na urina, resultando em perdas de nitrogênio para os ruminantes (Chanthakhoun et al., 2012).

No rúmen, aproximadamente 50% da proteína dietética pode ser degradada em amônia pelos microrganismos ruminais. A maioria das bactérias ruminais são proteolíticas, porém a produção de amônia é atribuída principalmente a um grupo filogeneticamente diversificado, denominadas bactérias hiperprodutoras de amônia (Krause e Russell, 1996). Essas bactérias foram inicialmente identificadas como *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* e *Clostridium aminophilum* e produzem, em média, 20 vezes mais amônia quando comparado a outras espécies de bactérias ruminais produtoras de amônia (Nolan, 1975; Paster et al., 1993). Essas bactérias não utilizam carboidratos como fonte de energia e são fermentadoras obrigatórias de aminoácidos, sendo encontradas em menor quantidade no rúmen (James et al., 1988; Chen e Russell, 1989b).

A amônia representa a principal fonte de nitrogênio solúvel presente no líquido ruminal e a sua concentração depende da quantidade e da solubilidade da proteína dietética, da quantidade de ureia reciclada através da saliva, da difusão da ureia pela parede do rúmen e da taxa de absorção no rúmen. A reciclagem da ureia na saliva pode ajudar a equilibrar a demanda de nitrogênio no rúmen, sendo que 10 - 40% da ureia ruminal podem ser fornecidas através da ureia secretada na saliva (Stewart e Smith, 2005). A concentração de amônia no rúmen pode variar de 1 mM a 40 mM dependendo do tipo de alimentação fornecido ao animal (Wallace et al., 1995; Bach et al., 2005).

De acordo com Bento e colaboradores (2015), a utilização de nitrogênio na dieta dos ruminantes possui grande impacto econômico na nutrição de ruminantes. Os modelos propostos de fermentação no rúmen revelam que as bactérias ruminais possuem diferentes padrões de utilização das fontes nitrogênio e que as bactérias hiperprodutoras de amônia são responsáveis por uma grande fração da desaminação de aminoácidos no rúmen, apesar da abundância das mesmas ser relativamente baixa.

Nas últimas décadas, bactérias Gram-positivas e sensíveis a monensina, com elevada atividade específica de produção de amônia foram isoladas de ruminantes (Chen e Russell, 1989a; Taghavi-Nezhad et al., 2014). Estas bactérias hiperprodutoras de amônia foram inicialmente caracterizadas como fermentadoras obrigatórias de aminoácidos e foram detectadas em pequenas quantidades no rúmen, por meio do uso

de sondas moleculares para o rRNA 16S (Krause e Russell, 1996). A quantificação de bactérias hiperprodutoras de amônia em meios com ausência de carboidratos demonstram que a população desses organismos é baixa, no entanto, a diversidade bioquímica dentro deste grupo foi maior do que o esperado em estudos com ruminantes mantidos a pasto (Attwood et al., 1998).

Estudos visando o isolamento, caracterização e quantificação de bactérias hiperprodutoras de amônia em animais alimentados com dietas tropicais ou suplementadas com proteína degradável no rúmen são escassos. A utilização de proteína dietética é um fator limitante na produtividade nos trópicos, sendo a proteína um dos nutrientes mais caros da dieta para novilhas. Assim, a compreensão do papel das bactérias ruminais no metabolismo de proteínas da dieta é essencial para o desenvolvimento de estratégias para melhorar a eficiência da retenção de nitrogênio no animal e reduzir custos de produção na pecuária (Bento et al., 2015).

No trabalho realizado por Bento et al (2015), verificou-se que isolados bacterianos hiperprodutores de amônia obtidos de novilhos alimentados com forrageiras tropicais também foram capazes de metabolizar açúcares como fonte de carbono, o que representa uma vantagem competitiva para a exploração e colonização de nichos ecológicos no rúmen. Além disso, a análise bioquímica e genética destes isolados indicou várias características distintas das estirpes já descritas na literatura.

Diante disso, no presente trabalho o objetivo foi estudar as características fisiológicas dos isolados de bactérias hiperprodutoras de amônia e fermentadoras de carboidratos relacionadas com a utilização de diferentes fontes de substratos (carboidratos e aminoácidos) visando avaliar o impacto potencial desse grupo funcional de bactérias no metabolismo de nitrogênio no ecossistema ruminal.

1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Attwood, G.T.; Klieve, A.V.; Ouwerkerk, D.; Patel, B.K. Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.5, p.1796-1804, 1998.
- Bach, A.; Calsamiglia, S.; Stern, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. E9–E21, 2005.
- Bento, C.B.P.; Azevedo, A.C.; Detmann, E.; Mantovani, H.C Biochemical and genetic diversity of carbohydrate-fermenting and obligate amino acid-fermenting hyper-ammonia-producing bacteria from Nellore steers fed tropical forages and supplemented with casein. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 28, 2015.
- Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Reynolds, C.K.; Kristensen, N.B.; Van Vuuren, A.M. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal**, v.4, n.7, p. 1184-1196, 2010.
- Canesin, R.C.; Berchielli, T.T.; Messana, J.D.; Baldi, F.; Pires, A.V.; Frighetto, R.T. S.; Reis, R.A. Effects of supplementation frequency on the ruminal fermentation and enteric methane production of beef cattle grazing in tropical pastures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 11, p. 590–600, 2014.
- Casper, D.P.; Maiga, H.A.; Brouk, M.J. Synchronization of carbohydrate and protein sources on fermentation and passage rates in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.1779-1790, 1999.
- Chanthakhoun, V.; Wanapat, M.; Berg, J. Level of crude protein in concentrate supplements in influenced rumen characteristics, microbial protein synthesis and digestibility in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Livestock Science**, v. 144, n. 3, p. 197–204, 2012.
- Chen, G.; Russell, J.B. Sodium-dependent transport of branched-chain amino acids by a monensin-sensitive ruminal *Peptostreptococcus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2658–2663, 1989a.
- Chen, G.; Russell, J.B. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1052–1057, 1989b.
- Creevey, C.J; Kelly, W.J; Henderson, G; Leahy, S.C. Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. **Microbial Biotechnology**, v.7, n. 5, p. 467-479, 2014.
- Deng, W; Xi, D; Mao, H; Wanapat, M. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: A review. **Molecular Biology Reports**, v. 35, n. 2, p. 265–274, 2008.
- Detmann, E.; Paulino, M.F.; Valadares Filho, S.C.; Batista, E.D.; Rufino, L.M.A. Aspectos nutricionais aplicados a novilhas em pastejo nos trópicos. In: SIMPÓSIO DE

PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 9, 2014 Viçosa, MG. Anais... Viçosa, MG: DZO-UFV, p.239-267, 2014a.

Henderson, G.; Cox, H.; Ganesh, S.; Jonker, A.; Young, W. Janssen, P.H. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-15, 2015.

Hess, M. Metagenomic Discovery of. **Science**, v. 463, n. 6016, p. 463–467, 2011.

Hungate, R.E. **The Rumen and Its Microbes**. New York: Academic Press. 1996.

James, B; Strobel, H.J; Chen, G. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n.4, p. 872–877, 1988.

Jami, E.; Mizrahi, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. **Plos One**, v.7, n. 3, p. 1–8, 2012.

Kamra, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, n. 1, p. 124–135, 2005.

Kim, M.; Morrison, M.; Yu, Z. Phylogenetic diversity of bacterial communities in bovine rumen as affected by diets and micro environments. **Folia Microbiology**, v. 56, p.453-458, 2011.

Kocherginskaya, S.A.; Aminov, R.I.; White, B. A. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Random Sequencing, and Statistical Ecology Approaches. **Anaerobe**, v.7, n.3, p. 119–134, 2001.

Koike, S.; Pan, J.; Kobayashi, Y.; Tanaka, K. Kinetics of *In sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1429–1435, 2003.

Krause, D. O.; Russell, J. B. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n.3, p.815–821, 1996.

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

Li, R.W.; Wu, S.; Baldwin, R.L.V.I.; Li, W.; Li, C. Perturbation dynamics of the rumen microbiota in response to exogenous butyrate. **Plos One**, v.7, p. 29392, 2012.

Morrison, M.; Mackie, R. Nitrogen metabolism by ruminal microorganisms: current understanding and future perspectives. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.47, p. 227 – 246, 1996

Nolan, J.V. Quantitative models of nitrogen metabolism in sheep. **Digestion and Metabolism in the Ruminant**, v. 416, 1975.

Owens, F.N.; Zinn, R. Protein metabolism of ruminant animals. **The Ruminant animal: Digestive Physiology and Nutrition**, p.227–249, 1988.

Paster, B. J.; Russell, J.B.; Yang, C.M.J.; Chow, J.M.; Woese, C.R.; Tanner, R. Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium aminophilum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, n.1, p.107-110, 1993.

Paulino, M.F; Detmann, E.; Valadares filho, S.C.; Silva, A.G.; Cabral, C.H.A.; Valente, E.E.L.; Barros, L.V.; De Paula, N.F.; Lopes, S.A.; Couto, V.R.M. Bovinocultura programada. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 7, 2010, Viçosa. **Anais...Viçosa: DZO-UFV**, 2010. p.267-297.

Pengpeng, W.; Tan, Z. Ammonia assimilation in rumen bacteria: a review. **Animal Biotechnology**, v.24, n.2, p.107–28, 2013.

Rychlik, J.L.; La Vera, R.; Russell, J.B. Amino acid deamination by ruminal *Megasphaera elsdenii* strains. **Current Microbiology**, v.45, n.5, p.340–345, 2002.

Souza, M.A.; Detmann, E.; Paulino, M.F.; Sampaio, C.B.; Lazzarini, I.; Valadares Filho, S.C. Intake, digestibility and rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and/or starch. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p.1299-1310, 2010.

Stewart, G.; Smith, C. Urea nitrogen salvage mechanisms and their relevance to ruminants, non-ruminants and man. **Nutrition Research Reviews**, v.18, p.49-62, 2005.

Sylvester, J.T.; Karnati, S.K.R.; Firkins, J.L.; Yu, Z.; Newbold, C.J. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3378–3384, 2004.

Taghavi-Nezhad, M.; Alipour, D.; Flythe, M. D.; Zamani, P.; Khodakaramian, G. The effect of essential oils of *Zataria multiflora* and *Mentha spicata* on the in vitro rumen fermentation, and growth and deaminative activity of amino acid-fermenting bacteria isolated from Mehraban sheep. **Animal Production Science**, v. 54, n. 3, p. 299–307, 2014.

Valadares Filho, S. DE C.; Paulino, P.V.R.; Magalhães, K. A. Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas de composição de alimentos BR-CORTE. **Viçosa, MG: UFV, Suprema Gráfica Ltda**, 2006.

Wallace, R.J.; Kopecny, J.; Broderick, G.A.; Walker, N.D.; Sichao, L.; Newbold, C.J.; McKain, N. Cleavage of di- and tripeptides by *Prevotella ruminicola*. **Anaerobe**, v.1, p.335–343, 1995.

Wallace, R.J.; Onodera, R.; Cotta, M.A. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: **The rumen microbial ecosystem**. [s.l.] Springer, p.283–328, 1997.

CAPÍTULO 2

Preferências de substratos por bactérias hiperprodutoras de amônia isoladas de novilhos nelore

2.1 INTRODUÇÃO

Os peptídeos e aminoácidos são substratos utilizados como fonte de carbono e energia por muitas espécies de microrganismos do ecossistema ruminal (Fonknechten et al., 2010). As bactérias proteolíticas possuem complexos enzimáticos (proteínases e peptidases) ancorados no envelope celular que são capazes de hidrolisar proteínas solúveis em peptídeos e aminoácidos (Bach et al., 2005). Esses produtos podem ser assimilados diretamente por outras espécies de bactérias para síntese de proteína microbiana, ou serem utilizados como fonte de energia, gerando amônia como produto da fermentação (Attwood et al., 1998; Bach et al., 2005).

O metabolismo de nitrogênio no rúmen tem sido investigado com o objetivo de maximizar a utilização da proteína dietética, aumentando o fluxo de nitrogênio do rúmen para o intestino delgado e reduzindo as perdas desse nutriente para o meio ambiente (Walker et al., 2005; Calsamiglia et al., 2010; Chanthakhoun et al., 2012). Nesse contexto, o balanço entre a disponibilidade de carboidratos e de proteínas influencia o crescimento microbiano e a produção de biomassa no rúmen. Quando há excesso de carboidratos solúveis, as reações catabólicas podem ocorrer mais rapidamente do que os processos anabólicos que resultam na incorporação de amônia pelos microrganismos do rúmen. A amônia acumulada pode ser absorvida através do epitélio ruminal e convertida em ureia no fígado sendo posteriormente excretada na urina (Bach et al., 2005).

A produção de amônia pelos ruminantes é predominantemente realizada por diferentes espécies de bactérias ruminais que variam quanto à afinidade pelos aminoácidos e quanto à atividade de desaminação (Wallace et al., 1997). As espécies bacterianas dominantes no rúmen geralmente apresentam baixa atividade de desaminação, porém as espécies descritas como hiperprodutoras de amônia (HAB), apesar de serem menos abundantes, são capazes de desaminar aminoácidos com

atividade cerca de 20 vezes maior em relação às espécies bacterianas dominantes no rúmen (Chen e Russell, 1989; Attwood et al., 1998). Devido à sua alta atividade específica de produção de amônia, estima-se que as HAB são capazes de desaminar mais de 25% da proteína presente na dieta dos ruminantes (Krause e Russell, 1996).

As bactérias hiperprodutoras de amônia foram inicialmente caracterizadas como fermentadoras obrigatórias de aminoácidos e foram encontradas em pequenas quantidades no rúmen (Krause e Russell, 1996). Apesar dos relatos sobre a quantificação das bactérias hiperprodutoras de amônia na ausência de carboidratos demonstrarem quantidades frequentemente baixas desses microrganismos, a diversidade bioquímica dentro deste grupo foi maior do que o esperado (Attwood et al., 1998).

Bento et al. (2015), verificaram que isolados de bactérias hiperprodutoras de amônia obtidos de novilhos Nelore alimentados com forrageiras tropicais também foram capazes de metabolizar carboidratos como fonte de carbono, o que sugere maior potencial para exploração de nichos ecológicos no rúmen em comparação com as espécies hiperprodutoras de amônia fermentadoras obrigatórias de aminoácidos. No entanto, as preferências de substratos desse grupo de bactérias não foram caracterizadas, e a ocorrência da repressão catabólica durante o crescimento com diferentes substratos não foi investigada.

Nesse trabalho, o objetivo foi avaliar a utilização de diferentes fontes de substratos (aminoácidos, peptídeos e carboidratos) como fonte de carbono e/ou energia por bactérias hiperprodutoras de amônia fermentadoras de carboidratos, visando entender as possíveis funções desse grupo bacteriano no metabolismo de nitrogênio no ecossistema ruminal.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Origem dos isolados

Neste trabalho, foram utilizadas bactérias hiperprodutoras de amônia (HAB) isoladas por Bento et al (2015) a partir de novilhas Nelore alimentadas com dieta à base de feno de Tifton 85 (*Cynodon* sp.) e suplementadas ou não com caseína. Os isolados (C89, C114, C116, C118, R91, R96, R107) foram escolhidos de acordo com a atividade específica de desaminação, produção de amônia e assimilação de carboidratos. Os isolados foram cultivados em meio mineral anaeróbico limitante em

nitrogênio contendo (por litro); 292 mg K_2HPO_4 ; 240 mg KH_2PO_4 ; 480 mg Na_2SO_4 ; 480 mg NaCl; 100 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 64 mg $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$; 4000 mg Na_2CO_3 ; 600 mg hidrócloro de cisteína, adicionado de vitaminas e minerais (Chen e Russell, 1989). O meio mineral anaeróbio foi preparado sob atmosfera de CO_2 livre de oxigênio e o pH foi ajustado para 6,5 com solução de NaOH (3M).

2.2.2 Análise filogenética do gene que codifica o rRNA 16S dos isolados de HAB

A árvore filogenética foi reconstruída a partir das sequências do gene que codifica rRNA 16S dos isolados (Bento et al., 2015). Todas as sequências foram alinhadas no programa Clustal W (Thompson et al., 1994), utilizando o método de *Neighbour Joining* para reconstrução filogenética no programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2007). As sequências do gene rRNA 16S de cada isolado foram comparadas com sequências depositadas no GenBank, utilizando o algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.2.3 Avaliação da velocidade específica de crescimento (μ)

As velocidades específicas de crescimento (μ) dos isolados foram avaliadas por meio do cultivo em meio mineral acrescido de diferentes fontes de aminoácidos/peptídeos (casaminoácidos, Trypticase, peptona de caseína, peptona de farinha de soja e peptona de proteose) na concentração final de 15 g/L. Os isolados também foram cultivados em meios com diferentes fontes de carboidratos (glicose, maltose, celobiose, xilose e sacarose) na concentração final de 4 g/L. A incubação foi feita em tubos de anaerobiose a 39 °C, sem agitação. O pH final do meio, após 24 horas de incubação foi avaliado por meio do potenciômetro digital (TEC-2mp). Alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos 0, 6 e 24 horas de incubação para avaliar a atividade específica de desaminação, concentração de amônia e análise dos produtos finais da fermentação (ácidos orgânicos voláteis).

Para avaliar a preferência de substratos (aminoácidos, peptídeos e carboidratos) dos isolados, as culturas de HAB's foram cultivadas em meio contendo Trypticase (3 g/L) e/ou glicose (2 g/L). O inóculo inicial foi de 5% (v/v), e as culturas foram mantidas em anaerobiose a 39 °C por um período de 24 horas de incubação. Os valores da densidade óptica ($D.O_{600nm}$) foram avaliados a cada 30 minutos, utilizando espectrofotômetro Spectronic 20 D (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA).

Todos os experimentos foram realizados com três réplicas técnicas e duplicata biológica.

A velocidade específica de crescimento em todas as fontes de carbono foi calculada pela regressão linear do logaritmo neperiano da D.O._{600nm} durante a fase exponencial de crescimento. A velocidade específica de crescimento representa o coeficiente angular da relação Ln da D.O._{600nm} *versus* o tempo de incubação (h).

2.2.4 Análise de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Dual acoplado a um detector de índice de refração (RI) Shodex RI-101 mantido a 45 °C, e coluna de exclusão iônica Phenomenex Rezex ROA, 300 × 7,8 mm, mantida a 45 °C. A fase móvel utilizada foi o ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mmol/L. As amostras (1,0 mL) foram coletadas e centrifugadas (12000 × g, 10 min) para remoção das células e o sobrenadante livre de células foi tratado conforme descrito por Siegfried et al (1984). A curva padrão foi feita utilizando ácido succínico, ácido fórmico, ácido propiônico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido isobutírico, ácido butírico (concentrações de 0,625 a 10 mmol/L) ácido isovalérico (concentrações de 0,312 a 5 mmol/L) e ácido acético (concentrações de 1,25 a 20 mmol/L).

2.2.5 Avaliação da concentração de amônia, proteína microbiana e atividade específica de desaminação (AED)

A concentração de amônia nas amostras foi avaliada pelo método colorimétrico de Chaney e Marbach (1962). A absorvância foi medida a 630 nm em espectrofotômetro Spectronic 20D (Thermo Fischer Scientific, Madison, WI, USA) utilizando o cloreto de amônio (NH₄Cl nas concentrações de 20,38 a 203,83 mg/L) como padrão. A concentração de proteína microbiana foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando lisozima (concentrações de 1,25 a 25 µg) como padrão. A atividade específica de desaminação (AED) foi calculada pela diferença da concentração de amônia (mmol/L) entre os tempos zero e seis horas de incubação, dividido pela concentração de proteína microbiana (mg/L) e pelo tempo de incubação (minutos).

2.2.6 Análise estatística

Para a avaliação da velocidade específica de crescimento dos isolados, densidade óptica, atividade específica de desaminação e concentração de amônia nos ensaios *in vitro*, as análises de variância (ANOVA) foram realizadas por intermédio do procedimento MIXED do SAS 9.4. O experimento foi conduzido e avaliado segundo delineamento casualizado, em esquema fatorial (5x5), sendo cinco animais e cinco tratamentos, segundo o modelo abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + S_j + BS_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Em que: μ = constante geral; B_i = efeito do isolado bacteriano i ; S_j = efeito do substrato de crescimento j ; BS_{ij} = interação do isolado bacteriano i e substrato de crescimento j ; ε_{ij} = erro aleatório, pressuposto NID (0; σ^2).

Para o caso de interações significativas, o desdobramento das mesmas foi realizado por meio do *statement* SLICE do SAS. Adotou-se 0,05 como nível crítico de probabilidade de ocorrência do erro tipo I.

Os produtos da fermentação dos isolados bacterianos nos ensaios *in vitro* foram avaliados segundo delineamento inteiramente casualizado por intermédio do procedimento MIXED do SAS 9.4, de acordo com o modelo abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + \varepsilon_{(i)j}$$

Em que: μ = constante geral; B_i = efeito do isolado bacteriano i ; $\varepsilon_{(i)j}$ = erro aleatório, pressuposto NID (0; σ^2).

Quando significativo, comparou-se os efeitos dos isolados bacterianos por meio do teste de Tukey, utilizando-se $\alpha = 0,05$.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Análise filogenética do gene que codifica o rRNA 16S dos isolados de HAB

A árvore filogenética foi reconstruída pelo alinhamento das sequências do gene que codifica rRNA 16S dos isolados utilizados neste trabalho, juntamente com as sequências de outros isolados de HAB depositadas no GenBank. A Figura 1 representa a árvore filogenética consenso obtida pela análise de *bootstrap* (número de vezes que o agrupamento ocorreu nas replicações), considerando 1000 replicações. Os isolados de HAB utilizadas neste trabalho foram agrupados em dois clados monofiléticos

descendentes de ancestral comum. Os ramos foram suportados com valores de *bootstrap* > 99%. Quatro isolados (R107, C114, C116, C118) de HAB agruparam no clado 1 e foram filogeneticamente relacionados com o gênero *Clostridium bifermentans* (Figura 1). Os outros três isolados (C89, R91 e R96) agruparam no clado 2, com outras bactérias relacionadas ao gênero *Clostridium sordellii* (Figura 1). Os demais isolados utilizados na reconstrução da árvore filogenética são espécies já descritas na literatura como bactérias hiperprodutoras de amônia e apresentaram menor similaridade com os isolados obtidos de novilhos Nelore.

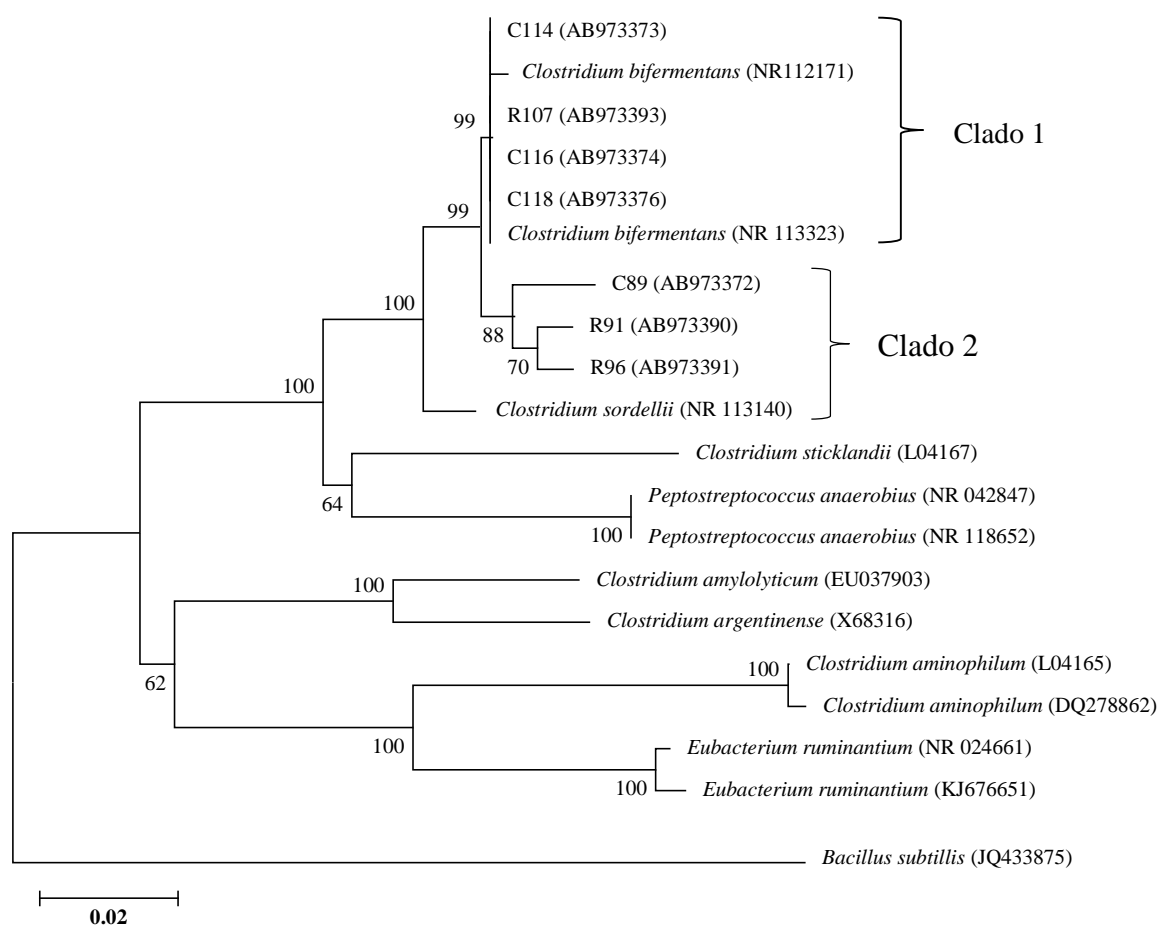


Figura 1. Relações filogenéticas das bactérias hiperprodutoras de amônia (HAB) isoladas a partir de novilhos Nelore. A reconstrução foi realizada a partir de sequências do gene que codifica o rRNA 16S isolados por Bento et al (2015), e incluindo outras culturas de bactérias hiperprodutoras de amônia já descritas na literatura. A árvore consenso foi reconstruída no programa Mega 6.0 utilizando o método *Neighbour Joining*, com *bootstrap* de 1000 replicações. Os números de acesso GenBank das estirpes bacterianas são indicados entre parênteses. A barra de escala representa mudanças em 2 nucleotídeos por 100 nucleotídeos analisados.

2.3.2 Caracterização fisiológica das bactérias hiperprodutoras de amônia *in vitro*

Os isolados bacterianos cultivados em meio mineral anaeróbio suplementados com substratos nitrogenados (peptídeos e aminoácidos) apresentaram diferenças nas velocidades específicas de crescimento (μ) nos substratos analisados. Os valores encontrados variaram de 0,376 h⁻¹ (C116) a 1,447 h⁻¹ (C114), ambos para o substrato peptona farinha de soja (Tabela 1).

Os isolados C116 e C118 apresentaram maiores ($P < 0,05$) velocidades específicas de crescimento em Trypticase (1,072 e 0,954 h⁻¹, respectivamente) e peptona de proteose (0,835 e 0,947 h⁻¹) quando comparado aos demais substratos avaliados (Tabela 1). A densidade óptica (D.O.) dos isolados cultivados em meio com Trypticase variou de 0,215 (R107) a 0,934 (R96) (Tabela 1), sendo que o isolado R107 foi o que apresentou a menor ($P < 0,05$) D.O._{600nm} neste substrato quando comparado aos demais isolados avaliados.

Tabela 1. Avaliação da velocidade específica de crescimento (μ) e densidade óptica (D.O._{600nm}) dos isolados bacterianos fermentadores de aminoácidos. Os isolados foram cultivados em meio mineral anaeróbio suplementados com diferentes substratos nitrogenados (15 g/L) por 24 horas a 39 °C.

Isolados	μ (h ⁻¹)				
	Casaminoácidos	Trypticase	Peptona de caseína	Peptona de proteose	Peptona de farinha de soja
C89	0,686 bAB	0,752 abBC	0,736 abB	0,887 aAB	0,617 bC
R91	0,627 cAB	0,810 bB	0,890 abA	1,003 aA	0,866 abB
R96	0,471 bB	0,650 aC	0,715 aB	0,678 aC	0,668 aC
R107	0,471 bB	0,827 aB	0,887 aA	0,874 aAB	0,786 aBC
C114	0,565 cB	0,554 dC	0,760 bAB	0,749 cBC	1,447 aA
C116	0,734 bcA	1,072 aA	0,679 cB	0,835 bB	0,376 dD
C118	0,651 bAB	0,954 aAB	0,737 bB	0,947 aAB	0,723 bBC

Isolados	D.O. _{600nm} 24 horas				
	Casaminoácidos	Trypticase	Peptona de caseína	Peptona de proteose	Peptona de farinha de soja
C89	0,500 cAB	0,917 aA	0,649 bBC	0,633 bAB	0,446 cD
R91	0,388 cBC	0,652 aB	0,678 aB	0,608 aAB	0,517 bC
R96	0,501 eA	0,934 aA	0,832 bA	0,674 cA	0,594 dB
R107	0,461 cAB	0,215 dC	0,654 aBC	0,671 aA	0,565 bBC
C114	0,336 cC	0,680 aB	0,474 bD	0,472 bC	0,696 aA
C116	0,431 cAB	0,623 aB	0,599 aC	0,621 aAB	0,471 bCD
C118	0,430 cB	0,681 aB	0,676 aB	0,583 bB	0,559 bBC

As médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha comparam o mesmo isolado entre diferentes fontes de substratos. As letras maiúsculas nas colunas comparam substratos entre os isolados. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na linha ou coluna não diferem entre si a nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. μ = velocidade específica de crescimento; D.O._{600nm} = densidade óptica.

Quando se comparou a velocidade específica de crescimento de todos isolados dentro de cada fonte de substrato, a menor média ($P < 0,05$) foi obtida para

casaminoácidos entre os isolados avaliados (Figura 2A). Os isolados de HAB que agruparam no clado 1 (Figura 1), apresentaram as maiores velocidades específicas de crescimento entre os substratos analisados.

Quando foi comparado a D.O._{600nm} média dos isolados dentro de cada fonte de carbono e energia, o substrato Trypticase foi o que proporcionou a maior D.O._{600nm} ($P < 0,05$) entre os isolados (Figura 2B). Os resultados indicam que há diferenças na preferência de substratos entre os isolados analisados. De forma geral, peptona de farinha de soja e casaminoácidos foram os substratos que apresentaram menor rendimento de biomassa (Figura 2B).

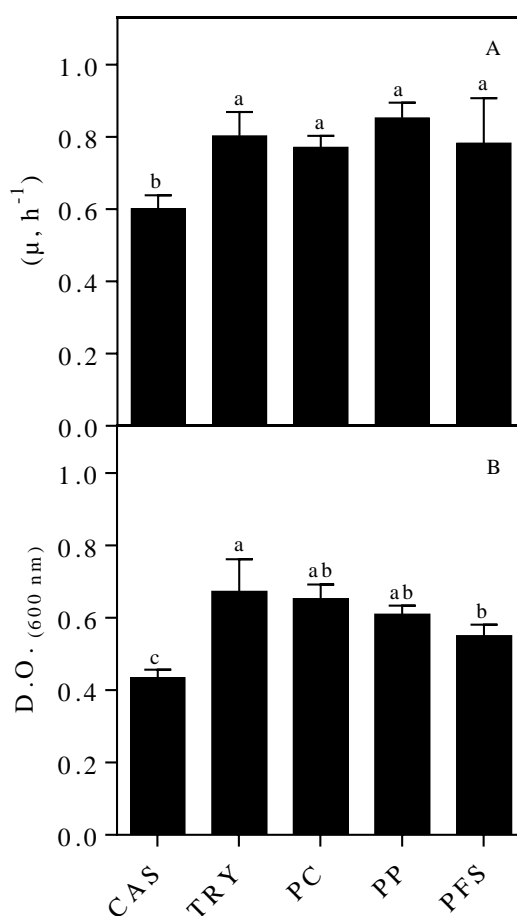


Figura 2. Velocidade específica de crescimento (μ) (A), e densidade óptica D.O. 600 nm (B), dos isolados de HAB. Casaminoácidos (CAS), Trypticase (TRY), Peptona de caseína (PC), Peptona de proteose (PP), Peptona de farinha de soja (PFS).

Todos os isolados bacterianos cultivados em meio mineral anaeróbio suplementados com diferentes substratos nitrogenados apresentaram AED superior a $150\text{ nmol de NH}_3 \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, porém essa atividade nem sempre foi

proporcional a concentração final de amônia produzida pelos isolados avaliados (Tabela 2).

O isolado C118 foi o que apresentou os maiores ($P < 0,05$) valores de AED (713,88 e 872,11 nmol de $\text{NH}_3 \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) quando cultivado com casaminoácidos e peptona de caseína, respectivamente. No entanto, a maior concentração de amônia foi obtida com o isolado R96 (42,18 e 38,49 mmol/L) cultivado nos substratos Trypticase e peptona de caseína, respectivamente (Tabela 2).

Os isolados C89 e R96 apresentaram maior AED ($P < 0,05$) quando cultivados no substrato peptona de caseína e peptona de proteose, respectivamente. O isolado R91 apresentou maior AED ($P < 0,05$) em peptona de caseína. O isolado R107 apresentou a menor AED ($P < 0,05$) para peptona de farinha de soja. O isolado C114 apresentou maior AED ($P < 0,05$) quando cultivado nos substratos Trypticase, casaminoácidos e peptona de caseína (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade específica de desaminação (nmol de $\text{NH}_3 \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) e concentração de amônia (mmol/L) dos isolados bacterianos fermentadores de aminoácidos. Os isolados foram cultivados em meio mineral anaeróbio suplementados de 15 g/L dos diferentes substratos nitrogenados por 24 horas a 39 °C.

Isolados	AED ¹ (nmol de $\text{NH}_3 \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)				
	Casaminoácidos	Trypticase	Peptona de caseína	Peptona de proteose	Peptona de farinha de soja
C89	333,01 bC	221,57 bA	652,75 aAB	582,38 aA	154,51 bB
R91	348,56 bcC	335,81 bcA	787,12 aA	486,87 bAB	170,49 cB
R96	352,57 bC	302,12 bA	686,68 aAB	593,60 aA	176,44 bB
R107	471,44 abC	348,35 abA	497,29 aB	276,06 abBC	264,47 bAB
C114	497,02 aBC	302,45 abA	476,14 aB	238,39 bC	228,86 bAB
C116	763,58 aA	349,40 bA	671,59 aAB	351,03 bBC	377,75 bA
C118	713,88 aAB	446,46 bA	872,11 aA	424,35 bABC	408,21 bA
Isolados	NH_3^2 (mmol/L)				
	Casaminoácidos	Trypticase	Peptona de caseína	Peptona de proteose	Peptona de farinha de soja
C89	19,33 cB	37,11 aAB	26,59 bBC	22,24 bcB	19,60 bcBC
R91	23,34 bAB	34,29 aB	35,90 aAB	23,03 bB	23,45 bB
R96	21,67 bAB	42,18 aA	38,49 aA	25,14 bAB	24,62 bB
R107	22,23 cAB	23,52 cC	37,30 aAB	29,95 bA	29,49 bA
C114	22,59 bcAB	37,20 aAB	24,15 bC	23,62 bcB	16,05 cC
C116	26,92 cA	33,21 aB	32,89 abAB	27,15 bcAB	20,94 dBC
C118	23,42 cAB	41,21 aA	31,49 bB	31,25 bA	27,51 bcAB

A média seguida de letras minúsculas na mesma linha compara o mesmo isolado entre as diferentes fontes de substratos. As letras maiúsculas nas colunas comparam cada fonte de substratos entre os isolados. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na linha ou coluna não diferem entre si a nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey. AED¹ = atividade específica de desaminação; NH_3^2 = amônia.

As maiores ($P < 0,05$) médias de AED foram obtidas entre os isolados cultivados em peptona de caseína (Figura 3A). No entanto, as maiores médias de concentrações de amônia foram obtidas para os isolados cultivados em Trypticase e peptona de caseína ($P < 0,05$) (Figura 3B).

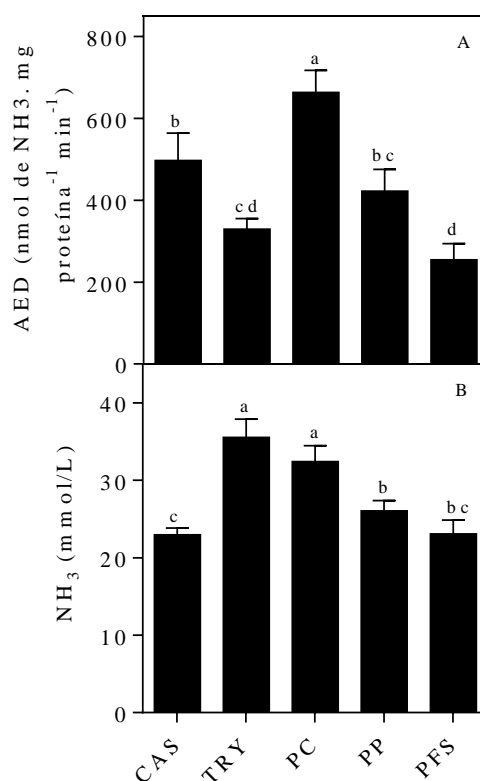


Figura 3. Atividade específica de desaminação (AED) (A) e concentração de amônia (NH₃) (B) dos isolados de HAB cultivados em diferentes fontes de aminoácidos e peptídeos. Casaminoácidos (CAS), Trypticase (TRY), Peptona de caseína (PC), Peptona de proteose (PP), Peptona de farinha de soja (PFS).

Os isolados cultivados em diferentes substratos produziram ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido fórmico e ácido isovalérico como principais produtos de fermentação (Tabela 3). A concentração total dos ácidos orgânicos voláteis produzidos pelos isolados variou de 23,55 a 80,85 mmol/L para Trypticase (Tabela 3).

De forma geral, a maioria dos isolados apresentou alta produção de ácidos orgânicos totais para os seguintes substratos (Trypticase, casaminoácidos e peptona de caseína), com concentrações acima de 50,48 mmol/L, exceto para o isolado R107 onde a concentração total de AOV foi de 23,55 mmol/L para trypticase (Tabela 3). Para os substratos peptona de farinha de soja e peptona de proteose as concentrações dos ácidos orgânicos voláteis totais foram sempre inferiores a 50 mmol/L.

Tabela 3. Produtos da fermentação (mmol/L) dos isolados bacterianos com alta atividade específica de desaminação que foram cultivados em meio mineral anaeróbico suplementado com diferentes fontes de aminoácidos (15 g/L).

Fontes de carbono	Isolado	AOV total (mmol/L)	A						
			A	P	B	IB	F	S	IV
Casaminoácidos	C89	65,46	29,77	15,89	7,55	2,23 B	6,05 B	2,19	2,98 BC
	R91	75,10	34,39	15,10	7,13	1,79 C	9,70 A	2,32	2,94 BC
	R96	65,92	33,40	16,21	8,02	2,78 A	Nd	nd	4,92 A
	R107	67,56	29,47	16,08	8,15	1,42 D	7,79 AB	2,28	2,37 B
	C114	66,06	28,56	14,89	7,26	1,87 BC	8,58 AB	2,37	2,21 C
	C116	77,49	34,17	16,94	7,63	2,28 B	7,23 AB	2,39	3,08 B
	C118	73,51	34,67	15,53	7,57	1,63 CD	9,05 AB	2,25	2,81 BC
Trypticase	C89	80,85 A	39,04 A	9,18 AB	7,71A	4,71 A	7,95 C	nd	8,71 A
	R91	50,48 B	25,12 C	6,28 B	3,79 C	1,80 B	12,54 B	nd	4,82 C
	R96	75,26 A	37,09 AB	7,83 B	6,92 A	4,07 A	12,07 B	nd	6,88 AB
	R107	23,55 C	8,88 D	3,25 C	nd	2,43 B	2,46 D	nd	4,72 C
	C114	67,08 AB	32,51 B	8,36 B	6,46 AB	4,25 A	9,35 C	nd	6,16 BC
	C116	68,08 AB	25,60 C	7,22 B	4,69 BC	2,71 B	15,48 A	nd	4,42 C
	C118	78,39 A	36,62 AB	12,05 A	6,35 AB	4,00 A	15,62 A	nd	7,40 AB
Peptona de Caseína	C89	73,45 A	29,58 AB	8,73	5,24 BC	3,08 B	17,92 A	1,83 A	5,09 BC
	R91	65,31 BC	30,07 AB	8,71	5,34 BC	2,85 B	15,28 B	1,60 B	5,12 BC
	R96	68,42 ABC	9,03 D	8,43	6,68 A	4,57 A	7,24 D	nd	7,85 A
	R107	62,92 C	26,55 AB	8,68	5,60 ABC	3,59 AB	8,73 D	1,74 AB	5,49 B
	C114	62,94 C	24,71 C	8,24	4,79 C	3,25 AB	16,06 AB	1,58 B	4,31 C
	C116	68,23 ABC	29,99 AB	8,66	5,72 ABC	3,67 AB	15,53 AB	1,71 AB	5,30 BC
	C118	69,02 AB	31,46 A	8,36	6,01 AB	3,74 AB	11,89 C	1,74 AB	5,81 B
Peptona de Farinha de soja	C89	37,70 BC	24,34 BC	4,22	2,51 BC	1,07 D	3,67 A	nd	2,09 DE
	R91	48,85 AB	32,77 A	5,23	2,87 AB	1,99 B	3,23 AB	nd	2,76 BCD
	R96	49,95 A	34,92 A	5,52	3,34 A	2,44 AB	Nd	nd	3,92 A
	R107	46,89 ABC	31,32 AB	4,06	2,45 BC	2,84 A	1,99 C	nd	3,01 BC
	C114	36,79 C	21,92 C	4,00	2,20 C	1,27 CD	Nd	nd	1,42 E
	C116	41,66 ABC	27,57 ABC	4,94	2,51 BC	1,91 BC	2,49 C	nd	2,45 CD
	C118	42,21 ABC	27,92 ABC	3,97	2,34 BC	2,40 AB	2,53 BC	nd	3,32 AB
Peptona de proteose	C89	46,76	24,98 AB	4,63 A	3,52	2,26 BC	5,85 BC	1,42 AB	2,46 D
	R91	48,55	27,33 A	5,01 A	3,84	2,30 BC	5,70 BC	1,63 A	2,74 CD
	R96	40,50	20,40 B	4,89 A	3,76	2,98 ABC	2,71 D	nd	3,18 ABC
	R107	39,30	19,61 B	2,56 B	3,44	3,12 AB	4,96 C	1,64 A	3,29 AB
	C114	40,59	23,16 AB	5,36 A	3,50	2,04 C	3,14 D	1,05 B	2,34 D
	C116	47,37	24,60 AB	4,80 A	3,62	2,26 BC	7,29 A	1,46 AB	2,78 BCD
	C118	42,25	21,67 B	2,84 B	3,24	3,38 A	6,56 AB	1,10 B	3,46 A

As letras maiúsculas nas colunas comparam cada fonte de aminoácidos entre os isolados. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si a nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. A = Ácido acético; P = Ácido propiônico; B = Ácido butírico; IB = Ácido isobutírico; F = Ácido fórmico; S = Ácido succínico; IV = Ácido isovalérico; nd = não detectado.

A análise da velocidade específica de crescimento dos isolados bacterianos cultivados em diferentes fontes de carboidratos indicou que todos os isolados foram capazes de fermentar glicose com velocidade específica de crescimento média de $1,402 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 4).

Os isolados C89, C114 e C118 apresentaram as maiores ($P < 0,05$) velocidades específicas de crescimento em glicose. Nenhuma das culturas de HAB avaliadas neste estudo foi capaz de utilizar sacarose ou xilose como fonte de carbono e energia (Tabela 4). Apenas os isolados R107, C114, C116 e C118 utilizaram o dissacarídeo maltose e

somente o isolado C114 cresceu em meio contendo celobiose como fonte de carbono e energia.

Os isolados C114 e C118 foram as culturas mais versáteis em utilizar carboidratos e apresentaram maiores velocidades específicas de crescimento nas fontes de carbono (glicose e maltose) testadas (Tabela 4). Esses resultados indicaram diferenças entre os isolados quanto à capacidade de metabolizar carboidratos, sendo que os isolados agrupados no clado 1 foram mais versáteis do que os isolados agrupados no clado 2 (Figura 1).

Tabela 4. Avaliação da velocidade específica de crescimento (μ , h^{-1}) e densidade óptica D.O._{600nm} das culturas de HAB's cultivadas em meio contendo carboidratos (4 g/L) por 24 horas a 39 °C.

Isolados	μ (h^{-1})				
	Glicose	Maltose	Celobiose	Sacarose	Xilose
C89	1,473 AB	Nd	nd	Nd	nd
R91	1,371 B	Nd	nd	Nd	nd
R96	1,335 B	Nd	nd	Nd	nd
R107	1,226 aB	0,496 bB	nd	Nd	nd
C114	1,637 aA	1,026 bA	1,763 a	Nd	nd
C116	1,258 aB	0,275 bC	nd	Nd	nd
C118	1,517 aAB	0,379 bC	nd	Nd	nd

Isolados	D.O. (_{600nm})				
	Glicose	Maltose	Celobiose	Sacarose	Xilose
C89	1,310 A	-	-	-	-
R91	1,193 AB	-	-	-	-
R96	1,227 AB	-	-	-	-
R107	1,227 aAB	0,249 bB	-	-	-
C114	1,210 aAB	1,078 bA	1,232 a	-	-
C116	1,155 aA	0,150 bB	-	-	-
C118	1,247 aAB	0,228 bB	-	-	-

As médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha comparam o mesmo isolado entre as diferentes fontes de carboidratos. As letras maiúsculas nas colunas comparam cada fonte de carboidratos entre os isolados. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na linha ou coluna não diferem entre si a nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. μ = velocidade específica de crescimento; D.O._{600nm} = densidade óptica; nd = não detectado; - = ausência de crescimento.

Quando os isolados foram cultivados em carboidratos a concentração de ácidos orgânicos voláteis totais variou de 2,58 a 63,94 mmol/L de acordo com os substratos fermentados. Os principais produtos do metabolismo em meio contendo glicose foram, ácido acético, ácido propiônico e ácido láctico. A maioria dos isolados também produziu pequenas concentrações de ácido butírico, ácido isobutírico e ácido isovalérico (Tabela 5). O isolado C114 destacou-se quanto à produção de ácido láctico (36,30 e 37,28 mmol/L) quando cultivado em presença de maltose e celobiose, respectivamente.

Tabela 5. Produtos da fermentação (mmol/L) dos isolados bacterianos com alta atividade específica de desaminação cultivados em meio mineral anaeróbio suplementados com diferentes fontes de carboidratos de 4 g/L.

Fontes de Carbono	Isolado	Total AOV (mmol/L)	A	P	B	IB	F	S	IV	L
			mmol/L							
Glicose	C89	63,37	2,84 AB	2,18 A	0,544	0,174	nd	nd	0,228	56,98
	R91	61,19	2,97 AB	2,20 A	0,689	0,122	nd	nd	0,260	56,58
	R96	62,21	3,31 A	1,91 B	0,648	0,255	nd	nd	0,163	54,97
	R107	63,94	3,00 AB	2,08 AB	0,690	0,123	nd	nd	0,217	56,55
	C114	60,86	2,62 AB	2,22 A	0,487	nd	nd	nd	nd	53,61
	C116	58,85	2,87 AB	2,15 AB	0,706	0,288	nd	nd	nd	51,83
	C118	63,14	2,54 B	2,08 AB	0,532	0,370	nd	nd	0,202	56,11
Maltose	R107	18,75 B	6,50 B	0,370	Nd	2,270A	9,980 A	nd	0,340	0,170
	C114	38,37 A	2,07 C	0,506	0,410	0,240B	nd	nd	0,214	36,30
	C116	11,13 C	6,45 B	0,190	0,540	0,190B	4,68 AB	nd	0,650	nd
	C118	18,20 B	8,00 A	0,250	0,520	1,25A	8,95 A	nd	0,500	nd
Celobiose	C114	46,49	7,82	0,598	0,306	0,278	nd	nd	0,207	37,28

As letras maiúsculas nas colunas comparam cada fonte de aminoácidos entre os isolados. As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na linha ou coluna não diferem entre si a nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. A = Ácido acético; P = Ácido propiônico; B = Ácido butírico; IB = Ácido isobutírico; F = Ácido fórmico; S = Ácido succínico; IV = Ácido isovalérico; L = ácido láctico; nd = não detectado.

2.3.3 Utilização de carboidratos, peptídeos e misturas de substratos pelas bactérias hiperprodutoras de amônia

A cinética de utilização de substratos e geração de produtos da fermentação foi monitorada durante o cultivo das bactérias hiperprodutoras de amônia em meio contendo glicose, Trypticase ou a mistura dos dois substratos. Todos os isolados consumiram glicose (2 g/L) em aproximadamente 6 horas de cultivo e atingiram a fase estacionária após cerca de 4 horas de incubação. A velocidade específica de crescimento (μ) variou de 0,924 h⁻¹ (R107) a 1,199 h⁻¹ (C118). O ácido láctico foi o principal produto de fermentação com concentrações máximas variando de 10,54 mmol/L (R107) a 18,41 mmol/L (C89) (Figura 4). Para todos os isolados, observou-se a redução da D.O._{600nm} máxima após as culturas consumirem toda a glicose do meio, com decréscimo de 30,53 % para o isolado C114 no tempo de 24 horas de cultivo.

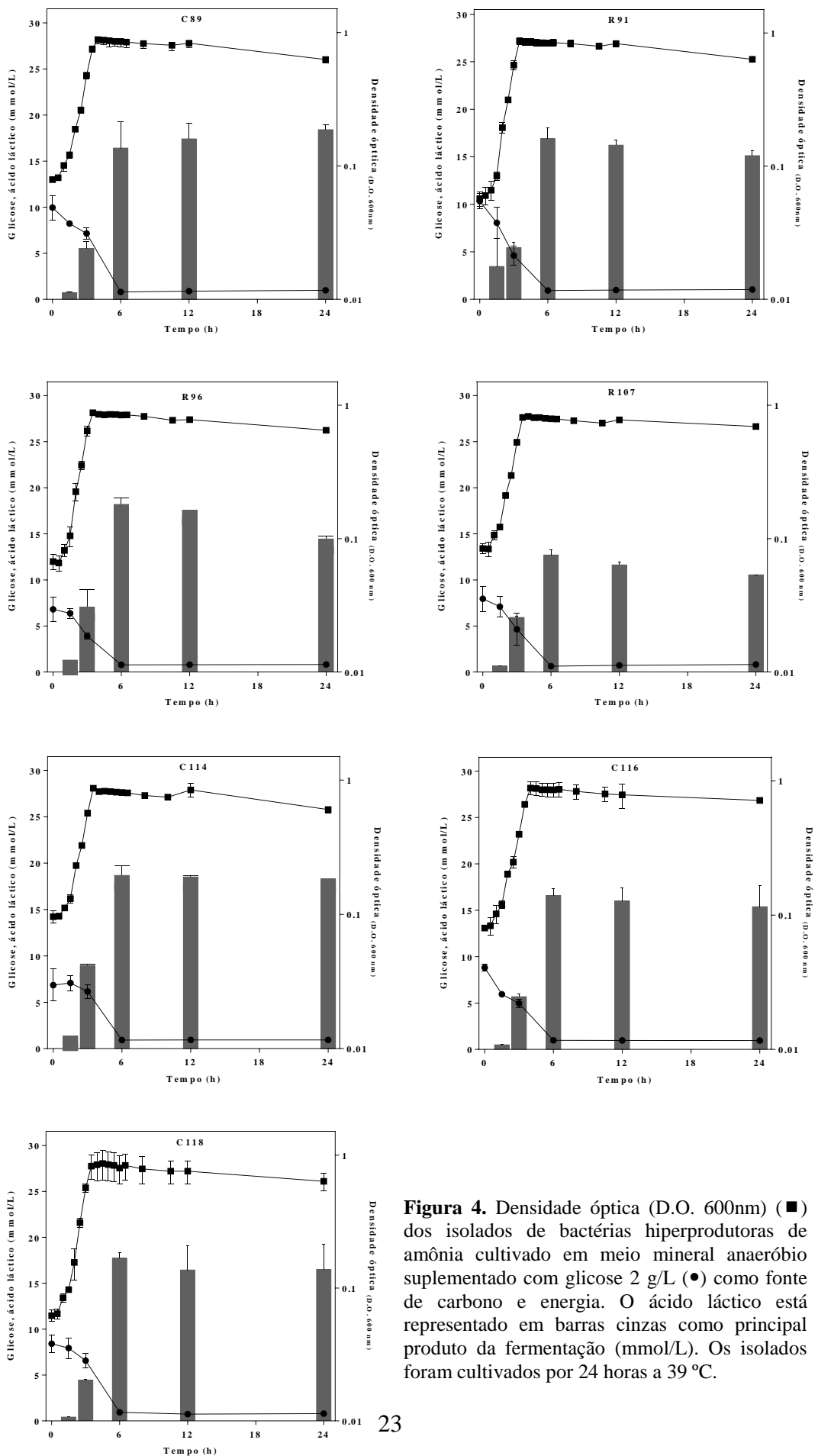


Figura 4. Densidade óptica (D.O. 600nm) (■) dos isolados de bactérias hiperprodutoras de amônia cultivado em meio mineral anaeróbico suplementado com glicose 2 g/L (●) como fonte de carbono e energia. O ácido láctico está representado em barras cinzas como principal produto da fermentação (mmol/L). Os isolados foram cultivados por 24 horas a 39 °C.

Quando as bactérias hiperprodutoras de amônia foram cultivadas em meio contendo Trypticase (3 g/L) como fonte de carbono, observou-se crescimento contínuo por aproximadamente 12 horas até as mesmas atingirem a fase estacionária.

O acúmulo de NH_3 acompanhou o crescimento dos isolados C114, C116 e C118, sendo que a mesma tendência não foi observada para os isolados C89, R91, R96 e R107. Para a maioria dos isolados, observou-se aumento expressivo na concentração de NH_3 no meio de cultivo após 12 ou 24 horas de incubação, o qual esteve dissociado do crescimento bacteriano (Figura 5).

A análise de ácidos orgânicos indicou que a concentração desses produtos do metabolismo microbiano esteve associada com o aumento da densidade óptica dos isolados (Figura 1). O principal produto do metabolismo foi o ácido acético, seguido por ácido propiônico e butírico (Figura 5). Outros produtos da fermentação (ácido isobutírico e ácido isovalérico) dos isolados de HAB também foram observados, porém, apresentando concentrações menores que 1 mmol/L (dados não apresentados).

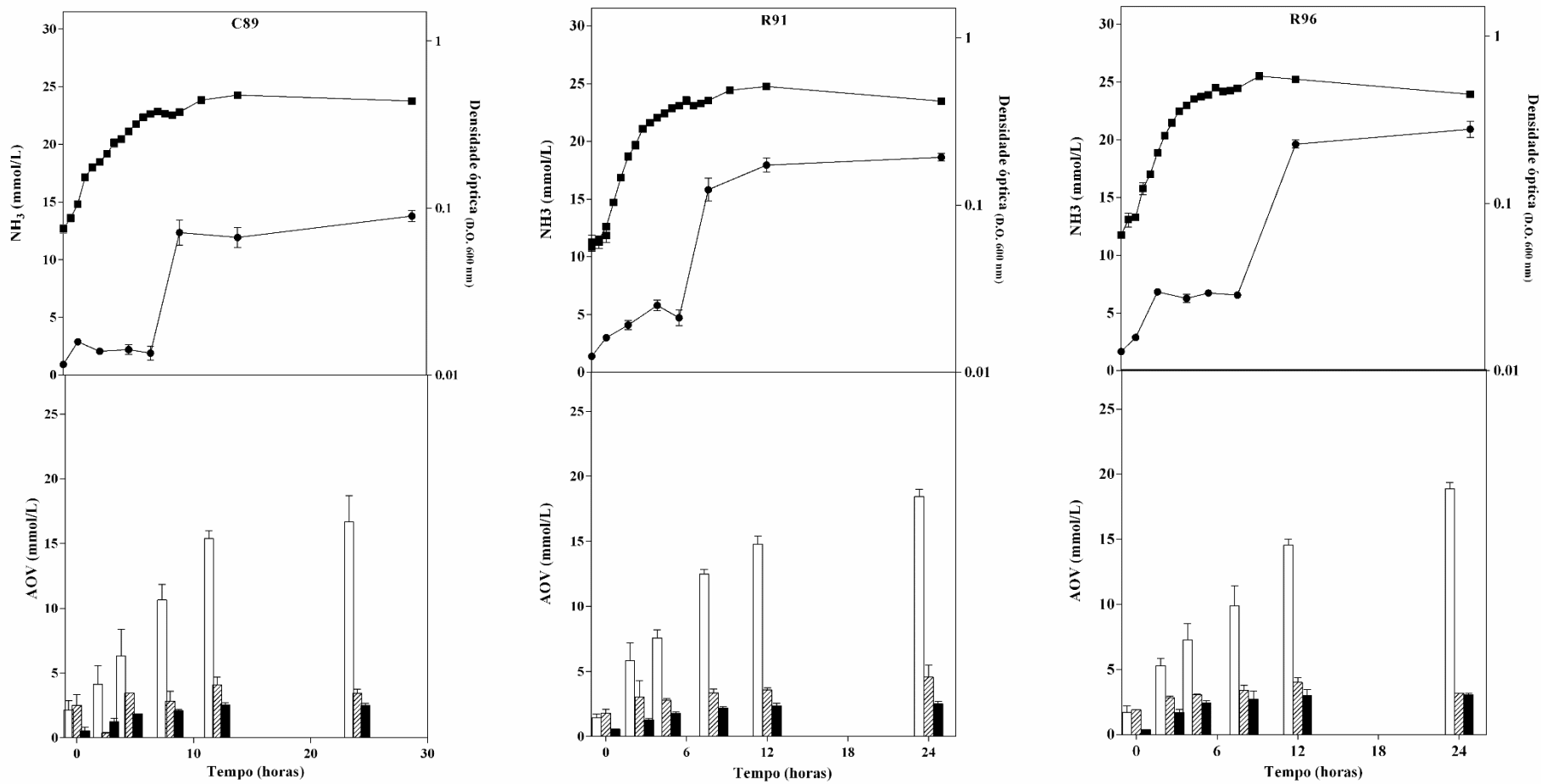


Figura 5. Continuação

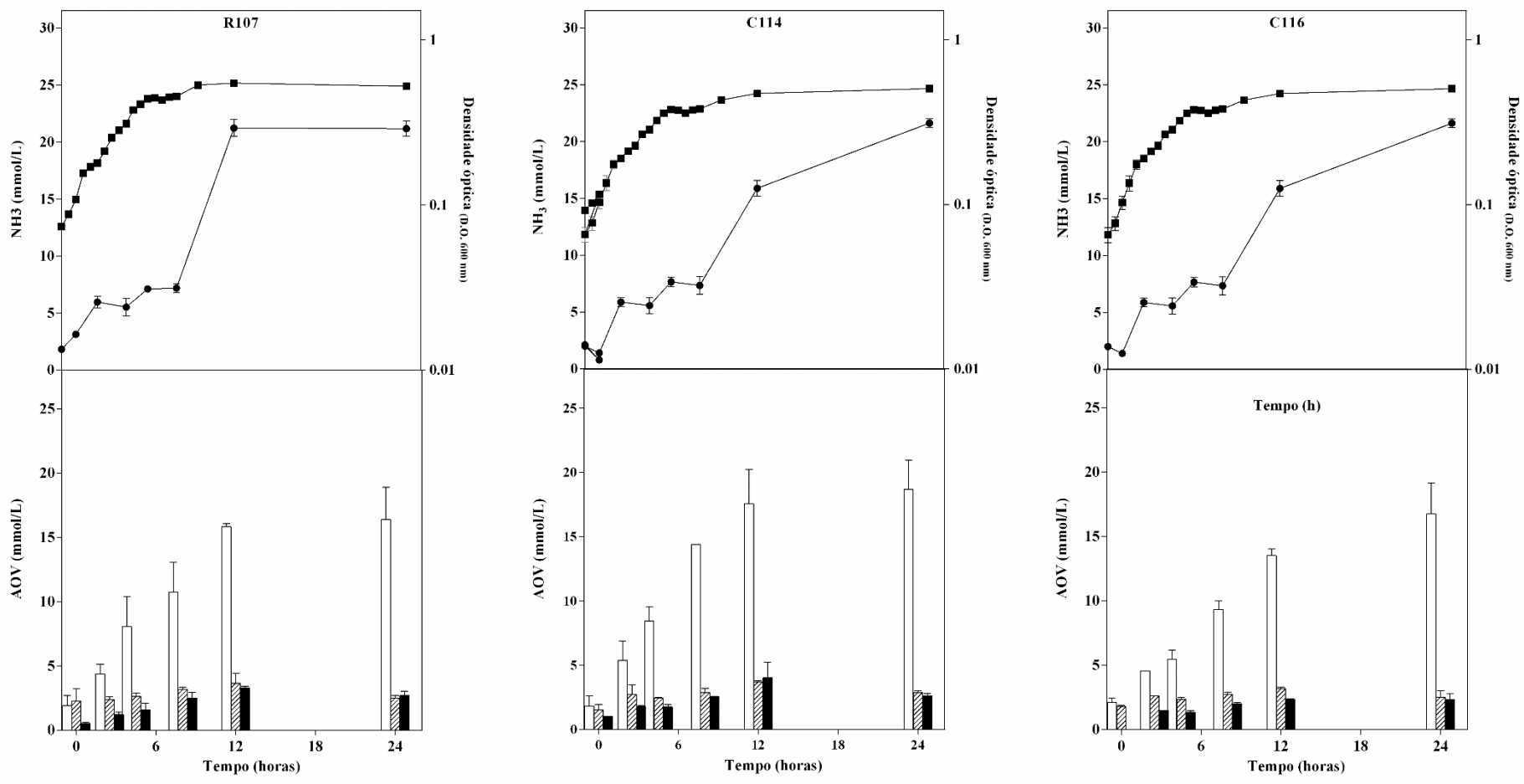


Figura 5. Continuação

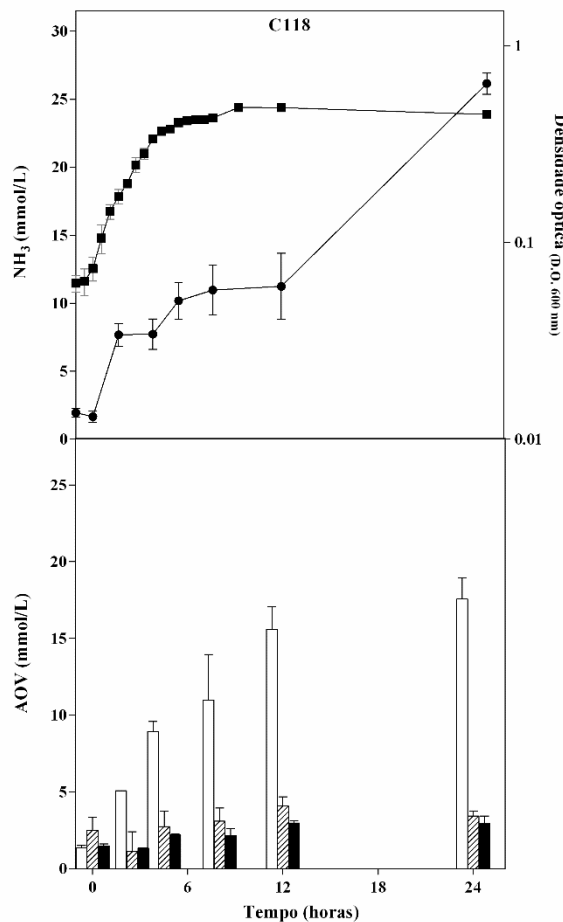


Figura 5. Densidade óptica (■), concentração de amônia (mM) (●) e produtos de fermentação (mmol/L) dos isolados de bactérias hiperprodutoras de amônia estão representados por diferentes barras (branca - ácido acético), (hachurada - ácido propiônico), (preta - ácido butírico). O meio foi suplementado com Trypticase 3 g/L como fonte de carbono e energia. Os isolados foram cultivados por 24 horas a 39 °C.

Quando os isolados bacterianos foram cultivados no meio com a mistura dos substratos (glicose e Trypticase), todos os isolados apresentaram uma D.O._{600nm} máxima próximas de 1,0 atingindo a fase estacionária em aproximadamente três horas. Foi observado o consumo da glicose após seis horas de incubação para todos os isolados (Figura 6).

Para todos os isolados de HAB cultivados em meio contendo a mistura de carboidrato e fonte de aminoácidos, foi observado uma baixa concentração de amônia no meio até o consumo total da glicose. Após doze horas de incubação dos isolados ocorreu aumento da concentração de amônia, sendo esta de 25 a 30 mmol/L para os seguintes isolados R91, R96, C114, C116 e C118. Os isolados C89 e R107 foram os que apresentaram menores concentrações de amônia após 24 horas de incubação, com valores próximos de 10 mmol/L (Figura 6).

O consumo de glicose esteve associado com a produção de ácido láctico e a concentração máxima variou entre 15 a 20 mmol/L para os isolados (C89, R91, R96, C114 e C116) (Figura 6). Os isolados (R107 e C118) apresentaram concentrações menores que 15 mmol/L, apesar de terem atingido valores de DO máximas similar aos demais isolados avaliados neste estudo. Outros produtos da fermentação (ácido butírico, ácido isobutírico e ácido isovalérico) também foram observados em baixas concentrações nas incubações realizadas (dados não mostrados).

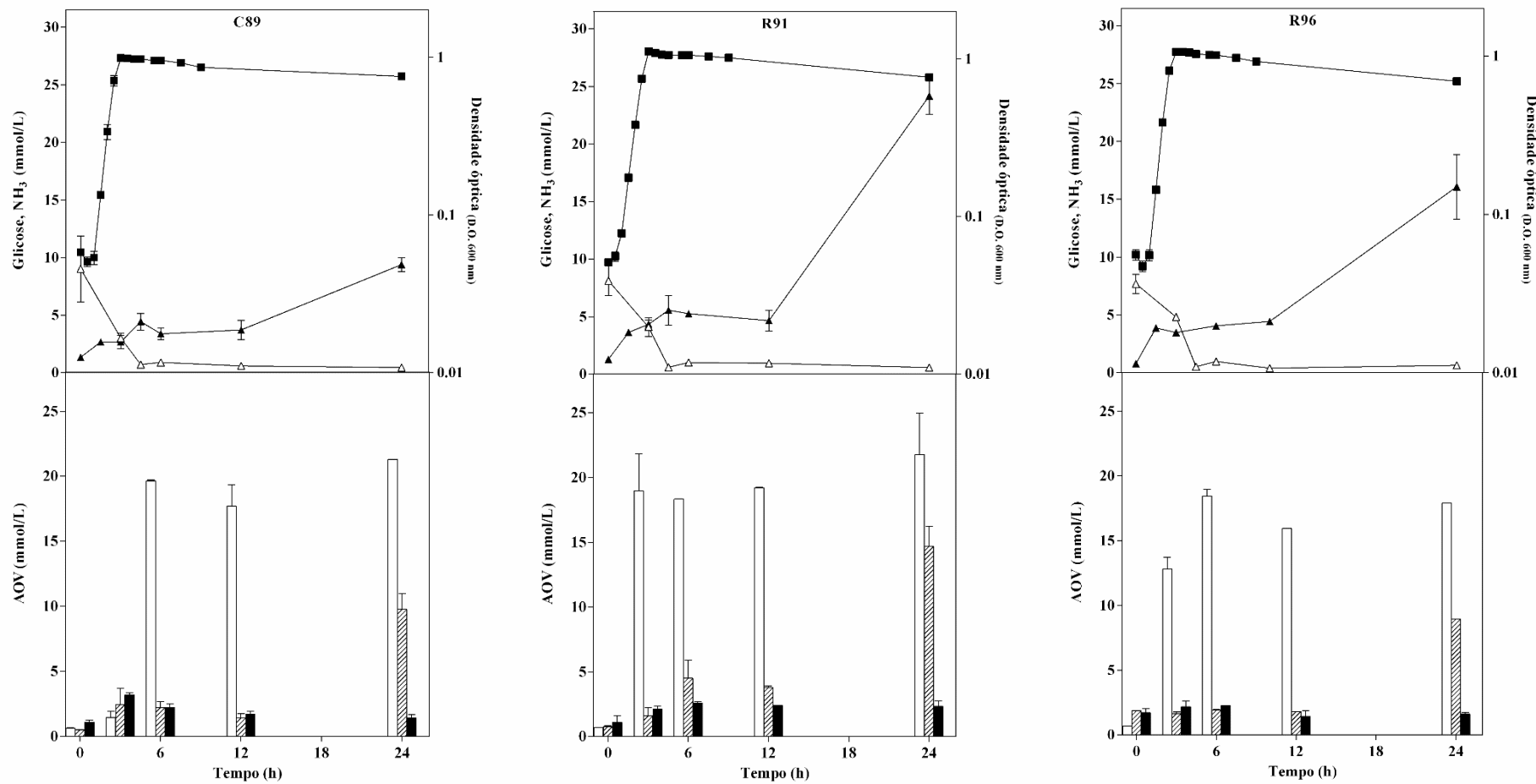


Figura 6. Continuação

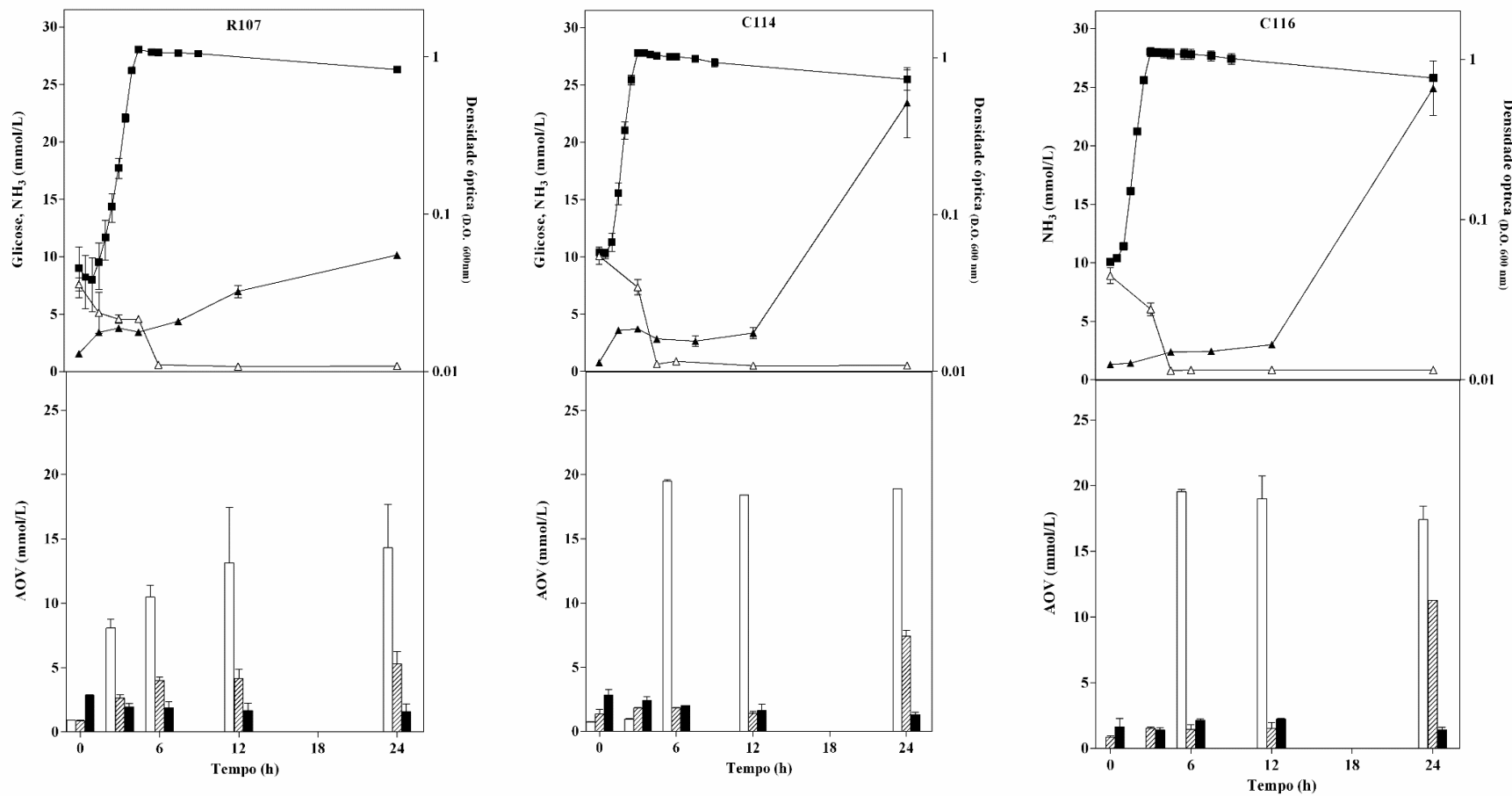


Figura 6. Continuação

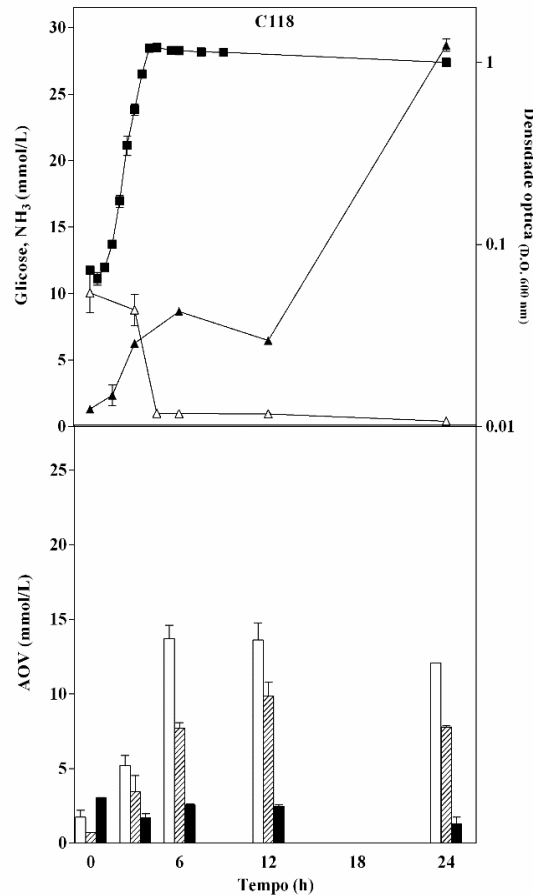


Figura 6. Densidade óptica (■), concentração de amônia (mmol/L) (▲), consumo da glicose (D), produtos de fermentação (mmol/L), (barras branca - ácido láctico) (barras hachurada - ácido acético), (barras preta - ácido propiônico) dos isolados de bactérias hiperprodutoras de amônia em meio mineral anaeróbico suplementado com Trypticase 3 g/L e glicose 2g/L como fonte de carbono e energia. Os isolados foram cultivados por 24 horas a 39 °C.

2.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, bactérias hiperprodutoras de amônia isoladas do rúmen de novilhas Nelore foram cultivadas em diferentes fontes de substratos (aminoácidos, peptídeos e/ou carboidratos) para investigar a capacidade das mesmas em metabolizar esses substratos e avaliar a influência das fontes de carbono e energia sobre a atividade de desaminação dessas bactérias. No rúmen, existem diferentes espécies de bactérias proteolíticas, além de populações de bactérias especializadas na fermentação de aminoácidos e na produção de amônia. Esses microrganismos podem influenciar a atividade de desaminação e a utilização de proteína dietética no rúmen (Attwood et al., 1998; Bach et al., 2005).

Bento et al (2015), isolaram bactérias com alta atividade específica de desaminação que foram capazes de fermentar carboidratos. Análises do gene que

codifica o rRNA 16S de diversas bactérias ruminais hiperprodutoras de amônia indicaram que os isolados utilizados no presente estudo estão filogeneticamente relacionados com as espécies *Clostridium bifermentans* e *Clostridium sordellii* (Figura 1).

O gênero *Clostridium* consiste de um grupo de bactérias Gram-positivas, anaeróbias amplamente distribuídas no ambiente, formadoras de esporos e pertencentes ao filo Firmicutes (Collins et al., 1994). Este gênero possui vias e enzimas com atividades exclusivas envolvidas na degradação de aminoácidos (ex. aminomutases dependentes de B12 e oxirredutases contendo selênio) (Stadtman, 2002; Kim et al., 2004). Uma característica metabólica marcante do *Clostridium* é a fermentação de aminoácidos por meio da reação de Stickland (Stickland, 1934). Essa reação caracteriza-se pela oxidação de um aminoácido acoplado à redução de outro aminoácido. Neste processo, a energia é conservada pela formação de ATP por meio da fosforilação em nível do substrato (Stadtman, 2002; Andreesen, 2004).

As espécies *C. bifermentans* e *C. sordellii* se assemelham em suas características morfológicas e fisiológicas, mas são geneticamente diferentes (Nakamura et al., 1975). *C. bifermentans* foi descrita como não patogênica, porém, algumas estirpes de *C. bifermentans* são consideradas como patogênicas (Wong et al., 2014), assim como a maioria das estirpes de *C. sordellii* (Aldape et al., 2006). Além disso, muitas estirpes de *C. bifermentans* são utilizadas para produção de biomoléculas de importância industrial (Myszka et al., 2012; Leja et al., 2013), incluindo ácido acético, butírico e fórmico (Wu e Yang, 2003), etanol, butanol, acetona (Khanal et al., 2004), dióxido de carbono, hidrogênio e nitrogênio (Levin et al., 2006).

Em geral, os isolados de HAB utilizados neste trabalho foram capazes de metabolizar substratos nitrogenados, sendo a Trypticase o principal substrato utilizado pelos isolados de HAB. A Trypticase é composta de peptídeos que são obtidos a partir da digestão enzimática da caseína. A maioria dos peptídeos originados a partir da Trypticase são facilmente utilizados pelas bactérias ruminais (Mangan, 1972). Outras espécies de bactérias isoladas do rúmen como, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* e *Clostridium aminophilum* (Paster et al., 1993) também são capazes de metabolizar aTrypticase como única fonte de energia. Apesar de estarem presentes em baixa população no rúmen, as HAB apresentava atividade específica de desaminação suficiente para contribuir significativamente para a produção de NH₃ nesse ecossistema.

A atividade específica de desaminação dos isolados de HAB utilizados neste trabalho nem sempre foi relacionada com a maior concentração de amônia nos substratos utilizados (Tabela 2), sugerindo que esses isolados bacterianos diferem em sua capacidade de tolerar o acúmulo de amônia (Bento *et al.*, 2015). Adicionalmente, os isolados podem diferir quanto à afinidade e especificidade de aminoácidos/peptídeos utilizados como fonte de carbono e energia. Os substratos como Trypticase e casaminoácidos são constituídos predominantemente por peptídeos e aminoácidos livres, respectivamente, enquanto os demais substratos podem possuir outras moléculas potencialmente metabolizáveis em sua composição (por ex. carboidratos, nucleotídeos).

Os substratos nitrogenados (casaminoácidos, Trypticase, peptona de caseína, peptona de proteose e peptona de farinha de soja) utilizados neste trabalho são misturas compostas de peptídeos e/ou aminoácidos resultantes da digestão pancreática, hidrólise ácida ou digestão enzimática de proteínas. O substrato peptona de farinha de soja possui em sua composição misturas de aminoácidos e carboidratos, o que pode resultar em menor atividade específica de desaminação e produção de amônia por alguns isolados de HAB (Tabela 2).

No trabalho realizado por Bento *et al.*, (2015), foi observado entre os isolados de HAB a produção de vários ácidos orgânicos a partir da fermentação de Trypticase, com predominância de ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido isovalérico e ácido fórmico. Neste estudo, os isolados de HAB cultivados em diferentes fontes de nitrogênio apresentaram produção de todos esses ácidos orgânicos (Tabela 3). A produção dos ácidos orgânicos pelos isolados variou dependendo do substrato nitrogenado testado. Muitos ácidos orgânicos são produzidos a partir da desaminação e oxidação de aminoácidos (Russell, 2002). Os isolados de HAB que foram cultivados em aminoácidos apresentaram maior produção de propionato e butirato comparado aos demais substratos analisados.

No trabalho realizado por Attwood *et al.* (1998), observou-se que os isolados de HAB obtidos a partir do rúmen de novilhas, ovelhas e cervos, foram capazes de fermentar diferentes carboidratos, incluindo glicose, frutose, celobiose, xilose, maltose e trealose, mas as taxas de desaminação desses isolados não foram determinadas. No presente estudo, todos os isolados de HAB foram capazes de metabolizar glicose como fonte de carbono apresentando alta atividade específica de desaminação e produção de biomassa (Tabela 4).

As características fisiológicas desses isolados bacterianos contestam a ideia de que a maioria das HAB são fermentadoras obrigatórias de aminoácidos. Essa característica pode conferir a esses isolados vantagens competitivas para a exploração de nichos ecológicos em ecossistemas complexos como o ambiente ruminal (Bento et al., 2015). No entanto, quando os isolados foram cultivados em carboidratos (mono e dissacarídeos) diferentes da glicose, o crescimento foi limitado ou ausente. A única exceção foi o isolado C114 que cresceu com alta velocidade específica de crescimento e produção de biomassa em meio contendo maltose e celobiose (Tabela 4). Assim, este isolado apresentou um padrão de crescimento diferenciado dos outros isolados analisados.

Os principais produtos do metabolismo desses isolados cultivados em meio contendo os carboidratos foram ácido acético, ácido propiônico e ácido láctico (Tabela 5). Essa preferência quase exclusiva dos isolados de HAB pelo uso da glicose pode representar uma limitação para o crescimento no ecossistema ruminal. Estudos adicionais deverão ser realizados para comparar a afinidade pelo substrato dessas bactérias em relação a outras espécies de bactérias do ecossistema ruminal.

As bactérias presentes no rúmen são expostas a várias fontes de carbono e energia, mas os organismos podem exibir preferência por determinados substratos ou diferir em sua afinidade (Russell e Baldwin, 1978). Quando os isolados de HAB foram cultivados em meio contendo dois substratos (glicose e Trypticase), observou-se variação na concentração final dos produtos da fermentação. O ácido láctico foi o principal produto das culturas de HAB cultivados em meio contendo carboidratos (Figura 6). Considerando que a disponibilidade de carboidratos livres no rúmen é baixa, as HAB deveriam exibir alta afinidade por esses substratos para que possam competir com as espécies mais abundantes de bactérias no ecossistema ruminal. Isso sugere que a adaptação para utilização eficiente de aminoácidos pode ser uma estratégia evolutiva interessante para esse grupo microbiano no ambiente ruminal.

2.5 CONCLUSÕES

As HAB isoladas do rúmen de novilhas foram capazes de metabolizar todos os substratos nitrogenados com alta atividade específica de desaminação e produção de amônia. As estirpes de HABs avaliadas variaram na sua capacidade de metabolizar mono e dissacarídeos. A maior velocidade de crescimento e utilização preferência de

glicose em meio contendo mistura de substratos sugere que a atividade de desaminação de HABs seja regulada por repressão catabólica.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreesen, J.R. Glycine reductase mechanism. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.8, p. 454-461, 2004.

Attwood, G.T.; Klieve, A.V.; Ouwerkerk, D.; Patel, B.K. Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.5, p.1796-1804, 1998.

Bach, A.; Calsamiglia, S.; Stern, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. E9–E21, 2005.

Bento, C.B.P.; Azevedo, A.C.; Detmann, E.; Mantovani, H.C Biochemical and genetic diversity of carbohydrate-fermenting and obligate amino acid-fermenting hyper-ammonia-producing bacteria from Nellore steers fed tropical forages and supplemented with casein. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 28, 2015.

Bergman, E. N. Energy contributions of volatile fatty acid from the gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review**, v. 70, p. 567–590, 1990.

Bradford, M. Photometric methods for protein determination. Procedures and materials. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

Chaney, A. L e Marbach, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v.8, p.130–132, 1962.

Chanthakhoun, V.; Wanapat, M.; Berg, J. Level of crude protein in concentrate supplements in fluenced rumen characteristics, microbial protein synthesis and digestibility in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Livestock Science**, v. 144, n. 3, p. 197–204, 2012.

Chen, G e Russell, J. B. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1052–1057, 1989.

Chen, G.; Russell, J. B. Sodium-dependent transport of branched-chain amino acids by a monensin-sensitive ruminal *Peptostreptococcus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2658–2663, 1989.

Collins, M.D.; Lawson, P.A.; Willems, A.; Cordoba, J.J.; Fernandez-Garayzabal, J.; Garcia, P.; Cai, J.; Hippe, H.; Farrow, J.A. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.812 - 826, 1994.

Fonknechten, N.; Chaussonnerie, S.; Tricot, S.; Lajus, A.; Andreesen, J.R.; Perchat, N.; Pelletier, E.; Gouyvenoux, M.; Barbe, V.; Salanoubat, M.; Le Paslier, D.; Weissenbach, J.; Cohen, G.N.; Kreimeyer, A. *Clostridium sticklandii*, a specialist in

amino acid degradation: revisiting its metabolism through its genome sequence. **BMC Genomics**, v. 11, p.1-10, 2010.

Kim, J.; Hetzel, M.; Boiangiu, C.D.; Buckel, W. Dehydration of (R)-2-hydroxyacyl-CoA to enoyl-CoA in the fermentation of alpha-amino acids by anaerobic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 455-468, 2004.

Krause, D. O; Russell, J. B. An rRNA Approach for Assessing the Role of Obligate Amino Acid-Fermenting Bacteria in Ruminant Amino Acid Deamination, **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, p. 815 - 821, 1996.

Mangan, J.L. Quantitative studies on nitrogen metabolism in the bovine rumen. **British Journal of Nutrition**, v. 27, p. 261-283, 1972.

Nagaraja, T.G.; Newbold, C.J.; Van Soest, P.J e Demeyer, D.I. **Manipulation of ruminal fermentation**, p. 523–632. In Hobson, P.M. and C. W. Stewart (ed.), The rumen microbial ecosystem, 2nd ed. Blackie Academic and Professional, London, England. 1997.

Nakamura, S.T.; Shimamura, H.; Hayashi, and S. Nishida. Reinvestigation of the taxonomy of *Clostridium bifermentans* and *Clostridium sordellii*. **Journal of Medical Microbiology**, v.8, p. 299-309, 1975.

Paster, B. J.; Russell, J. B; Yang, C. M. J.; Chow, J. M.; Woese, C. R.; Tanner, R. Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* and *Clostridium aminophilum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p. 107-110, 1993.

Russel, J.B e Baldwin, R.L. Substrate preferences in rumen bacteria: Evidence of catabolite regulatory mechanisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 36, p. 319-329, 1979.

Russell, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, NY: Cornell University; 2002.

Ryan, K.J.; Ray, C.G. **Sherris Medical Microbiology**, McGraw Hill, 2004.

Siegfried, B.R; Ruckemann, H; Stumpf, G. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtschaft Forsch**, v.37, p.298, 1984.

Stadtman, T.C Discoveries of vitamin B12 and selenium enzymes. **Annual Review Biochemistry**, v.71, p.1-16, 2002.

Stickland, L.H. Studies in the metabolism of the strict anaerobes (genus *Clostridium*): The chemical reactions by which *Clostridium sporogenes* obtains its energy. **Biochemical Journal**, v.28, p.1746-1759, 1934.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, n. 24, p. 1596-1599, 2007.

Thompson, J.D; Higgins, D.G. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 11, p. 4673-4680, 1994.

Wallace, R. J; Onodera, R; Cotta, M. A. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: **The rumen microbial ecosystem**, Springer, p. 283–328, 1997.

CAPÍTULO 3

Avaliação dos efeitos da suplementação proteica e energética sobre os parâmetros ruminais e colonização bacteriana do farelo de soja *in situ* em novilhas Nelore

3.1 INTRODUÇÃO

A disponibilidade de alimentos para os ruminantes nos trópicos varia de acordo com a sazonalidade, com período seco e chuvoso distintos (Figueiras et al., 2010; Costa et al., 2011). A suplementação proteica é a principal estratégia para reduzir as limitações dos compostos nitrogenados em pastagens tropicais, sendo uma prática comum na produção de carne e leite em países de clima tropical (Lazzarini et al., 2009; Bento et al., 2015). O problema dietético do período seco (baixo teor de proteína bruta na forragem) e o metabólico durante o período das águas (proteína bruta com alta solubilidade), enfatiza a importância dos compostos nitrogenados na dieta de bovinos nos trópicos. Assim, os esquemas de suplementação utilizados durante a época da seca e das águas visam o estabelecimento do equilíbrio dietético, com a elevação da concentração de proteína na dieta para que os substratos energéticos das forragens possam ser adequadamente transformados em produtos de origem animal (Detmann et al., 2014a).

A suplementação com compostos energéticos como o amido amplia a disponibilidade de energia metabolizável, otimizando as reações anabólicas e aumentando a eficiência do uso da proteína metabolizável (Schroeder e Titgemeyer, 2008; Detmann et al., 2014b). A suplementação proteica diminui as perdas excessivas de nitrogênio para o ambiente (Reynal e Broderick, 2005), além de aumentar a síntese de proteína microbiana em função do maior aporte de amônia do rúmen (Russell et al., 1992; Bach et al., 2005). Com isso, as formulações de dietas para os novilhas possibilitam balancear a quantidade de carboidratos e proteínas consumidas pelo animal, visando maximizar o crescimento microbiano no rúmen (Bento et al., 2015).

Em condições tropicais, a suplementação com compostos nitrogenados constitui a meta prioritária para ampliar a utilização da forragem tropical de baixa qualidade

(Detmann et al., 2010; Souza et al., 2010). A suplementação em bovinos em condições tropicais permite inserir fontes de nutrientes adicionais, refletindo em mudanças no consumo de forragem, na disponibilidade de energia dietética e, conseqüentemente, no desempenho animal (Paulino et al., 2010). Em condições tropicais a associação entre os suplementos energéticos e nitrogenados podem implicar efeito interativo sobre o metabolismo dos compostos nitrogenados reduzindo os efeitos deletérios da suplementação apenas energética sobre a degradação ruminal da fibra, ampliando a produção de compostos nitrogenados microbianos no rúmen e elevando o nível dietético de nutrientes digestíveis totais, possivelmente por reduzir os efeitos da competição entre espécies fibrolíticas e não fibrolíticas (Detmann et al., 2010; Lazzarini, 2011).

A suplementação infrequente tem como principal objetivo a otimização do uso de mão de obra e conseqüente redução dos custos associados à distribuição dos suplementos e o manejo dos animais. Esta consiste essencialmente no fornecimento da mesma massa de suplementos ofertados aos animais suplementados diariamente; contudo, o suplemento seria ofertado de forma acumulada em dias alternados, sendo essa alternância variável em função da estratégia de manejo definida para o sistema de produção (Rufino et al., 2016).

Estudos realizados em condições tropicais demonstraram que os suplementos de proteína para ruminantes podem afetar diretamente a eficiência da conversão de proteína metabolizável em proteína líquida (Costa et al., 2011; Lazzarini et al., 2013). No entanto, há pouca informação nos trópicos sobre como a frequência do fornecimento de nitrogênio e energia no rúmen afeta a eficiência da utilização de nitrogênio em novilhas. Nesse sentido, é necessário investigar o efeito da suplementação de fontes proteicas como o farelo de soja no metabolismo animal e avaliar a eficiência de uso de nitrogênio em novilhas alimentadas com forragens tropicais.

Nesse cenário, é importante caracterizar os grupos bacterianos envolvidos na colonização e degradação das partículas de alimentos que chegam ao ecossistema ruminal. Tendo em vista a lacuna no conhecimento sobre o processo de colonização ruminal de suplementos proteicos (a exemplo do farelo de soja), neste trabalho objetivou-se avaliar os parâmetros ruminais, a degradação *in situ* da matéria seca e a sucessão da colonização bacteriana no farelo de soja incubado no rúmen de novilhas Nelore suplementadas com diferentes níveis de proteína e energia.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia e no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia ambos pertencentes a Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

3.2.1 Animais, dietas e tratamentos

Foram utilizadas cinco novilhas Nelore, com peso corporal (PC) médio inicial de $280 \pm 7,5$ kg, fistuladas no rúmen. As novilhas foram mantidas em baias individuais cobertas, com piso de concreto, dispostas com comedouro e acesso irrestrito a água e mistura mineral. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEAUP-UFV; protocolo 03/2016).

A alimentação volumosa basal foi constituída por feno de Tifton 85 (*Cynodon* sp) com teor médio de PB de 80,2 g/kg de matéria seca, o qual foi fornecido diariamente *ad libitum*, às 6h00 e 18h00, permitindo-se sobras de aproximadamente 100 g/kg de forragem fornecida.

O experimento foi conduzido segundo o delineamento em quadrado latino 5×5 , com cinco tratamentos, cinco novilhas e cinco períodos experimentais, sendo cada período com 28 dias de duração. Os períodos experimentais foram divididos em 14 dias para adaptação das novilhas à dieta, condições de manejo e instalações e 14 dias para as demais coletas.

Foram avaliados os seguintes tratamentos: controle, sem suplementação (somente forragem); suplementação diária com 200 g de proteína bruta (PB); suplementação diária com 200 g de PB e 400 g de amido; suplementação infrequente (a cada 3 dias) com 600 g de PB; e suplementação infrequente (a cada 3 dias) com 600 g de PB e 1200 g de amido.

As amostras de feno, farelo de soja, amido e ureia foram secas a 55 °C, processadas em peneiras de porosidade 1 mm e avaliadas quanto aos teores de matéria seca (MS) pelo método INCT-CA G-003/1 e matéria orgânica (MO) pelo método INCTA-CA M-001/1 (Tabela 1). As amostras de feno, farelo de soja e ureia foram avaliadas quanto ao teor de proteína bruta (PB) pelo método INCT-CA N-001/1 (Tabela 1). As amostras de feno e farelo de soja foram avaliadas quanto ao teor de

fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) pelo método INCT-CA F-002/1 (Tabela 1), segundo técnicas descritas por Detmann et al (2012).

Tabela 1. Teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN) dos alimentos fornecidos ao animal e incubados.

Alimento	MS	MO	PB	FDN
	g/kg	g/kg MS		
Feno	887,5	936,5	80,2	813,0
Farelo de Soja	881,6	817,0	525,2	131,7
Amido	861,7	100,0	-	-
Ureia	981,7	100,0	268,7	-

3.2.2 Avaliação dos parâmetros ruminais

As amostras do conteúdo ruminal foram coletadas de novilhas fistuladas na interface líquido:sólido após duas horas da alimentação da manhã. A coleta foi realizada após o período de adaptação (14 dias) nos dias 21° e 23° de cada período experimental. O conteúdo ruminal foi filtrado em quatro camadas de gaze e submetido à avaliação do pH por intermédio de potenciômetro digital (Tecnal, São Paulo, Brasil). Alíquotas de 10 mL foram coletadas e armazenadas a -20 °C para análises posteriores das concentrações de amônia, proteína microbiana e ácidos orgânicos voláteis.

3.2.3 Efeito de bactérias hiperprodutoras de amônia (HAB) sobre a atividade específica de desaminação e produção de amônia *in vitro*

Os isolados hiperprodutores de amônia (C114 e C118) utilizados no presente trabalho foram previamente selecionados de acordo com sua alta atividade específica de desaminação e produção de amônia. Os isolados foram cultivados em meio mineral anaeróbio limitante em nitrogênio contendo (por litro); 292 mg K₂HPO₄; 240 mg KH₂PO₄; 480 mg Na₂SO₄; 480 mg NaCl; 100 mg MgSO₄.7H₂O; 64 mg CaCl₂.2 H₂O; 4000 mg Na₂CO₃; 600 mg hidrocloreto de cisteína, adicionado de vitaminas e minerais (Chen e Russell, 1989). O meio mineral foi suplementado com 15 g/L de Trypticase e o crescimento dos isolados foi de 12 horas de incubação a 39 °C. Para o ajuste da densidade óptica, os isolados foram ressuspensos em solução de cloreto de sódio 0,85% para obter turbidez correspondente a 1,0 da escala de McFarland. Posteriormente, três mililitros de cada cultura (C144 e C118) foram inoculados em garrafas (50 mL) contendo 27 mL do líquido ruminal de cada tratamento dos animais

contendo os alimentos farelo de soja (30 mg) e feno Tifton (270 mg). A densidade populacional inicial estimada dos isolados bacterianos no líquido ruminal foi de 10^7 UFC/mL. Também foi realizada a incubação do líquido ruminal sem adição de bactérias (controle) para comparação com os tratamentos.

As incubações foram realizadas em duplicata para cada tratamento e os frascos foram mantidos sob agitação a 150 rpm em condições de anaerobiose à temperatura de 39 °C por 24 horas. Amostras foram coletadas nos tempos 0, 6 e 24 horas de incubação para análise da concentração de amônia, proteína microbiana e cálculo da atividade específica de desaminação.

Para quantificação da viabilidade dos isolados C114 e C118 adicionadas ao líquido ruminal foi realizada a diluição seriada *in vitro*. Após a adição dos isolados bacterianos no líquido ruminal foram coletadas amostras de 0,5 mL em tubos Hungate livre de O₂ nos tempos de 0 e 24 horas de incubação. Para a enumeração dos isolados foram realizadas diluições de 10^{-1} a 10^{-12} em meio mineral anaeróbio (volume inicial 180 µL) utilizando placas de 96 poços de poliestireno. Foram adicionados 20 µL das amostras dos três tratamentos: líquido ruminal sem adição de bactérias (controle) e líquido ruminal com adição dos isolados C114 e C118. A incubação foi realizada a 39 °C por 24 horas em condições de anaerobiose e o crescimento foi avaliado pelo monitoramento da turbidez do meio. A confirmação do crescimento bacteriano foi avaliada adicionando-se 30 µL de resazurina 0,01% (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) em cada poço ao final da incubação. A redução do corante, foi avaliada conforme previamente descrito por Palomino *et al.*, (2002).

3.2.4 Análise de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras (1,0 mL) foram coletadas e centrifugadas ($12000 \times g$, 10 min) para remoção das células e o sobrenadante livre de células foi tratado conforme descrito por Siegfried et al (1984). As amostras foram analisadas utilizando cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Dual acoplado a um detector de índice de refração (RI) Shodex RI-101 mantido a 45 °C, e coluna Phenomenex Rezex ROA, $300 \times 7,8$ mm mantida a 45 °C. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mmol/L. A curva padrão foi feita utilizando ácido succínico, ácido fórmico, ácido propiônico, ácido valérico, ácido isovalérico, ácido isobutírico, ácido butírico (concentrações de

0,625 a 10 mmol/L), ácido isovalérico (concentrações de 0,312 a 5 mmol/L) e ácido acético (1,25 a 20 mmol/L).

3.2.5 Análise da concentração de amônia, proteína microbiana e atividade específica de desaminação (AED)

A concentração de amônia nas amostras foi avaliada pelo método colorimétrico de Chaney e Marbach (1962). A absorvância foi medida a 630 nm em espectrofotômetro Spectronic 20D (Thermo Fischer Scientific, Madison, WI, USA) utilizando o cloreto de amônio (NH₄Cl nas concentrações de 20,38 a 203,83 mg/L) como padrão. A concentração de proteína microbiana foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando lisozima (concentrações de 1,25 a 25 µg) como padrão. A atividade específica de desaminação (AED) foi calculada pela diferença da concentração de amônia (mmol/L) entre os tempos zero e seis horas de incubação, dividido pela concentração de proteína microbiana (mg/L) e pelo tempo de incubação (minutos).

3.2.6 Degradabilidade do farelo de soja *in situ*

Os sacos para incubação do farelo de soja no rúmen das novilhas fistuladas foram confeccionados com tecido de náilon (Sefar Nitex; Sefar, Suíça) com porosidade de 50 µm com as dimensões de 5 × 5 cm. Em cada saco foram adicionados aproximadamente 0,5 g de amostra seca ao ar e processada em peneira de porosidade 2 mm (NRC, 2001).

A cada período, por três dias consecutivos 21º, 22º e 23º dia, os sacos foram simultaneamente colocados em duplicatas no rúmen de todos os animais após o fornecimento da primeira suplementação (às 6h00 da manhã), e foram removidos nos tempos de 0,5; 2; 6; 12 e 24 horas de incubação.

Após a retirada do rúmen, todos os sacos foram lavados em água corrente até total clareamento. Os sacos foram então transferidos para estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas. Após esse período, os sacos foram colocados em estufa a 105 °C por dezesseis horas para avaliação da matéria seca não degradada. A degradabilidade do material incubado foi calculada como percentual de material degradado ao longo do tempo, conforme a fórmula a seguir:

$$\%MS \text{ degradada} = \frac{MS \text{ Incubada (g)} - Ms \text{ não degradada (g)}^*}{MS \text{ incubada (g)}} \times 100$$

*para cada tempo de incubação

3.2.7 Análise *in situ* da colonização do farelo de soja pela microbiota ruminal

A análise *in situ* da colonização do farelo de soja pela microbiota ruminal foi realizada utilizando a técnica de Nested PCR-DGGE (Muyzer et al., 1993). Aproximadamente 6 g da amostra seca ao ar processada em peneira de porosidade 2 mm foram pesadas em duplicatas em sacos de náilon (8 × 15 cm e porosidade de 50 µm) (NRC, 2001) e incubadas no rúmen dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

A cada período, por três dias consecutivos (21º, 22º e 23º dias), os sacos foram simultaneamente incubados no rúmen de todos os animais após o fornecimento da primeira suplementação (às 6h00 da manhã), sendo removidos nos tempos de 0,5; 2; 6; 12 e 24 horas de incubação.

Em cada intervalo de tempo, dois sacos (contendo farelo de soja) foram retirados de cada animal e processados por lavagem com água destilada gelada para retirada dos resíduos de alimentos. O conteúdo de cada saco foi identificado e armazenado em ultra-freezer à -80 °C para posterior extração do DNA da microbiota aderida as partículas de farelo de soja.

A extração de DNA total das amostras do farelo de soja incubado nos diferentes tempos foi realizada de acordo com Stevenson e Weimer (2007). A qualidade e a quantidade do DNA extraído foram mensuradas utilizando nano Drop™ Plate (Thermo Scientific Multiskan GO), sendo armazenados a -20°C até o uso.

O DNA total da comunidade microbiana das amostras de farelo de soja coletados dos diferentes tratamentos e horários foram utilizados em reações de amplificação (PCR) com oligonucleotídeos específicos para o gene do rRNA 16S de grupos taxonômicos do domínio Bacteria (Muyzer et al., 1993). A primeira reação da PCR utilizou os iniciadores universais bacterianos 9bfm (5'-GAGTTTGATYHTGGCTCAG-3') e 1512uR (5'-ACGGHTACCTTGTTACGACTT-3') para amplificar os genes do rRNA 16S (Muhling et al., 2008) a partir do DNA genômico extraído do farelo de soja incubado

no rúmen. A reação de amplificação continha tampão de reação GoTaq (0,5X), MgCl₂ (0,5 mmol/L), dNTPs (0,2 mmol/L), oligonucleotídeos forward (0,12 mmol/L), oligonucleotídeos reverse (0,12 mmol/L), DNA Taq polymerase (0,1 unidade/μL, Promega Corporation, Madison, WI, EUA) e BSA (0,08 mg/mL). Um microlitro do produto da amplificação da primeira reação foi usado como DNA molde. A Nested-PCR foi realizada usando os primers 341f-GC (5' CCTACGGGAGGCAGCAGCGCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGG CACGGGGGG-3') e 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Muhling et al., 2008) para amplificar uma região mais curta (tamanho esperado de 177 pb) do gene que codifica para o rRNA 16S e aumentar a especificidade da análise (Heuer et al., 1997; Gomes et al., 2001).

A reação de amplificação continha tampão de reação GoTaq (0,5 X), MgCl₂ (0,5 mmol /L), dNTPs (0,2 mmol/L), *primer forward* (0,12 mmol/L), *primer reverso* (0,12 mmol/L), Taq polimerase (0,1 μL/L) (Promega Corporation , Madison, WI, USA) e BSA (0,08 mg ml/L). Um microlitro do produto de amplificação da primeira reação foi usado como molde de DNA. A nested-PCR foi realizada em termociclador A200 Gradient Thermal cycler com desnaturação inicial de 96 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 96 °C por 1 min, 56 °C por 1 min e 72 °C por 30 s, seguido por uma extensão final a 72 °C por 5 min (Muhling et al., 2008). Para as amplificações realizadas com oligonucleotídeos para os domínios Firmicutes e Bacteroidetes a temperatura de anelamento foi de 56 °C e 52 °C, respectivamente.

Em todas as análises foram utilizadas reações sem DNA molde como controle negativo. As reações de PCR foram realizadas em termociclador A200 Gradient Thermal cycler. Os amplicons resultantes da amplificação por PCR foram analisados em gel de agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1,8% em tampão TBE 1X (0,1 M de Tris/HCl, 0,09 M de ácido bórico, 1 mM e EDTA, pH 8,0) (Sambrook et al., 1989). O marcador 100 pb DNA Ladder (Promega, Madison, USA) foi utilizado para estimar os tamanhos dos diferentes amplicons.

3.2.8 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) foi realizada utilizando-se o equipamento DGGE-2401 (C.B.S., Scientific Company, INC., USA). Foram aplicados 8 μL dos produtos de PCR, juntamente com 8 μL do tampão da

amostra (azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%, glicerol 70% e TAE 1 X), em gel de poli(acrilamida) (acrilamida:N,N'-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE 1X, para fragmentos de tamanhos variando de 200 pb a 400 pb. O gradiente desnaturante variou linearmente de 40% a 60% ureia/formadida para a análise dos fragmentos.

O gradiente desnaturação foi obtido a partir da mistura de duas soluções (A e B) dispensadas por mini-bomba peristáltica formadora de gradiente (MPP-100-220: Mini-Peristaltic Pump for Gradient Gel Casting, C.B.S., Scientific Company, INC., USA). A solução A continha 100% dos agentes desnaturantes (7 mol/L de ureia e 40% de formamida desionizada (v/v)) em 8% de acrilamida: N, N'-metilenobisacrilamida (37,5: 1), e a solução B foi preparada como para solução A, mas sem os agentes desnaturantes. As soluções A e B também continham persulfato de amônio (3,1 mmol/L) de polimerizador e catalisador de N, N, N', N-tetrametiletilenodiamina (3,7 µmol/L). O gradiente desnaturante foi monitorado com 20 µL do corante de visualização (azul de bromofenol 0,5%, xileno cianol 0,5% e 1X TAE). Permitiu-se que os géis polymerizassem durante 3 horas antes de aplicar as amostras de DNA.

Para a formação do gradiente (40% a 60%) no gel de 23 mL foram utilizadas diferentes proporções das soluções estoques. Para a obtenção de 11,5 mL da solução 40% foram utilizados 6,9 mL da solução estoque sem o agente desnaturante e 4,6 mL da solução estoque 100% desnaturante. Para obter 11,5 mL da solução 60% foram utilizados 4,6 mL da solução estoque sem agente desnaturante e 6,9 mL da solução estoque 100% do agente desnaturante. A cada uma das soluções obtidas com as misturas sem o agente desnaturante e com 100% dos agentes desnaturantes foram adicionados 0,36% (v/v) de persulfato de amônio 10% (p/v) [polimerizador] e 0,043% (v/v) de TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletileno diamino) [catalisador]. À solução 60% foram adicionados 20 µL de corante (azul de bromofenol 0,5 %, xileno cianol 0,5 % e TAE 1X) para visualização do gradiente. O tempo de polimerização do gel antes da aplicação das amostras foi de 3 horas antes de carrear as amostras de DNA.

Uma mistura de fragmentos de rRNA 16S das seguintes espécies bacterianas foram utilizadas como marcadores na canaleta central e nas canaletas localizadas nas extremidades do gel: *Escherichia coli* ATCC 29214 (γ -Proteobacteria), *Salmonella entérica typhimurium* ATCC 14028 (γ -Proteobacteria), *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Firmicutes) e *Lactococcus lactis* ATCC 19435 (Firmicutes).

A eletroforese foi realizada na temperatura de 60°C e voltagem constante de 100 V, durante 15 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de SYBR® Gold (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel foi visualizada e foto-documentada no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene).

3.2.9 Análise do perfil bandas do DGGE para o domínio Bacteria

Os perfis de bandas dos géis obtidos pela PCR-DGGE foram analisados utilizando o programa Bionumerics 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente Dice de similaridade e no método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) para análise dos agrupamentos. A variável riqueza foi estimada com base na matriz binária gerada por meio da análise da imagem digitalizada do gel no software Bionumerics 5.1, na qual a presença da banda foi codificada como um (1) e ausência como zero (0). O índice de Shannon–Wiener foi calculado baseado na equação abaixo e utilizando o programa Past (Hammer et al., 2001).

$$H' = - \sum_{i=1}^s (P_i)(\log P_i)$$

Onde s é o número de bandas na amostra e $P_i = n_i/N$; n_i = número de bandas i ; N = número total de bandas.

Para a análise estatística das variáveis riqueza e índice de Shannon-Wiener, devido ao fato dessas variáveis terem sido avaliadas para os tempos nos respectivos tratamentos, utilizou-se uma com cinco tratamentos (controle, proteína frequente, energia frequente, proteína infrequente e energia infrequente) e cinco repetições, de acordo com o esquema de amostragem em cada período experimental (SAS Institute Inc., versão 9.4, Cary, NC, USA).

Os diagramas de Venn foram construídos por meio da ferramenta Venny (Bardou et al., 2014), utilizando a matriz binária de presença e ausência de banda com objetivo de verificar a riqueza e as interseções das bandas obtidas nos DGGE.

3.2.10 Análise estatística

Para as variáveis relacionadas aos parâmetros do líquido ruminal as análises de variância (ANOVA) foram realizadas por intermédio do procedimento MIXED do SAS 9.4, para delineamento em quadrado latino, segundo o modelo abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + T_k + D_l + TD_{kl} + \varepsilon_{ijkl}$$

Em que: μ = constante geral; A_i = efeito do animal i (aleatório); P_j = efeito do período j (aleatório); T_k = efeito do tratamento k (fixo); D_l = efeito do dia l (fixo); TD_{kl} = interação tratamento k e dia l (fixo); ε_{ijkl} = erro aleatório, pressuposto NID (0; σ^2).

As somas de quadrados dos tratamentos foram decompostas em quatro contrastes ortogonais, sendo estes: controle *vs* suplementados; suplementação frequente *vs* infrequente; suplementação com energia *vs* sem energia; Interação frequência de suplementação e presença ou ausência de energia. Para o caso de interações significativas, o desdobramento das mesmas foi realizado por meio do *statement* SLICE do SAS. Adotou-se 0,05 como nível crítico de probabilidade de ocorrência do erro tipo I.

Para avaliação da degradabilidade do farelo de soja, foi realizada como medidas repetidas no tempo, em que a mais adequada estrutura de (co)variâncias foi escolhida utilizando-se o menor critério de informação de Akaike.

3.3 RESULTADOS

3.3.1. Análise bioquímica do conteúdo ruminal de novilhas Nelore com suplementação proteica energética frequente e infrequente

O fornecimento dos suplementos proteicos e energéticos não alterou o pH ruminal ($P > 0,05$; Tabela 1). Observou-se interação entre frequência de suplementação e energia ($P < 0,05$). A suplementação energética infrequente promoveu aumento do pH ruminal ($P < 0,05$) (Tabela S1). Não foi observado efeito de dia ou interação entre dia e tratamento sobre o pH ruminal ($P > 0,05$).

Novilhas suplementadas apresentaram maiores ($P < 0,05$) concentrações de amônia no líquido ruminal (Tabela 1). A concentração de amônia ruminal não foi influenciada ($P > 0,05$) pela frequência de suplementação, pela adição de amido ao suplemento ou pela interação entre esses fatores (Tabela 1). Houve efeito ($P < 0,05$) de interação entre dia de avaliação e tratamento (Tabela 1). Novilhas que receberam suplementação infrequente apresentaram menor ($P < 0,05$) concentração de amônia no terceiro dia do ciclo de suplementação (Tabela S2).

Novilhas suplementadas e não suplementadas apresentaram concentrações semelhantes ($P>0,05$) de proteína microbiana no líquido ruminal. Contudo, entre as novilhas que foram suplementadas, a adição de energia (amido) resultou na redução da concentração de proteína microbiana no líquido ruminal (Tabela 1).

Quando os produtos finais da fermentação foram avaliados observou-se efeito do dia de avaliação para os ácidos orgânicos voláteis totais e o acetato. A concentração de propionato não foi alterada por nenhum dos fatores estudados, enquanto a concentração final de butirato foi maior ($P<0,05$) nas novilhas que receberam a suplementação (Tabela 1).

Tabela 1. Características do líquido ruminal de novilhas Nelore com suplementação proteica e energética frequente e infrequente.

Item	Tratamento ¹					EPM ²	Dia ³		EPM ²	p-valor ⁴					
	C	PF	PEF	PI	PEI		1	3		C x S	F	E	F*E	Dia	Dia*Trat
pH	6,61	6,63	6,54	6,63	6,70	0,046	6,63	6,61	0,038	0,69	0,04	0,69	0,03	0,52	0,68
NH ₃	2,02	5,16	5,32	4,38	4,11	0,607	5,06	3,34	0,349	<0,01	0,10	0,92	0,71	<0,01	<0,01
Proteína microbiana	1601	1695	1554	1659	1454	145,2	1530	1655	140,9	0,86	0,19	<0,01	0,53	0,1	0,93
AOV Totais	65,96	74,72	75,37	73,06	76,77	6,101	75,82	66,94	5,374	0,13	0,24	0,55	0,45	0,02	0,23
Ac. acético	53,10	59,72	60,01	57,70	53,10	5,063	60,17	53,28	4,594	0,18	0,14	0,46	0,41	0,02	0,22
Ac. propiônico	8,03	8,82	9,10	9,63	8,87	0,797	9,46	8,32	0,499	0,25	0,72	0,76	0,52	0,09	0,22
Ac. butírico	4,82	6,18	6,26	5,74	5,80	0,726	6,18	5,33	0,676	0,01	0,22	0,84	0,97	0,23	0,50

pH, NH₃ (mM), proteína microbiana (mg/mL), concentração de ácidos orgânicos voláteis (total, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico)(mmol/L). ¹Tratamentos, C = controle, PF = suplementação frequente de proteína, PEF= suplementação frequente de proteína e energia, PI= suplementação infrequente de proteína, PEI = suplementação infrequente de proteína e energia. ²EPM = erro padrão da média. ³Dia do ciclo da suplementação. ⁴Contrastes ortogonais, C x S = controle (não suplementado) versus suplementados. F= Efeito da frequência de suplementação. E = Efeito da presença ou ausência de energia no suplemento. F*E = interação entre o efeito da frequência e da energia. Dia = efeito do dia de avaliação. Dia*trat = efeito da interação entre dia de avaliação e o tratamento.

3.3.2 Degradabilidade *in situ* do farelo de soja e concentração de DNA ao longo dos tempos de incubação

As novilhas suplementadas e não suplementadas com diferentes frequências de proteína e energia apresentaram taxa de degradação do farelo de soja maior que 90% em todos os tratamentos no tempo de 24 horas de incubação (Figura 1). A porcentagem da matéria seca degradada do farelo de soja *in situ* aumentou linearmente de acordo com os tempos de incubação no ambiente ruminal para todos os tratamentos (Figura 1).

Quando foi avaliada a colonização do farelo de soja no rúmen das novilhas recebendo diferentes níveis de suplementação proteica e energética, observou-se aumento no rendimento de DNA microbiano extraído do farelo de soja incubado no rúmen para todos os tratamentos avaliados, principalmente após 12 horas de incubação (Figura 1). A suplementação de proteína e energia infrequente resultou em baixa concentração de DNA no farelo de soja nos tempos iniciais (0 a 12 h) de coleta das amostras (Figura 1), atingindo concentrações acima de 1000 ng/ μ L/g MS de DNA após 24 horas de incubação.

Para as novilhas que receberam suplementação de proteína frequente, proteína e energia frequente e proteína infrequente, as concentrações de DNA microbiano foram de aproximadamente 1000 ng/ μ L/g MS (Figura 1). Para o tratamento controle a concentração de DNA foi acima de 1500 ng/ μ L/g MS após 24 horas de incubação no rúmen.

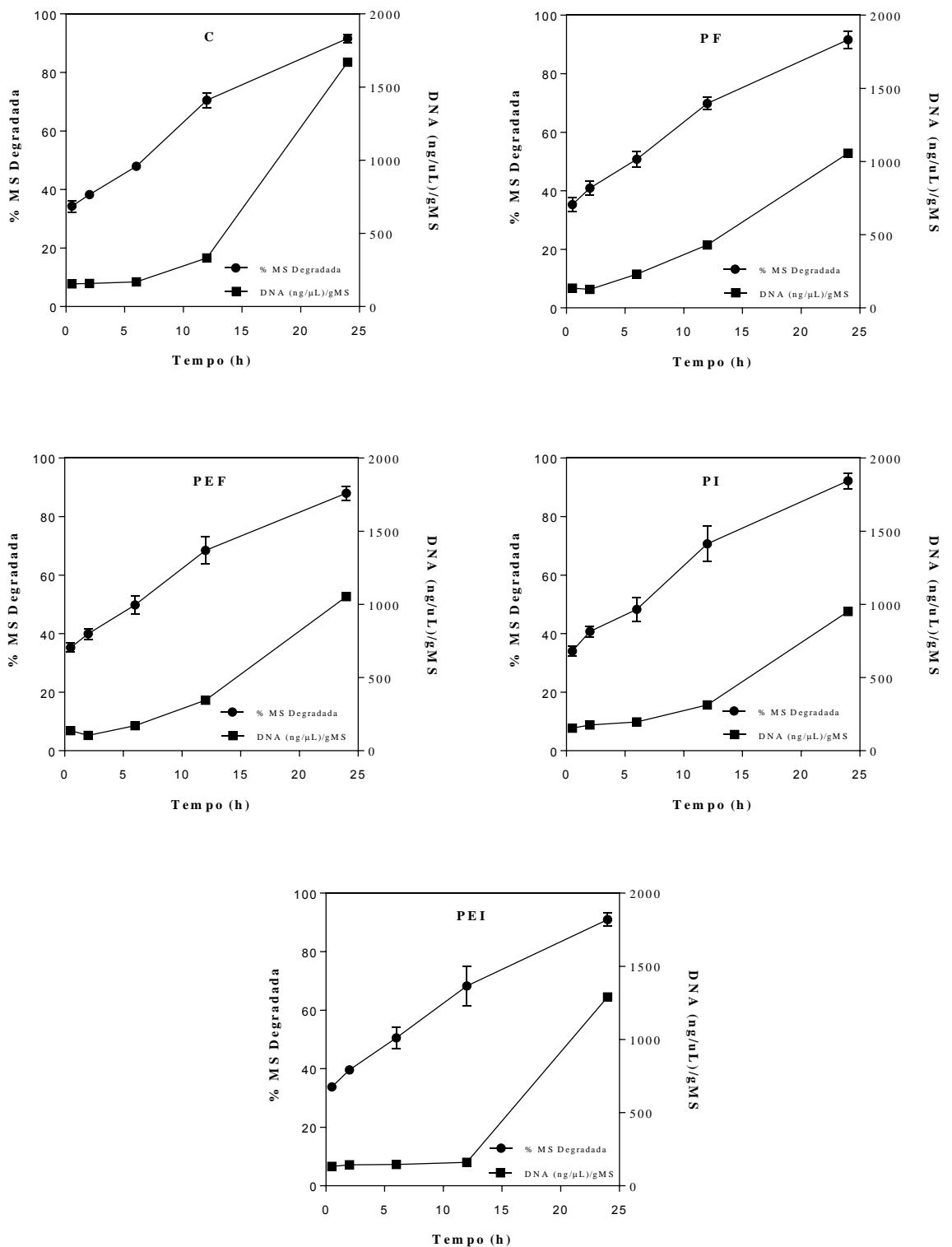


Figura 1. Degradabilidade *in situ* do farelo de soja e concentração de DNA microbiano extraído do suplemento incubado no rúmen de novilhas Nelore recebendo diferentes tratamentos. C = controle, PF = suplementação de proteína frequente, PEF= suplementação de proteína e energia frequente, PI= suplementação de proteína infrequente, PEI = suplementação de proteína e energia infrequente. O cálculo foi realizado a partir da concentração de DNA total (ng/μL) dividido pela grama de matéria seca degradada (gMS degradada). As amostras foram incubadas em 2 repetições para cada tempo de incubação por um período de 24 horas de incubação. MS= matéria seca

3.3.3 Análise da diversidade genética de bactérias durante a colonização do farelo de soja em novilhas Nelore recebendo diferentes de fontes de suplementação proteica e energética

A composição da comunidade bacteriana durante a colonização do farelo de soja foi avaliada por meio da Reação de Cadeia de Polimerase - Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (PCR-DGGE). A diversidade bacteriana no farelo de soja foi avaliada por meio da amplificação do gene que codifica o rRNA 16S, utilizando oligonucleotídeos específicos para os filos Bacteroidetes e Firmicutes (Figura 2 e 3).

A análise do perfil de bandas geradas com oligonucleotídeos específicos para o filo Bacteroidetes revelou de 9 a 24 bandas (Figura 2), enquanto os oligonucleotídeos específicos para o filo Firmicutes geraram de 11 a 31 bandas (Figura 3). Os resultados indicaram que, em geral, as amostras dentro de um mesmo tratamento possuem maior similaridade. Porém, foram observadas variações na comunidade bacteriana entre tratamentos, novilhas, período experimental e tempo de coleta das amostras, não sendo possível distinguir bandas específicas associadas com um ou outro tratamento avaliado neste estudo.

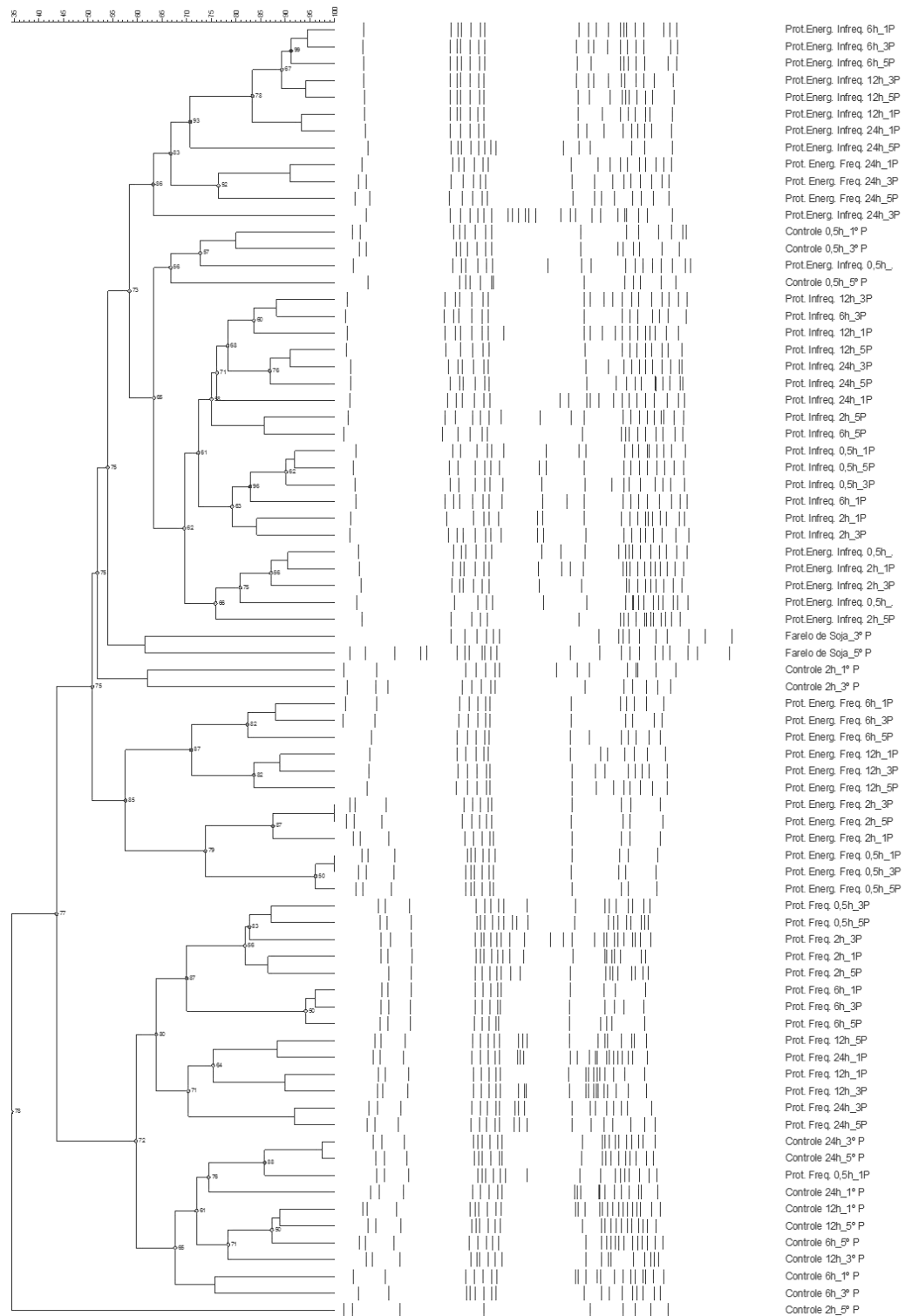


Figura 2. Perfil eletroforético de seqüências do gene rRNA 16S da colonização do farelo de soja obtido por Eletroforese em Gel Gradiente Desnaturante (DGGE). As novilhas receberam os seguintes tratamentos. C = controle, PF = suplementação de proteína frequente, PEF= suplementação de proteína e energia frequente, PI= suplementação de proteína infrequente, PEI = suplementação de proteína e energia infrequente nos diferentes tempos de incubação. O farelo de soja foi (FS) foi utilizado para comparação com os tratamentos que foram incubados no rúmen. Os perfis foram obtidos após amplificação utilizando oligonucleotídeos específicos para o filo Bacteroidetes. O dendograma com agrupamento UPGMA foi gerado no programa Bionumerics 5.1. A escala de 40 a 100 indica o nível de similaridade.

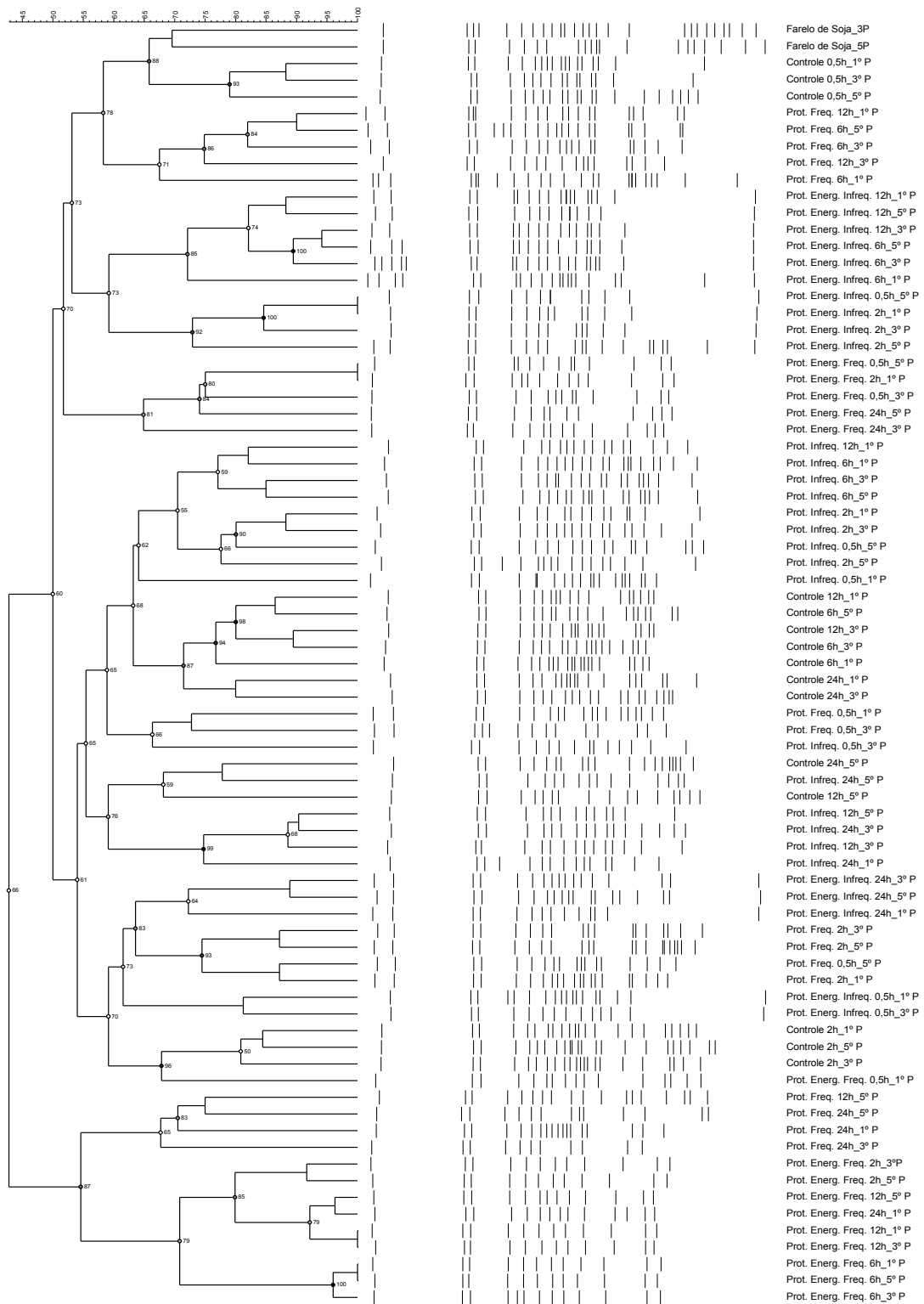


Figura 3. Perfil eletroforético de seqüências do gene rRNA 16S da colonização do farelo de soja obtido por Eletroforese em Gel Gradiente desnaturante (DGGE). As novilhas receberam os seguintes tratamentos. C = controle, PF = suplementação de proteína frequente, PEF= suplementação de proteína e energia frequente, PI= suplementação de proteína infrequente, PEI = suplementação de proteína e energia infrequente nos diferentes tempos de incubação. O farelo de soja foi (FS) foi utilizado para comparação com os tratamentos que foram incubados no rúmen. Os perfis foram obtidos após amplificação utilizando oligonucleotídeos específicos para o filo Firmicutes. O dendograma com agrupamento UPGMA foi gerado no programa Bionumerics 5.1. A escala de 35 a 100 indica o nível de similaridade.

A análise da riqueza e do índice de Shannon-Wiener (diversidade) revelaram diferenças ($P < 0,05$) para o filo Bacteroidetes entre os tempos de incubação do farelo de soja para os seguintes tratamentos: controle, proteína frequente e proteína e energia frequente (Figura 4A e 4B). Para as novilhas que receberam suplementação proteica infrequente e proteína e energia infrequente não foi observado diferença ($P > 0,05$) na riqueza de espécies e índice de Shannon-Wiener entre os tempos de incubação do farelo de soja no rúmen (Figura 4A e 4B).

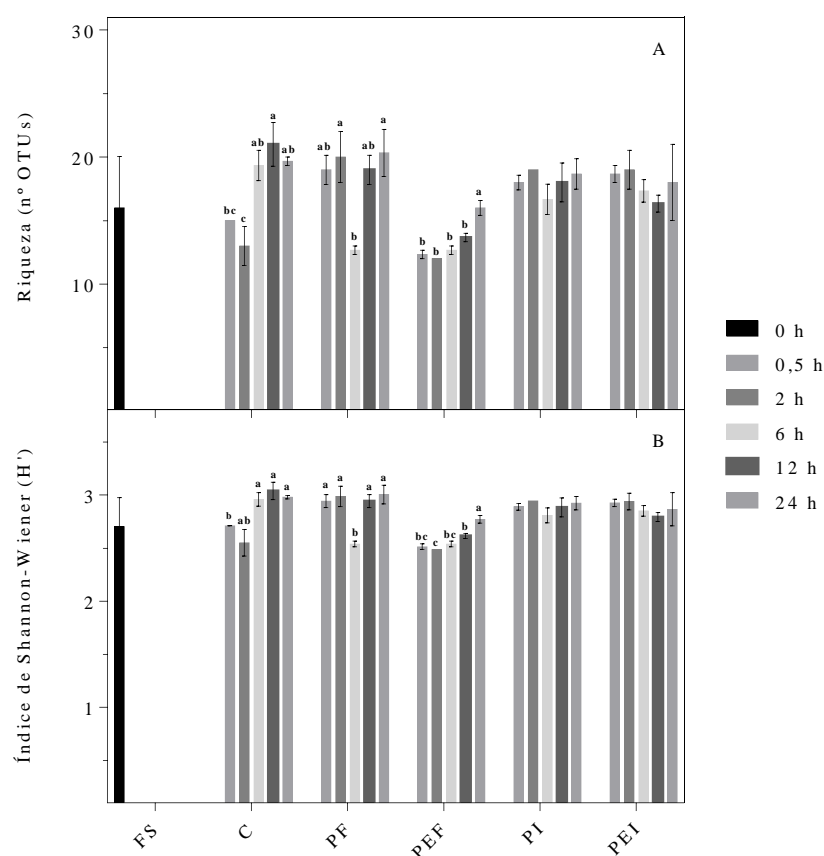


Figura 4. Análise da riqueza de espécies e diversidade genética da colonização *in situ* nos diferentes tratamentos avaliados por Eletroforese em Gel Gradiente Desnaturante (DGGE), utilizando oligonucleotídeos específicos para o filo Bacteroidetes. As novilhas receberam os seguintes tratamentos: C = controle, PF = suplementação de proteína frequente, PEF = suplementação de proteína e energia frequente, PI = suplementação de proteína infrequente, PEI = suplementação de proteína e energia infrequente nos diferentes tempos de incubação. O farelo de soja foi (FS) utilizado para comparação da comunidade bacteriana com os tratamentos que foram incubados no rúmen. A) Riqueza de espécies e B) Índice de Shannon-Wiener calculados a partir da matriz binária de ausência e presença de bandas. As letras significam diferença dentro de cada tratamento nos diferentes tempos de colonização a nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

A análise da riqueza para o filo Firmicutes revelou diferenças ($P < 0,05$) entre os tempos de incubação do farelo de soja para as novilhas que receberam os seguintes

tratamentos: controle, proteína frequente, proteína e energia frequente e proteína infrequente (Figura 5A). Quando as novilhas receberam a suplementação proteica e energética infrequente não foi observada diferença ($P>0,05$) entre o número de sequências (OTUs) nos diferentes tempos de incubação do farelo de soja no rúmen (Figura 5A).

Também houve diferença para o índice de Shannon-Wiener ($P<0,05$) na análise do filo Firmicutes nos cinco tempos de incubação do farelo de soja para os tratamentos controle, proteína e energia frequente e proteína infrequente (Figura 5B). Para os tratamentos proteína frequente e proteína e energia infrequente não foi observado diferença ($P>0,05$) entre os tempos de incubação do farelo de soja (Figura 5B).

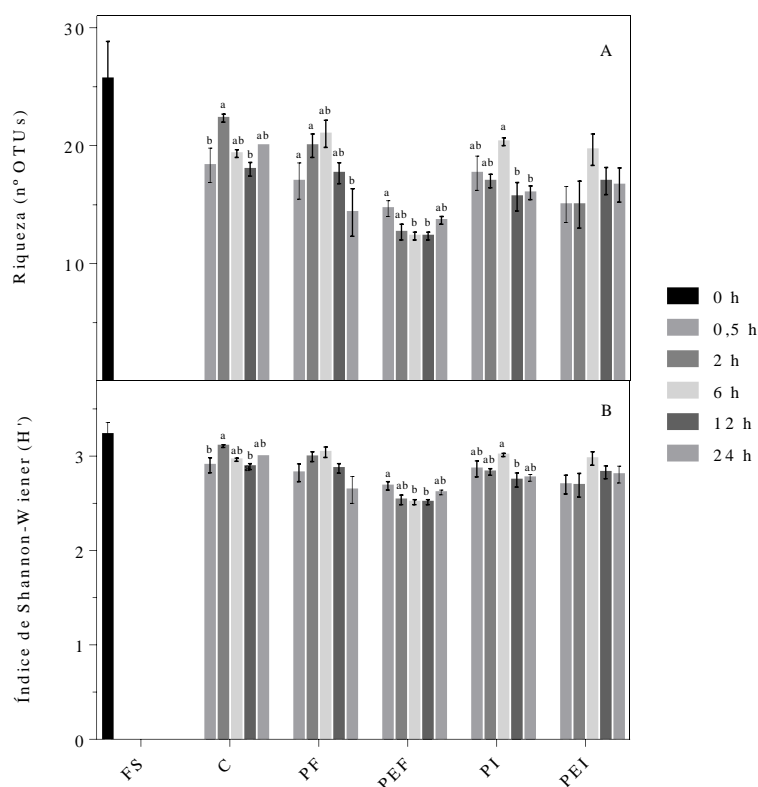


Figura 5. Análise da riqueza de espécies e diversidade genética da colonização *in situ* dos diferentes tratamentos avaliados por por Eletroforese em Gel Gradiente desnaturante (DGGE) utilizando oligonucleotídeos específicos para o filo Firmicutes. As novilhas receberam os seguintes tratamentos. C = controle, PF = suplementação de proteína frequente, PEF= suplementação de proteína e energia frequente, PI= suplementação de proteína infrequente, PEI = suplementação de proteína e energia infrequente nos diferentes tempos de incubação. O farelo de soja foi (FS) foi utilizado para comparação com os tratamentos que foram incubados no rúmen. A) Riqueza e B) Índice de Shannon-Wiener calculados a partir da matriz binária de ausência e presença de bandas.

Os diagramas de Venn foram obtidos por meio da ferramenta Venny, utilizando a matriz binária gerada no software Bionumerics 5.1, e utilizados para avaliar a distribuição de sequências (OTUs) associadas com a colonização do farelo de soja entre os diferentes tratamentos avaliados neste trabalho.

Para o filo Bacteroidetes, o diagrama de Venn revelou oito sequências comuns entre os tempos de incubação do farelo de soja no tratamento controle. Para os tempos de 30 minutos e duas horas de incubação foram observadas quatro sequências exclusivas para esses tempos de incubação. Foi observado baixo número de sequências compartilhadas entre os tempos de incubação do farelo de soja nas novilhas mantidas no tratamento controle (Figura 6).

Para as novilhas que receberam o tratamento controle, suplementação de proteica frequente, suplementação de proteica e energetica frequente, o diagrama de Venn revelou oito, nove e sete sequências, respectivamente, compartilhadas entre os diferentes tempos de amostragem durante a colonização do farelo de soja. Para os tratamentos com suplementação de proteína infrequente e proteína e energia infrequente observou-se maior riqueza de espécies na colonização do farelo de soja, e para ambos os tratamentos foi observado baixo número de sequências compartilhadas entre os tempos de incubação (Figura 6).

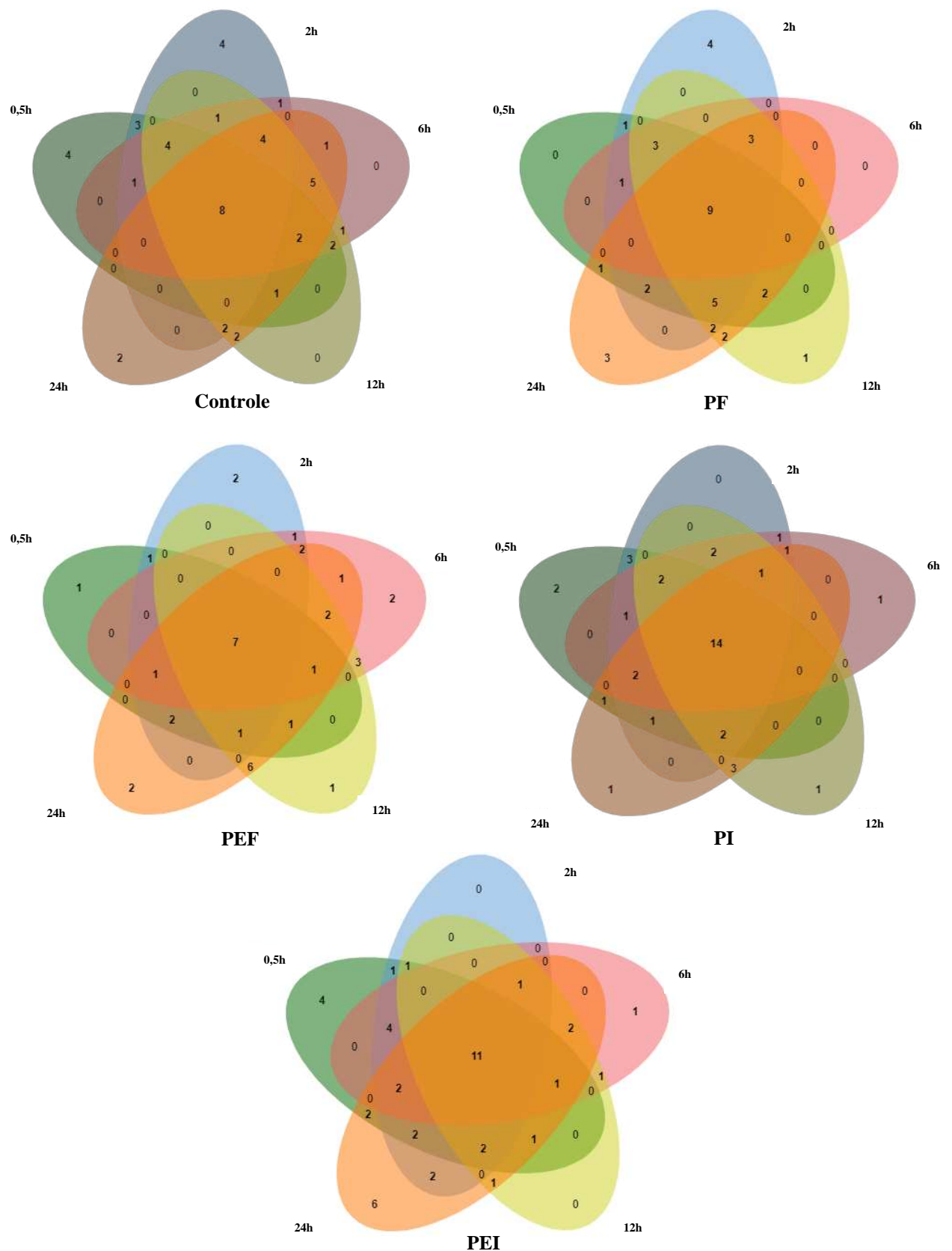


Figura 6. Diagrama de Venn com a distribuição do número de seqüências comuns entre os tratamentos utilizados neste trabalho. Foi utilizado oligonucleotídeos específicos para o filo Bacteroidetes. Os diagramas de Venn foram construídos por meio da ferramenta de Venny (Bardou *et al.*, 2014) utilizando-se a matriz binária gerada da análise da imagem do gel no software Bionumerics 5.1. As novilhas receberam os seguintes tratamentos: Controle; PF= Suplementação de proteína frequente; PEF= Suplementação proteína e energia frequente; PI= Suplementação de proteína infrequente; PEI= Suplementação de proteína e energia infrequente.

Quando foi utilizado oligonucleotídeos específicos para o filo Firmicutes observou-se maior riqueza de espécies na colonização do farelo de soja entre os tratamentos controle, suplementação de proteína frequente e proteína e energia infrequente. Para os três tratamentos verificaram-se, respectivamente, onze, nove e dez sequências compartilhadas nos diferentes tempos de incubação (Figura 7). No tratamento controle observou-se aumento na riqueza de espécies. No entanto, os números de sequências observadas para cada tratamento entre os tempos de incubação do farelo de soja no rúmen foram baixos.

Para as novilhas que receberam suplementação proteica e energética frequente e proteína e energia infrequente foi observado diminuição na riqueza de espécies compartilhada entre os tempos de incubação, com apenas duas e quatro sequências compartilhadas, respectivamente (Figura 7).

3.3.4 Viabilidade dos isolados de HAB no líquido ruminal *in vitro*

Quando os isolados de HAB (C114 e C118) foram incubados no líquido ruminal das novilhas que receberam diferentes tratamentos de suplementação proteica e energética, não foi observado diferença entre tratamentos e culturas avaliadas (Figura 9). A viabilidade de todos os isolados diminuiu ao final da incubação.

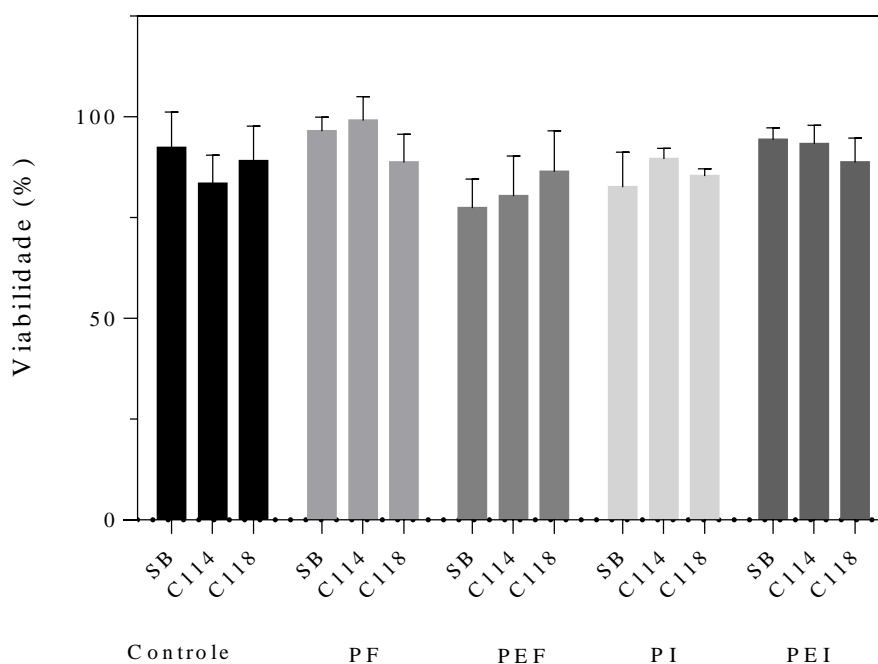


Figura 8. Viabilidade de bactérias hiperprodutoras de amônia (C114 e C118) adicionadas no líquido ruminal *in vitro* das novilhas que receberam diferentes tratamentos de suplementação proteica e energética. O cálculo foi realizado a partir do \log_{10} do número final (Nf) subtraído por \log_{10} do número inicial (Ni) de células $\times 100$ para cálculo da porcentagem da viabilidade das células. A enumeração foi realizada utilizando meio mineral anaeróbico adicionado de Trypticase (15 g/L), em condições de anaerobiose a 39 °C por 24 horas. Não houve diferença significativa entre os isolados entre os cinco tratamentos a 5% de significância pelo teste de Tukey.

3.3.5 Efeito de bactérias hiperprodutoras de amônia na atividade de desaminação *in vitro* do líquido ruminal de novilhas recebendo ou não suplementação proteica e energética

A atividade específica de desaminação (AED), em relação ao controle, não foi alterada quando HAB (isolados C114 e C118) foram adicionadas ao líquido ruminal das novilhas que receberam a suplementação proteica e/ou energética frequente ou infrequente (Figura 9A). Também não houve diferença na concentração de amônia

($P>0,05$) entre as novilhas que receberam diferentes fontes de suplementações quando comparado ao líquido ruminal de animais não suplementados (Figura 9B).

Para a variável pH do líquido ruminal não observou-se diferenças entre todos os tratamentos avaliados após a incubação ou não *in vitro* com os isolados C114 e C118 (dados não mostrados).

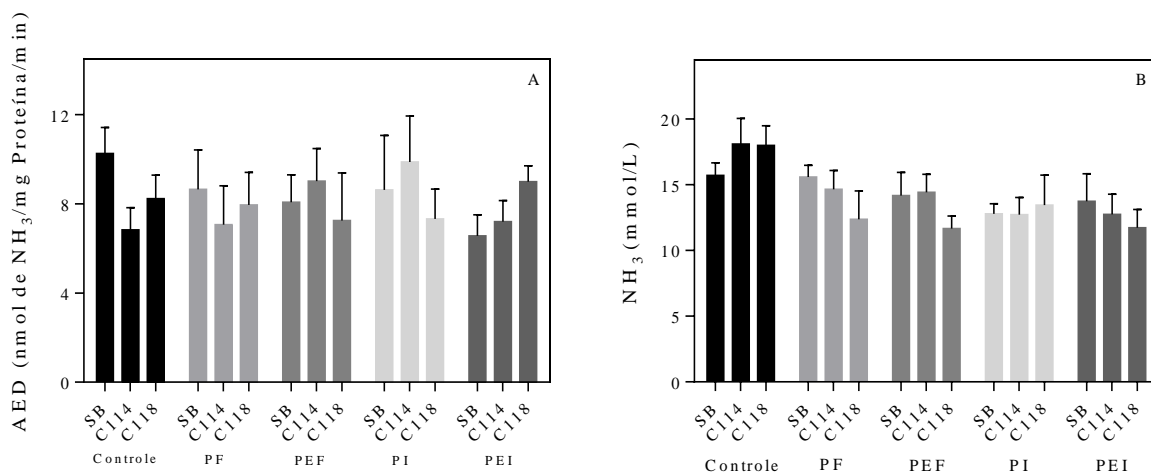


Figura 9. Efeito da adição de bactérias hiperprodutoras de amônia (isolados C114 e C118) no líquido ruminal de animais recebendo ou não suplementação proteica e energética. Os parâmetros bioquímicos: (A); AED (B); NH₃ (C) foram avaliados com animais recebendo cinco diferentes tratamentos. Os tratamentos correspondem a: controle, PF = suplementação de proteína frequente, PEF= suplementação de proteína e energia frequente, PI= suplementação de proteína infrequente, PEI = suplementação de proteína e energia infrequente. SB = sem adição de bactéria, NH₃ = amônia, AED = atividade específica de desaminação. Não houve diferença significativa entre os isolados entre os cinco tratamentos a 5% de significância pelo teste de Tukey.

3.4 DISCUSSÃO

A suplementação proteica e energética em animais recebendo compostos nitrogenados tem como objetivo fornecer fontes de carbono e energia ao ambiente ruminal, minimizando deficiências e/ou desbalanços de nutrientes que podem ocorrer nas forragens tropicais e favorecendo o crescimento dos microrganismos anaeróbios que colonizam esse ecossistema (Franco et al., 2017). A frequência da suplementação energética não alterou a concentração de amônia no líquido ruminal de novilhas Nelore (Tabela 1). Estudos conduzidos nos trópicos demonstraram que a suplementação com compostos nitrogenados aumentaram a concentração de amônia no rúmen (Costa et al., 2011), porém reduz a incorporação de ureia reciclada em amônia pelos microrganismos ruminais (Batista et al., 2016). A suplementação com caseína no rúmen de novilhas Nelore foi associada ao aumento da atividade específica de

desaminação de aminoácidos e da concentração de amônia no rúmen (Bento et al., 2016).

Os animais suplementados e não suplementados apresentaram concentrações semelhantes de proteína microbiana no líquido ruminal (Tabela 1). A proteína microbiana depende da disponibilidade de nitrogênio e de carboidratos. A concentração de proteína microbiana no rúmen é geralmente mais resistente às mudanças induzidas pelas fontes de alimentos. No entanto, este parâmetro sozinho, muitas vezes, não reflete as mudanças no tamanho da população e riqueza de espécies no rúmen (Bento et al., 2016). A falta de sincronização entre a disponibilidade de energia e nitrogênio no rúmen resulta no uso ineficiente dos substratos fermentáveis, reduzindo a síntese de proteína microbiana pelo animal (Hall e Huntington, 2008; Colle e Todd, 2008; Chanthakhoun et al., 2014). Os produtos da fermentação variaram de acordo com o fornecimento da suplementação dos animais, sendo que os ácidos orgânicos em maior concentração foram acetato, propionato e butirato (Tabela 1).

A matéria seca do farelo de soja destacou-se quanto às taxas de degradação, em função da elevada capacidade de fermentação desse substrato pelos microrganismos ruminais. Considerando-se a elevada taxa de digestão da proteína do farelo de soja no rúmen, a utilização desse alimento deve ocorrer concomitante ao fornecimento de carboidratos de rápida fermentação (Cabral et al., 2005). Observou-se aumento no rendimento de DNA microbiano extraído após 12 horas de incubação, indicando colonização eficiente do farelo de soja no rúmen, independente da estratégia de suplementação proteica e energética utilizada (Figura 1). No entanto, no tratamento controle e nos tratamentos com suplementação de proteína e energia infrequente, a porcentagem de DNA extraída nos tempos iniciais de colonização do farelo de soja foi menor em relação aos tratamentos com suplementação frequente. Os microrganismos do rúmen rapidamente colonizam as partículas de alimentos que chegam ao rúmen, resultando na degradação dos substratos e liberação dos nutrientes da dieta (Miron et al., 2001; Russell e Rychlik, 2001; Koike et al., 2003). Os dados desse estudo sugerem que a falta de sincronia entre a disponibilidade de proteína e energia pode ter afetado a colonização do farelo de soja no rúmen, resultando em menor concentração do DNA nos tempos iniciais de incubação. Para os tratamentos no qual a proteína e energia estavam disponíveis, a concentração de DNA aumentou em relação ao tempo de incubação (Figura 1).

No presente trabalho, o impacto da suplementação de proteína e energia foi analisado para investigar mudanças na composição da comunidade microbiana relacionadas ao aumento da disponibilidade de nitrogênio no rúmen. O perfil eletroforético das bandas no gel de DGGE revelou baixos índices de similaridade entre os tratamentos e tempos de incubação dos suplementos. A compreensão das mudanças na composição da microbiota ruminal é de importância fundamental para o estudo da dinâmica e das interações da comunidade microbiana ruminal com o hospedeiro e das alterações causadas pelas dietas fornecidas ao animal. Análises da composição e abundância do *core* da comunidade bacteriana no rúmen de novilhas demonstraram que os filos Bacteroidetes, Firmicutes e γ -proteobactérias compreendem mais de 95% da abundância bacteriana no rúmen (Jami e Mizrahi, 2012).

Neste trabalho, a análise dos índices de riqueza e diversidade mostrou que o filo Bacteroidetes apresentou baixa diversidade de espécies de bactérias em comparação com o filo Firmicutes (Figura 4A e B, respectivamente), o que pode estar associado ao aumento de populações de bactérias com menor participação no metabolismo de proteínas.

Quando foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o filo Firmicutes observaram-se diferenças ($P < 0,05$) de riqueza e diversidade das espécies entre os tratamentos e tempos de incubação do farelo de soja para os animais que receberam diferentes tipos de suplementação de proteína e energia (Figura 5A e B, respectivamente). Para o filo Firmicutes sugere-se que o aumento da riqueza e diversidade que podem estar associados com o maior número de espécies de bactérias que estão envolvidas na degradação de proteína. O filo Firmicutes apresenta muitos gêneros de bactérias que são degradadores de proteínas, tais como *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium* e *Streptococcus* (Attwood e Reilly, 1995).

Neste trabalho, foi possível observar por meio dos diagramas de Venn que determinadas sequências foram agrupadas com o tempo de colonização do farelo de soja em cada animal recebendo diferentes fontes de suplementação proteica e energética (Figura 6 e 7). Petri et al (2012) verificou agrupamento de OTUs por dieta ou fração (líquida ou sólida) do conteúdo ruminal analisado. No entanto, Kocherginskaya et al (2001) demonstrou agrupamento significativo de OTUs entre dieta rica em volumoso (100% de feno) e dieta rica em grãos (72% de grão).

A viabilidade dos isolados de HAB no líquido ruminal *in vitro* sugere que essas bactérias não foram capazes de competir com a microbiota dominante no líquido

ruminal dos animais suplementados com proteína e energia (Figura 8). Com isso, não foi observado aumento da atividade específica de desaminação e da produção de amônia em nenhuma das fontes de suplementação proteica e energética para a incubação *in vitro* dos isolados de HAB (Figura 9). No entanto, Elwakeel et al. (2012), quando adicionaram *Fusobacterium necrophorum* no líquido ruminal *in vitro* suplementado com lisina observaram aumento da concentração de amônia, indicando a degradação da lisina. Quando *F. necrophorum* foi inoculada no líquido ruminal enriquecido com lisina (50 mM), observou-se aumento linear da concentração amônia, sendo o aminoácido degradado quase completamente após 24 horas de incubação (Russell, 2005). Esses resultados sugerem diferenças expressivas entre a capacidade de colonização e competição dessas espécies bacterianas no ecossistema ruminal

3.5 CONCLUSÕES

A suplementação de novilhas Nelore com fontes proteicas e energéticas altamente degradáveis no rúmen pode melhorar a fermentação ruminal em animais alimentados com forragens de baixa ou média qualidade.

As bactérias hiperprodutoras de amônia fermentadores de carboidratos demonstraram capacidade limitada de competir com a microbiota dominante do ecossistema ruminal.

Diferentes esquemas de suplementação proteica e energética não afetaram a colonização *in situ* de suplemento proteico (farelo de soja).

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen, M. S.; Bradford, B. J.; Harvatine, K. J. The cow as a model to study food intake regulation. **Annual Review of Nutrition**, v. 25, p. 523–547, 2005.

Attwood, G.T e Reilly, K. Identification of proteolytic rumen bacteria isolated from New Zealand cattle. **Journal of Applied Microbiology**, v. 79, p. 22-29, 1995.

Bach, A.; Calsamiglia, S.; Stern, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. E9–E21, 2005.

Bardou, P.; Mariette, J.; Escudié, F.; Djemiel, C.; Klopp, C. jvonn: an interactive Venn diagram viewer. **BMC Bioinformatics**, v. 293, p. 1-7, 2014.

Batista, E.D.; Detmann, E.; Gomes, D.I.; Rufino, L.M.; Paulino, M.F.; Valadares Filho, S.C.; Franco, M.O.; Sampaio, C.B.; Reis, W.L.S. Effect of protein supplementation in the rumen, abomasum, or both on intake, digestibility, and nitrogen

utilization in cattle fed high-quality tropical forage. **Animal Production Science**, p. 1-8, 2016.

Bento, C.B.P.; Azevedo, A.C.; Detmann, E.; Mantovani, H.C Biochemical and genetic diversity of carbohydrate-fermenting and obligate amino acid-fermenting hyper-ammonia-producing bacteria from Nellore steers fed tropical forages and supplemented with casein. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 28, 2015.

Bento, C.B.P.; Azevedo, A.C.; Gomes, D.I.; Batista, E.D.; Rufino, L.M.A.; Detmann, E.; Mantovani, H.C. Effect of protein supplementation on ruminal parameters and microbial community fingerprint of Nellore steers fed tropical forages. **Animal**, p. 1-11, 2016.

Bergman, E. N. Energy contributions of volatile fatty acid from the gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review**, v. 70, p. 567–590, 1990.

Bradford, M. Photometric methods for protein determination. Procedures and analysis. **Analytical Biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.

Cabral, L.S.; Valadares Filho, S.C.; Zervoudakis, J. T.; Souza, A.L.; Detmann, E. Degradabilidade *in situ* da matéria seca, da proteína bruta e da fibra de alguns alimentos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.777-781, 2005.

Chaney, A.L.; Marbach, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.08, p. 130–132, 1962.

Chanthakhoun, V.; Wanapat, M.; Berg, J. Level of crude protein in concentrate supplements influenced rumen characteristics, microbial protein synthesis and digestibility in swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Livestock Science**, v.144, p.197–204, 2012.

Chen, G.; Russell, J.B. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.5, p.1052-1057, 1989.

Cheng, K.J.; Fay, J.P.; Howarth, R.E.; Costerton, J.W. Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 40, p. 613-625, 1980.

Cole, N.A.; Todd, R.W. Opportunities to enhance performance and efficiency through nutrient synchrony in concentrate-fed ruminants. **Journal of Animal Science**, v.86, E318–E333, 2008.

Costa, V.A.C.; Detmann, E.; Paulino, M.F.; Valadares Filho, S.C.; Carvalho, I.P.C and Monteiro, L.P. Consumo e digestibilidade em novilhas em pastejo durante o período das águas sob suplementação com fontes de compostos nitrogenados e de carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p.1788–1798, 2011.

Detmann, E.; Paulino, M.F.; Valadares Filho, S.C. Otimização do uso de recursos forrageiros basais. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 7, 2010, Viçosa. **Anais...** Viçosa: DZO-UFV, 2010. p.191-240.

Detmann, E.; Paulino, M.F.; Valadares Filho, S.C.; Batista, E.D.; Rufino, L.M.A. Aspectos nutricionais aplicados a novilhas em pastejo nos trópicos. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 9, 2014 Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: DZO-UFV, 2014a. p.239-267.

Detmann, E.; Souza, M.A.; Valadares Filho, S.C.; Queiroz, A.C.; Berchielli, T.T.; Saliba, E.O.S.; Cabral, L.S.; Pina, D.S.; Ladeira, M.M.; Azevedo, J.A.G. **Métodos para Análise de Alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 2012. 214p.

Detmann, E.; Valente, E.E.L.; Batista, E.D.; Huhtanen, P. An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. **Livestock Science**, v.162, p.141-153, 2014b.

Edwards, J.E.; Huws, S.A.; Kim, E.J.; Kingston-Smith, A.H. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 62 p.323-335, 2007.

Elwakeel, E.A.; Amachawadi, R.G.; Nour, A.M.; Nasser, M.E.A.; Nagaraja, T.G.; Titgemeyer, E.C. In vitro degradation of lysine by ruminal fluid-based fermentations and by *Fusobacterium necrophorum*. **Journal Dairy Science**, v. 96, p.495–505, 2012.

Figueiras, J. F.; Detmann, E.; Franco, M. O.; Batista, E. D.; Reis, W. L. S.; Paulino, M. F.; Valadares Filho S. C. Effects of Supplements with Different Protein Contents on Nutritional Performance of Grazing Cattle During the Rainy Season. **Asian Australas. Journal of Animal Science**, v.29, p. 1710-1718, 2016.

Figueiras, J.F.; Detmann, E.; Paulino, M. F.; Valente, T.N.P.; Valadares Filho, S.C and Lazzarini, I. Intake and digestibility in cattle under grazing supplemented with nitrogenous compounds during dry season. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.1303–1312, 2010.

Franco, M.O.; Detmann, E.; Valadares Filho, S. C.; Batista, E. D. Luana Rufino, M, A.; Barbosa, M.M.; Lopes, A.R. Intake, digestibility, and rumen and metabolic characteristics of cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and different levels of starch. **Asian-Australas Journal of Animal Sciences**, v. 30, p.797-803, 2017.

Gomes, N.C.; Heur, H.; Scholfield, J.; Costa, R.; Mendonça-Hangler, L.; Smalla, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant Soil**, v. 232, p.167–180, 2001.

Gorka, P.; Kowalski, Z. M.; Pietrzak, P.; Kotunia, A.; Kiljanczyk, R.; Flaga, J.; Holst, J.; Guilloteau, P.; Zabielski, R. Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, p. 47–53, 2009.

Hall, M. B.; Huntington, G.B. Nutrient synchrony: Sound in theory, elusive in practice. **Journal of Animal Science**, v.86, E287–E292, 2008.

Heuer, H.; Krsek, M.; Baker, P.; Smalla, K.; Wellington, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, p.3233–3241, 1997.

Hammer, O.; Harper, D.A.T and Ryan, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, p.1-9, 2001.

Huntington, G.B. Energy metabolism in the digestive tract and liver of cattle: influence of physiological state and nutrition. **Reproduction Nutrition Development**. v. 30, p. 35–47, 1990.

Jami, E e Mizrahi, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. **PLoS One**, v.7, 2012.

Koike, S.; Yoshitani, S.; Kobayashi, Y.; Tanaka, K. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, p.23–30, 2003.

Lazzarini, I.; Detmann, E.; Paulino, M.F.; Valadares Filho, S.C.; Valadares, R.F.D.; Oliveira, F.A. Nutritional performance of cattle grazing on low-quality tropical forage supplemented with nitrogenous compounds and/or starch. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, p. 664–674, 2013.

Lazzarini, I.; Detmann, E.; Sampaio, C.B.; Paulino, M.F.; Valadares Filho, S.C.; Souza, M.A and Oliveira, F.A. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p. 2021–2030, 2009.

Lazzarini, I. **Desempenho nutricional de novilhas em pastejo durante os períodos de seca e águas suplementados com compostos nitrogenados e/ou amido**. 2011. 66f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2011.

Miron, J.; Ben-Guendalia, D.; Morrison, M. **Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria**. *Journal of Dairy Sciences*, v.84, p.1924-1309, 2001.

Muhling, M.; Woolven-Allen, J.; Murrell, J. C.; Joint, I. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. **The ISME Journal**, v.2, p.379–392, 2008.

Muyzer, G.; De Wall, E.C.; Uitterlinden, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700, 1993.

National Research Council – NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**, 7.ed. Washington, DC: Academy Press, 2001. 381p.

Palomino, J.C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.2720-2722, 2002.

Paulino, M.F.; Detmann, E.; Valadares filho, S.C.; Silva, A.G.; Cabral, C.H.A.; Valente, E.E.L.; Barros, L.V.; De Paula, N.F.; Lopes, S.A.; Couto, V.R.M. Bovinocultura programada. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 7, 2010, Viçosa. **Anais...**Viçosa: DZO-UFV, 2010. p.267-297.

Petri, R.M.; Forster, R.J.; Yang, W.; McKinnonand, J.J.; McAllister, T. A. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. **Journal of Applied Microbiology**, v.112, p.1152–1162, 2012.

Reynal, S.M.; Broderick, G.A.; Bearzi, C. Comparison of four markers for quantifying microbial protein flow from the rumen of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4065-4082, 2005.

Rufino, L.M.A.; Detmann, E.; Gomes, D.Í.; Reis, W.L.S.; Batista, E.D.; Valadares Filho, S.C and Paulino, M.F. Intake, digestibility and nitrogen utilization in cattle fed tropical forage and supplemented with protein in the rumen, abomasum, or both. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.7, p.1-10, 2016.

Russell, J.B e Rychlik, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Ecology and Evolution of Infection**, p.1-5, 2001.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 198.

Schroeder, G.F.; Titgemeyer, E.C. Interaction between protein and energy supply on protein utilization in growing cattle: a review. **Livestock Science**, v.114, p.1-10, 2008.

Siegfried, B. R.; Ruckemann, H.; Stumpf, G. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtsch Forsch**, v.37, p.298, 1984.

Souza, M.A.; Detmann, E.; Paulino, M.F.; Sampaio, C.B.; Lazzarini, I.; Valadares Filho, S.C. Intake, digestibility and rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and/or starch. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, p.1299-1310, 2010.

Stevenson, D.M.; Weimer, P.J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology Biotechnology**, p.75, p.165–174, 2007.

Kocherginskaya.; S.A.; Aminov, R.I.; White, B. A. Analysis of the Rumen Bacterial Diversity under two Different Diet Conditions using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Random Sequencing, and Statistical Ecology Approaches. **Anaerobe**, v.7, p.119-134, 2001.

Valente, E.E.L.; Paulino, M.F.; Detmann, E.; Valadares filho, S.C.; Barros, L.V.; Acedo, T.S.; Couto, V.R.M.; Lopes, S.A. Levels of multiple supplements or nitrogen salt for beef heifers in pasture during the dry season. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.2011-2019, 2011.

7 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1. Avaliação da interação entre frequência e energia para o pH ruminal.

	Energia		<i>p</i> -valor ¹	
	Sem	Com		
Frequência	Frequente	6,63 (PF)	6,54 (PEF)	0,07
	Infrequente	6,63 (PI)	6,70 (PEI)	0,18
	<i>p</i> -valor ²	0,92	<0,01	

Tratamentos, PF = suplementação frequente de proteína; PEF= suplementação frequente de proteína e energia; PI= suplementação infrequente de proteína; PEI = suplementação infrequente de proteína e energia. ¹Para efeito energia. ²Para efeito de frequência.

Tabela suplementar 2. Avaliação da interação dia e tratamento para a amônia ruminal (mmol/L).

Item	Dia	Tratamento				EPM	
		C	PF	PEF	PI		PEI
NH ₃	1	1,94	5,27	5,65	6,27	6,16	0,831
	3	2,1	5,05	4,99	2,5	2,06	0,672
	<i>p</i> -valor	0,8	0,73	0,31	<0,01	<0,01	

Tratamentos, C = controle, PF = suplementação frequente de proteína, PEF= suplementação frequente de proteína e energia, PI= suplementação infrequente de proteína, PEI = suplementação infrequente de proteína e energia. EPM = erro padrão da média. NH₃= amônia.