

JANAINA ROSA DE LIMA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
RUMINAIS COM ALTA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE
PRODUÇÃO DE AMÔNIA.**

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
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L732i
2009

Lima, Janaina Rosa de, 1978-

Isolamento e caracterização e bactérias ruminais com
alta atividade específica de produção de amônia / – Viçosa,
MG, 2009.

xiv, 103f : il (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Rúmen – Microbiologia. 2. Rúmen – Fermentação.
3. Proteínas na nutrição animal. 4. Aminoácidos. 5. Amônia
6. Clostridium. 7. Bacteriocinas. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.355

JANAINA ROSA DE LIMA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
RUMINAIS COM ALTA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE
PRODUÇÃO DE AMÔNIA.**

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

APROVADA: 29 de abril de 2009.

Prof^a. Andréa de O. Barros Ribon
(Co-orientador)

Prof. Augusto César de Queiroz
(Co-orientador)

Prof^a. Célia Alencar de Moraes

Dr^a. Rosinéa Aparecida de Paula

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Orientador)

“Não sei se a vida é curta ou longa demais para nós.
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocarmos o coração das pessoas”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia Agrícola, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento à pesquisa.

À Deus que nos momentos difíceis estava sempre presente para acalmar o espírito e fortalecer o corpo para que o trabalho pudesse continuar.

À minha família que mesmo pequena em número de componentes é a maior força que eu encontro e o meu suporte para todas as horas. Meu agradecimento eterno a minha mãe Rute, meu pai Manoel e minha irmã Alaione que são sem dúvida as pessoas a quem eu devo todos os sucessos que eu alcançar. Obrigada mãe e pai por acreditarem em mim e me impulsionar a querer me tornar sempre um ser humano melhor.

A todos os amigos que sempre tornaram o ambiente de trabalho um lugar de agradável convivência, especialmente aos “anaeróbicos”: Aline, Fernanda, Alexandra, Marcelo, Cláudia, Gabi, Débora. Fernandinha, obrigada pelas consultorias em informática. Aos amigos que fiz através do departamento, Bruno Xavier, Esther, Guilherme, Elson, e especialmente à minha amiga Patrícia Leal, pelos momentos felizes e amizade sincera.

À professora Célia Alencar pelo carinho maternal dedicado a mim e pelo profissionalismo e delicadeza que sempre dedicou aos seus estudantes, minha eterna admiração. Ao professor Hilário Mantovani, pela orientação e capacidade profissional. À professora Andréa Ribon pelos conselhos e disponibilidade.

Aos funcionários Nilcéa, Laura, do Departamento de Microbiologia. A todos que me ajudaram direta ou indiretamente na finalização deste trabalho, minha gratidão.

BIOGRAFIA

JANAINA ROSA DE LIMA, filha de Manoel Miguel de Lima e Rute Rosa de Lima, nasceu em São João Nepomuceno, Estado de Minas Gerais, em 26 de fevereiro de 1978.

Graduou-se em maio de 2002, Licenciada em Ciências Biológicas e em março de 2003, Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora.

Iniciou, em março de 2003, o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa com término em fevereiro de 2005.

Inicou em fevereiro de 2005, o curso de doutorado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1.....	3
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1.1. Ruminantes e bovinocultura brasileira.....	3
1.2. Microbiota do rúmen e sua importância na fermentação ruminal.....	4
1.3. Degradação de proteínas no rúmen e produção de amônia.....	8
1.4. Ionóforos.....	10
1.5. Bacteriocinas.....	12
1.6. LITERATURA CITADA.....	15
CAPÍTULO 2.....	25
Avaliação da produção de amônia, atividade específica de produção de amônia e diversidade genética da comunidade de bactérias ruminais de animal alimentado com níveis crescentes de proteína na dieta.....	25
2.1. INTRODUÇÃO.....	25

2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.2.1. Animal e dieta.....	27
2.2.2. Microrganismos e condições de cultivo.....	28
2.2.3. Enriquecimento (transferências) das culturas e diluições seriadas.....	28
2.2.4. Determinação da produção de amônia e atividade específica de produção de amônia.....	29
2.2.5. Extração do DNA da microbiota ruminal.....	29
2.2.6. Análise da diversidade genética da população por PCR-DGGE.....	30
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
2.3.1. Atividade específica de produção de amônia e produção de amônia de microrganismos ruminais obtidos de bovino alimentado com dieta contendo diferentes níveis de proteína bruta.....	32
2.3.2. Análise da diversidade genética da microbiota ruminal de bovino alimentado com diferentes níveis de proteína bruta.....	38
2.4. LITERATURA CITADA.....	45
CAPÍTULO 3.....	50
Isolamento e caracterização de bactérias hiperprodutoras de amônia (HPA) do rúmen	50
3.1. INTRODUÇÃO.....	50
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.2.1. Isolamento de bactérias com alta atividade específica de produção de amônia.....	52
3.2.2. Condições de cultivo dos microrganismos e estocagem das culturas.....	53
3.2.3. Determinação da produção de amônia e atividade específica de produção de amônia.....	54
3.2.4. Análise do crescimento e de produtos do metabolismo microbiano.....	54
3.2.5. Análise bioquímica dos isolados HPA e atividade de desaminação em diferentes aminoácidos.....	55

3.2.6. Diversidade genética dos isolados.....	56
3.2.7. Análise do gene rDNA 16S.....	57
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
3.3.1. Isolados hiperprodutores de amônia (HPA).....	58
3.3.2. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de desaminação de bactérias ruminais.....	59
3.3.3. Análise das características e dos produtos do metabolismo dos isolados HPA.....	62
3.3.4. Análise bioquímica e atividade de desaminação em diferentes fontes de aminoácidos das HPA.....	66
3.3.5. Diversidade genética dos isolados com alta atividade específica de produção de amônia.....	69
3.3.6. Análise da sequência do rDNA 16S.....	73
3.4. LITERATURA CITADA.....	76
CAPÍTULO 4.....	81
Atividade de monensina e bovicina HC5 sobre a degradação de aminoácidos por bactérias ruminais e isolados com alta atividade específica de produção de amônia.....	81
4.1. INTRODUÇÃO.....	81
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	83
4.2.1. Obtenção de líquido ruminal e isolados com alta atividade específica de produção de amônia.....	83
4.2.2. Condições de cultivo dos microrganismos e estocagem das culturas.....	84
4.2.3. Preparação e atividade de bovicina HC5.....	85
4.2.4. Determinação da produção de amônia e atividade específica de produção de amônia.....	85
4.2.5. Enriquecimento e inibição de bactérias desaminadoras.....	86
4.2.6. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA).....	86
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87

4.3.1. Análise do efeito de bovicina HC5 e monensina sobre a atividade de desaminação dos microrganismos ruminais após enriquecimento da microbiota ruminal.....	87
4.3.2. Análise do efeito de bovicina HC5 e monensina sobre a atividade de desaminação dos microrganismos rumianis após diluição seriada da microbiota ruminal.....	89
4.3.3. Efeito de bovicina HC5 e monensina sobre a atividade de desaminação de microrganismos hiperprodutores de amônia.....	92
4.4. LITERATURA CITADA.....	98
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. AEPA (A) e produção de amônia (B) de culturas de microrganismos ruminais cultivadas em meio contendo Trypticase. 33

Figura 2. AEPA (A) e produção de amônia (B) de culturas de microrganismos ruminais cultivadas em meio contendo Trypticase. 35

Figura 3. (A) Perfil eletroforético obtido por eletroforese em gel de gradiente desnaturantes (DGGE) de fragmentos do gene rDNA 16S da microbiota ruminal presentes no rúmen de bovino alimentado com diferentes níveis de proteína bruta (PB). (B) Análise do perfil eletroforético através do programa GelCompar II[®]. 39

Figura 4. A) Perfil eletroforético obtido por eletroforese em gel de gradiente desnaturantes (DGGE) de fragmentos do gene rDNA 16S da microbiota ruminal recebendo 8% proteína bruta (PB) na dieta. (B) Análise do perfil eletroforético através do programa GelCompar II[®]. 40

Figura 5. (A) Perfil eletroforético obtido por eletroforese em gel de gradiente desnaturantes (DGGE) de fragmentos do gene rDNA 16S da microbiota ruminal recebendo 18% proteína bruta (PB) na dieta. (B) Análise do perfil eletroforético através do programa GelCompar II[®]. 41

Figura 6. (A) Perfil eletroforético obtido por eletroforese em gel de gradiente desnaturantes (DGGE) de fragmentos do gene rDNA 16S da microbiota ruminal recebendo 24% proteína bruta (PB) na dieta. (B) Análise do perfil eletroforético através do programa GelCompar II[®]. 42

Figura 7. Produção de amônia por microrganismos ruminais que não receberam tratamento térmico. 59

Figura 8. Produção de amônia por microrganismos ruminais que receberam tratamento térmico sem enriquecimento prévio. 61

Figura 9. Produção de amônia por microrganismos ruminais que foram enriquecidos com suplementação de Trypticase (15 g/L) por 24 horas. 61

Figura 10. Curva de crescimento dos isolados hiperprodutores de amônia (HPA). 64

Figura 11. Análise da diversidade genética dos isolados com alta atividade específica de produção de amônia. 69

Figura 12. Dendrograma obtido pelo método UPGMA mostrando as relações genéticas entre os isolados com base na tipagem BOX-PCR. 72

Figura 13. Análise filogenética dos isolados hiperprodutores de amônia (HPA). 74

Figura 14. Efeito da adição de bovicina HC5 (●) e monensina (■) sobre a produção de amônia pela microbiota ruminal cultivada em meio contendo Trypticase. 88

Figura 15. Perfil eletroforético em gel de análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) da microbiota ruminal enriquecida em meio mineral anaeróbio adicionado de Trypticase como única fonte de carbono. 89

Figura 16. (A) Efeito da adição de bovicina HC5 (50 AU/mL), monensina (5μM) e células de *S. bovis* HC5 (5% v/v) sobre a produção de amônia pela microbiota ruminal e densidade óptica ao final de 24 horas de incubação a 39 °C (B). 90

Figura 17. Efeito da Bovicina HC5 (32 UA/mL) e monensina (5 μM) sobre a produção de amônia por microrganismos ruminais ressuspensos em meio mineral anaeróbio adicionado de 15 g/L de Trypticase. 92

Figura 18. Efeito da Bovicina HC5 (32 AU/mL) e monensina (5 μM) sobre a atividade específica de produção de amônia por microrganismos ruminais. 93

Figura 19. Efeito da adição de bovicina HC5 (B) e monensina (C) sobre o crescimento da microbiota ruminal. (A) Tratamento controle sem adição de bovicina HC5 ou monensina.

95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da ração contendo níveis crescentes de proteína bruta na dieta	27
Tabela 2. Características de isolados de bacilos gram-positivos esporulados com alta produção específica de amônia.	63
Tabela 3. Produtos da fermentação dos isolados HPA cultivados durante 48 horas a 39 °C em meio anaeróbio suplementado com Trypticase (15 g/L).	65
Tabela 4. Características bioquímicas dos isolados HPA.	66
Tabela 5. Atividade específica de produção de amônia em diferentes aminoácidos pelos isolados hiperprodutores de amônia (HPA).	68
Tabela 6. Matriz da distância genética euclidiana média entre os isolados.	71

RESUMO

LIMA, Janaina Rosa de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2009.
Isolamento e caracterização de bactérias ruminais com alta atividade específica de produção de amônia. Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-orientadores: Andréa de Oliveira Barros Ribon e Augusto César de Queiroz.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a produção de amônia em bovinos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de proteína bruta e averiguar o impacto da dieta sobre a diversidade genética do ecossistema ruminal; isolar e caracterizar fisiológica e geneticamente bactérias ruminais com alta atividade específica de produção de amônia e determinar o efeito de monensina e bovicina HC5 sobre a atividade de desaminação dos isolados bacterianos hiperprodutores de amônia. A produção total de amônia e a atividade específica de produção de amônia (AEPA) de culturas mistas e puras obtidas a partir do líquido ruminal de animal submetido a dietas contendo níveis crescentes de proteína foram analisadas. As culturas foram incubadas em meio mineral anaeróbico contendo Trypticase (15 g/L) e a atividade de desaminação foi determinada. A diversidade genética da microbiota ruminal do animal alimentado com dieta contendo concentrações crescentes de proteína e das culturas de enriquecimento transferidos *in vitro* na presença de Trypticase foi analisada por *Denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE). Verificou-se que a habilidade de desaminar aminoácidos variou entre as culturas de bactérias ruminais colhidas de bovino alimentado com 8, 18 e 24 % de proteína bruta (PB). Aliquotas de líquido ruminal que foram diluídas sucessivamente (incrementos de 10 vezes) apresentaram menor atividade de desaminação de Trypticase. A AEPA decresceu linearmente com a diluição da microbiota ruminal, tendo sido inferior a 10 nmoles de amônia/mg proteína/min após a diluição 10^{-4} (8 e 18% de PB) ou 10^{-5} (24 % de PB). A análise da diversidade genética da microbiota ruminal pela técnica de DGGE não indicou mudanças significativas na composição da comunidade microbiana entre o primeiro e o

último dia de alimentação com cada dieta. Para as transferências a partir da dieta com 8%, 18 % e 24 % de PB, observou-se variação nos perfis de bandas correspondentes às diferentes espécies microbianas presentes nas amostras. A cultura oriunda da dieta contendo 24% de PB foi a que apresentou maior produção de amônia e adaptação mais rápida a Trypticase. Bactérias que apresentaram alta atividade específica de produção de amônia foram isoladas e parâmetros metabólicos foram avaliados. As estratégias de isolamento utilizadas permitiram a obtenção de quatorze isolados (culturas 27B, 35, 53P, 57A, 86A, 86C, 92B, 99A, 102, 102B, 103, 15A, 15B e CT2) com alta atividade específica de produção de amônia. Esses microrganismos foram caracterizados como bastonetes gram-positivos, capazes de produzir esporos termoresistentes e de crescerem em condições de anaerobiose. Os resultados obtidos indicaram que os isolados se diferenciam quanto à taxa de desaminação e velocidade de crescimento em meio contendo Trypticase. Entretanto, foi observado que esses isolados compartilharam características culturais e produtos de fermentação comuns. As análises bioquímicas dos microrganismos relacionados nesse trabalho mostraram que vários isolados foram capazes de fermentar carboidratos. Quando os isolados foram incubados com aminoácidos, verificou-se alta atividade específica de produção de amônia a partir de fenilalanina, glutamina, Isoleucina, leucina, serina, tirosina e treonina. A análise da diversidade genética dos quatorze isolados com alta atividade específica de produção de amônia pela técnica de BOX-PCR resultou em padrões de bandas distintos entre os isolados e culturas hiperprodutoras de amônia previamente descritas na literatura. Com base nos dados do seqüenciamento do rDNA 16S foi determinado que os isolados 57A, 86A, 99A, 102 e 15A apresentaram identidade de 96 %, 99 %, 93 %, 94 % e 99 % respectivamente, com *Clostridium botulinum* e o isolado RF2B, oriundo de fezes de suíno, porém ainda não caracterizado. Os isolados 15B e CT2 apresentaram identidade de 94 % e 88 % respectivamente com *Clostridium hastiforme*. A sensibilidade da microbiota ruminal e dos isolados hiperprodutores de amônia do rúmen à bacteriocina bovina HC5 e ao ionóforo monensina foi avaliada e os resultados demonstraram que a bacteriocina HC5 inibiu a produção de amônia pela microbiota ruminal e pelos isolados hiperprodutores de amônia caracterizados neste trabalho. Considerando os resultados obtidos neste trabalho, infere-se que a microbiota ruminal de bovinos de clima tropical apresenta bactérias com alta atividade específica de produção de amônia relacionadas ao gênero *Clostridium* que podem contribuir para as perdas de nitrogênio dietético no rúmen.

ABSTRACT

LIMA, Janaina Rosa de, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2009. **Isolation and characterization of rumen bacteria with high specific activity of ammonia production.** Advisor: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-Advisors: Andréa de Oliveira Barros Ribon and Augusto César de Queiroz.

The objectives of this study was to evaluate the production of ammonia in cattle fed diets containing increasing levels of crude protein and investigate the impact of diet on the genetic diversity of the rumen ecosystem, isolate and characterize physiological and genetically rumen bacteria with high specific activity, production ammonia and determine the effect of monensin and bovicina HC5 on deamination of the bacterial isolates hiperprodutores ammonia. The total production of ammonia and specific activity of ammonia production (SAAP) of pure and mixed cultures obtained from the rumen of animals fed diets containing increasing levels of protein were analyzed. Cultures were incubated in anaerobic mineral medium containing Trypticase (15 g/L) and deamination was determined. The genetic diversity of the rumen microflora of the animal fed a diet containing increasing concentrations of protein and the enrichment cultures transferred in vitro in the presence of Trypticase was analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). It was found that the ability of deaminated amino acids varied between the cultures of ruminal bacteria harvested from cattle fed with 8, 18 and 24% crude protein (CP). Aliquots of rumen fluid were diluted successively (increments of 10 times) reduced deamination of Trypticase. The SAAP decreased linearly with the dilution of the rumen microbiota, was less than 10 nmoles ammonia / mg protein / min after dilution 10⁻⁴ (8 and 18% CP) or 10⁻⁵ (24% CP). Analysis of genetic diversity of the rumen microbiota by DGGE technique did not indicate significant changes in microbial community composition between the first and last days of feeding with each diet. For transfers from the diet with 8, 18 and 24% CP, there were changes in the profiles of bands corresponding to different microbial species present in

the samples. The culture originated from the diet containing 24% CP showed the highest production of ammonia and adapt more quickly to Trypticase. Bacteria that showed high specific activity of ammonia production were isolated and metabolic parameters were evaluated. The strategies used in isolation has been obtained from fourteen isolates (cultures 27B, 35, 53P, 57A, 86A, 86C, 92B, 99A, 102, 102B, 103, 15A, 15B and CT2) with high specific activity of ammonia production. These organisms were characterized as Gram-positive, capable of producing heat-resistant spores and grow under anaerobic conditions. The results indicated that the isolates differ in the rate of deamination and growth rate in medium containing Trypticase. However, it was observed that these isolates shared cultural characteristics and fermentation products in common. The biochemical analysis of microorganisms involved in this work showed that several isolates were able to ferment carbohydrates. When the isolates were incubated with amino acids, there was high specific activity of ammonia production from phenylalanine, glutamine, isoleucine, leucine, serine, tyrosine and threonine. Analysis of genetic diversity among fourteen isolates with high specific activity of ammonia production by the technique of BOX-PCR resulted in different band patterns among the isolates and cultures hiperprodutoras ammonia previously described in the literature. Based on data from the sequencing of 16S rDNA was determined that the isolates 57A, 86A, 99A, 102 and 15A showed identity of 96%, 99%, 93%, 94% and 99% respectively with *Clostridium botulinum* and isolated RF2B, coming feces of pigs, but not yet characterized. Isolates 15B and CT2 had 94% identity and 88% respectively with *Clostridium hastiforme*. The sensitivity of rumen microbes and isolated hiperprodutores ammonia rumen bacteriocin bovicin HC5 and the ionophore monensin was evaluated and the results showed that bovicin HC5 inhibited the production of ammonia by ruminal microbes and the isolated hiperprodutores ammonia characterized in this work. Considering the results obtained in this study, it appears that ruminal microbes of cattle tropical bacteria present with high specific activity of ammonia production related to the genus *Clostridium* that may contribute to the loss of dietary nitrogen in the rumen.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil destaca-se mundialmente por sua elevada produção de carne e leite. O país possui o segundo maior rebanho bovino do mundo. Os países asiáticos e europeus constituem os principais mercados importadores da carne bovina brasileira. Com relação à pecuária leiteira, os estados de Minas Gerais e São Paulo destacam-se como maiores produtores de leite e garantem a exportação de produtos lácteos para os EUA e países da Europa.

Ruminantes como bovinos, dependem de uma associação simbiótica com microrganismos do rúmen para degradarem alimentos fibrosos e disponibilizarem nutrientes e produtos de fermentação necessários para o metabolismo de animal. Propionato representa o principal substrato gliconeogênico para o hospedeiro. Entretanto, alguns produtos da fermentação, tais como metano e amônia podem ser indesejáveis.

Em animais ruminantes a maioria da proteína dietética é convertida pela fermentação dos microrganismos ruminais em amônia, que é utilizada na promoção do crescimento da microbiota ruminal. Entretanto, quando a taxa de produção de amônia ultrapassa a taxa de assimilação pelos microrganismos, ocorre perda do nitrogênio dietético devido à excreção de uréia na urina do animal. Na década de 80 e 90 foram isolados microrganismos ruminais que possuíam taxas de desaminação cerca de 10 a 15 vezes maiores do que os microrganismos fermentadores de carboidrato que habitam o

rúmen. Esses microrganismos foram denominados hiperprodutores de amônia por serem fermentadores obrigatórios de aminoácidos. Estudos anteriores indicaram que essas bactérias podem contribuir para perdas do nitrogênio dietético.

A proteína é o componente mais caro da dieta dos ruminantes, porém não existem estudos no país sendo realizados para averiguar a ocorrência e relevância ecológica de bactérias com alta atividade específica de produção de amônia no ecossistema ruminal de animais mantidos a pasto ou em sistemas de confinamento. Vários métodos têm sido utilizados para manipular a fermentação ruminal visando minimizar as perdas nutricionais.

Bacteriocinas, que são substâncias antimicrobianas de natureza protéica, têm sido indicadas como uma estratégia alternativa para alterar os produtos da fermentação ruminal, objetivando maximizar a produtividade animal. Neste contexto, torna-se importante averiguar o impacto da dieta sobre a microbiota ruminal e seus produtos de fermentação, bem como determinar as alterações na composição das comunidades microbianas do rúmen, principalmente aquelas envolvidas no metabolismo de nitrogênio.

Neste trabalho objetivou-se: (1) avaliar a produção de amônia em bovinos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de proteína bruta e averiguar o impacto da dieta sobre a diversidade genética do ecossistema ruminal; (2) isolar e caracterizar fisiológica e geneticamente bactérias ruminais com alta atividade específica de produção de amônia; (3) determinar o efeito de monensina e bovicina HC5 sobre a atividade de desaminação dos isolados bacterianos hiperprodutores de amônia.

CAPÍTULO 1.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Ruminantes e bovinocultura brasileira

Ruminantes são membros da Subordem Ruminantia, na qual se insere a família Bovidae. Caracterizam-se por serem mamíferos herbívoros que possuem estômago dividido em quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e obomaso, sendo o rúmen o maior deles (HUNGATE, 1966). O trato gastrintestinal desse tipo de animal possui condições ideais para o crescimento de microrganismos anaeróbios (KOZLOSKI, 2002). Mais de 180 espécies de animais ruminantes já foram descritas, porém, a domesticação de bovinos, ovinos e caprinos destaca-se pela importância econômica desses animais.

Animais ruminantes, tais como bovinos leiteiros e de corte, possuem grande importância econômica para o Brasil (SIMPEP, 2005). O País detém o segundo maior efetivo bovino do mundo (em torno de 204 milhões de cabeças), sendo superado apenas pela Índia onde a produção de carne tem importância reduzida em função dos aspectos culturais que interferem no consumo desse produto (EMBRAPA/CNPGC, 2006).

Além de abastecer um mercado interno de grande magnitude, o Brasil vem se destacando de forma crescente no mercado mundial, tendo alcançado a condição de

maior exportador de carne bovina em 2003, com mais de 1,3 milhões de toneladas equivalente-carcaça, que renderam US\$ 1,5 bilhão. Líder mundial, em 2003 o Brasil exportou carne bovina para 104 países (EMBRAPA/CNPGC, 2006; ARAÚJO, 2006). Além disso, em 15 anos, a produção nacional de leite passou de 11,1 bilhões de litros para 25,7 bilhões. Isso representa um crescimento de 131% entre os anos de 1980 e 2006, transformando o País, de tradicional importador, em exportador de lácteos (EMBRAPA/CNPGL, 2006).

1.2. Microbiota do rúmen e sua importância na fermentação ruminal

O rúmen constitui um ambiente favorável para o crescimento microbiano, atuando como câmara de fermentação com condições estáveis, tais como: temperatura entre 38 a 42°C (média de 39°C); anaerobiose; pH variando entre 5,5 a 7,0 (média de 6,8); presença de bactérias, protozoários e fungos; suprimento constante de nutrientes e contínua remoção de digesta e dos produtos de fermentação; matéria seca entre 10 a 15%; gravidade específica entre 1,022 e 1,055; tensão superficial do líquido de 50 dinas/cm e pressão osmótica constante (LANA, 2005).

Existe grande diversidade de espécies bacterianas no rúmen. A enumeração direta de bactérias indicou que o número desses microrganismos pode ser maior que 10^{10} UFC (unidades formadoras de colônia) por mL de conteúdo ruminal. A maioria dos microrganismos ruminais é estritamente anaeróbia e perde viabilidade celular quando a concentração de oxigênio atinge índices maiores que 1 parte por milhão ou quando o potencial redox é maior do que -0,3 volts. A sensibilidade desses microrganismos ao oxigênio se deve em parte, ao fato de não possuírem enzimas (superóxido desmutase e catalase) capazes de destoxificar moléculas reativas de oxigênio (O_2 ; H_2O_2). (RUSSELL, 2002 ; ATTWOOD et al., 1998; LANA, 2005).

A identificação e o estudo do metabolismo das espécies bacterianas ruminais foi estimulada somente após a Segunda Guerra Mundial (meados do século XX), pelo desenvolvimento de técnicas anaeróbias para o cultivo de microrganismos (HUNGATE, 1966). Antes disto, o conhecimento sobre a ecologia microbiana do rúmen e a

fermentação ruminal eram limitados. A importância da microbiota ruminal está associada ao seu papel na fermentação de substratos solúveis e insolúveis, proteínas e lipídios da dieta (RUSSELL, 2002). Quando o alimento chega ao rúmen, as bactérias aderem-se à fração sólida (digesta e parede do rúmen) e possibilitam a hidrólise de componentes da dieta, polissacarídeos não-estruturais, facilmente degradados pela atividade enzimática da microbiota ruminal e polissacarídeos estruturais, componentes fibrosos da dieta que compõem grande parte da parede celular vegetal e são mais resistentes ao ataque microbiano (HUNGATE, 1966). Para serem utilizados pelos ruminantes, esses polímeros devem ser degradados a substâncias de baixa massa molecular, tais como açúcares, oligossacarídeos, aminoácidos e peptídeos.

A fermentação ruminal é um processo exergônico onde carboidratos e outros substratos são convertidos a produtos finais de fermentação como acetato, propionato, butirato, amônia, metano CO_2 , H_2 e biomassa microbiana (HUNGATE, 1966; RYCHLIK e RUSSELL, 2001). Parte dos ácidos orgânicos (acetato, propionato e butirato) é absorvida pelo epitélio ruminal e atuam como as principais fontes de energia para o ruminante (ANNISON e LEWIS, 1959). O acetato e o propionato absorvidos são transportados através da corrente sanguínea até o fígado onde são absorvidos atuando como substratos para a gliconeogênese hepática do animal (ALLEN *et al.*, 2005). Parte da energia da fermentação é conservada na forma de ATP que é utilizado em reações anabólicas (formação de biomassa microbiana) e na manutenção das funções celulares (KOZLOSKI, 2002).

As bactérias presentes no rúmen também possuem a importante função de suprir os animais ruminantes nas suas necessidades diárias de vitaminas do complexo B e K. Concentrações dessas vitaminas, principalmente de tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2) e ácido nicotínico geralmente são maiores no conteúdo ruminal do que nos próprios alimentos consumidos pelos animais. A maior parte da tiamina encontra-se dissolvida no líquido ruminal, assim como cerca de 40% da biotina, ácido pantotênico e piridoxina (vitamina B6) e podem, dessa forma, serem absorvidas pelas paredes do rúmen. Já as vitaminas riboflavina, ácido nicotínico, ácido fólico e vitamina B12 encontram-se dentro da célula microbiana (SALES *et al.*, 2003).

Usualmente, bactérias ruminais são classificadas de acordo com a atuação de cada grupo no processo de fermentação no rúmen. Os principais grupos de microrganismos do rúmen são ativos na degradação da celulose, hemicelulose, lignina, amido, proteína e lipídeos. Bactérias celulolíticas produzem celulases extracelular,

responsáveis pela hidrólise da celulose (CHENG e COSTERTON, 1986). Essas espécies geram como produtos finais de fermentação principalmente, acetato, propionato, butirato, succinato, formato, etanol, lactato, CO₂ e H₂ (HUNGATE, 1966). Segundo DEHORITY (1987) e VAN SOEST (1982), as principais espécies celulolíticas são *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Bacteroides succinogenes* e *Butyrivibrio fibrisolvens*. Bactérias amilolíticas são as responsáveis pela degradação do amido da dieta, pela enzima amilase. *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium* fermentam amido e açúcares solúveis produzindo acetato, formato, etanol e propionato (RUSSELL *et al.*, 1988). As archaea metanogênicas (anaeróbias estritas) são organismos capazes de produzir metano. Essas archaeas têm papel importante na regulação da fermentação pela remoção das moléculas de H₂ (TEIXEIRA, 1991). O gênero *Methanobacterium* utiliza o H₂ presente no meio, contribuindo para a regeneração de co-fatores, como NAD⁺ e NADP⁺ (VAN SOEST, 1982). Bactérias proteolíticas presentes no rúmen são capazes de degradar proteína e produzir succinato, acetato, formato e propionato. *Prevotella* e *Bacteroides* são exemplos de gêneros de bactérias proteolíticas (TEIXEIRA, 1991; VAN SOEST, 1982).

A ação combinada de bactérias proteolíticas, como *Prevotella ruminicola*, e de outras espécies de bactérias gram-positivas que fermentam aminoácidos contribuem para a produção de amônia no rúmen (RUSSELL *et al.*, 1988; CHEN e RUSSELL, 1989; MADEIRA *et al.*, 1997). BLADEN *et al.* (1961) examinaram a capacidade de várias bactérias do rúmen em desaminar proteínas hidrolisadas, porém, a maioria das espécies produziu pouca quantidade de amônia. Baseado na atividade e no número dos microrganismos no rúmen, eles concluíram que *P. ruminicola* foi a principal bactéria responsável pela produção de amônia *in vitro*. Trabalhos posteriores, entretanto, indicaram que essa espécie não poderia ser responsável pela acumulação de amônia *in vivo* (RUSSELL, 1996).

Na década de 1980, foram descobertas três espécies de bactérias que ocorriam em pequeno número no rúmen, porém, apresentavam alta atividade específica de produção de amônia. Essas bactérias não utilizavam carboidratos como fonte de energia e eram fermentadoras obrigatórias de aminoácidos (RUSSELL *et al.*, 1988; CHEN e RUSSELL, 1989). *Peptostreptococcus anaerobius* C, *Clostridium sticklandii* SR e *Clostridium aminophilum* F foram classificadas como bactérias gram-positivas, sensíveis à monensina e hiperprodutoras de amônia (RUSSELL e STROBEL, 1989;

PASTER *et al.*, 1993; ATTWOOD *et al.*, 1998). Bactérias que fermentam carboidratos no rúmen geralmente possuem taxa de desaminação de aminoácidos em torno de 20 nmoles/mg proteína/min, enquanto que as bactérias hiperprodutoras de amônia (HPA) atingem taxas 15 vezes maiores (PASTER *et al.*, 1993).

As HPA já estudadas possuem pouca capacidade proteolítica. Como essas bactérias não utilizam carboidratos como fonte de energia para o crescimento, parecem ser responsáveis por um terço da produção total de amônia no rúmen (RUSSELL, 1988; RUSSELL, 1996). Entretanto, as espécies já caracterizadas foram obtidas apenas de animais de clima temperado submetidos a dietas ricas em proteínas (RUSSELL e STROBEL, 1989; PASTER *et al.*, 1993; KRAUSE E RUSSELL, 1996; ATTWOOD *et al.*, 1998). No entanto, pouco se conhece sobre a diversidade e abundância de bactérias desaminadoras em bovinos de clima tropical, alimentados com dietas variadas (forragem e concentrado).

ATTWOOD e colaboradores (1998) isolaram na Nova Zelândia bactérias hiperprodutoras de amônia de animais que se alimentavam preferencialmente de forragens ricas em proteínas, porém, com baixa disponibilidade de carboidratos solúveis. Estudos com carneiros, entretanto, demonstraram que parte da proteína dietética era perdida devido à produção e fluxo excessivo de amônia no rúmen, acarretando altas perdas de nitrogênio pelo animal. As HPA isoladas naquele estudo apresentaram taxas de crescimento, características filogenéticas e bioquímicas distintas de todos os outros microrganismos hiperprodutores de amônia já descritos (ATTWOOD *et al.*, 1998).

Como a maioria das bactérias ruminais que fermentam carboidratos não utiliza aminoácidos como fonte preferencial de carbono e nitrogênio, é possível enriquecer *in vitro* as espécies obrigatoriamente fermentadoras de aminoácidos (BLADEN *et al.*, 1961). O sequenciamento do rDNA 16S dessas espécies tem possibilitado a obtenção de sondas de rRNA para estudos de enumeração *in vivo*. Experimentos de hibridização indicaram que as bactérias fermentadoras de aminoácidos representam aproximadamente 3,5% da microbiota ruminal de animais consumindo dietas à base de feno com 9% proteína dietética (KRAUSE e RUSSELL, 1996).

1.3. Degradação de proteínas no rúmen e produção de amônia

As proteínas dos alimentos, mais as proteínas endógenas da saliva, as células epiteliais descamadas e os restos dos microrganismos lisados, juntos, constituem o *pool* de proteínas potencialmente fermentáveis no rúmen (NOLAN, 1993; VAN SOEST, 1994). Considera-se que a degradabilidade da proteína no rúmen refere-se ao processo de conversão da proteína da dieta até amônia, envolvendo então, as etapas de digestão da proteína até aminoácidos e de fermentação dos aminoácidos a ácidos orgânicos (BRODERICK *et al.*, 1991 e RUSSELL *et al.*, 1991). Segundo RUSSELL *et al.* (1991) o termo fermentação refere-se as etapas de desaminação e formação de produtos finais, enquanto que digestão refere-se as etapas iniciais de degradação protéica. A degradação da proteína é um processo múltiplo envolvendo solubilização, hidrólise extracelular, transporte para o interior da célula, desaminação e a formação de amônia, ácidos orgânicos, CO₂ e metano (OWENS e ZINN, 1988; RUSSELL *et al.*, 1991; DEWHURST *et al.*, 2000).

Entre 30 e 50% de bactérias isoladas da digesta ruminal produzem proteases extracelulares que contribuem para a atividade proteolítica no rúmen (PRINS *et al.*, 1983). Estudos diferenciados entre bactérias e protozoários têm indicado que ambos possuem atividade proteolítica, mas a atividade específica das bactérias parece ser 6 a 10 vezes maior do que a dos protozoários (COTTA e HESPELL, 1986), ou aproximadamente 152,6 e 14,4 µg de proteína degradada por hora, respectivamente (BROCK *et al.*, 1982).

O primeiro passo para que se efetive a proteólise dos compostos dietéticos é a adsorção da proteína solúvel à superfície bacteriana (NUNGENT e MANGAN, 1981) ou a adsorção da bactéria à partícula insolúvel de proteína (BRODERICK *et al.*, 1991). As enzimas proteolíticas estão intimamente associadas à parede celular bacteriana (NRC, 1985; OWENS e ZINN, 1988) explicando a necessidade de adsorção inicial à partícula protéica para que se tenha início ao processo de proteólise. A hidrólise da proteína pelas enzimas microbianas libera oligopeptídeos, os quais são então hidrolisados em peptídeos e aminoácidos (WALLACE e COTTA, 1988), tornando-se prontamente disponíveis para serem absorvidos pelas bactérias. Posteriormente, os

peptídeos e aminoácidos são hidrolisados por endopeptidases localizadas no citoplasma da bactéria (BACH *et al.*, 2005).

O sistema Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS), integra as taxas de degradação das diferentes frações de carboidratos e proteínas na síntese de proteína microbiana, além de considerar a taxa de fermentação ruminal e o fluxo de nutrientes para absorção intestinal. O sistema CNCPS fraciona as proteínas na fração A (solúvel, nitrogênio não protéico, NNP); fração B1 (solúvel rapidamente degradada no rúmen); fração B2 (fração solúvel, com degradação intermediária no rúmen); fração B3 (insolúvel, lentamente degradada no rúmen); e a Fração C (indigestível durante sua permanência no trato gastrintestinal) (FOX *et al.*, 2000). A hidrólise de peptídeos a aminoácidos deve ocorrer para que os aminoácidos possam ser incorporados na proteína microbiana, que fornece até 90% do nitrogênio orgânico que chega ao intestino do ruminante (RUSSELL, 2000).

O metabolismo bacteriano dos aminoácidos absorvidos é complexo. Os aminoácidos são hidrolisados por desaminação oxidativa, formando α -cetoácidos e amônia, utilizados no processo de fermentação para produção de energia e na síntese de proteína microbiana (NOCECK e RUSSEL, 1988; BRODERICK *et al.*, 1991; RUSSELL, 2000). No citosol, ocorrem reações de transaminação, utilizando amônia e α -cetoácidos. No entanto, para polimerizar os aminoácidos formando as proteínas, o microrganismo depende da disponibilidade de ATP.

O processo de captação de nitrogênio do meio, na forma de amônia é realizado através do sistema enzimático de alta afinidade que utiliza as enzimas glutamato sintase (que não requer energia) e glutamamina sintetase (exige ATP, e é utilizado quando níveis de amônia no meio estão baixos, menor do que 1 mM) (ERFLE *et al.*, 1977). A amônia pertence à classe de substâncias chamadas eletrólitos fracos, e em solução, existem duas formas, a ionizada (NH_4^+) e a não ionizada (NH_3) (VISEK, 1984).

A proporção de amônia na forma não ionizada, que pode ser rapidamente incorporada através de difusão passiva, é pequena (0,38 a 2,50% para pH de 6,62 a 7,42) (HUNTINGTON e ARCHIBEQUE, 1999), entretanto, quando a taxa de desaminação excede a taxa de assimilação pelos microrganismos ruminais, o catabolismo protéico contribui para a alta produção de amônia e baixa retenção do nitrogênio, constituindo um processo indesejável e ineficiente (WALLACE *et al.*,

1995). Segundo RUSSEL *et al.* (1992) quanto maior a degradabilidade da proteína da ração, maior será a produção de amônia e, possivelmente, maiores serão as perdas de nitrogênio protéico através da excreção de compostos nitrogenados na forma de uréia pela urina do animal.

Visando reduzir as perdas de nitrogênio protéico decorrentes do metabolismo microbiano e aproximar a fermentação ruminal das características ideais, vários métodos têm sido utilizados para modificar as comunidades microbianas do rúmen e aumentar a eficiência da digestibilidade dos alimentos (WEIMER, 1998). A manipulação da fermentação ruminal pode ser processada por intervenção em três níveis, que inclui a manipulação da dieta, tornando-a mais palatável ou aumentando a digestibilidade de carboidratos estruturais; alteração da fisiologia do ruminante, como administração de colinérgicos (carbacol, pilocarpina), que envolve o aumento da produção salivar e maior atividade funcional do intestino (aumento da absorção pelo epitélio); modificação da microbiota ruminal, visando melhorar a eficiência de utilização de nutrientes ou inibindo grupos específicos de microrganismos que causam perdas de nitrogênio dietético, através da incorporação de probióticos (p. ex. *Saccharomyces cerevisiae*) e ionóforos (lasalocida, monensina), respectivamente (FAHEY *et al.*, 1993; MADEIRA *et al.*, 1997).

1.4. Ionóforos

Ionóforos foram inicialmente desenvolvidos como coccidiostáticos (SCHELLING, 1984), porém, seus efeitos benéficos também foram percebidos na fermentação ruminal (POTTER *et al.*, 1984; RUSSELL, 1997). Esses compostos poliésteres são moléculas carreadoras de íons que formam, em associação com cátions, complexos que podem ser transportados através da membrana lipídica de microrganismos (PRESSMAN e FAHIM, 1982). Monensina é um composto ionóforo produzido por linhagens de *Streptomyces cinnamonensis*, um actinomiceto, (RICHARDSON *et al.*, 1976) que teve seu uso aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) na década de 1970, e desde então tem sido adicionado na ração de bovinos para aumentar a eficiência alimentar (RUSSELL e STROBEL, 1989). Estudos posteriores indicam sua eficácia na diminuição de perdas relacionadas à degradação de

aminoácidos e acumulação de amônia no rúmen (RUSSEL, 1988; CHEN e RUSSELL, 1989), além de aumentar a disponibilidade de energia para o animal (POTTER *et al.*, 1984).

Os ionóforos modificam o movimento de íons através das membranas celulares, afetando o gradiente de prótons e a transdução de energia. Na tentativa de manter o gradiente de prótons, as células utilizam energia (ATP) e as ATPases de membrana. Este gasto de energia pode causar diminuição do crescimento até a morte da célula. Como os microrganismos utilizam mecanismos de transporte ativo secundário para a absorção de nutrientes, a atividade dos ionóforos afeta diretamente o desenvolvimento dos microrganismos do rúmen e do intestino grosso (RUSSELL e STROBEL, 1989).

Estudos realizados com gado de corte demonstraram que antibióticos inibidores de bactérias gram-positivas diminuem a produção de metano e amônia no rúmen e melhoraram a eficiência de utilização dos alimentos (RUSSELL e STROBEL, 1989). NAGARAJA *et al.* (1997) constataram redução de 4 % no consumo de matéria seca, aumento de 5% no ganho de peso e 9 % na melhoria da conversão alimentar em ruminantes alimentados com feno e alimentos concentrados. Estudos posteriores utilizando sondas para rRNA 16S indicaram que monensina eliminou completamente microrganismos hiperprodutores de amônia como *C. sticklandii* SR e *P. anaerobius* C do rúmen. Porém, a atividade de monensina contra *C. aminophilum* F não foi eficiente (KRAUSE e RUSSELL, 1996; RUSSELL, 1996).

Entretanto, monensina pode ser tóxico para humanos e animais (PRESSMAN e FAHIM, 1982) e a utilização de antibióticos em doses subterapêuticas na alimentação animal tem sido amplamente criticada (van den BOGAARD e STROBBERRING, 2000). Dentre as novas estratégias sugeridas para modificar a fermentação ruminal destaca-se o uso de compostos tamponantes, inibidores da metanogênese, suplementação lipídica, ácidos orgânicos e bacteriocinas (KLIEVE e HEGARTY, 1999; RUSSELL e MANTOVANI, 2002).

1.5. Bacteriocinas

Bacteriocinas são substâncias antimicrobianas de natureza protéica, produzida por bactérias gram-positivas e gram-negativas que apresentam espectro de ação amplo e variado (DIEP e NES, 2002). Bacteriocinas são nomeadas e agrupadas baseando-se na sua sequência de aminoácidos (JACK *et al.*, 1995) e diferem entre si em seu espectro de atividade, características bioquímicas e genéticas (KLAENHAMMER, 1998). KLAENHAMMER (1993) classificou as bacteriocinas em quatro classes. A Classe I que contém os lantibióticos que são pequenos peptídeos (19-38 aminoácidos, com peso molecular inferior a 5 kDa), formados por modificações pós-traducionais de serina e treonina que em suas formas desidratadas reagem com cisteína e formam anéis de lantionina. A Classe II formada por pequenas proteínas termoestáveis e tem como representantes pidiocina PA-1, leucocina a, lactococcina G, lactacina F. A Classe III e IV possuem proteínas maiores (> 30 kDa), termolábeis como helveticinas e leuconocina (KLAENHAMMER, 1988; ALISSON *et al.*, 1994; COTTER *et al.*, 2005). Um novo esquema de classificação foi proposto por COTTER *et al.* (2005), o qual agrupa as bacteriocinas em duas classes distintas: lantibióticos contendo lantionina (Classe I) e bacteriocinas não lantibióticos (Classe II).

Os genes que codificam bacteriocinas podem estar localizados em plamídeos ou no cromossomo e estão organizados em operons. O gene estrutural codifica um pré-peptídeo que é o precursor da bacteriocina madura (KLAENHAMMER, 1993, SAHL *et al.*, 1995). A proteína de imunidade e de processamento previne a inibição dos microrganismos produtores de bacteriocinas pelos seus próprios peptídeos e garantem que a bacteriocina madura seja formada e exportada através da membrana, respectivamente (MARUGH *et al.*, 1992; VAN DER MEER *et al.*, 1993). A maioria das bacteriocinas da classe I e II é transportada para fora da célula por um sistema de transporte ABC (COTTER *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação de bacteriocinas das classes I e II envolve, inicialmente, a ligação da bacteriocina aos receptores específicos ou não específicos na membrana celular da bactéria alvo. Em seguida, ocorre a inserção da bacteriocina na membrana causando a dissipação da força proto-motora e a agregação de monômeros resultando na formação de poros, por onde a célula perde material intracelular (MONTVILLE e CHEN, 1998; ENNHAHAR *et al.*, 2000). Várias bacteriocinas produzidas por bactérias

do ácido láctico são peptídeos anfipáticos que se inserem na membrana celular de microrganismos sensíveis aumentando a permeabilidade e causando perda de íons, aminoácidos e ATP (DEEGAN *et al.*, 2006). A nisina, produzida por *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina do ácido láctico que tem sido mais estudada e cujo modo de ação é melhor entendido (RUSSELL e MANTOVANI, 2002).

A nisina possui efeito antimicrobiano sobre várias bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, esporos de *Clostridium* e *Bacillus* (CLEVELAND *et al.*, 2001). MAZZOTA e MONTVILLE (1997) trabalhando com linhagens resistentes de *L. monocytogenes* verificaram que esse microrganismo possuía elevado conteúdo de ácidos orgânicos e sua constituição diferia da linhagem selvagem. O mesmo aconteceu com linhagens mutantes de *C. botulinum* (MAZZOTA e MONTVILLE, 1999). Esses autores concluíram que o elevado conteúdo de ácidos orgânicos saturados conferia maior rigidez à membrana plasmática, conferindo resistência à ação da bacteriocina. CALLAWAY *et al.* (1997) trabalhando com a microbiota do rúmen incubadas *in vitro* com alfafa, testou os efeitos de nisina, que é atóxica a animais e humanos, sobre a fermentação ruminal. O estudo indicou que nisina e monensina inibiram a atividade celulolítica de bactérias ruminais e diminuíram a degradação de amônioácidos pela microbiota ruminal, sendo que nisina foi mais eficiente do que monensina no controle do crescimento de *Clostridium aminophilum* F.

O primeiro relato da produção de substâncias semelhantes a bacteriocinas por bactérias ruminais foi feito por YVERSON e MILLS (1976). A produção de bacteriocinas já foi evidenciada em *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus* e *Enterococcus faecium* (CHAN e DEHORITY, 1999; MOROVSKY *et al.*, 2001). WHITFORD *et al.* (2001) purificaram uma bacteriocina de *Streptococcus gallolyticus* LRC0255 através de cromatografia de fase reversa. Os resultados indicaram que o peptídeo apresentava massa molecular de 6 kDa e características semelhantes as bacteriocinas da classe II. RYCHLIK e RUSSELL (2002), isolaram uma espécie de *Butyrivibrio*, linhagem JL5, que produzia um peptídeo com massa de 3,5 kDa e atividade antimicrobiana contra *C. sticklandii* SR, uma bactéria hiperprodutora de amônia.

Outros trabalhos indicaram que vários isolados de *Streptococcus bovis* isoladas do rúmen bovino produzem bacteriocinas (MANTOVANI e RUSSELL, 2001) com atividade de inibição contra *Clostridium*, *Listeria monocytogenes* e outras bactérias gram-positivas (MANTOVANI e RUSSELL, 2003). *Streptococcus bovis* é uma bactéria

gram-positiva, anaeróbia facultativa que possui requerimentos nutricionais simples e tempo de geração curto. Bovicina HC5 foi isolada de *S. bovis* HC5, apresenta espectro de ação semelhante à monensina (MANTOVANI *et al.*, 2002), possui massa molecular de aproximadamente 2449 Da e sua sequência amino-terminal possui similaridade com os lantibióticos (MANTOVANI *et al.*, 2002). A bovicina HC5 mostrou ter amplo espectro antibacteriano em comparação à bovicina 255 (MANTOVANI e RUSSELL, 2001; MANTOVANI *et al.*, 2002). Bovicina HC5 é resistente à alfa-quimiotripsina, à proteinase K e ao calor (121 °C por 20 minutos). Além disso, sua manipulação se torna mais fácil por possuir estabilidade ao oxigênio (MANTOVANI *et al.*, 2001; HOULIHAN *et al.*, 2004).

Estudos demonstraram que a atividade bacteriocinogênica de bovicina HC5 é mediada pela formação de poros na membrana plasmática, dissipando os gradientes iônicos da célula alvo (MANTOVANI *et al.*, 2002). Recentemente, a atividade desta bacteriocina foi testada contra *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e linhagens de *Clostridium tyrobutyricum* isolados da polpa de manga deteriorada. A adição de 40 a 160 UA/mL de bovicina HC5 em caldo BHI resultou na diminuição da velocidade específica de crescimento e da DO máxima atingida por *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *C. tyrobutyricum*. Concentrações de 40 e 80 UA/mL de bovicina HC5 resultaram no aumento da fase lag dos isolados em pelo menos 10 h (CARVALHO *et al.*, 2007). Estudos do efeito de bovicina HC5 sobre a produção de metano e amônia demonstraram que esta bacteriocina foi capaz de diminuir a produção desses compostos *in vitro* em populações mistas do rúmen (MANTOVANI *et al.*, 2002).

LITERATURA CITADA

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.

ALLISON, M. J.; FERMAUX, C.; AHN, C.; KLAENHAEMMER, T. R. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of peptides encoded within the lactacin F operon. **J. Bacteriol.** 2235-2241. 1994.

ANNISON, E. F.; LEWIS, D. **Metabolism in the rúmen**. London: Methuen e Co LTD, 1959, 184 p. 1959.

ARAÚJO, L. **Brasil alimentos**. n. 38, 2006.

ATTWOOD, G. T., KLIEVE, A. V., OUWERKERK, D. e PATEL, B. K. C. Ammonia-hyperproducing bacteria from new Zealand ruminants. **Appl. Environ. Microbiol.** n. 5, p. 1796-1804. 1998.

BACH, A., CALSAMIGLIA, S. e STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rúmen. **J. Dairy Sci.** 88: (E. Suppl.):E9-E21. 2005.

BLADEN, H. A., BRYANT, M. P. e DOETSCH, R. N. A study of bacterial species from the rumen which produce ammonia from protein hydrolysate. **Appl. Microbiol.** n. 9, p. 175-180. 1961.

BRODERICK, G.A., WALLACE, R.J., ØRSKOV, E.R. Control of rate and extent of protein degradation. In: TSUDA, T., SASAKI, Y., KAWASHIMA, R. (Ed.) *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. New York, Academic Press, p.542-592, 1991.

BROCK, F.M., FORSBERG, C.W., BUCHANAN-SMITH, J.G. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. **Appl. Environ. Microbiol.**, 44: 561-569, 1982.

CALLAWAY, T. R. The effect of nisin and monensin on ruminal fermentations in vitro. **Curr. Microbiol.** v.35, n.2, Aug, p.90-96. 1997.

CARVALHO, A. A. T. ; COSTA, E.D. ; MANTOVANI, H.C. ; VANETTI, M.C.D. . Effect of bovicin HC5 on growth and spore germination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated from spoiled mango pulp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1000-1009, 2007.

CLEVELAND, J.; FERNANDEZ, A.; RODRIGO, M.; MARTINEZ, A. Modelling the effect of heat shock and germinant concentration on spore germination of a wild strain of *Bacillus cereus*. **International J. of Food Microbiol.** P. 1-20, 2001.

CHAN, W. W. e DEHORITY, B. A. Production of *Ruminococcus flavefaciens* growth inhibitors by *Ruminococcus albus*. **Anim. Feed Sci. Technol.** v. 77, p. 61-71. 1999.

CHENG, K.H.; COSTERTON, J.W. Microbial adhesion and colonization within the digestive tract. In: BARNES, E.M.; MEAD, G.C. **Anaerobic bacteria in habitats other than man**. LONDON: Blackwell Sci. Publ., p. 239-262. 1986.

CHEN, G. e RUSSELL, J. B. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** n. 55, p. 1052-1057. 1989.

COTTA, M.A., HESPELL, R.B. Protein and amino acid metabolism of rumen bacteria. In: MILLIGAN, L.P., GROVUM, W.L., DOBSON, A. (Ed.) **Control of digestion and metabolism in ruminants**. Prentice-hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA, p.122-136, 1986.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews.** 777-788. 2005.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **Intern. Dairy J.** 1058-1071, 2006.

DEHORITY, B. A. **Rumen microbiology**. Wooster: Ohio State University, 239p. 1987.

DEWHURST, R. J., DAVIES, D. R. e MERRY, R. J. Microbial protein supply from the rumen. **Anim. Feed Sci. Technol.** n. 85, p. 1-21. 2000.

DIEP, D. B. e NES, I. F. Ribossomally syntetized and bacterial peptides in gram positive bactéria. **Curr. Drug. Targets.** p. 102-22. 2002.

DOBSON, M. **Aspect of digestive physiology in ruminants.** Ithaca: Comstock Publ. Assoc., p. 74 -98. 1988.

EMBRAPA/Cnpgc. <http://www.embrapa.cnpgc.br>. 2006.

EMBRAPA/Cnpgl. <http://www.embrapa.cnpgl.br>. 2006.

ENNAHAR S, SASHIHARA T, SONOMOTO K, ISHIZAKI A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 24, p. 85-106. 2000.

ERFLE, J. D., SAUER, F. D., MAHADEVAN, S. Effect of ammonia concentration on activity of enzymes of ammonia assimilation and on synthesis of amino acids by mixed rumen bacteria in continuous culture. **J. Dairy Sci.**, 60: 1064-1072, 1977.

FAHEY, G. C.; BOURQUIM, L. D.; TITGEMEYER, E. C. Postharvest treatment of fibrous feedstuffs to improve their nutritive value. IN: **Forage cell wall structure and digestibility.** ASA, Madison, WI, 717-66. 1993.

FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P.; VAN AMBURGH, M. E.; CHASE, L. E.; PELL, A. N.; OVERTON, T. R.; TEDESCHI, L. O.; RASMUSSEN, C. N.; DURBAL, V. M. **The Net Carbohydrate and protein system for evaluating herd nutrition and nutrient excretion.** The Cornell University Nutrient Management Planning System. Ithaca, NY: Cornell University, 2000. 236 p.

HOBSON, P. N. (Ed.) **The rumen microbial ecosystem.** Elsevier Applied Science, England, p. 217-250, 1988.

HOULIHAN, A. J.; MANTOVANI, H. C. e RUSSELL, J. B. The effect of pH on the activity of bovicina HC5, a bacteriocina from *Streptococcus bovis* HC5. **FEMS Lett.** v. 231, p. 27-32. 2004.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press. 533 p. 1966.

HUNTINGTON, G.B., ARCHIBEQUE, S.L. **Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants**. Proceedings of the American Society of Animal Science. 1999.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** p. 39-86. 1993.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie.** P. 337-345. 1988.

KLIEVE, A. V. e HEGARTY, R. S. Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural and Economic Resources**, v.50, p.1315-1319. 1999.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 1 ed. Santa Maria: UFSM., 140p. 2002.

KRAUSE, D. O., RUSSELL, J. B. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62, n. 3, p. 815-821. 1996.

JACK, R. N.; TAGG, J. R. e RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiol. Ver.** 171-200. 1995.

LANA, R. de PAULA. **Sistema Viçosa de Formulação de Rações**. 3º ed. Editora UFV.2005.

MADEIRA, H. M. F., PENG, L. e MORRISON, M. Biochemical and mutational analysis of a gingipain-like peptidase activity from *Prevotella ruminicola* B₁₄ and its role in ammonia production by ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 63, n. 2, p. 670-675. 1997.

MANTOVANI, H. C.; KAM, D. K. e RUSSELL, J. B. The antibacterial activity and sensitivity of *Streptococcus bovis* strains isolated from the rumen of cattle. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 37, p. 223-229. 2001.

MANTOVANI, H. C. e RUSSELL, J. B. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 67, p. 808-813. 2001.

MANTOVANI, H. C., HU, H.; WOROBO, R. W. e RUSSELL, J. B. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiol.** V. 148, p. 3347-3352. 2002.

MANTOVANI, H. C. e RUSSELL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **International J. of Food Microbiology** 89, p. 77-83, 2003.

MARUGH, J. D.; GONZALES, C. F.; CUNKA, B. S.; LEDEBOER, A. M.; PUCCI, M. J.; TOONEM, M. Y.; VALKER, S. A.; ZOETMULDER, L. C. M. e VANDEBERGH, P. A. Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 58, p. 2360-67. 1992.

MAZZOTA, A. S.; MONTVILLE, T. J. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10 C and 30 C. **J. Applied Microbiology** v.82, p. 32-38, 1997.

MAZZOTA, A. S.; MONTVILLE, T. J. Characterization of fatty acid composition, spore germination, and thermal resistance in a nisin-resistance mutant *Clostridium botulinum* 169B and in the wild type strain. **J. Applied Microbiology.** 65. P. 285-308. 1999.

MONTVILLE, T. J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions **Appl. Environ. Microbiol. Biotech.** P- 511-19, 1998.

MOROVSKY, M. P.; PRISTAS, P.; JAVORSKY, P.; NES I. F e HOLO, H. Isolation and characterization of enterocin BC25 and occurrence of the entA gene among ruminal gram-positive cocci. **Microbiol. Res.** v. 156, p. 133-8. 2001.

NAGAJARA, T. G. Manipulation of ruminal fermentation. In: **The rumen microbial ecosystem.** London: Blackie Academic e Professional. P. 523-632.

NOLAN, J.V. Nitrogen kinetics In: Forbes, F.M., France, F. **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.** CAB International, 1993. 1^a ed, p. 123-145.

NUNGENT, J.H.A., MANGAN, J.L. Characteristics of the rumen proteolysis of fraction I (18S) leaf protein from lucerne (*Medicago sativa* L.). **Br. J. Nutr.**, 46: 39-58, 1981.

National Research Council (NRC). **Ruminant nitrogen usage**. Washington, DC., 138p. 1985.

NOCECK, J.E., RUSSELL, J.B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **J. Dairy Sci.**, 71: 2070-2107, 1988.

OWENS, F.N., ZINN, R. Protein metabolism of ruminant animals. In: CHURCH, D.C. (Ed.) **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. Prentice Hall, New Jersey – USA, p.227-249, 1988.

PASTER, B. RUSSELL, J. B., YANG, C. M. J., CHOW, J. M., WOESE, C. R. and TANNER R. Phylogeny of ammonia-producing ruminal bacteria, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* and *Clostridium aminophilum* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 43, p.107–110. 1993.

PRINS, R. A. VAN RHEENEN, D. L. e VAN'T KLOOSTER, A. T. Characterisation of microbial proteolytic enzymes in the rumen. **Ant. van Leeuw.**, v. 49, p. 585-95. 1983.

POTTER E.L; VANDUYN R.L; COOLEY C.O. Monensin toxicity in cattle. **J Anim Sci** n. 58, p.1499–1511.1984.

PRESSMAN, B. C. e FAHIM, M. Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. **Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.** 22, p. 465-90. 1982.

RICHARDSON, L.F., RAUN, A.P., POTTER, E.L. et al. Effect of monensin on ruminal fermentation *in vitro* and *in vivo*. **Journal Animal Science**, 43:657-664, 1976.

RUSSELL, J. B. e STROBEL, H. J. Mini-review: The effect of ionophores on ruminal fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.** n. 55, p. 1-6. 1989.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, NY: James B. Russell. p 122. 2002.

RUSSELL, J. B., STROBEL, H. J. e CHEN, G. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Appl. Environ. Microbiol.** n. 54, p. 872-877. 1988.

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

RUSSEL,J.B., ONODERA,R., HINO,T. Ruminal protein fermentation: News perspectives on previous contradictions. In: TSUDA,T., SASAKI,Y., KAWASHIMA,R. (Ed.) **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. New York, Academic Press, p. 681-697, 1991.

RUSSELL, J. B. Inhibition of hyperactive amino acid-degrading ruminal bacteria and the potential for decreasing wasteful ammonia production. **US Dairy Forage Research Center**. p. 61-64. 1996.

RUSSELL, J. B. **Mechanisms of action of ionophores**. p. 88-92 (Proc cornell nutrition conference for feed manufacturers) 1997.

RUSSELL, J. B. Ruminal fermentation. **Encyclopedia of Microbiology**, Academic Press v. n. 4, p.185-194. 2000.

RUSSEL,J.B., O'CONNOR,J.D., FOX,D.G., SNIFFEN,C.J., VAN SOEST,P.J. A Net Carbohydrate and Protein System for evaluating cattle diets. I. Ruminal fermentation. **J. Anim. Sci.**, 70: 3551-3561, 1992.

RUSSELL, J. B. Inhibition of hyperactive amino acid-degrading ruminal bacteria and the potential for decreasing wasteful ammonia production. **US Dairy Forage Research Center**. p. 61-64. 1996.

RUSSELL, J. B. e MANTOVANI, H. C. The bacteriocins of ruminal bacteria and there potencial as and alternative to antibiotics. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** V. 4, p. 347-355. 2002.

RYCHLIK, J. L e RUSSELL, J. B Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**. v. 292, p. 552-558. 2001.

RYCHLICK, J. L. e RUSSELL, J. B. Bacteriocin-like activity of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and its effect on other ruminal bacteria and ammonia production. **Appl. Environ. Microbiol.** V.3; p. 1040-6. 2002.

SAHL, H. G.; JACK, R. W. e BIERBAUN, G. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. **Eur. J. Biochem.** v. 230, p. 827-53. 1995.

SALLES, M. S. V. ; ZANETTI, Marcus Antonio ; CLARO, G. R. ; SARAN NETTO, A. ; FRANZOLIN, R. . Avaliação de colheita de líquido ruminal por fistula ou sonda esofágica em bovinos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 55, n. 4, p. 438-442, 2003.

SHELLING, G. T. Monensin mode of action in the rumen. **J. Anim. Sci.** 58, p.1518-27. 1984.

SIMPEP. <http://www.simpep.feb.unesp.br/>. 2005.

TANNER, R. Phylogeny of ammonia-producing ruminal bacteria, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* and *Clostridium aminophilum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology.** n. 43, p. 107-110. 1993.

TEIXEIRA, JÚLIO CÉSAR. Nutrição dos Ruminante, Lavras, MG: ESAL/ FAEPE, 1991.

VAN DER MEER, J. R.; POLMAN, J.; BEERTHUYZEN, M. M.; SIEZEN, R. J.; KUIPERS, O. P. e de VOS, W. M. Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *Nis P*, encoding of subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *Nis R*, encoding of regulatory protein involved in nisin biosynthesis. **J. Bacteriol.** v. 175, p. 2578-88. 1993.

VAN DER BOGAARD, A. E. e STOBBERLING, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics. In: **Int. J. Antimicrob. Agents.** 14, p. 327-35. 2000.

VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N. (Ed.) **The rumen microbial ecosystem.** Essex: Elsevier, 1988. p.387-443

VAN SOEST, P. J . **Nutritional ecology of the ruminant.** Corvallis: O e B Books, 374p. 1982.

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

WISEK, W.J. Ammonia: Its effects on biological systems. Metabolic hormones, and reproduction. **J. Dairy Sci.**, 67(3): 481-498, 1984.

WHITFORD, M. F.; McPHERSON, M. A.; FOSTER, R. J.; TEATHER, R. M. Identification of bacteriocin-like inhibitors from ruminant *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of Bovicin 255. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67; p. 569-574. 2001.

WALLACE, R. J.; ESCHENLAVER, S.; NEWBOLD, C. J. Rumen bacteria capable of growth on peptides and amino acids as sole source of energy: numbers and their role in ammonia production. **Annal. Zootech.**, v. 44, p. 147. 1995.

WALLACE, R.J., COTTA, M.A. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: WEIMER, P. J. **Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective**. J. Dairy Sci. v.76, p. 327-35. 1998.

YVERSON, W. G. e N. F. MILLS. Bacteriocins of *Streptococcus bovis*. **Can. J. Microbiol.** 22. P. 1040-1047. 1976.

CAPÍTULO 2.

Avaliação da produção de amônia, atividade específica de produção de amônia e diversidade genética da comunidade de bactérias ruminais de animal alimentado com níveis crescentes de proteína na dieta.

2.1. INTRODUÇÃO

O ecossistema ruminal é extremamente complexo, em razão do grande número de microrganismos presentes e das interações ecológicas entre diferentes espécies de microrganismos. As mudanças na microbiota ruminal podem resultar de mecanismos fisiológicos relacionados ao hospedeiro, bem como de fatores extrínsecos, a exemplo da composição da dieta e do uso de promotores de crescimento (TEIXEIRA, 1991). A enorme diversidade de organismos ruminais pode ser devida à complexidade do substrato (HUNGATE, 1966). No rúmen, sobrevivem e predominam as espécies capazes de sintetizar enzimas que participam de vias metabólicas mais eficientes no aproveitamento da energia contida no substrato (DEHORTY, 1987).

Algumas espécies de bactérias que fermentam carboidratos podem desaminar aminoácidos (BLADEN *et al.*, 1961), porém, a atividade de desaminação dessas espécies não explica a produção de amônia oriunda de culturas mistas de bactérias ruminais (RUSSELL *et al.*, 1988). Na década de 1980, bactérias desaminadoras de aminoácidos foram isoladas e apresentaram taxas de produção de amônia cerca de vinte vezes maiores em comparação com outros grupos de microrganismos ruminais (RUSSELL *et al.*, 1988).

ATTWOOD *et al.*, (1998) isolaram duas espécies de *Peptostreptococcus* com alta atividade de produção de amônia que foram obtidas a partir de diluições altas (10^{-8} e 10^{-10}) da microbiota ruminal e mantiveram a viabilidade quando foram transferidos

para meio de cultura limitante em nitrogênio. Entretanto, vários outros isolados não mantiveram a viabilidade quando foram transferidos para meio de cultivo deficiente em carboidratos, indicando que espécies desaminadoras de aminoácidos possuem requisitos nutricionais específicos. RYCHLIK e RUSSELL (2002) verificaram que a microbiota ruminal de bovino alimentado com feno (14 % de proteína bruta) que cresciam em meio contendo Trypticase como única fonte de energia acontecia em torno de 10^5 células viáveis/mL.

Sondas de rRNA 16S indicaram que a população de bactérias fermentadoras de aminoácidos previamente caracterizadas representava cerca de 3% da microbiota ruminal (KRAUSE e RUSSELL, 1996). Entretanto, diluições seriadas desses microrganismos indicaram que a concentração dessas espécies não ultrapassou 10^6 células viáveis/mL enquanto a enumeração de células viáveis da microbiota ruminal foi sempre maior do que 10^9 células/mL (YANG e RUSSELL, 1993).

A utilização de técnicas moleculares para estudo de microrganismos cultiváveis ou independentes de cultivo constitui alternativa para o estudo da diversidade genética de espécies microbianas (ZHOU *et al.*, 2004). Técnicas de *fingerprint* genético são utilizadas para avaliar a diversidade genética de uma comunidade microbiana de um ambiente específico. Essas técnicas moleculares são baseadas em reações de polimerase em cadeia (PCR) e na resolução das diversas sequências amplificadas, por migração eletroforética diferenciada em gel de agarose ou poliacrilamida (KIRK *et al.*, 2004; HORI *et al.*, 2006). A análise do perfil eletroforético de comunidades microbianas complexas na verificação da diversidade a partir de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) tem alcançado grande sucesso (MUIZER *et al.*, 1993; ROSADO e DUARTE, 2000). Essa técnica vem demonstrando ser a melhor opção no estudo em longo prazo que envolva coletas em diferentes intervalos de tempo e análise simultânea de várias amostras (MUIZER e SAMALLA, 1998; MUIZER *et al.*, 1999).

Os objetivos desse trabalho foram analisar a produção total de amônia e a produção específica de produção de amônia a partir de líquido ruminal de animal submetido a dietas contendo níveis crescentes de proteína através de diluições seriadas e transferências consecutivas da microbiota ruminal e avaliar a diversidade genética de culturas mistas de microrganismos ruminais transferidos *in vitro* na presença de Trypticase.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia de Anaeróbios e Ecologia Microbiana do Departamento de Microbiologia Agrícola e no Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa – Minas Gerais.

2.2.1. Animal e dieta

Foi utilizado um novilho em crescimento, da raça gir, fistulado no rúmen, com cerca de 350 kg alojado em baia individual contendo bebedouro e comedouro com sal mineral à vontade. Os tratamentos consistiram de animal recebendo concentrado (milho, farelo de soja e uréia) com de 8, 18 e 24% de proteína bruta (PB) e alimentos forrageiros (capim ou feno) (Tabela 1). O animal passou por um período de adaptação a cada tipo de dieta (5 dias) antes do início da colheita de amostras para as análises experimentais.

Tabela 1. Composição da ração contendo níveis crescentes de proteína bruta na dieta.

Nível de PB (%)	Relação vol:conc	Milho (Kg/d)	Farelo de soja (Kg/d)	Uréia (g/d)
8	(90:10)	1,0	—	—
18	(80:20)	1,0	1,0	140
24	(65:35)	1,0	2,6	180

PB (proteína bruta); **vol** (volumoso); **conc** (concentrado); **Kg** (quilo); **g** (grama); **d** (dia).

2.2.2. Microrganismos e condições de cultivo

Os microrganismos foram cultivados anaerobicamente em meio de cultura mineral anaeróbio limitante em nitrogênio contendo (por litro): 292 mg de K_2HPO_4 , 240 mg de KH_2PO_4 , 480 mg de Na_2SO_4 , 480 mg de $NaCl$, 100 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 64 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 4000 mg de Na_2CO_3 , 600 mg de cisteína·HCl, adicionado de vitaminas e minerais (COTTA e RUSSELL, 1982) e suplementado com 15 g/L de Trypticase. Os meios de cultura foram preparados sob atmosfera de CO_2 livre de oxigênio e distribuídos em tubos de cultura vedados com tampões de borracha e selados com lacre de alumínio. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio e os tubos foram incubados a 39°C. O crescimento foi monitorado pela mudança na densidade óptica a 600 nm.

2.2.3. Enriquecimento (transferências) das culturas e diluições seriadas

As amostras de líquido ruminal (aproximadamente 1000 ml) foram coletadas após o 5º dia de adaptação às diferentes dietas (8, 18 e 24 % de PB). Amostras de líquido de rúmen proveniente das diferentes dietas sofreram transferências sucessivas (25 %, v/v) em meio mineral anaeróbio, sem adição de carboidratos e suplementado com 15 g/L de Trypticase, a cada 24 horas durante 7 dias. As transferências tiveram como objetivo o enriquecimento da microbiota ruminal desaminadora, uma vez que foi utilizado meio de cultivo com Trypticase como única fonte de energia. Foram retiradas alíquotas de 1 mL após 0, 6 e 24 horas de incubação e congeladas a – 20 °C para posterior análise de amônia e proteína. Após o período de incubação, de cada 24 horas, as garrafas anaeróbias contendo a microbiota resultante das transferências foram congeladas a – 20 °C para análise da diversidade microbiana por PCR-DGGE. Amostras do líquido de rúmen coletados no primeiro e no último dia de cada dieta também foram estocados a – 20 °C para posterior análise da diversidade genética por PCR-DGGE.

Amostras (1 mL) do líquido de rúmen provenientes do 5º dia de adaptação de cada dieta também foram transferidas para garrafas anaeróbias (9 mL) contendo meio de cultura limitante em nitrogênio e suplementado com 15 g/L de Trypticase. Foram feitas diluições seriadas com incremento de 10x (10^0 a 10^{-10}). As garrafas aneróbias foram incubadas por 24 horas a 39 °C e alíquotas de 1mL foram retiradas nos tempos 0, 6 e 24

horas para análise de amônia e proteína. As diluições da microbiota ruminal tiveram como objetivos a quantificação dos microrganismos que obtivessem crescimento em meio contendo Trypticase como única fonte de energia, ou seja, a estimativa da população desaminadora do rúmen e ainda, se o nível da população variava de acordo com a dieta do animal.

2.2.4 Determinação da produção de amônia e atividade específica de produção de amônia

A amônia presente no sobrenadante foi determinada pelo método colorimétrico de Chaney e Marbach (CHANEY e MARBACH, 1962). A absorvância (630 nm) foi medida em espectrofotômetro Spectronic 20D, utilizando-se cloreto de amônio como padrão. A produção de amônia em (mM) foi expressa como a diferença entre a amônia total determinada ao final da incubação e a concentração presente nas amostras no tempo zero hora. A proteína celular foi determinada de acordo com BRADFORD (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

A atividade específica de produção de amônia (AEPA) foi calculada pela diferença de concentração de amônia (mM) nos frascos de incubação entre os tempos zero e seis horas, dividido pela concentração da proteína microbiana (mg/L), e pelo tempo de incubação (minutos).

2.2.5 Extração do DNA da microbiota ruminal

Antes da etapa de extração do DNA total, as garrafas anaeróbias contendo as amostras congeladas do tratamento do material enriquecido (transferências) e o líquido de rúmen puro congelado passaram por cinco lavagens com solução salina 0,85% para retirar os sedimentos de alimento da dieta e diminuir a interferência de proteinases e DNAses contidas naturalmente na amostra. As lavagens consistiram de uma primeira centrifugação a 500 rpm/ 10 minutos e outras quatro lavagens a 5000 rpm/10 minutos, o sobrenadante resultante das lavagens foi rejeitado. A extração de DNA total dos tratamentos relativos às transferências de líquido de rúmen e o líquido de rúmen puro

(primeiro e último dia de coleta) dos diferentes níveis das dietas foi feito utilizando-se o Kit Wizard[®] Genomic Purification (Promega, Madison, USA), segundo especificações do fabricante.

As amostras de DNA extraídas foram analisadas em gel de agarose (Sigma-Aldrich) 0,8 % em tampão TAE 1X [Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM (pH 8)], corados com brometo de etídio ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) (SAMBROOK *et al.*, 1989). A quantificação foi feita por comparação com marcadores de quantidade de DNA de fago λ nas concentrações de $25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e $75 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. O DNA extraído foi visualizado no sistema de digitalização de imagens Eagle Eye[™] (Stratagene, Cedar Creek, USA).

2.2.6 Análise da diversidade genética da população por PCR-DGGE

O DNA da comunidade microbiana presente no líquido de rúmen dos animais alimentados com as diferentes dietas e o DNA referente às transferências (enriquecimento) foram utilizados em reações de amplificado com oligonucleotídeos específicos para o gene 16S rRNA de grupos microbianos representantes do domínio Eubactéria (MUYZER *et al.*, 1993). A reação de PCR foi realizada em tubos de 200 μL para um volume final de 25 μL . A mistura de reação foi preparada com 5 μL do tampão GoTaq[®] Reaction Buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 mM de MgCl_2 (Promega, Madison, USA), 200 μM de desoxirribonucleotídeos trifosfatado (dNTP), 0,4 μM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega, Madison, USA), 5 μg de albumina sérica bovina (BSA) (Invitrogen, Califórnia, USA), 2% (v/v) de formamida desionizada, 20 ng de DNA total e água desionizada (Milli-Q) esterilizada para completar o volume final. O programa de amplificação descrito por MUYSER *et al.*, (1997) foi utilizado, com modificações: temperatura inicial de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos, seguida por extensão final a 72 °C por 10 minutos. Aliquotas de 5 μL foi analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão TAE 1X [Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM (pH 8)], corado com brometo de etídio ($0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) (SAMBROOK *et al.*, 1989) para confirmação da

qualidade da amplificação e visualizado no sistema de digitalização de imagens Eagle Eye™ (Stratagene, Cedar Creek, USA). O restante (20 µL) foi analisado por eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) realizada em equipamento “DCode™ Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad-Califórnia, USA).

As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (acrilamida:*N,N'*-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 8% (p/v) em tampão TAE 1X, para fragmentos de 200 pb a 400 pb, com gradiente desnaturante de 40 a 60%. O gradiente foi formado a partir da mistura de duas soluções estoque de poliacrilamida dispensados pelo formador de gradiente (Modelo 475 Gradiente Delivery System – Bio-Rad Califórnia, USA), onde a solução 100% desnaturante continha 7M de uréia e 40% (v/v) de formamida. Para a formação do gradiente também foram utilizados 0,003% (p/v) de persulfato de amônio (polimerizador), 0,17% (v/v) de TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletileno diamino) como catalisador, e 50 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 2 horas. Como marcadores específicos foi utilizada uma mistura de rDNA 16S de nove espécies bacterianas representantes de diferentes filos (*Actinomyceto* sp. 21A-Laboratório de Microbiologia Industrial, UFV, MG; *Actinomyceto* sp. 26A-Laboratório de Microbiologia Industrial, UFV, MG; *Alcaligenes xylosoxydans* ATCC 13138; *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 12136; *Bacillus subtilis* ATCC 23858; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525; *Pseudomonas putida* ATCC 15176 e *Staphylococcus aureus* ATCC 12692).

A corrida eletroforética foi realizada à 60 °C, 50 V por 16 horas, em TAE 1X. O gel foi corado por 20 minutos com SYBR® Gold (Invitrogen, Califórnia, USA), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel foi foto-documentada em sistema de digitalização de imagens EagleEye™ (Stratagene, Cedar Creek, USA). A análise das imagens dos géis para verificar a diversidade genética foi realizada com o auxílio do programa GelCompar II® 5.10 (Applied Maths Inc., Austin, USA).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Atividade específica de produção de amônia e produção de amônia de microrganismos ruminais obtidos de bovino alimentado com dieta contendo diferentes níveis de proteína bruta.

A habilidade de desaminar aminoácidos variou entre as culturas de bactérias ruminais colhidas de bovino alimentado com 8, 18 e 24% de proteína bruta (PB). A atividade específica de produção de amônia (AEPA) a partir de Trypticase foi de 38,2; 51,3 e 54,5 nmoles de amônia/mg proteína/min para as culturas oriundas do líquido ruminal de dietas com 8, 18 e 24% de PB, respectivamente (Figura 1A). Quando as culturas foram transferidas para novo meio de cultura contendo Trypticase a atividade de desaminação aumentou expressivamente, atingindo valores maiores do que 400 nmoles de amônia/mg proteína/min após a terceira transferência. As culturas de bactérias ruminais oriundas do animal recebendo 24% de PB foram as que apresentaram aumento mais rápido da AEPA, atingindo valores maiores que 450 nmoles de amônia/mg proteína/min após apenas duas transferências.

O aumento da AEPA pode ser relacionado com o aumento da concentração de amônia resultante da desaminação de aminoácidos pelas culturas. Após a primeira transferência em meio contendo Trypticase a concentração de amônia foi de aproximadamente 40 mM para a cultura do animal recebendo 8 e 18% de PB, e de aproximadamente 50 mM para a cultura oriunda do animal alimentado com dieta contendo 24% de PB (Figura 1B). A concentração de amônia aumentou até a terceira transferência para todas as culturas, tendo atingido aproximadamente 110 mM após sete transferências para as culturas oriundas de dietas com 8 e 24% de PB. A atividade de desaminação foi menor na cultura oriunda da dieta com 18% de PB, tendo sido obtido

cerca de 75 mM de amônia após sete transferências (Figura 1B). Tratamentos controles onde não houve suplementação com Trypticase, a concentração de amônia foi sempre inferior a 3 mM (dados não mostrados).

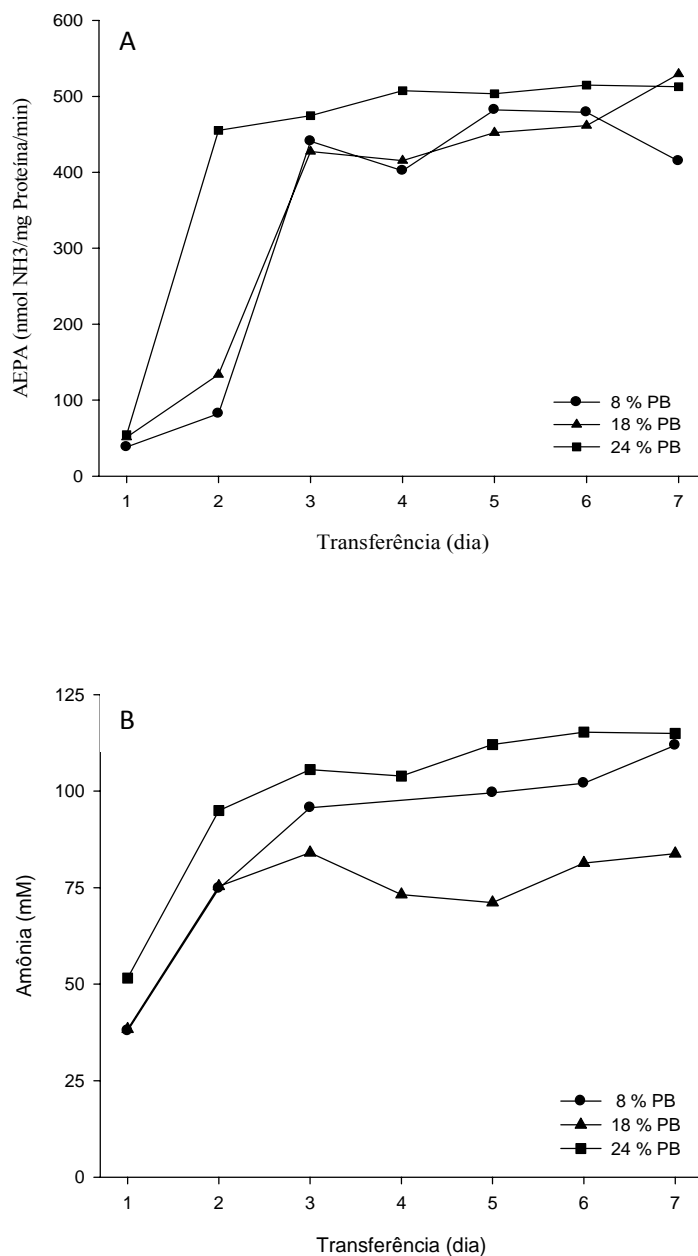


Figura 1. ACPA (A) e produção de amônia (B) de culturas de microrganismos ruminais cultivadas em meio contendo Trypticase. As culturas foram inoculadas (25% v/v) com líquido ruminal de bovino recebendo dietas com 8, 18 e 24% de PB. Após 24 horas de incubação a 39 °C as culturas foram transferidas para novo meio anaeróbico adicionado de Trypticase.

GUSTAFSSON e PALMQUIST (1993) verificaram que incrementos na ingestão de proteína degradável no rúmen (PDR) aumentam as concentrações de amônia no rúmen e de uréia no sangue. RYCHLIK e RUSSELL (2002) demonstraram que a atividade específica de produção de amônia depende da dieta e da especificidade pelo substrato das diferentes espécies de bactérias existentes no rúmen. RUSSELL *et al.*, (1988) fizeram enriquecimentos da microbiota ruminal utilizando carboidratos e Trypticase como fontes de energia e verificaram que o enriquecimento onde foi utilizado Trypticase como único substrato, houve aumento da concentração de amônia, o que não ocorreu com o enriquecimento com outras fontes de carbono. O resultado obtido neste trabalho indica que houve uma seleção dos microrganismos que são preferencialmente desaminadores.

A síntese de proteína microbiana no rúmen depende da disponibilidade de carboidratos e de nitrogênio. Os microrganismos ruminais são capazes de incorporar grande parte da amônia que é produzida no rúmen pela desaminação dos aminoácidos e hidrólise dos compostos nitrogenados. Entretanto, em certas condições dietéticas a taxa de produção de amônia no rúmen excede a taxa de assimilação pelas bactérias. A falta de sincronização entre a disponibilidade de energia e nitrogênio no rúmen resulta na utilização ineficiente dos substratos fermentáveis e redução da síntese de proteína microbiana pelo ruminante (NRC, 1989).

Alíquotas de líquido ruminal que foram diluídas sucessivamente (incrementos de 10 vezes) apresentaram menor atividade de desaminação de Trypticase (Figura 2A). A concentração de amônia diminuiu mais rapidamente nas diluições oriundas de dietas contendo 8, 18 e 24% de PB (Figura 2A). A AEPA decresceu linearmente com a diluição da microbiota ruminal, tendo sido inferior a 10 nmoles de amônia/mg proteína/min após a diluição 10^{-4} (8 e 18% de PB) ou 10^{-5} (24 % de PB) (Figura 2B). O valor inicial médio da AEPA entre as dietas foi de 45 nmoles de amônia/mg proteína/min, tendo diminuído para aproximadamente 2,3 nmoles de amônia/mg proteína/min nas diluições mais elevadas (Figura 2A).

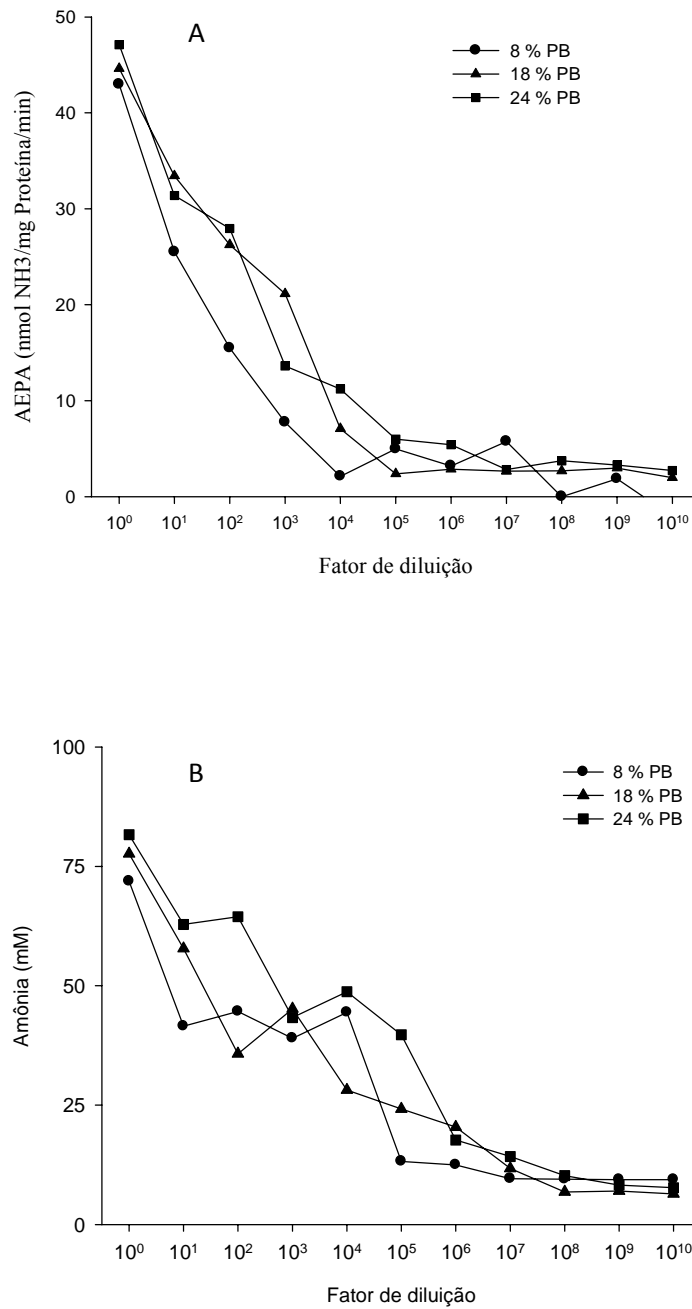


Figura 2. AEPA (A) e produção de amônia (B) de culturas de microrganismos ruminais cultivadas em meio contendo Trypticase. As culturas foram diluídas (incrementos de 10 vezes) a partir de líquido ruminal de bovino recebendo dietas com 8, 18 e 24% de PB e incubadas por 24 horas a 39 °C.

RYCHLIK e RUSSELL (2002) diluíram serialmente a microbiota ruminal de bovino alimentado com feno em meio anaeróbico com Trypticase como única fonte de energia e verificaram que após 72 horas de incubação a concentração de amônia foi maior que 100 mM. Entretanto, a elevada concentração de amônia só foi observada para diluições menores que 10^{-5} . As diluições mais altas (10^{-8} ou 10^{-9}) apresentaram densidades ópticas muito reduzidas evidenciando que bactérias desaminadoras não estavam presentes na amostra ou estavam em número muito reduzido.

As culturas oriundas da dieta com 24 % de PB foram aquelas que mantiveram maior concentração de amônia ao longo das diluições, evidenciando a maior abundância de microrganismos desaminadores nessa dieta. LANA *et al.* (1998) demonstraram a redução do pH, *in vitro*, de 6,5 para 5,7, resultou na diminuição da produção de amônia em bactérias ruminais de animais recebendo dietas contendo apenas forragem. Entretanto, culturas bacterianas de animais recebendo 90 % de concentrado apresentaram produção similar de amônia nos dois diferentes pHs. Esses resultados indicam que a dieta do animal influencia a composição da microbiota ruminal e o aproveitamento da proteína dietética (CLARCK *et al.* 1992; RYCHLIK e RUSSELL, 2002).

Trabalhos anteriores verificaram que diluições mais altas da microbiota ruminal possuíam espécies que fermentavam carboidrato e algumas dessas bactérias inibiam o crescimento de *Clostridium sticklandii* SR, uma bactéria hiperprodutora de amônia RYCHLIK e RUSSELL (2002). Esses autores isolaram uma espécie de bactéria (*Butyrivibrio fibrisolvens* JL5) produtora de bacteriocina a partir de diluições da microbiota ruminal. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que as interações de antagonismo entre os microrganismos ruminais podem favorecer o desenvolvimento de algumas espécies microbianas em detrimento de outras. O efeito antagônico direto contra grupos específicos de microrganismos resulta na redução de suas células viáveis, através da produção de compostos antibacterianos, competição por nutrientes, e ainda podem ter efeitos sobre o metabolismo microbiano, aumentando ou diminuindo a atividade enzimática (FULLER, 1989).

Muitos lactobacilos produzem bacteriocinas que inibem outras bactérias gram-positivas (JACK, 1995), mas o impacto potencial de bacteriocinas na ecologia ruminal tem recebido atenção apenas recentemente (KALMOKOFF *et al.*, 1996; MANTOVANI e RUSSELL, 2003). WELLS *et al.* (2006) em seu trabalho, verificou que os lactobacilos presentes no rúmen poderiam estar inibindo o crescimento de *S. bovis*. Quando os

animais foram alimentados apenas de forragem, o número de lactobacilos em crescimento foi inferior a 10^4 por mL de líquido ruminal. Porém, a adaptação gradual de grãos de cereais para feno causou aumento nos lactobacilos. A substituição de cereais para o feno teria diminuído a oferta de degradação ruminal de aminoácidos. Entretanto, *S. bovis* poderia utilizar amônia como única fonte de nitrogênio, uma vez que o fluido ruminal nunca apresentava menos de 5 mM de amônia e a inibição de *S. bovis* não poderia ser explicada pela limitação de nitrogênio. Sobreposições em ágar indicaram que os lactobacilos produziram uma substância difusível que inibiu o crescimento de *S. bovis* isolados anteriormente. Uma vez que estas estirpes de *S. bovis* tinham sido isoladas de diferentes partes do mundo, este fator inibitório não foi estirpe específica. Os autores concluíram que os lactobacilos produziam uma bacteriocina que tinha efeito sobre o crescimento de *S. bovis*. Desta maneira, diante dos resultados obtidos neste trabalho e dos relatos citados na literatura é necessário que haja maiores estudos sobre as interações ecológicas entre a microbiota ruminal e os impactos resultantes dessas interações nas populações de organismos do rúmen.

2.3.2 Análise da diversidade genética da microbiota ruminal de bovino alimentado com diferentes níveis de proteína bruta.

Os perfis eletroforéticos gerados a partir da técnica de DGGE revelaram que entre o primeiro e o último dia de alimentação com cada dieta, a diversidade da comunidade microbiana do rúmen não sofreu mudanças significativas. O menor índice de similaridade (62,5%) foi encontrado entre primeiro dia de fornecimento da dieta com 8% de PB e o último dia de fornecimento da dieta com 24% de PB (Figura 3A e B). Esse resultado demonstra que apesar de haver algumas diferenças no perfil da comunidade, os grupos microbianos representativos se mantiveram estáveis mesmo com o aumento no nível de proteína na dieta. Entretanto, alterações significativas nas espécies ecologicamente relevantes pode ter ocorrido pois a técnica de DGGE negligencia a detecção de comunidades microbianas que estão em pequeno número (SIMPSON *et al.*, 2000).

Para as transferências a partir da dieta com 8% de PB os perfis de bandas mostraram que diferentes espécies microbianas estão presentes nas amostras (Figura 4A). A análise do dendrograma e da matriz de similaridade (Figura 4B) das amostras sugeriram maior similaridade entre os dois primeiros dias (47,8 %) e menor similaridade entre o primeiro e o último dia de transferência (19,2%). Esse resultado indica que houve uma seleção de grupos microbianos em detrimento de outros. Embora a diversidade de microrganismos observada nas figuras 4 a 6 seja menor do que a da figura 3, a atividade de desaminação desses organismos foi cerca de 10 vezes maior do que a da microbiota ruminal total (Figura 1A e 1B). Considerando que esses microrganismos não estão presentes em níveis maiores do que 10^4 a 10^5 UFC/mL no rúmen (Figura 2B) justifica-se o pequeno número de bandas detectadas pela técnica de PCR-DGGE antes das etapas de enriquecimento (Figuras 4 a 6).

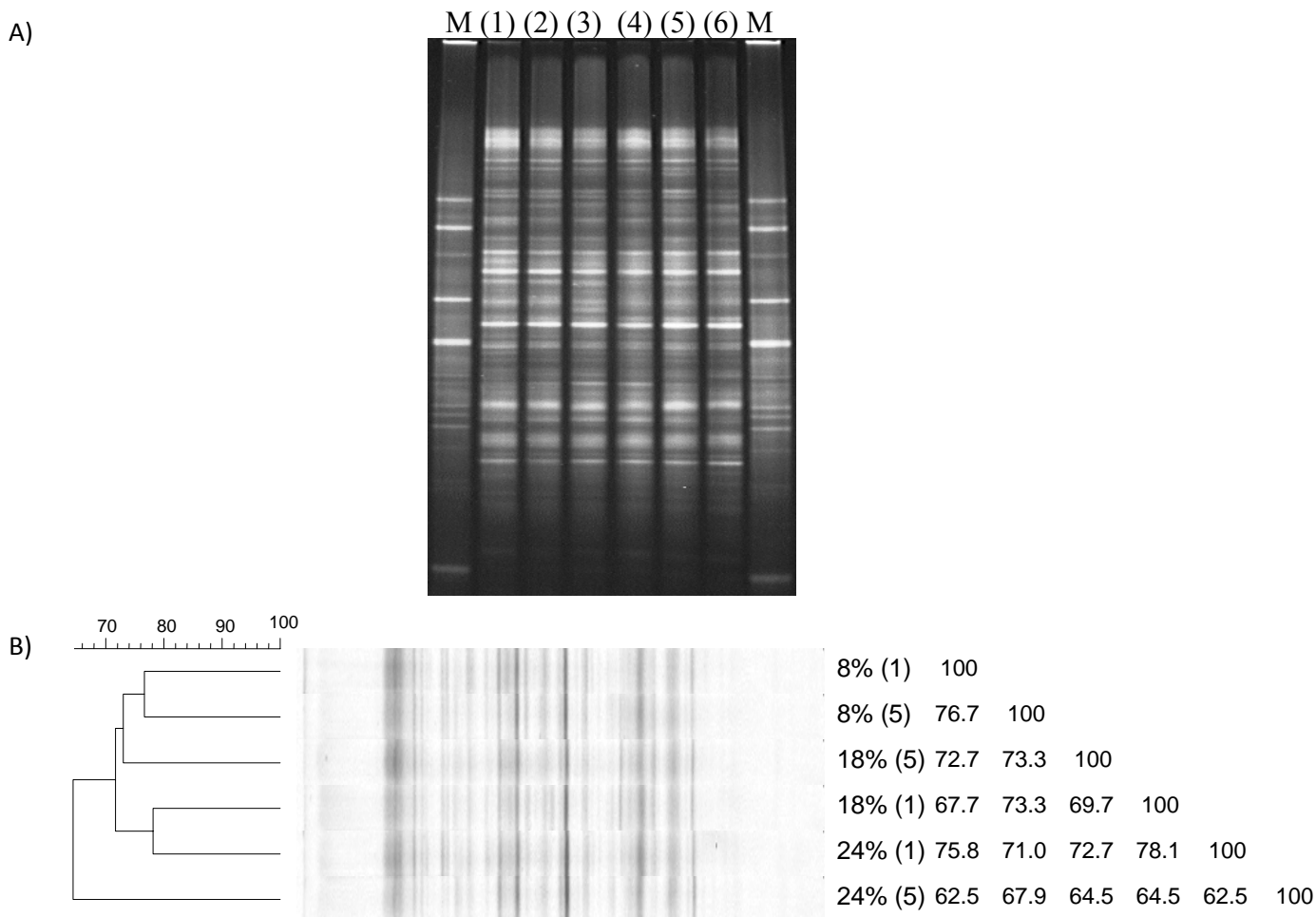


Figura 3. (A) Perfil eletroforético obtido por eletroforese em gel de gradiente desnaturantes (DGGE) de fragmentos do gene rDNA 16S da microbiota ruminal presentes no rúmen de bovino alimentado com diferentes níveis de proteína bruta (PB). Os perfis foram obtidos após amplificação utilizando *primers* universais para Eubactéria. (1) Líquido de rúmen de animal alimentado com 8% de PB no primeiro dia da dieta; (2) Líquido de rúmen de animal alimentado com 8% de PB no último dia da dieta (animal adaptado); (3) Líquido de rúmen de animal alimentado com 18% de PB no primeiro dia da dieta; (4) Líquido de rúmen de animal alimentado com 18% de PB no último dia da dieta (animal adaptado); (5) Líquido de rúmen de animal alimentado com 24% de PB no primeiro dia da dieta; (6) Líquido de rúmen de animal alimentado com 24% de PB no último dia da dieta (animal adaptado). M (marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias conhecidas). (B) Análise do perfil eletroforético através do programa GelCompar II[®] 5.10 mostrando matriz de similaridade e dendograma com agrupamento UPGMA. (1) primeiro dia da dieta; (5) último dia da dieta.

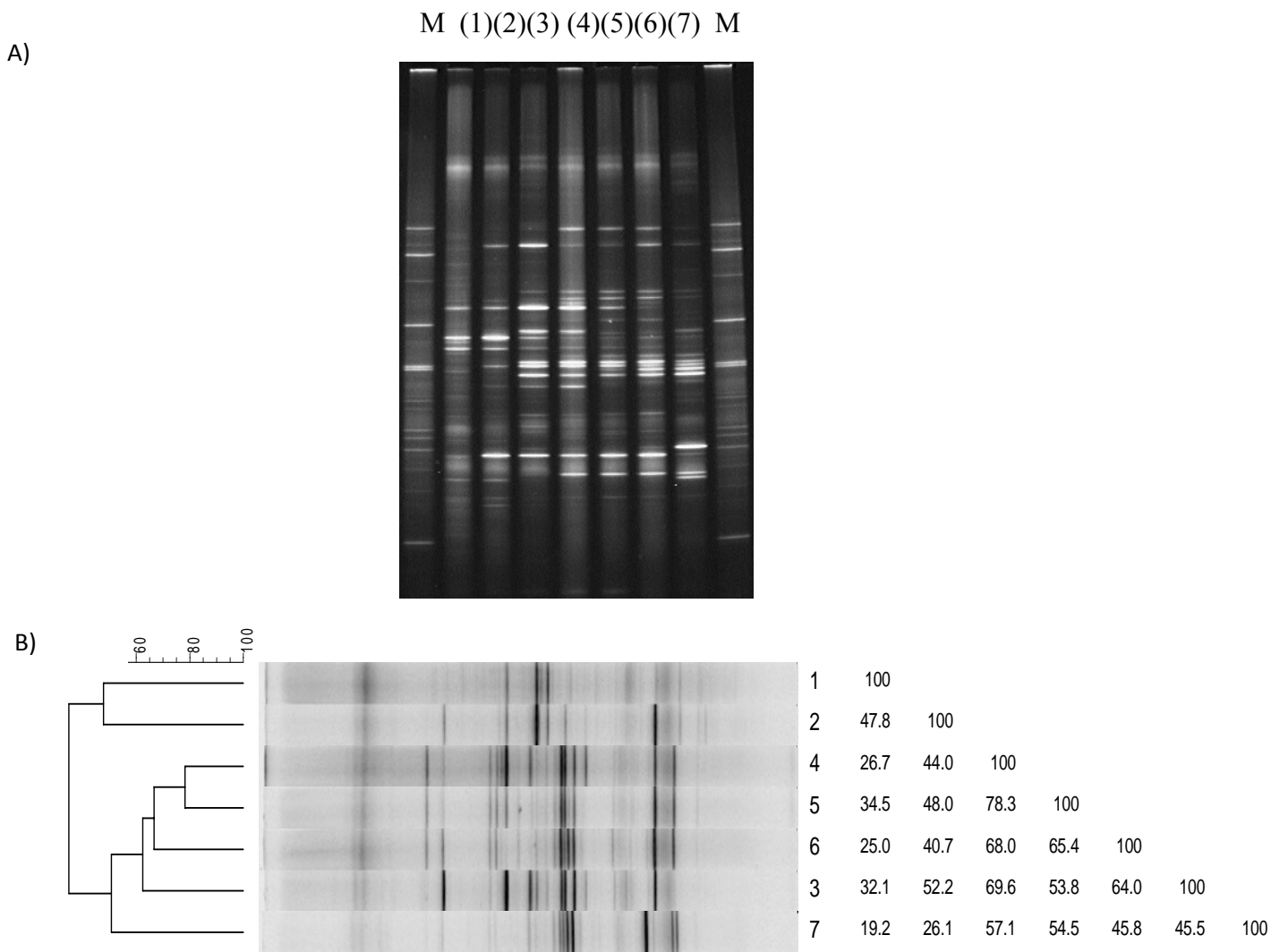
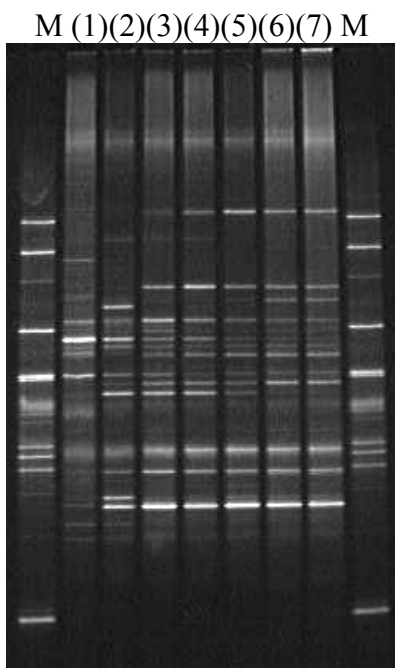


Figura 4. A) Perfil eletroforético obtido por eletroforese em gel de gradiente desnaturantes (DGGE) de fragmentos do gene rDNA 16S da microbiota ruminal recebendo 8% proteína bruta (PB) na dieta. O resultado foi obtido ao longo de sete dias de transferência (1 a 7) em meio basal com Trypticase (15 g/L) como única fonte de energia. O perfil eletroforético foi obtido após amplificação utilizando *primers* universais para Eubactéria. (1) primeiro dia (24 horas de enriquecimento); (2) segundo dia (primeira transferência); (3) terceiro dia (segunda transferência); (4) quarto dia (terceira transferência); (5) quinto dia (quarta transferência); (6) sexto dia (quinta transferência); (7) sétimo dia (sexta transferência). M (marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias conhecidas). (B) Análise do perfil eletroforético através do programa GelCompar II[®] 5.10 mostrando matriz de similaridade e dendograma com distâncias genética (agrupamento UPGMA). (1 a 7) dias das transferências.

A)



B)

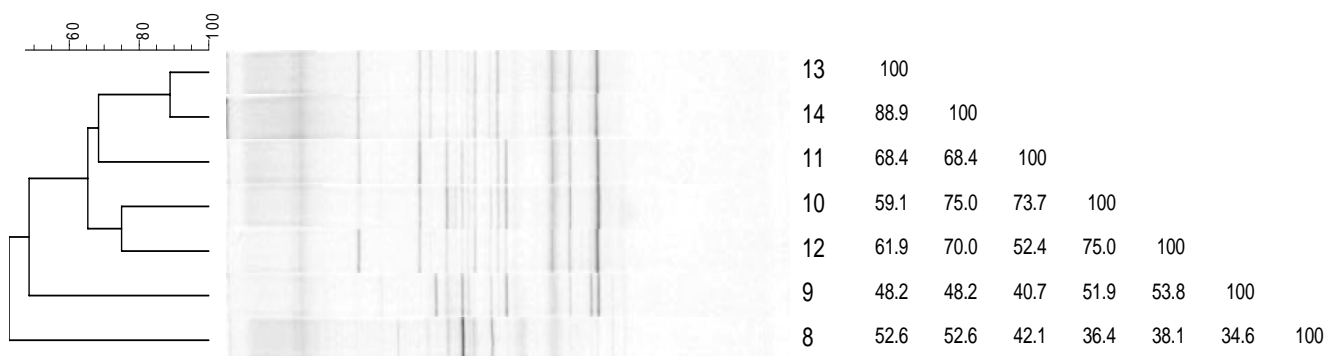


Figura 5. (A) Perfil eletroforético obtido por eletroforese em gel de gradiente desnaturantes (DGGE) de fragmentos do gene rDNA 16S da microbiota ruminal recebendo 18% proteína bruta (PB) na dieta. As bandas correspondem aos diferentes dias de transferência da microbiota em meio basal com Trypticase (15 g/L) como única fonte de energia. O perfil eletroforético foi obtido após amplificação utilizando *primers* universais para Eubactéria. (8) primeiro dia (24 horas de enriquecimento); (9) segundo dia (primeira transferência); (10) terceiro dia (segunda transferência); (11) quarto dia (terceira transferência); (12) quinto dia (quarta transferência); (13) sexto dia (quinta transferência); (14) sétimo dia (sexta transferência). M (marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias conhecidas). (B) Análise do perfil eletroforético através do programa GelCompar II[®] 5.10 mostrando matriz de similaridade e dendograma com distâncias genéticas (agrupamento UPGMA). (8 a 14) dias das transferências.

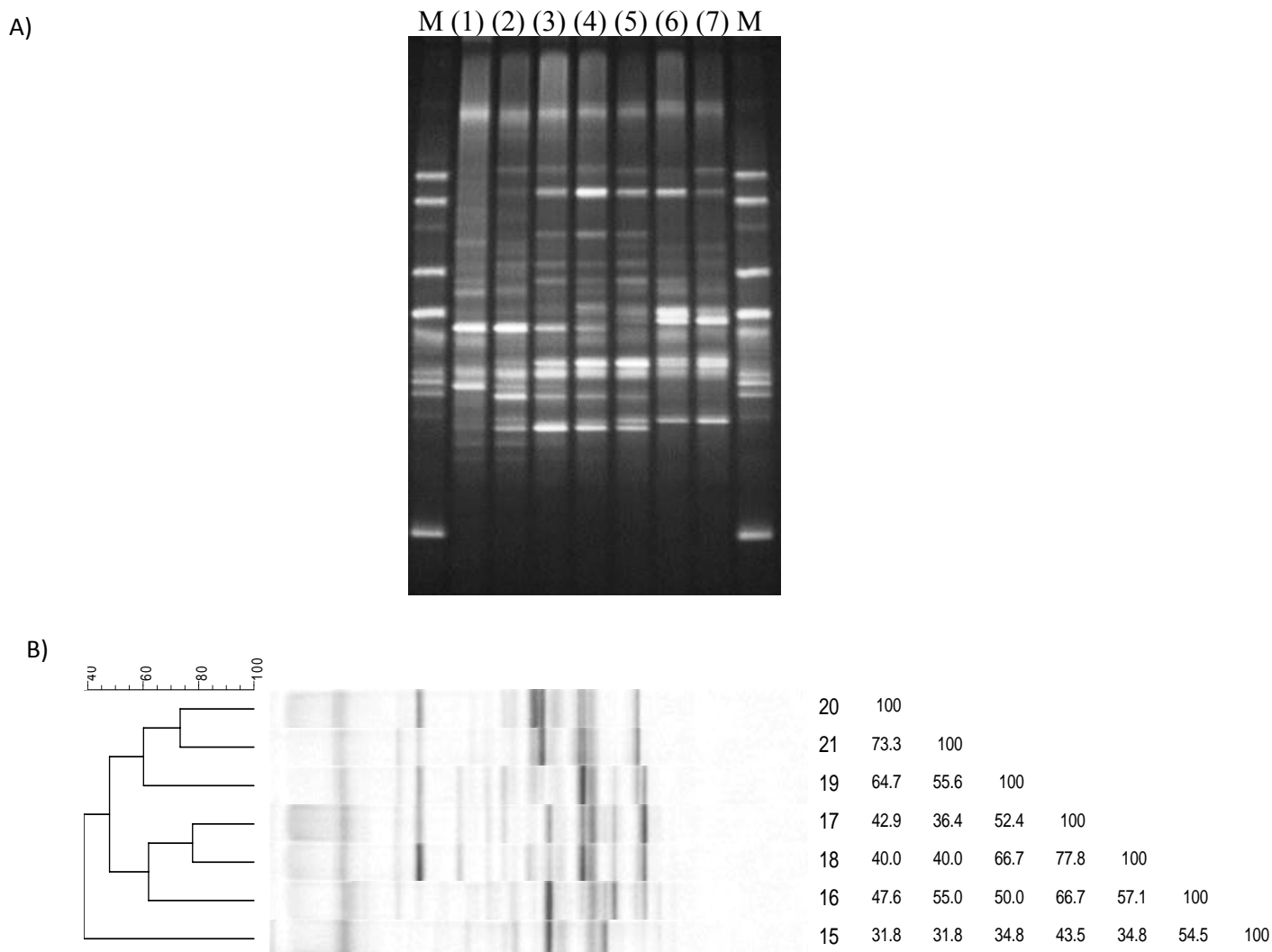


Figura 6. (A) Perfil eletroforético obtido por eletroforese em gel de gradiente desnaturantes (DGGE) de fragmentos do gene rDNA 16S da microbiota ruminal recebendo 24% proteína bruta (PB) na dieta. As bandas correspondem aos diferentes dias de transferência da microbiota em meio basal com Trypticase (15 g/L) como única fonte de energia. O perfil eletroforético foi obtido após amplificação utilizando *primers* universais para Eubactéria. (15) primeiro dia (24 horas de enriquecimento); (16) segundo dia (primeira transferência); (17) terceiro dia (segunda transferência); (18) quarto dia (terceira transferência); (19) quinto dia (quarta transferência); (20) sexto dia (quinta transferência); (21) sétimo dia (sexta transferência). M (marcador preparado com a mistura de fragmentos do gene rDNA 16S de bactérias conhecidas). (B) Análise do perfil eletroforético através do programa GelCompar II[®] 5.10 mostrando matriz de similaridade e dendograma com distâncias genéticas (agrupamento UPGMA). (15 a 21) dias das transferências.

As transferências da microbiota ruminal oriunda da dieta com 18% de PB indicou variação nos perfis de bandas em relação ao tratamento com 8% de PB (Figura 5A). A análise do dendrograma e da matriz de similaridade das amostras demonstraram que entre o primeiro e o segundo dia houve mudanças na microbiota, evidenciada pela pequena similaridade entre as amostras (34,6 %). Esses resultados indicam uma rápida adaptação de algumas espécies microbianas ao substrato. As últimas transferências (sexto e sétimo dias) a cultura mista já estava praticamente estabelecida, mostrando alto grau de similaridade (88,9 %) (Figura 5B). TAJIMA *et al.*, (2001) trabalhando com bibliotecas de clones do rDNA 16S verificaram que durante a adaptação dos animais a dietas ricas em proteína existe a transição da população bacteriana original para comunidades diferenciadas, incluindo representantes de bactérias ureolíticas (*Megasphaera elsdenii*) e desaminadoras (*Clostridium* sp.).

O perfil eletroforético para a dieta contendo 24% de PB mostrou certa conservação de bandas em relação aos tratamentos anteriores (Figura 6A). Esta composição de espécies foi a que apresentou maior produção de amônia e adaptação mais rápida a Trypticase. A menor similaridade dos perfis eletroforéticos ocorreu entre o primeiro e o último dia de transferência (31,8 %). Os dias intermediários formaram um padrão de agrupamento maior em comparação com os primeiros e os últimos dias. O sexto e o sétimo dia foram os que obtiveram maior nível de similaridade entre si (73,3 %), evidenciando a adaptação da microbiota (Figura 6B). De acordo com CLARCK *et al.* (1992) uma parcela dessas diferenças na composição dos microrganismos pode ser atribuída às diferenças nas técnicas utilizadas para selecionar microrganismos do rúmen. O enriquecimento da microbiota ruminal pelo cultivo em Trypticase parece ter selecionado espécies de microrganismos desaminadores devido ao substrato e a formulação da dieta com níveis elevados de proteína dietética.

Uma importante interpretação do perfil eletroforético gerado pela DGGE diz respeito à intensidade das bandas geradas. Assume-se que a intensidade da banda está diretamente correlacionada com a densidade de filotipos nas amostras (MURRAY *et al.*, 1996). No presente trabalho, verificou-se que em todos os níveis das dietas houve aparecimento de bandas com intensidades variadas e também o desaparecimento de bandas. Desta maneira, podemos assumir que em todos os tratamentos houve uma resposta adaptativa da microbiota, com o incremento de algumas comunidades e extinção de outras em resposta a seletividade ao substrato.

A microbiota que habita o trato gastrointestinal apresenta grande biodiversidade e é caracterizada por apresentar alta densidade, variada diversidade e complexas interações (SIMPSON *et al.*, 2002). As populações residentes ecossistema têm sido descritas para animais herbívoros, onívoros e carnívoros contribuindo para o entendimento nutricional, fisiológico, imunológico e em processos dependentes do hospedeiro (CONWAY, 1997). Estudos anteriores têm demonstrado que a DGGE tem tido sucesso em examinar comunidades microbianas complexas (HEUER e SMALLA, 1997; MUYSER e SMALLA, 1998; FREITAS *et al.*, 2008). SIMPSON *et al* (2002) ao analisarem, por DGGE, o conteúdo ruminal de animais alimentados com diferentes dietas, verificaram alto polimorfismo com cerca de vinte bandas representando cada dieta. Da mesma forma SIMPSON *et al* (2000) verificaram que DGGE pode ser utilizado para monitorar mudanças nas populações de bactérias do trato gastrintestinal de suínos. Essa técnica tem se mostrado eficiente em verificar a diversidade microbiana em vários tipos de habitats, como diferenciar comunidades do solo (HEUER e SAMALLA, 1997) e a diversidade de organismos eucariotos (DUARTE, 2008).

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a adição de proteína na dieta de ruminantes afeta a dinâmica da microbiota ruminal. O entendimento do perfil dos grupos microbianos relacionados com a mudança da dieta pode levar a um melhor entendimento dos fatores que afetam o crescimento e a manutenção da microbiota ruminal assim com fornecer dados para que as formulações de ração animal sejam mais eficientes constituindo menor desperdício de componentes dietéticos.

2.4 LITERATURA CITADA

ATTWOOD, G. T., KLIEVE, A. V., OUWERKERK, D. e PATEL, B. K. C. Ammonia-hyperproducing bacteria from new Zealand ruminants. **Appl. Environ. Microbiol.** n. 5, v. 64, p. 1796-1804. 1998.

BLADEN, H. A., BRYANT, M. P. e DOETSCH, R. N. A study of bacterial species from the rumen which produce ammonia from protein hydrolysate. **Appl. Microbiol.** v. 9, p. 175-180. 1961.

BRADFORD, M. Photometric methods for protein determination. Procedures and analysis. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254. 1976.

CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.

CLARCK, J.H. *et al.* Symposium:nitrogen metabolism and amino acid nutrition in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.75, n. 8, p. 2304-2323, 1992.

CONWAY, P. Development of intestinal microbiota. In: MACKIE, R.I.; WHITE, B.A.; ISAACSON, R.E. (Eds.). **Gastrointestinal microbiology**. New York: Chapman and Hall. p.3-38. 1997.

COTTA, M. A., e RUSSELL, J. B. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. **J. Dairy Sci.** v. 65, p. 226-234. 1982.

- DEHORITY, B.A. **Rumen microbiology**. The Ohio State University, 1987. 125p.
- DUARTE, S. **Biodiversity and activity of microbial decomposers of leaf litter in streams under anthropogenic stress**. Universidade do Minho. Tese de Doutorado apresentada em 2008.
- FREITAS, K. C.; GABRIEL, J. E.; LEITE, L. C.; ARMAS, R. D.; LANNA, D. P. e MADEIRA, H. M. F. Molecular characterization of ruminal bacterial diversity in vitro. *Acta Sci. Anim. Sci.* Maringá, v. 30, n. 2, p. 187-192, 2008.
- GUSTAFSSON, A.H.; PALMQUIST, D.L. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.475-484, 1993.
- HEUER, H. e SAMALLA. 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.
- HORI, T., HARUTA, S.; UENO, Y.; ISSHI, M.; IGARASHI, Y. Direct comparison of single-strand conformation polymorphism and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 6 rRNA gene fragments. **J. Microbiol. Methods**, v.66, p. 165-169. 2006.
- HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press. 533 p. 1966.
- JACK, R.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.** v.59, p.171–200. 1995.

KALMOKOFF, M., BARTLETT, F. AND TEATHER, R.M. Are ruminal bacteria armed with bacteriocins. **J. Dairy Sci.** v. 79, p. 1467–1509. 1996.

KIRK, J. L.; BEAUDETE, L. A., HART. M.; TREVOUS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **J. of Microiol. Methods**, v. 66, p. 165-169. 2004.

KRAUSE, D. O., RUSSELL, J. B. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62, n. 3, p. 815-821. 1996.

LANA, R.P., RUSSELL, J.B., VAN AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.2190-2196, 1998.

National Research Council (NRC). **Ruminant nitrogen usage**. Washington, DC. 1989, 138p.

MANTOVANI, H. C. e RUSSELL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **International J. of Food Microbiology** 89, p. 77-83, 2003.

MURRAY, A.E., HOLLIBAUGH, J.T. & ORREGO, C. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, 2676–2680. 1996.

MUYZER, G., DE WAAL, E.C., UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase

chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.59, p. 695-700. 1993.

MUYSER, G, SAMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.73, p.127-141. 1998.

MUYSER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Currente Opinon in Microbiology*. v.2, p.317-322. 1999.

ROSADO, A. S., DUARTE, G. F. **Utilização de eletroforese em gel com gradients desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperature (TGGE) para estudar diversidade microbiana.** *Genética e melhoramento de microrganismos.* Edusp. São Paulo. p. 97-127. 2000.

RUSSELL, J. B., STROBEL, H. J. e CHEN, G. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 54, p. 872-877. 1988.

RYCHLICK, J. L. e RUSSELL, J. B. Bacteriocin-like activity of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and its effect on other ruminal bacteria and ammonia production. *Appl. Environ. Microbiol.* v.3; p. 1040-6. 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. e MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual.** 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory 1659 p. Press, 1989.

SIMPSON, J. M., V. J. MCCracken, H. R. GASKINS, AND R. I. MACKIE. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to

monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.4705-4714. 2000.

SIMPSON, J.M., SANTO DOMINGO, J.W.; REASONER, D.J. Microbial source tracking: state of the science, **Environ. Sci. Technol.** v.36, p. 5279–5288. 2002.

TAJIMA K, AMINOV R.I; NAGAMINE T; MATSUI H; NAKAMURA M; BENNO Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 67, p. 2766–2774. 2001.

TEIXEIRA, JÚLIO CÉSAR. **Nutrição dos Ruminante**, Lavras, MG: ESAL/ FAEPE, 1991.

WELLS J. E .; KRAUSE D. O.; CALLAWAY, T. R. E RUSSELL, J. B. A bacteriocin-mediated antagonism by ruminal lactobacilli against *Streptococcus bovis*. **FEMS Microbiol. Ecol.** v. 22, p. 237-243. 2006.

YANG, C.M.J., RUSSELL, J.B. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. **J. Anim. Sci.**, v.71, p.3470-3476. 1993.

ZHOU, H.W., C. NUSSBAUMER, Y. CHAO AND A DELONG. Disparate roles for the regulatory A subunit isoforms in Arabidopsis protein phosphatase 2A. **The Plant Cell.** v.16, p.709-722. 2004.

CAPÍTULO 3

Isolamento e caracterização de bactérias hiperprodutoras de amônia (HPA) do rúmen

3.1. INTRODUÇÃO

A microbiota dos ruminantes é numerosa e geneticamente diversificada, constituída de bactérias, fungos, protozoários e vírus (DEHORITY e ORPIN, 1997). O sucesso de animais ruminantes está associado à sua habilidade de digerir material vegetal rico em fibras (HUNGATE, 1966). Os microrganismos ruminais contribuem na fermentação de substratos insolúveis da dieta produzindo como produtos finais do processo fermentativo substâncias que incluem ácidos orgânicos voláteis, metano, amônia, acetato, lactato, formato, etanol, propionato, CO₂ e H₂ (VAN SOEST, 1994).

A maioria da proteína dietética que entra no rúmen é rapidamente fermentada e a desaminação de aminoácidos por alguns microrganismos do rúmen como *Bacteroides rumenicola*, *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*, *Eubacterium ruminantium*, and *Butyrivibrio fibrisolvens* podem produzir amônia como produto final de fermentação (PASTER *et al.*, 1993; RUSSELL, 2002). BLADEN *et al.* (1961) verificaram que esses microrganismos convertiam menos que 25% de hidrolizado de caseína em amônia após um período de 96 horas de incubação e concluíram que *Bacteroides rumenicola* era a espécie com maior taxa de produção de amônia entre as culturas puras de microrganismos já isolados. Entretanto, estudos posteriores comprovaram que essa espécie atingia níveis de atividade específica de produção de amônia menores que a microbiota ruminal como um todo (RUSSELL, 1983; HINO e RUSSELL, 1985; RUSSELL *et al.*, 1988; RUSSELL e STROBEL, 1989).

Por muitos anos, foi assumido que a maioria das classes representantes de bactérias ruminais já tivessem sido isoladas (RUSSELL, 1984), entretanto, RUSSELL e STROBEL (1989) isolaram bactérias que ocorriam em pequeno número no rúmen e fermentavam aminoácidos como única fonte de nitrogênio e energia. *Peptostreptococcus anaeróbios* C, *Clostridium sticklandii* SR e *Clostridium aminophilum* F, foram classificadas como bactérias hiper-produtoras de amônia, pois apresentam taxas de atividade específica de produção de amônia cerca de 10 a 15 vezes maiores que outras espécies bacterianas do rúmen (RUSSELL e STROBEL, 1989; PASTER *et al.*, 1993). KRAUSE E RUSSELL (1996) em experimento com hibridização verificaram que esse tipo de microrganismo ocorre em torno de 3,5% da comunidade de bactérias que ocorrem no rúmen. WHITEHEAD e COTTA (2004) isolaram bactérias de fezes de suínos em meio de cultura contendo peptona de caseína que apresentaram concentrações de produção de amônia (40 mM) semelhantes aquelas produzidas por bactérias hiperprodutoras de amônia do rúmen de bovinos. Entretanto, esses isolados foram filogeneticamente distintos dos HPA de conteúdo ruminal.

Atualmente, ferramentas moleculares têm sido constantemente utilizadas para avaliar a diversidade microbiana de diferentes ecossistemas e diferenciar espécies bacterianas. Dentre as técnicas de *fingerprint* utilizadas, está o BOX-PCR que se baseia na presença de elementos BOX ao longo do genoma do microrganismo (VERSALOVIC *et al.*, 1991a). Elementos BOX são sequências repetitivas composta de várias combinações de três subunidades, box A, box B e box C. São diferentes das sequências REP e ERIC. Essas sequências repetitivas podem servir como *primers*, ligando sítios separados no cromossomo bacteriano. A subunidade box A são muito conservadas em toda a população de bacteriana, estando presentes tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas e em alto número de cópias no genoma. O PCR baseado nas subunidades BOX sendo utilizados como *primers* rendem resultados consistentes com aqueles obtidos por hibridização do DNA (VERSALOVIC *et al.*, 1991b).

Os objetivos desse trabalho foram isolar bactérias que apresentam alta atividade específica de produção de amônia e caracterizar genotípica e fenotipicamente bactérias hiperprodutoras de amônia encontradas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios e no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa-MG.

3.2.1 Isolamento de bactérias com alta atividade de produção específica de amônia

Após a etapa de enriquecimento da microbiota ruminal através de transferências e diluições sucessivas, o último dia de todas as transferências, bem como todas as diluições que foram feitas da microbiota ruminal das diferentes dietas (8, 18 e 24% de PB) foram espalhadas em placas de Petri contendo meio mineral sólido suplementado com Trypticase com a ajuda de alça de repicagem e incubadas a 39°C em câmara de anaerobiose. As colônias que se desenvolveram após 24-72 horas foram enumeradas e transferidas para meio de cultura líquido anaeróbio contendo Trypticase (15 g/L) e alíquotas de 1 mL foram recolhidas nos tempos 0 e 24 horas para análise de amônia. Os isolados que apresentaram os melhores valores de produção de amônia foram re-estriados em meio sólido para nova purificação. As características morfológicas de cada isolado foram visualizadas microscopicamente e a pureza de cada isolado foi confirmada através de teste de Gram e exames microscópicos.

Líquido de rúmen de animal alimentado com feno foi coletado duas horas após o animal ter sido alimentado. O líquido ruminal foi filtrado através de 4 camadas de gaze estéril, acondicionado em Erlenmeyer e transportadas imediatamente para o Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios onde foram mantidas a 39°C até que houvesse separação de fases entre as partículas de alimento e protozoários. Amostras de líquido ruminal foram diluídas sucessivamente em incrementos de 10 vezes em meio mineral

com 15g/L de Trypticase e incubadas por 24 horas a 39 °C. As amostras diluídas também foram submetidas a tratamento térmico a 80 °C por 20 minutos. O tratamento térmico serviu para que fosse observado o nível em que microrganismos formadores de esporos e com alta produção de amônia ocorriam na microbiota ruminal. Paralelamente foi realizado um enriquecimento do líquido de rúmen em meio mineral contendo 15g/L de Trypticase por 24 horas. Ao final desse período foram feitas diluições seriadas com incremento de 10 vezes e tratamento térmico de 80 °C por 20 minutos, seguida da incubação das diluições por 24 horas a 39 °C. Esse enriquecimento serviu para observar se o nível de ocorrência de microrganismos esporulados e produtores de amônia aumentava à medida que a microbiota fosse enriquecida. Amostras para determinação da amônia foram coletadas nos tempos 0 e 24 horas. Após o período de incubação de cada tratamento, foram feitas lâminas e coradas através de coloração de Gram para confirmar a existência de microrganismos puros. Os isolados selecionados foram crescidos em meio mineral líquido suplementado com Trypticase e tiveram alíquotas de 1 mL recolhidas nos tempos 0 e 24 horas para análise de amônia.

3.2.2 Condições de cultivo dos microrganismos e estocagem das culturas

As bactérias isoladas foram cultivadas anaerobicamente em meio de cultura mineral anaeróbio limitante em nitrogênio contendo (por litro): 292 mg de K_2HPO_4 , 240 mg de KH_2PO_4 , 480 mg de Na_2SO_4 , 480 mg de NaCl, 100 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 64 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 4000 mg de Na_2CO_3 , 600 mg de cisteína·HCl, adicionado de vitaminas e minerais (COTTA e RUSSELL, 1982) suplementado com 15 g/L de Trypticase. Os meios de cultura foram preparados sob atmosfera de CO_2 livre de oxigênio e distribuídos em tubos de cultura vedados com tampões de borracha e selados com lacre de alumínio. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio e os tubos foram incubados a 39°C. O crescimento foi monitorado pela mudança na densidade óptica a 600 nm.

O meio de estocagem foi preparado sob atmosfera de N_2 , transferido para câmara de anaerobiose e distribuído (3 mL) em frascos de estocagem de 10 mL. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha, lacrados com selos de alumínio e autoclavados (121° C, 15 minutos). Alíquotas de 4 mL das culturas a serem estocadas foram transferidas para os frascos contendo meio anaeróbio e congeladas a - 20° C.

3.2.3 Determinação da produção de amônia e atividade específica de produção de amônia

A atividade de desaminação foi determinada ressuspensando os isolados provenientes do enriquecimento (transferências), das diluições ou do tratamento térmico que apresentaram previamente maiores taxas de produção de amônia (10 mL, DO_{600nm} de 1,0) em meio mineral anaeróbio adicionado de 15 g/L de Trypticase. Os frascos foram incubados anaerobicamente a 39 °C e alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos 0, 6 e 24 horas. A amônia no sobrenadante foi determinada pelo método colorimétrico de Chaney e Marbach (CHANEY e MARBACH, 1962). A absorvância (630 nm) foi medida em espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron, Waltham, MA, USA), utilizando-se cloreto de amônio como padrão.

A produção de amônia (mM) foi expressa como a diferença entre a amônia total determinada ao final da incubação e a concentração presente nas amostras no tempo 0 hora. A proteína celular foi determinada de acordo com BRADFORD (1976), utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão. A atividade específica de desaminação foi calculada pela diferença de concentração de amônia (mM) nos frascos de incubação entre os tempos 0 e 6 horas, dividido pela concentração da proteína microbiana (mg/L), e pelo tempo de incubação (minutos).

3.2.4 Análise do crescimento e de produtos do metabolismo microbiano

O crescimento microbiano em meio líquido foi monitorado por meio da leitura de densidade óptica (DO) a 600 nm, utilizando-se espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron, Waltham, MA, USA). A velocidade específica de crescimento (μ) foi determinada a partir da regressão linear dos valores obtidos pelo logaritmo neperiano (\ln) da DO_{600nm} durante a fase de crescimento exponencial. O valor μ corresponde ao coeficiente angular da relação do \ln DO_{600nm} pelo tempo expresso na equação de regressão linear.

Para análise dos produtos de fermentação, amostras das culturas crescidas após 48 horas a 39 °C em meio mineral anaeróbio adicionado de Trypticase, foram retiradas e

centrifugadas (10.000 rpm/10 minutos) e o sobrenadante livre de células (20 µL) analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foi utilizado um cromatógrafo Hewlett-Pacckard série 1050 acoplado a um detector de índice de refração (IR) Hewlett-Pacckard 1047A (Hewlett-Pacckard Company, Wilmington, DE, USA) mantido a 45 °C, e coluna Bio-Rad HPX-87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) mantida a 60 °C. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mM com fluxo de 0,7 mL/minuto. Os padrões de ácidos orgânicos (50 mM) e açúcares (10 mM) utilizados para calibração do aparelho e comparação com os produtos de fermentação foram compostos por ácido succínico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, etanol, ácido butírico, ácido fumárico, lactose, glicose e galactose.

3.2.5 Análise bioquímica dos isolados HPA e atividade de desaminação em diferentes aminoácidos

Os isolados selecionados foram crescidos em meio mineral anaeróbio suplementado com 15g/L de Trypticase e estriados em ágar sangue em câmara de anaerobiose. Após 24 horas de incubação a 37 °C as colônias foram coletadas com o auxílio de um *swab* seguindo-se as com as recomendações do fabricante. Foi utilizado o Kit api® 20A que avalia 21 caracteres bioquímicos para bactérias anaeróbias.

Para analisar a atividade de desaminação dos microrganismos escolhidos em diferentes aminoácidos, os isolados foram crescidos em meio mineral anaeróbio suplementado de Trypticase por 24 horas. As amostras foram centrifugadas (5.000 rpm/5 minutos), lavadas em meio mineral anaeróbio sem suplementação de Trypticase e ressuspendidas (20 mL, DO_{600nm} de 1,0) em meio mineral anaeróbio sem suplementação. Vinte poços de uma placa de Elisa foram inoculados com 225 µL de cada suspensão de microrganismo seguido de incubação em câmara de anaerobiose. Uma solução padrão dos aminoácidos (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, fenilalanina, glicina, glutamato, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptofano, valina) foi preparada na concentração de 500 mM e 25 µL de cada solução foi utilizada no ensaio (volume final de 250 µL em cada poço da placa de Elisa). Amostras foram coletadas nos tempos 0, 6 e

24 horas. A análise da produção total de amônia e atividade específica de produção de amônia foi realizada de acordo com o item 3.2.3.

3.2.6 Diversidade genética dos isolados

O DNA total dos isolados foi extraído utilizando o Kit Wizard[®] Genomic Purification (Promega, Madison, USA), segundo especificações do fabricante, a partir de culturas crescidas em 10 mL de meio de cultura anaeróbico e analisado por BOX-PCR segundo RADEMAKER *et al.* (1997) com modificações, utilizando o oligonucleotídeo 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'(BOX A1R). As reações de amplificação foram realizadas em volumes de 25 µL contendo 50 µM do iniciador (BOX 1R), 70 ng de DNA total, 200 µM de cada dNTP, 2 U de *Taq* DNA polimerase (Promega) e 1 mg/mL de BSA. Para a amplificação, foi utilizado o equipamento Sprint Thermocycler (PTC 100 Progamable Termal Controler, MJ Research, INC) programado para uma desnaturação inicial a 95°C por 7 minutos seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto; 65°C por 8 minutos e extensão final a 65°C por 8 minutos. Um controle sem DNA foi utilizado para constatar a ausência de contaminação das reações.

Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % contendo 0,2 µg/mL de brometo de etídio em tampão TBE 0,5X (2 mM EDTA, 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M ácido bórico [pH 8,0]) sob uma voltagem constante de 4 V cm⁻¹. Os géis foram visualizados sob luz UV e documentados em sistema de foto-documentação *Eagle Eye II* (Stratagene, Texas, USA). Foi usado como marcador de tamanho, 100 pb DNA Ladder (Promega, Madison, USA). Para analisar os resultados obtidos através do perfil de bandas encontrado, foi utilizado o modelo de Jaccard e os dendogramas foram construídos utilizando o programa UPGMA (*Unweighted pair-group method using arithmetic means*), usando o software MVSP 3,1.

3.2.7 Análise do gene rDNA 16S

Os isolados que apresentaram diferentes perfis BOX-PCR foram identificados por sequenciamento do gene rRNA 16S. Aproximadamente 50 ng de DNA total foi usado em reação de amplificação contendo 10 µM dos oligonucleotídeos rRNA 16S – 5'-AGAGTTTGATCMTGG-3' (16F) e 5'-TACCTTGTTACGACTT-3' (16R). A amplificação foi feita a 94° C por 1 minuto, seguindo-se 36 ciclos 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, 55° C por 1min com uma extensão final a 72 °C por 5 min (BERNS e THOMAS, 1965). O produto de cada amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. O produto da PCR foi tratado com a enzima ExoSAP-IT[®] (usb[®]) de acordo com a especificações do fabricante. A seqüência do gene rRNA 16S de cada isolado foi obtida por seqüenciamento em equipamento MegaBace (Applied Biosystems) e comparada a outras seqüências depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). O programa Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994) foi utilizado inicialmente para o alinhamento da seqüências, sendo que algumas correções foram feitas manual e visualmente, utilizando o programa MEGA 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007). Para as inferências filogenéticas foi utilizado o método de reconstrução *Neighbour joining* (NJ). A árvore de NJ foi obtida utilizando o programa MEGA 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Isolados hiperprodutores de amônia (HPA)

As estratégias de isolamento utilizadas permitiram a obtenção de quatorze isolados (culturas 27B, 35, 53P, 57A, 86A, 86C, 92B, 99A, 102, 102B, 103, 15A, 15B e CT2) com alta taxa de atividade específica de produção de amônia. Somente foram obtidas culturas puras dos isolados selecionados a partir de amostras de líquido ruminal da dieta com alto conteúdo de proteína (24 % PB). Destes, oito isolados (27B, 35, 53P, 86A, 86C, 92B, 103) foram obtidos dos experimentos de diluição seriada, 3 isolados (57A; 102; 102B) resultaram do plaqueamento das transferências sucessivas (enriquecimento) e os outros três isolados (15A, 15B e CT2) foram obtidos do experimento em que houve tratamento térmico das amostras de líquido ruminal. Os isolados obtidos com as amostras de líquido ruminal coletadas de animais consumindo dietas contendo menor concentração de proteína (8 e 18 %) apresentaram-se como culturas mistas, não sendo possível a obtenção de culturas puras mesmo após sucessivas tentativas de diluição e plaqueamento em meio sólido.

3.3.2 Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de desaminação de bactérias ruminais

Concomitantemente com o processo de isolamento, o efeito do tratamento térmico sobre a população das bactérias desaminadoras ruminais foi monitorado por meio da análise da produção de amônia (Figuras 7, 8 e 9). Os resultados demonstram que a microbiota do líquido de rúmen que não passou por tratamento térmico possuía células viáveis com habilidade de desaminar aminoácidos até a sexta diluição em meio mineral deficiente de carboidratos (Figura 7). Podemos considerar que a população de bactérias mistas do rúmen conseguiu sobreviver por causa da interação entre os microrganismos, onde bactérias que não desaminam aminoácidos puderam crescer pelo suprimento de substratos, como amônia, necessários para seu crescimento.

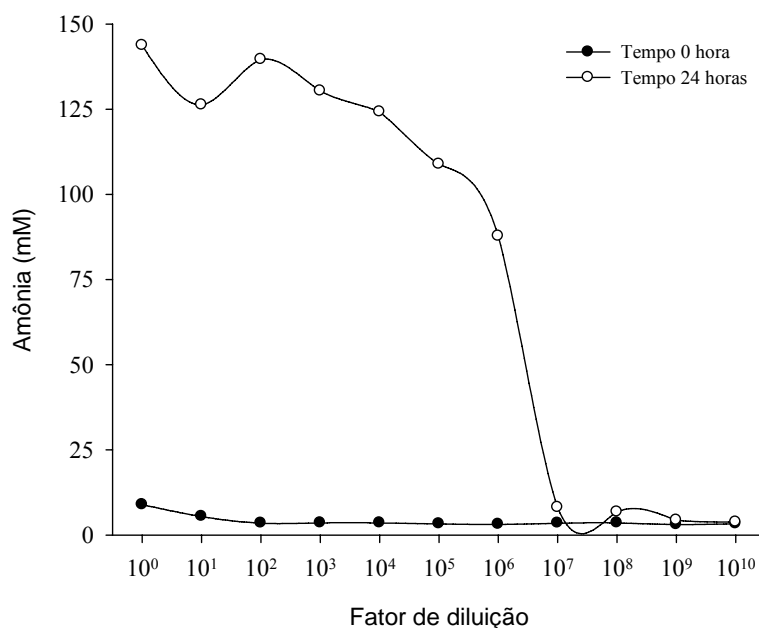


Figura 7. Produção de amônia por microrganismos ruminais que não receberam tratamento térmico. As diluições foram suplementadas com Trypticase (15g/L) e incubadas por 24 horas a 39 °C em meio mineral anaeróbio.

Quando a população de microrganismos do rúmen foi tratada termicamente e em seguida diluída, a viabilidade celular após 24 horas de incubação diminuiu cerca de 95% já na terceira diluição. Porém, ainda houve crescimento microbiano na primeira e segunda diluição, indicando que bactérias produtoras de endosporos conseguiram sobreviver ao tratamento térmico e se reproduzir. Entretanto, esse tipo de microrganismo parece estar em número reduzido no conteúdo ruminal (Figura 8). Porém, quando houve um enriquecimento prévio da amostra, houve produção de amônia até a terceira diluição, indicando que o enriquecimento promoveu o aumento da população que utiliza aminoácidos como fonte de energia (Figura 9).

De acordo com RYCHILIK e RUSSELL (2000) bactérias hiperprodutoras de amônia (HPA) ocorrem em menor número no rúmen (cerca de 5% da população total), porém, possuem uma alta taxa de produção de amônia. Como a maioria das espécies que habitam o rúmen é incapaz de utilizar aminoácido como única fonte de energia e carbono para crescimento, esse substrato fornece meios para que possa ser feita uma enumeração de bactérias que produzem amônia (RUSSELL *et al.*, 1988). RUSSELL *et al.* (1988) fizeram um enriquecimento prévio e diluíram o conteúdo ruminal em meio de cultura com Trypticase como fonte de energia, em três dias consecutivos, e constataram que o número mais provável de bactérias do gênero *Clostridium* no conteúdo ruminal não era maior que 10^3 UFC/mL, estando de acordo com os resultados obtidos nesse estudo.

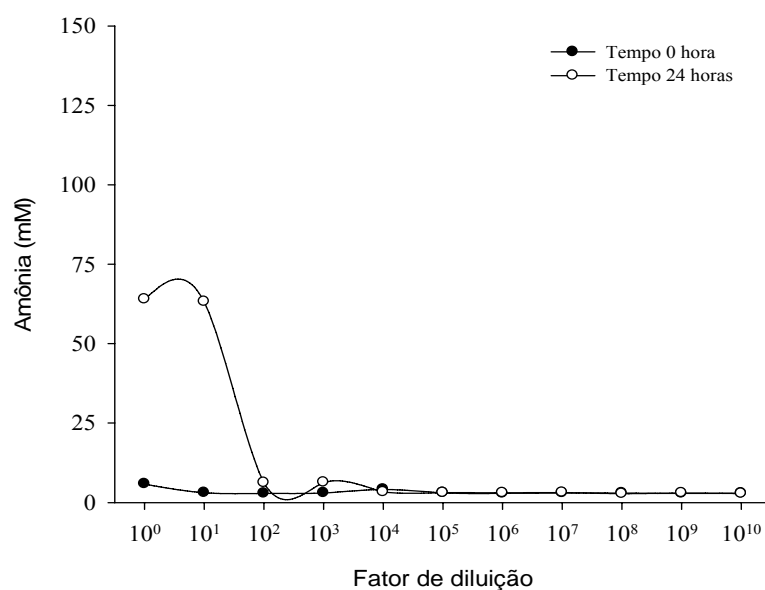


Figura 8. Produção de amônia por microrganismos ruminais que receberam tratamento térmico sem enriquecimento prévio. Após o choque térmico as amostras foram diluídas, suplementadas com Trypticase (15g/L) e incubadas por 24 horas a 39 °C em meio mineral anaeróbio.

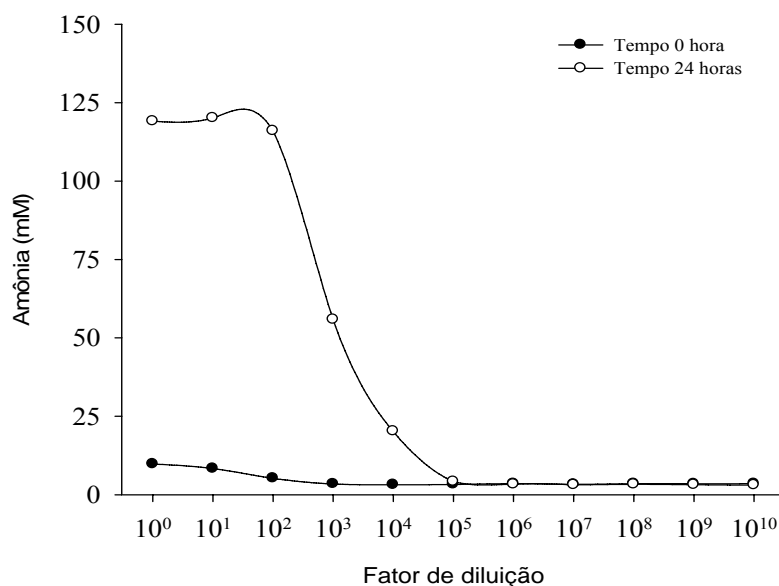


Figura 9. Produção de amônia por microrganismos ruminais que foram enriquecidos com suplementação de Trypticase (15 g/L) por 24 horas. Após esse período as amostras sofreram tratamento térmico (80 °C por 20min) e em seguida foram diluídas em incremento de 10 vezes e incubadas por 24 horas a 39 °C em meio mineral anaeróbio suplementado de 15 g/L de Trypticase.

3.3.3 Análise das características e dos produtos do metabolismo dos isolados HPA

Neste trabalho foram isoladas bactérias com alta atividade específica de produção de amônia, capazes de crescer em meio contendo Trypticase como única fonte de carbono e energia. Esses microrganismos foram caracterizados como bastonetes gram-positivos, capazes de produzir esporos termoresistentes e de crescerem em condições de anaerobiose. Os resultados obtidos indicaram que os isolados se diferenciaram quanto à taxa de desaminação e velocidade de crescimento em meio contendo Trypticase (Tabela 2). Todos os isolados apresentaram taxas de desaminação de aminoácidos maiores do que bactérias que fermentam carboidratos no rúmen e que geralmente possuem taxas menores que 20 nmol/mg proteína/min (RUSSEL, 1983). Os isolados apresentaram produção média de amônia de 103,5 mM e AEPA média de 485,8 nmoles/mg proteína/min.

Bactérias produtoras de amônia isoladas do rúmen de bovinos em trabalhos anteriores apresentavam baixa atividade específica de produção de amônia (*Megasfera elsdenii* B159: 19 nm de NH₃/mg de proteína/min; *Bacteroides ruminicola* B₁₄: 11 nm de NH₃/mg de proteína/min; *Streptococcus bovis* JB1: 11 nm de NH₃/mg de proteína/min; *Selenomonas ruminantium* HD₄: 15 nm de NH₃/mg de proteína/min) quando comparadas a bactérias mistas do rúmen (30 nm de NH₃/mg de proteína/min) (RUSSEL, 1983; RYCHILIK *et al.*, 2002). RUSSEL *et al.* (1988) isolaram duas bactérias que apresentavam atividades específicas de 346 e 427 nm de NH₃/mg de proteína/min, *Peptostreptococcus* sp. linhagem C e *Clostridium* sp. linhagem R, respectivamente.

Tabela 2. Características dos isolados bacilos gram-positivos esporulados com alta produção específica de amônia.

Isolado	Proteína na dieta(%) ¹	D.O máxima (médias)	μ velocidade específica de crescimento (h ⁻¹)	NH ₃ total (mM)	AEPA ² (nm NH ₃ /mg proteína/min)
27B	24% (10 ⁻⁹)	0,94	0,27	107,9	294,4
35	24% (10 ⁻¹⁰)	0,88	0,30	100,4	249,5
53P	24% (10 ⁻¹)	0,86	0,25	103,7	326,3
57A	24% (T)	1,05	0,28	124,4	725,0
86A	24% (10 ⁻¹⁰)	1,19	0,29	107,5	1005,6
86C	24% (10 ⁻¹⁰)	1,35	0,36	153,6	287,8
92B	24% (10 ⁻⁷)	0,88	0,31	137,5	273,3
99A	24% (10 ⁰)	1,16	0,23	142,3	544,7
102	24% (T)	1,18	0,22	159,2	841,0
102B	24% (T)	0,76	0,25	80,5	288,0
103	24% (10 ⁻¹)	0,95	0,25	95,9	210,8
15A	Feno	1,18	0,20	70,3	600,0
15B	Feno	1,01	0,06	33,2	489,0
CT2	Feno	0,88	0,07	33,0	667,1

1- origem dos isolados :diluição ou transferência (T) 2- AEPA: atividade específica de produção de amônia

As velocidades específicas de crescimento dos isolados que apresentaram maior atividade específica de produção de amônia (57A, 86A, 99A, 102, 15A, 15B e CT2) foram determinadas. Os resultado variaram de $0,06 \text{ h}^{-1}$ a $0,36 \text{ h}^{-1}$, indicando diferenças na velocidade de utilização desse substrato (Figura 10 e Tabela 2). ATTWOOD *et al.* (1998) trabalhando com microrganismos hiper-produtores de amônia também encontraram taxas de crescimento semelhantes, utilizando triptona e casaminoácidos como fonte de energia.

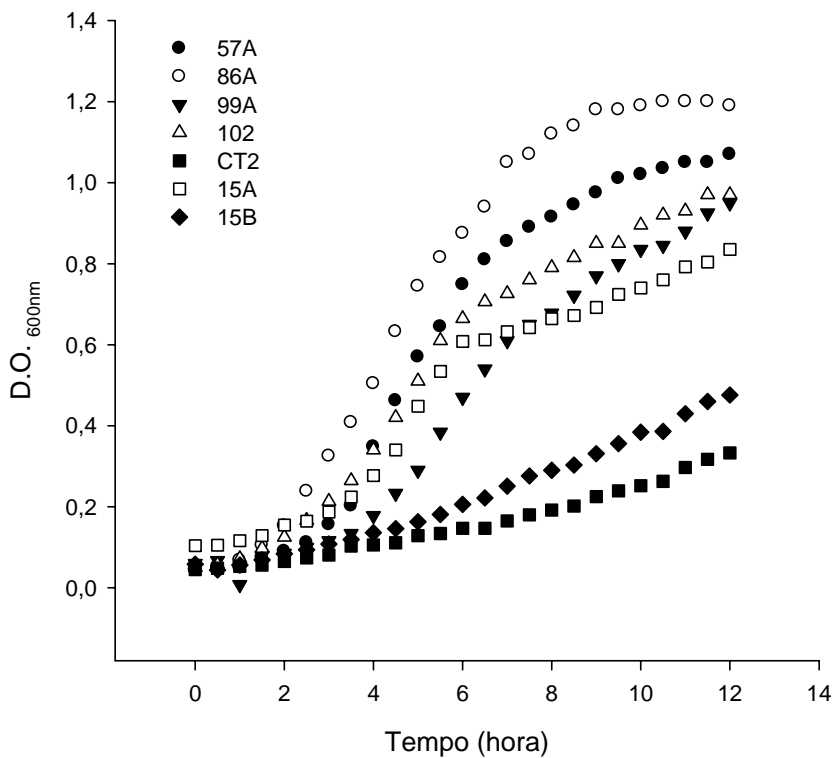


Figura 10. Curva de crescimento dos isolados hiperprodutores de amônia (HPA). Os microrganismos foram crescidos em meio mineral anaeróbio adicionado de 15g/L de Trypticase durante 12 horas a $39 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os produtos de fermentação produzidos pelos sete isolados selecionados foram determinados por HPLC. Com base nos resultados obtidos através das características culturais (Tabela 2) e aspectos relacionados à fisiologia (Tabela 3), observa-se que eles compartilham características culturais e produtos de fermentação comuns. Acetato, propionato e butirato são produzidos, com predominância para o acetato. Bactérias HPA já caracterizadas como *Peptostreptococcus anaerobius* produz no final da fermentação acetato e cadeias ramificadas de ácidos orgânicos. *Clostridium aminophilum* tem como produtos acetato e butirato e *Clostridium sticklandii* produz acetato, butirato e propionato (RUSSELL, 2002). Piruvato pode ser convertido a acetato por muitas bactérias incluindo microrganismos do gênero *Clostridium* (CARDON e BACKER, 1947). Dessa maneira, os resultados obtidos nesse trabalho estão de acordo com as características do metabolismo microbiano já relatadas para as bactérias HPA.

Tabela 3. Produtos da fermentação dos isolados HPA cultivados durante 48 horas a 39 °C em meio mineral anaeróbio suplementado de Trypticase (15 g/L).

Produto da fermentação	Isolado						
	57A	86A	99A	102	15A	15B	CT2
Succinato	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Lactato	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Formato	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Acetato	39,48 ¹	20,28 ¹	26,21 ¹	40,48 ¹	49,23 ¹	47,44 ¹	37,09 ¹
Propionato	28,93 ¹	19,44 ¹	26,89 ¹	29,56 ¹	30,68 ¹	32,02 ¹	30,75 ¹
Butirato	12,77 ¹	12,64 ¹	11,08 ¹	12,95 ¹	11,14 ¹	13,61 ¹	12,41 ¹
Etanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: não detectado

¹: valores em mM

3.3.4 Análise bioquímica e atividade de desaminação em diferentes fontes de aminoácido das HPA.

A análise bioquímica dos isolados revelou que o isolado 57A foi capaz de utilizar glicose, maltose, salicina. O isolado 86A foi capaz de fermentar várias fontes de carbono (glicose, lactose, sacarose, maltose, salicina, celulose, manose, rafinose, trealose). O isolado 99A utilizou somente salicina como fonte de carbono. O isolado 102 utilizou como fonte os açúcares glicose, maltose, salicina. 15A e CT2 foram capazes de fermentar maltose. Os isolados 57A, 86A e 102 foram capazes de produzir indol. Todos os isolados foram capazes de hidrolizar gelatina de origem bovina e esculina (citrato de ferro). Todos os isolados foram catalase negativa (Tabela 4).

Tabela 4. Características bioquímicas dos isolados.

Teste	57A	86A	99A	102	15A	15B	CT2	SR	F	C
IND	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
URE	-	-	-	+	-	+	+	nd	nd	-
GLU	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-	+	-	-	-	-	-	nd	nd	-
MAL	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
SAL	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
XYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
GLY	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd
CEL	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MNE	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MLZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAF	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TRE	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): reação positiva; (-): reação negativa; (nd): não determinado; IND L-triptofano; URE uréia; GLU D-glucose; MAN D-manitol; LAC D-lactose; SAC D-sacarose; MAL D-maltose; SAL salicina; XYL D-xilose; ARA L-arabinose; GEL gelatina; ESC esculina citrato de ferro; GLY glicerol; CEL D-celobiose; MNE D-manose; MLZ D-melezitose; RAF D-rafinose; SOR D-sorbitol; RHA L-ramnose; TRE D-trealose; CAT catalase. CULTURAS REFERÊNCIA: SR: *Clostridium stickilandii*; F: *Clostridium aminophilum*; C: *Peptostreptococcus anaeróbios*.

As análises bioquímicas dos microrganismos relacionados nesse trabalho mostraram que vários isolados foram capazes de fermentar carboidratos (Tabela 4). Os açúcares mais utilizados foram glicose, maltose e salicina. Outros microrganismos que já foram isolados e caracterizados com alta produção de amônia também demonstraram capacidade de crescer em fontes de carbono similares. Na década de 1980, RUSSELL *et al.* (1988) isolando microrganismos que apresentavam alta atividade específica de produção de amônia verificaram que o bastonete isolado foi capaz de fermentar substratos como glicose, fucose, maltose, celobiose, trealose, sorbitol, salicina além de hidrolisar gelatina, esculina. Igualmente, ATTWOOD *et al.* (1998) verificaram que nove das quatorze bactérias hiperprodutoras de amônia isoladas em seu trabalho foram capazes de fermentar várias fontes de carboidratos como glicose, frutose, galactose, manose, maltose, celobiose, trealose, melibiose, rafinose e também formavam indol. Assim como os isolados caracterizados no presente trabalho todos os microrganismos foram catalase negativo.

Quando os isolados foram crescidos em fontes individuais de aminoácidos, de uma maneira geral todos os isolados apresentaram alta atividade específica de produção de amônia em fenilalanina, glutamina, Isoleucina, leucina, serina, tirosina e treonina (Tabela 5). Os aminoácidos menos utilizados foram alanina, cisteína e valina. CHEN e RUSSELL (1989) verificaram que *Peptostreptococcus anaerobius* desaminava rapidamente leucina, serina, fenilalanina, treonina e glutamina preferencialmente. Isovalerato e isocaproato são produtos da fermentação da leucina, assim como fenilalanina é convertida a fenilacetato e fenilpropionato. Serina é desaminada a piruvato que pode ser convertido a acetato. Esses aminoácidos e seus subprodutos de desaminação que participam de vias metabólicas formando produtos como acetato e propionato já foram descritos para várias bactérias, inclusive para o grupo Clostridia (ELSDEN e HILTON, 1976; ELSDEN e HILTON, 1979). O metabolismo da treonina resulta na produção de substâncias como propionato, butirato e acetato (CARDON e BACKER, 1947; LEWIS e ELSDEN, 1955). Em trabalhos relatados anteriormente, o isolado hiperprodutor de amônia, *Clostridium aminophilum* F, formou acetato e butirato como produtos primários da desaminação de glutamina, glutamato, serina e histidina. A fermentação desses aminoácidos por esse microrganismo resultou em alta taxa de produção de amônia (CHEN e RUSSELL, 1989).

Tabela 5. Atividade específica de produção de amônia em diferentes aminoácidos pelos isolados hiperprodutores de amônia (HPA).

Aminoácido	Isolado						
	57A	86A	99A	102	15A	15B	CT 2
Alanina	9,0	5,3	8,4	6,9	8,8	9,6	8,4
Arginina	22,6	19,9	19,7	14,7	19,5	21,6	18,0
Asparagina	20,6	14,2	12,6	10,8	14,5	13,0	15,9
Aspartato	10,4	24,7	12,1	17,2	13,5	15,3	22,4
Cisteína	7,5	11,8	9,2	8,5	9,8	6,8	7,4
Fenilalanina	93,0	115,9	117,9	91,9	96,3	95,6	108,9
Glicina	9,8	8,1	13,7	8,5	7,1	12,8	12,5
Glutamato	10,2	12,6	11,3	9,0	8,8	8,2	11,8
Glutamina	80,6	85,1	70,6	90,6	85,6	84,5	82,7
Histidina	8,4	10,1	10,7	14,9	10,4	9,6	13,9
Isoleucina	42,0	34,5	36,6	46,1	41,4	43,2	44,4
Leucina	72,2	68,1	85,0	75,7	81,8	79,1	80,7
Lisina	16,2	11,4	11,1	12,4	18,5	11,9	15,2
Metionina	15,4	25,5	25,0	13,7	18,2	16,5	14,5
Prolina	10,7	17,0	14,5	14,4	17,5	13,9	12,2
Serina	80,3	114,3	110,8	101,6	127,3	121,2	131,9
Tirosina	37,1	27,2	46,6	46,8	44,8	40,7	44,1
Treonina	98,9	112,3	96,1	106,5	108,5	91,9	115,3
Triptofano	24,41	28,0	27,12	25,8	28,6	21,3	24,7
Valina	0,6	2,8	2,4	1,0	3,0	2,0	3,7

valores em nmoles.

3.3.5 Diversidade genética dos isolados com alta atividade específica de produção de amônia

A análise da diversidade genética dos quatorze isolados com alta atividade específica de produção de amônia pela técnica de BOX-PCR resultou em padrões de bandas distintos entre os isolados, com tamanhos variando de 100 a 1600 pb aproximadamente (Figura 11). Foram observados diferentes padrões de amplificação das seqüências BOX e verificou-se que o tipo BOX dos isolados selecionados neste estudo diferem das bactérias hiperprodutoras de amônia previamente caracterizadas (*Peptostreptococcus anaerobius* C, *Clostridium aminophilum* F e *Clostridium sticklandii* SR).

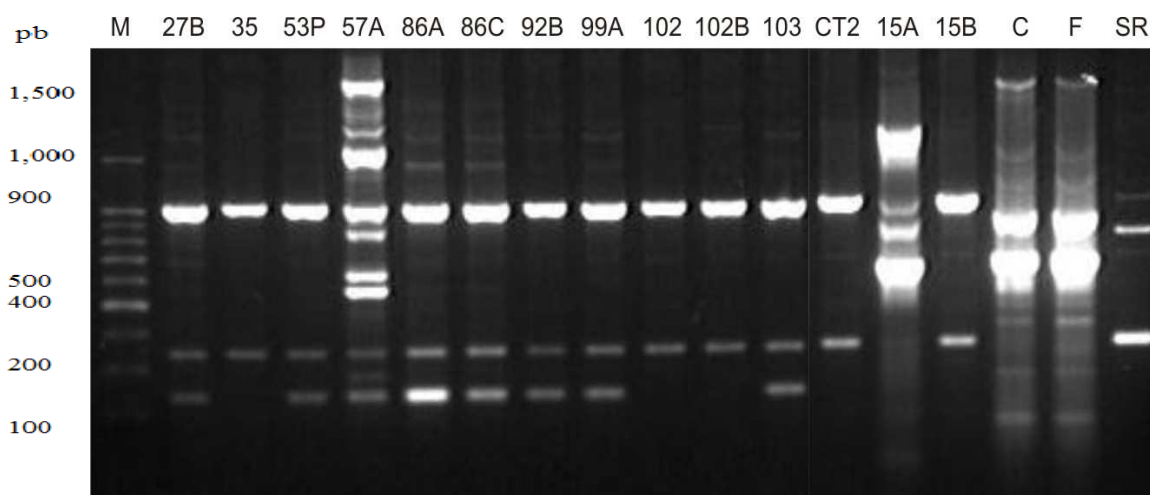


Figura 11. Análise da diversidade genética dos isolados com alta atividade específica de produção de amônia. O DNA total das culturas foi extraído e usado em reação de amplificação com o *primer* BOX A1R. Os isolados *Clostridium sticklandii* SR, *Peptostreptococcus anaerobius* C e *Clostridium aminophilum* F foram utilizados como culturas de referência. M (marcador, 100 pb DNA Ladder, Promega).

A matriz de distância genética mostrou que a diversidade entre os isolados variou de 33% a 83%. Quando os isolados encontrados nesse estudo são comparados aos isolados previamente descritos como HPA (C; F e SR) a distância genética aumenta (Tabela 6). Baseando-se na matriz contendo os valores das distâncias genéticas, foi realizada a análise de agrupamento pelo método hierárquico UPGMA. A análise de agrupamento dos dados de BOX revelou seis genótipos, organizados em quatro grupos distintos (Figura 12.)

A partir do seqüenciamento, foi verificado que a cultura F (*C. aminophilum* F), na realidade se tratava do microrganismo *Streptococcus bovis*, por esse motivo, o perfil de bandas gerado pelo BOX-PCR aproximou mais esse microrganismo de *P. anaerobius* C do que de *C. sticklandii* SR, uma espécie mais relacionada (Figura 11).

A análise do gel de BOX-PCR revelou quatro grupos distintos entre os isolados analisados e diferenças no perfil de polimorfismo entre os isolados e microrganismos HPA de amônia previamente descritos na literatura (C, F e SR) (Figura 11 e 12). Os isolados 15A e 57A mostraram o maior perfil de polimorfismo entre os isolados.

ATTWOOD *et al.*(1998) analisaram o perfil de bactérias HPA pela técnica de polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e também verificaram que os isolados por eles obtidos, diferiam no padrão de bandas entre si e entre os microrganismos hiperprodutores já descritos na literatura. Trabalhos recentes têm demonstrado que BOX-PCR é uma técnica eficiente em distinguir entre espécies de diferentes habitats, embora a metodologia ainda não tenha sido aplicada para analisar bactérias isoladas de rúmen. MARQUES *et al.*, (2008) trabalhando com uma coleção de 120 espécies de *Pseudomonas* discriminou sete *clusters* entre os microrganismos e identificou duas novas espécies. TORRES (2009) utilizando a técnica de BOX-PCR verificou a diversidade genética de bactérias endofíticas da família Enterobacteriaceae e obteve um total de 23 diferentes UTOs (unidades taxonômicas operacionais). GOMEZ-GIL *et al.*, (2004) verificaram a diversidade genética de *Vibrio harveyi*, um patógeno associado a doenças de organismos aquáticos e constataram que a técnica de BOX-PCR foi eficiente em diferenciar entre as diferentes linhagens.

Tabela 6. Matriz da distância genética euclidiana média entre os isolados.

	27B	35	53P	57A	86A	86C	92B	99A	102	102B	103	CT2	15A	15B	C	F	SR
27B	0,00	0,33	0,00	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,33	0,00	0,33	0,83	0,33	1,00	1,00	0,50
35	0,33	0,00	0,33	0,82	0,33	0,33	0,33	0,33	0,00	0,00	0,33	0,00	0,80	0,00	1,00	1,00	0,33
53P	0,00	0,33	0,00	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,33	0,00	0,33	0,83	0,33	1,00	1,00	0,50
57A	0,73	0,82	0,73	0,00	0,73	0,73	0,73	0,73	0,82	0,82	0,73	0,82	0,75	0,82	0,75	0,75	0,73
86A	0,00	0,33	0,00	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,33	0,00	0,33	0,83	0,33	1,00	1,00	0,50
86C	0,00	0,33	0,00	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,33	0,00	0,33	0,83	0,33	1,00	1,00	0,50
92B	0,00	0,33	0,00	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,33	0,00	0,33	0,83	0,33	1,00	1,00	0,50
99A	0,00	0,33	0,00	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,33	0,00	0,33	0,83	0,33	1,00	1,00	0,50
102	0,33	0,00	0,33	0,82	0,33	0,33	0,33	0,33	0,00	0,00	0,33	0,00	0,80	0,00	1,00	1,00	0,33
102B	0,33	0,00	0,33	0,82	0,33	0,33	0,33	0,33	0,00	0,00	0,33	0,00	0,80	0,00	1,00	1,00	0,33
103	0,00	0,33	0,00	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,33	0,00	0,33	0,83	0,33	1,00	1,00	0,50
CT2	0,33	0,00	0,33	0,82	0,33	0,33	0,33	0,33	0,00	0,00	0,33	0,00	0,80	0,00	1,00	1,00	0,33
15A	0,83	0,80	0,83	0,75	0,83	0,83	0,83	0,83	0,80	0,80	0,83	0,80	0,00	0,80	1,00	1,00	0,60
15B	0,33	0,00	0,33	0,82	0,33	0,33	0,33	0,33	0,00	0,00	0,33	0,00	0,80	0,00	1,00	1,00	0,33
C	1,00	1,00	1,00	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
F	1,00	1,00	1,00	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	1,00
SR	0,50	0,33	0,50	0,73	0,50	0,50	0,50	0,50	0,33	0,33	0,50	0,33	0,60	0,33	1,00	1,00	0,00

Frequências dadas em %.

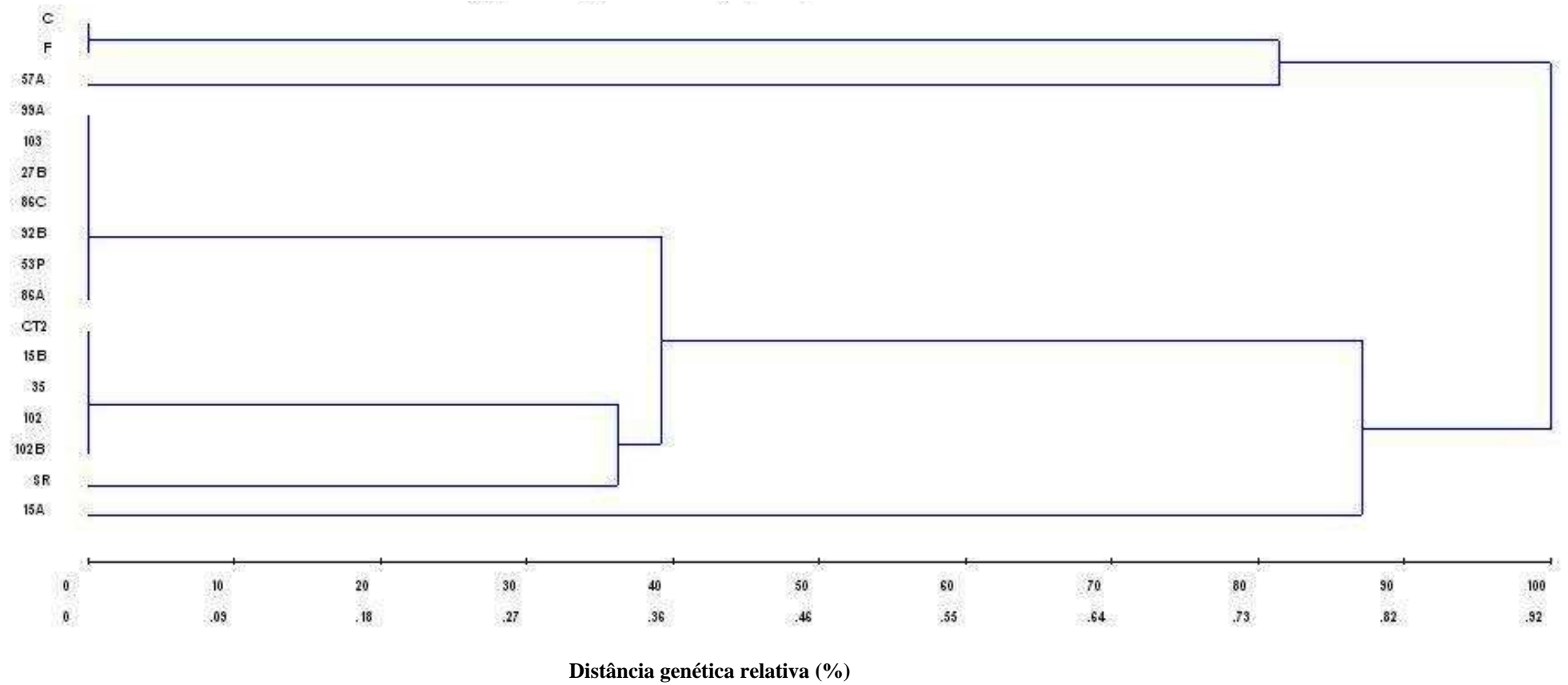


Figura 12. Dendrograma obtido pelo método UPGMA mostrando as relações genéticas entre os isolados com base na tipagem BOX-PCR.

3.3.6 Análise da sequência do rDNA 16S

O gene 16S rRNA dos isolados 57A, 86A, 99A, 102 e 15A foi seqüenciado e comparado às sequências de nucleotídeos existentes no *GenBank* (NCBI). Com base nos dados do seqüenciamento foi determinado que os isolados apresentaram identidade de 96%, 99%, 93%, 94% e 99% respectivamente, com *Clostridium botulinum* e o isolado RF2B, ainda não caracterizado, de fezes de suíno. Os isolados 15B e CT2 apresentaram identidade de 94% e 88% respectivamente com *Clostridium hastiforme*. MCSWEENEY *et al.* (1999) isolaram e caracterizaram bactérias proteolíticas do rúmen de carneiros alimentados com vegetais ricos em taninos e verificaram com base nas análises filogenéticas do 16S rDNA que um isolado (Lp 1284) que produzia altas taxas de produção de amônia foi similar a *C. botulinum*. Esse grupo de bactérias (Clostridia) contém tipos proteolíticos (A, B e F) e que também estão intimamente relacionados a *C. sporogenes*. Outro isolado Lp 1265 nesse mesmo trabalho foi relacionado com o gênero *Clostridium* porem, não foi possível a sua completa identificação.

Para a construção da árvore filogenética foram utilizadas as seqüências obtidas através do alinhamento, utilizando o programa CLUSTAL W (THOMPSON *et al.*, 1994), de sete isolados (57A, 86A, 99A, 102, 15A, 15B, CT2) e três microrganismos HPA já caracterizados (*C. sticklandii* SR, *P. anaerobius* C e *C. aminophilum* F. O método de reconstrução filogenética utilizado foi o *Neighbour joining*, também conhecido como o “método do vizinho mais próximo”. A Figura 13 mostra a árvore filogenética consenso obtida, acrescida dos valores de *bootstrap* considerando 5000 replicações.

Como pode ser observado, os ramos da árvore foram bem sustentados, apresentando na grande maioria dos clados, valores de *bootstrap* superiores a 95 %, o que a torna mais consistente e robusta. Os microrganismos foram agrupados em seis clados e três diferentes ramos principais, com o representante F (*C. aminophilum*) posicionado como um grupo externo. Os isolados 57A, 86A, 99A, 102 e 15A foram agrupados em um ramo principal da árvore, sendo que o isolado 15A foi aquele que comparativamente demonstrou maior distância genética dos demais. Os isolados CT2 e 15B foram agrupados em um segundo ramo, assim como os isolados C e SR utilizados como culturas referência agrupados no terceiro ramo principal (Figura 13).

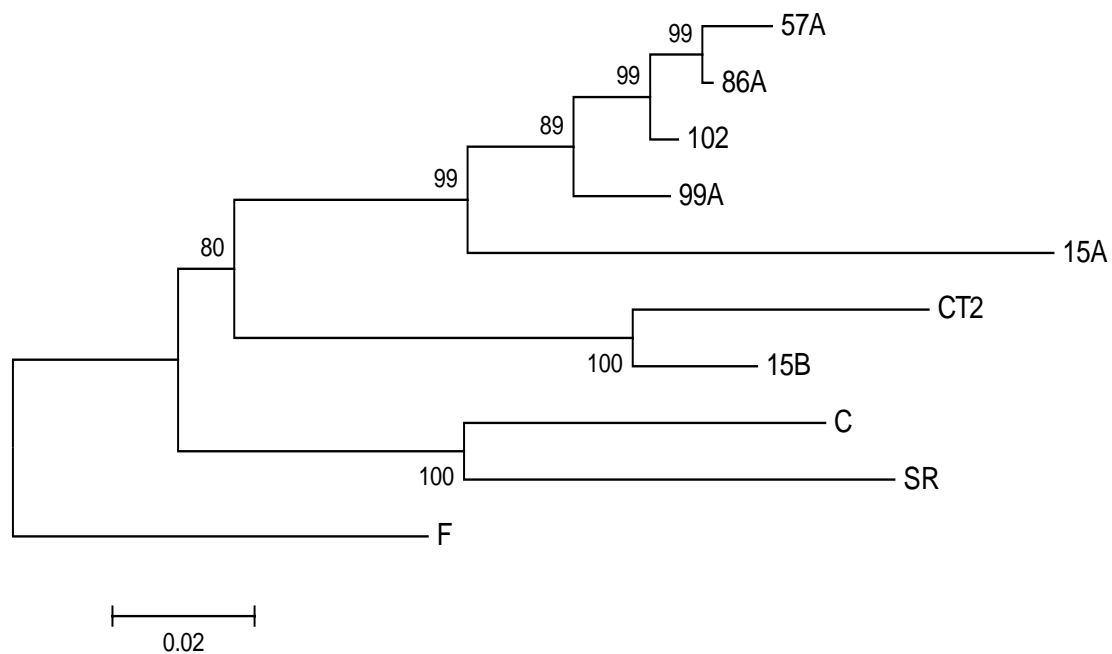


Figura 13. Análise filogenética dos isolados hiperprodutores de amônia (HPA). A árvore consenso foi construída utilizando o método *Neighbour joining*, com *bootstrap* de 5000 replicações, pelo programa MEGA 4.0. Para a análise foram utilizadas as seqüências de rRNA 16S dos isolados 57A, 86A, 99A, 102, 15A, 15B, CT2 e dos microrganismos *Clostridium sticklandii* SR, *Peptostreptococcus anaerobius* C e *Clostridium aminophilum* F.

De acordo com o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology a espécie de *C. botulinum* possui sete linhagens produtoras de toxinas (A a G), são bacilos gram-positivos com esporos ovais e subterminais. Gelatina, leite e carne são digeridos e amônia e H₂S são produzidos. Linhagens do tipo A e B reduzem prolina a δ-aminovalerato. Arginina, glicina, fenilalanina, serina, tirosina e triptofano são utilizados para o crescimento. Fenilalanina e triptofano são reduzidos a ácido fenilpropiónico e ácido p-indolpropiónico, respectivamente. Os tipos A, B e F convertem valina a isobutirato e leucina a isovalerato e hidrolizam esculina. Apesar de os isolados obtidos neste estudo utilizarem fenilalanina, serina, tirosina e triptofano como substratos, glicina não foi uma fonte preferencial na desaminação (CATO *et al.*, 1986).

Segundo o Manual de Bergey (CATO *et al.*, 1986), *Clostridium hastiforme* são bastonetes gram positivos com esporos terminais que não fermentam carboidratos, hidrolisam rapidamente gelatina, produzem H₂S e amônia. Produzem ácido isovalérico e pequenas quantidades de ácidos propiónico e isovalérico como produtos da fermentação. Piruvato, treonina e lactato não são utilizados. Entretanto, os isolados 15B e CT2 foram capazes de utilizar carboidratos como glicose, maltose e salicina.

RUSSELL *et al.*,(1988) isolaram bactérias com alta produção de amônia e as análises dos isolados revelaram que a linhagem R, produtora de esporos, capaz de sobreviver a altas temperaturas (80 °C), pertencia ao gênero *Clostridium*. Baseado na identificação presuntiva listada no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology a linhagem R se relacionava a *Clostridium sporogenes*, porém, havia importantes diferenças bioquímicas que impossibilitavam a completa identificação da espécie. Os microrganismos seqüenciados nesse estudo demonstraram ter similaridade com espécies de *Clostridium* já descritas. Entretanto, existe divergência em alguns parâmetros de comparação. Os isolados 57A, 86A, 102 e 15A são produtores de indol, enquanto que linhagens de *C. botulinum* não produzem esse tipo de substância. Outra diferença é em função da utilização de carboidratos. Linhagens desse microrganismo são incapazes de fermentar celobiose, entretanto, os isolados 84A e 99A foram capazes de produzir ácido a partir desse substrato. É necessário que seja feita a completa identificação dos isolados obtidos neste trabalho, pois, as análises bioquímicas realizadas contrastam com a identificação obtida a partir do seqüenciamento do rRNA 16S e das características de microrganismos HPA já caracterizados anteriormente.

3.4. LITERTURA CITADA

ATTWOOD, G. T., KLIEVE, A. V., OUWERKERK, D. e PATEL, B. K. C. Ammonia-hyperproducing bacteria from new Zealand ruminants. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 5, p. 1796-1804. 1998.

BERNS, K. I. e THOMAS, C. A. Isolation of high molecular weight DNA from *Hemophilus influenza*. **J. Mol. Biol.** v. 11, p. 476-490. 1965.

BLADEN, H. A., BRYANT, M. P. e DOETSCH, R. N. A study of bacterial species from the rumen which produce ammonia from protein hydrolysate. **Appl. Microbiol.** v. 9, p. 175-180. 1961.

BRADFORD, M. Photometric methods for protein determination. Procedures and analysis. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254. 1976.

CARDON, B. P. e BACKER, H. A. Amino acid fermentation by *Clostridium propionnicum* and *Diplococcus glycinophilus*. **Arch. Biochem.** v.12, p.165-180. 1947.

CATO, E. P., W. L. GEORGE, e S. M. FINEGOLD. Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23AL, p. 1141-1200. In P. H. Sneath, N. S. Mair, E. M. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**. The Williams & WilliamsCo., Baltimore. 1986.

CHANEY, A. L. e MARBACH, E. P. modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clin. Chem.** v. 8, p. 130-132. 1962.

CHEN, G. e RUSSELL, J. B. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 55, p. 1052-1057. 1989.

COTTA, M. A., e RUSSELL, J. B. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. **J. Dairy Sci.** v. 65, p. 226-234. 1982.

DEHORITY, B. A.; ORPIN, G.C. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. **The Rumen Microbial Ecosystem.** P. N. Hobson and C. S. Stewart. London, Blackie Academic, v. 2, p.196-245, 1997.

ELSDEN S.R. e HILTON M.G. The end products of the metabolism of aromatic amino acids by clostridia. **Archives of Microbiology.** v. 107, p.283–288.1976.

ESLDEN, S. e HILTON, M. Amino acid utilization patterns im clostrial taxonomy. **Arch. Microbiol.** v.123; n 2. 137-141. 1979.

GOMEZ-GIL, B.; SOTO-RODRIGUEZ, S.; GARCIA-GASCA, A.; ROQUE, A, VAZQUEZ-JUAREZ, R.; THOMPSON, F.L. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. **Microbiology.** v. 150, p. 1769-1777. 2004.

HINO, T., AND J. B. RUSSELL. The effect of reducing agent dispoand NADH/NAD on the deamination of amino acids by intact and cell-free extracts of rumen microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.** v.50, p.1368-1374. 1985.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes.** New York: Academic Press. 533 p. 1966.

KRAUSE, D. O., RUSSELL, J. B. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62, n. 3, p. 815-821. 1996.

LEWIS D. e ELSDEN, S. R. The fermentation of L-threonine, L-cysteine, L-serine, and acrylic acid by a gram-negative coccus. **Biochem. J.** v.60, p.683-692. 1955.

MARQUES, A. S.A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON R. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group **Genet. Mol. Biol.** v.31, n.1. 2008.

MCSWEENEY C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R.; KRAUSE, D. O. Isolation and Characterization of Proteolytic Ruminal Bacteria from Sheep and Goats Fed the Tannin-Containing Shrub Legume *Calliandra calothyrsus*. **Applied and Environmental Microbiology.**, v.. 65, p. 3075-3083.1999.

PASTER, B. RUSSELL, J. B., YANG, C. M. J., CHOW, J. M., WOESE, C. R. e TANNER, R. Phylogeny of ammonia-producing ruminal bacteria, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* and *Clostridium aminophilum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology.** v. 43, p. 107-110. 1993.

RUSSELL, J. B. Fermentation of peptides by *Bacteroides rurninicola* B,4. **Appl. Environ. Microbiol.** v.45, p.1566-1574. 1983.

RUSSELL, J. B.. Factors influencing competition and composition of the rumen bacterial flora, p. 313-345. In F. M. C. Gilchrist and R. I. Mackie (ed.), **Herbivore nutrition in the subtropics and tropics**, Science Press, Craighall, South Africa. 1984

RUSSELL, J. B., STROBEL, H. J. e CHEN, G. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 54, p. 872-877. 1988.

RUSSELL, J. B. e STROBEL, H. J. Mini-review: The effect of ionophores on ruminal fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 55, p. 1-6. 1989.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition.** Ithaca, NY: James B. Russell. p 122. 2002.

RYCHLICK, J. L. e RUSSELL, J. B. Mathematical estimations of hiper-ammonia producing ruminal bacteria and evidence for bacterial antagonism that decreases ruminal ammonia production. *FEMS Microbiol. Ecol.* v.32; p.121-128, 2000.

RYCHLICK, J. L. e RUSSELL, J. B. Bacteriocin-like activity of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and its effect on other ruminal bacteria and ammonia production. **Appl. Environ. Microbiol.** v.3; p. 1040-6. 2002.

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** v.24, p.1596-1599. 2007.

TOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSONS, T. J. 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.4673-80. 1994.

TORRES, A. R. **Diversidade genética de enterobactérias endofíticas de diferentes hospedeiros e colonização de *Catharantus roseus* por enófitos expressando o gene gfp.** Tese de doutorado da Universidade de São Paulo, depositado em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-03062005-152149/>. 2009.

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

WHITEHEAD, T. R.; COTTA, M. A. Isolation and identification of hyper-ammonia producing bacteria from swine manure storage pits. **Current microbiology**. v. 48, 1, pp. 20-26. 2004.

VERSALOVIC J.; KOEUTH T.; MCCABE E. R. B e LUPSKI J. R. Use of the polymerase chain reaction for physical mapping of *Escherichia coli* genes. **J Bacteriol**, v.173, p.5253-5255. 1991a.

VERSALOVIC J.; KOEUTH T.e LUPSKI J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research** , v.19, p.6823-6831. 1991b.

CAPÍTULO 4

Atividade de monensina e bovicina HC5 sobre a degradação de aminoácidos por bactérias ruminais e isolados com alta atividade específica de produção de amônia

4.1 INTRODUÇÃO

A desaminação de aminoácidos pelos microrganismos do rúmen é um processo dispendioso do ponto de vista nutricional, pois fornece mais amônia do que a microbiota pode usar para seu crescimento e manutenção (ANNISON, 1956). O excesso de produção de amônia constitui ônus para o produtor, uma vez que a proteína dietética é o componente mais caro da dieta. Além disso, a amônia, sob a forma de uréia excretada pela urina do animal contribui para a contaminação de lençóis freáticos em sistemas de manejo onde o gado é confinado (TAMMINGA, 1996).

Vários modelos matemáticos já foram desenvolvidos para otimizar o processo fermentativo e minimizar as perdas de nitrogênio da dieta pelo animal (AFRC, 1993; VAN HORN *et al.*, 1994; JONKER *et al.*, 1998; NRC, 2001) e aditivos alimentares são regularmente utilizados para manipular parâmetros da fermentação ruminal. Desde a década de 1970 ionóforos têm sido utilizados como aditivos e seus efeitos já foram comprovados na inibição de archea metanogênicas do rúmen e no aumento da produção de propionato (VAN NEVEL e DEMEYER, 1977; RUSSELL e STROBEL, 1989). Estudos posteriores demonstraram que monensina também tem ação inibitória contra bactérias desaminadoras e auxilia na diminuição da produção e acumulação de amônia no rúmen (LANA *et al.*, 1997).

Entretanto, monensina pode ser tóxico para humanos e animais (PRESSMAN e FAHIM, 1982) e a utilização de antibióticos em doses subterapêuticas na alimentação animal tem sido amplamente criticada (van den BOGAARD e STROBBERRING,

2000). Dentre as alternativas para modificar a fermentação ruminal destaca-se o uso de compostos tamponantes, inibidores da metanogênese, suplementação lipídica, ácidos orgânicos e bacteriocinas (MARTIN e STREETER, 1995; KLIEVE e HEGARTY, 1999; RUSSELL e MANTOVANI, 2002).

Estudos indicaram que espécies de *Streptococcus* isoladas do rúmen bovino produzem bacteriocinas (MANTOVANI e RUSSELL, 2001) que possuem atividade de inibição contra *Clostridium*, *Listeria monocitogenes* e outras bactérias gram-positivas (MANTOVANI e RUSSELL, 2003). Bovicina HC5 foi isolada de *S. bovis* HC5, apresenta espectro de ação semelhante à monensina (MANTOVANI *et al.*, 2002) e sua sequência amino-terminal possui similaridade com os lantibióticos (MANTOVANI *et al.*, 2002). Estudos do efeito de bovicina HC5 sobre a produção de metano e amônia demonstraram que esta bacteriocina foi capaz de diminuir a produção desses compostos *in vitro* em populações mistas do rúmen (MANTOVANI *et al.*, 2002). Entretanto, estudos sobre a ação desta bacteriocina contra isolados hiperprodutores de amônia ainda não foram realizados.

As propriedades desse peptídeo o tornam candidato potencial para ser utilizado na manipulação da fermentação ruminal como alternativa ao uso de promotores de crescimento. O objetivo desse trabalho foi avaliar a sensibilidade da microbiota ruminal e isolados hiperprodutores de amônia do rúmen à bacteriocina bovicina HC5 e ao ionóforo monensina.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia de anaeróbios e Genética Molecular e de Microrganismos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa-MG.

4.2.1 Obtenção de líquido ruminal e isolados com alta atividade específica de produção de amônia

O inóculo foi obtido a partir de bovino da raça gir-holanda, fistulados no rúmen, com cerca de 480 Kg alimentados com *Brachiaria decumbens* e 1,0 Kg de silagem de milho por dia. O conteúdo ruminal foi coletado 2 horas após a alimentação. O líquido ruminal foi filtrado através de 4 camadas de gaze, acondicionado em Erlenmeyer e transportadas imediatamente para o Laboratório de Anaeróbios da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde foram mantidas a 39°C até que houvesse separação de fases entre as partículas de alimento e protozoários. Os microrganismos ruminais foram coletados anaerobiamente do centro do Erlenmeyer. O conteúdo ruminal amostrado foi centrifugado (1710 g, 10 minutos, 25 °C) e lavados em meio mineral anaeróbico. O *pellet* foi ressuspendido e a DO foi ajustada para 1,6. As amostras foram incubadas a 39 °C e alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos de 0, 6 e 24 horas para análise de amônia e proteína.

Neste estudo foram utilizadas sete culturas de bactérias isoladas do rúmen que apresentavam alta atividade específica de produção de amônia. Os isolados oriundos do rúmen de bovino mestiço holandês x zebu recebendo dietas com 24% de PB (isolados 57A, 86A, 99A, 102) e dieta a base de feno (isolados 15A, 15B, CT2) foram cultivados em meio mineral anaeróbico utilizando Trypticase (15g/L) como única fonte de carbono.

Após 24 horas de crescimento os isolados foram centrifugados e ressuspensos em meio mineral e sua densidade óptica (DO) foi ajustada para 1,0, o que correspondeu a aproximadamente 112 mg de proteína/L. O crescimento microbiano foi monitorado por meio da determinação da DO a 600 nm. Foram colhidas amostras de 1 mL nos tempos 0, 6 e 24 horas de incubação para análise de amônia total e determinação da atividade específica de produção de amônia.

4.2.2 Condições de cultivo dos microrganismos e estocagem das culturas

A população total contida no líquido de rúmen e os isolados hiperprodutores de amônia foram cultivados anaerobicamente em meio de cultura mineral anaeróbio limitante em nitrogênio contendo (por litro): 292 mg de K_2HPO_4 , 240 mg de KH_2PO_4 , 480 mg de Na_2SO_4 , 480 mg de $NaCl$, 100 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 64 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 4000 mg de Na_2CO_3 , 600 mg de cisteína·HCl, adicionado de vitaminas e minerais (COTTA e RUSSELL, 1982) suplementado com 15 g/L de triptona. Os meios de cultura foram preparados sob atmosfera de CO_2 livre de oxigênio e distribuídos em tubos de cultura vedados com tampões de borracha e selados com lacre de alumínio. O pH do meio de cultura será ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio e os tubos foram incubados a 39°C. O crescimento foi monitorado pela mudança na densidade óptica a 600 nm.

O meio de estocagem foi preparado sob atmosfera de N_2 , transferido para câmara de anaerobiose e distribuído (3 mL) em frascos de estocagem de 10 mL. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha, lacrados com selos de alumínio e autoclavados (121° C, 15 minutos). Alíquotas de 4 mL das culturas a serem estocadas foram transferidas para os frascos contendo meio anaeróbio e congeladas a - 20° C.

4.2.3 Preparação e atividade de bovicina HC5

Para extração da bovicina HC5, culturas em batelada (1 L) de *S. bovis* HC5 foram crescidas até atingirem a fase estacionária (400 µg de proteína/ mL). Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 10000 rpm, 10 minutos, 4 °C e as células foram ressuspensas em solução ácida (pH 2) de NaCl 100 mM (volume final de 20 mL). A suspensão de células foi incubada por 2 horas a 39 °C, sob agitação de 120 rpm. Após esse período as células foram novamente centrifugadas a 10000 rpm, 10 minutos, 4 °C e o extrato livre de células foi adicionado de Tween 80 (0,1 % v/v).

A quantificação da atividade antimicrobiana de bovicina HC5 foi feita pela técnica de difusão em meio sólido, utilizando-se *Lactococcus lactis* ATCC 19435 como microrganismo indicador. Diluições seriadas sucessivas (incrementos de 2 vezes) do extrato livre de células foram realizadas em solução ácida de NaCl e alíquotas de cada diluição (50 µL) foram transferidas para poços de 6 mm de diâmetro feitos em meio sólido previamente inoculado com cerca de 10⁶ UFC/mL do microrganismo indicador. A atividade antibacteriana (expressa em unidades arbitrárias por mL, AU/mL) foi calculada a partir da recíproca da maior diluição utilizada que apresentou zona de inibição visível.

4.2.4 Determinação da produção de amônia e atividade específica de produção de amônia

A amônia no sobrenadante foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Chaney e Marbach (CHANEY e MARBACH, 1962). A absorvância (630 nm) foi medida em espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron, Waltham, MA, USA), utilizando-se cloreto de amônio como padrão. A concentração de amônia (mM) foi expressa como a diferença entre a amônia total determinada ao final da incubação e a concentração presente nas amostras no tempo 0 hora.

A determinação de proteína microbiana foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD *et al.*, 1976). A atividade específica de desaminação foi calculada pela diferença entre a concentração de amônia (mM) nos frascos de incubação nos tempos zero e seis horas, dividido pela concentração da proteína microbiana (mg/L) e pelo tempo de incubação (minutos).

4.2.5 Enriquecimento e inibição de bactérias desaminadoras

Bactérias totais de líquido de rúmen foram centrifugadas (5000 rpm por 15 minutos) e serialmente diluídas (incrementos de 10 vezes) em meio mineral anaeróbio (10 mL) e incubadas a 39 °C por 24 horas. A $DO_{600\text{ nm}}$ e a concentração de amônia foram determinadas como descrito no item 4.2.4. Bactérias produtoras de amônia foram enriquecidas por meio de transferências subseqüentes (10 % inoculo, v/v) em meio contendo Trypticase (15 g/L). Para verificar o efeito inibidor de ionóforo e bacteriocina sobre a produção de amônia, foram adicionados monensina (5 μ M) ou bovicina HC5 semi-purificada (50 AU/mL) aos enriquecimentos. Células de *Streptococcus bovis* HC5 (5% v/v) também foram adicionadas aos enriquecimentos para verificar se a existe inibição da microbiota ruminal pela simples adição do microrganismo bacteriocinogênico no meio.

4.2.6 Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA)

Amostras da microbiota ruminal foi centrifugada (5000 rpm por 15 minutos) e o DNA foi extraído utilizado-se protocolo básico para extração de DNA bacteriano (AUSUBEL *et al.*, 1987). O rRNA 16S foi amplificado usando os *primers* 16SF (5'-AGAGTTTGATCMTGG-3') E 16SR (5'-TACCTTGTTACGACTT-3'). A amplificação foi feita a 94° C por 1 minuto, seguindo-se 36 ciclos 94° C por 1 minuto, 55° C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, 55° C por 1min com uma extensão final a 72 °C por 5 min utilizando-se GoTaq DNA polimerase (Promega, Madison, USA) e o equipamento Sprint Thermocycler (PTC 100 Progamable Termal Controler, MJ Research, INC) (BERNS e THOMAS, 1965). O produto de cada amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Os produtos de PCR foram digeridos com Hae III (Promega, Madison, USA) por 5 horas (37 °C). Os fragmentos de restrição foram separados em agarose de alta resolução A-8455 (2,5% p/v) (Sigma[®]) contendo 0,2 μ g/mL de brometo de etídio em tampão TBE 0,5X (2 mM EDTA, 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M ácido bórico [pH 8,0]) sob uma voltagem constante de 80 V cm^{-1} . O gel foi visualizados sob luz UV e documentados em sistema de foto-documentação *Eagle Eye* (Stratagene, Texas, USA). Foi usado como marcador de tamanho DNA Ladder 50 pb (Promega, Madison, USA).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Análise do efeito de bovicina HC5 e monensina sobre a atividade de desaminação dos microrganismos ruminais após enriquecimento da microbiota ruminal

Quando a população ruminal foi enriquecida através de transferências (10 %, v/v) a cada 24 horas em meio mineral contendo Trypticase como única fonte de energia, a produção total de amônia aumentou de 40 para aproximadamente 65 mM no controle, enquanto que ao final das transferências a produção total de amônia, tanto para a bovicina HC5 (50 AU/mL) quanto para a monensina (5 μ M) foi inferior a 30 mM (Figura 14a). A adição de células de *S. bovis* HC5 também inibiu a produção de amônia pela microbiota ruminal, e seu efeito no último dia de transferência foi similar ao obtido com bovicina HC5 (dados não mostrados). A densidade óptica do controle não decresceu ao final das transferências, enquanto que para a bovicina e monensina houve um decréscimo na absorbância, de aproximadamente 0,9 (Figura 14b).

O perfil de bandas na análise de restrição de rDNA amplificado (ARDRA) revelou mudanças na microbiota ruminal que foi transferida em meio de cultura contendo Trypticase como única fonte de carbono em todos os tratamentos. Quando inibidores (bovicina HC5 ou monensina) foram adicionados ao meio, ocorreram mudanças semelhantes na população remanescente, porém, exibiram padrão de bandas diferentes durante as transferências. A adição de células de *Streptococcus bovis* HC5 causou menor efeito sobre o padrão de bandas obtidos pela análise de restrição em relação àqueles onde houve adição de bovicina ou monensina (Figura 15).

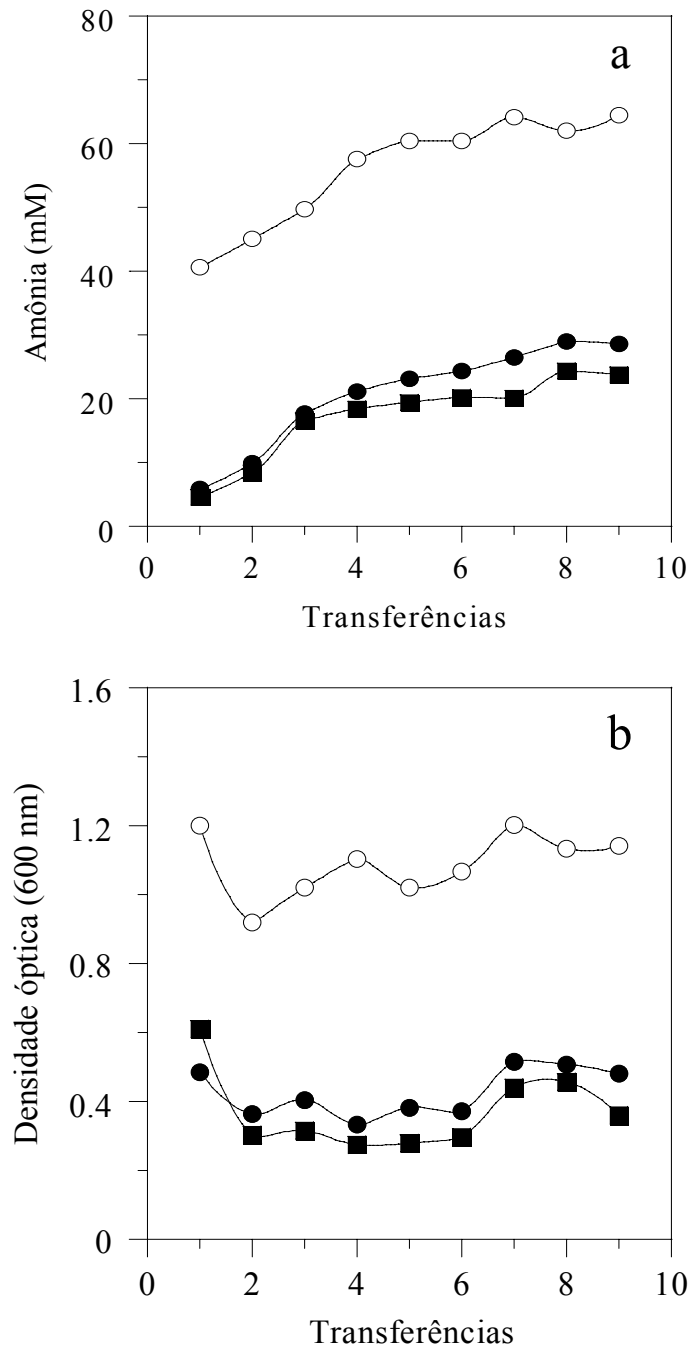


Figura 14. Efeito da adição de bovicina HC5 (●) e monensina (■) sobre a produção de amônia pela microbiota ruminal cultivada em meio contendo Trypticase. As culturas (10% inoculo, v/v) foram transferidas em intervalos de 24 horas e cultivadas a 39 °C. (○) controle.

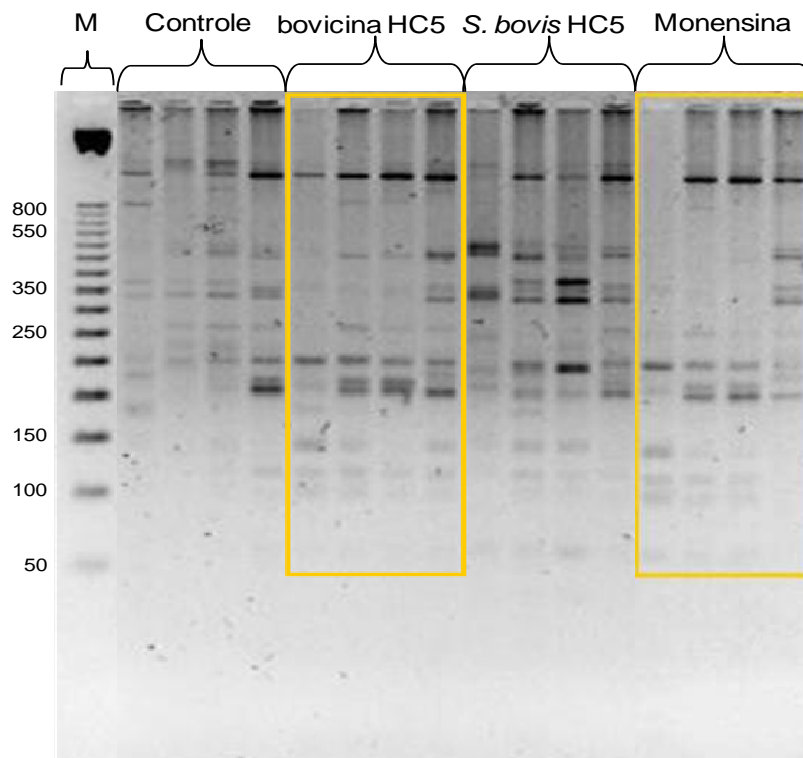


Figura 15. Perfil eletroforético em gel de análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) da microbiota ruminal enriquecida em meio mineral anaeróbio adicionado de Trypticase como única fonte de carbono. M (marcador).

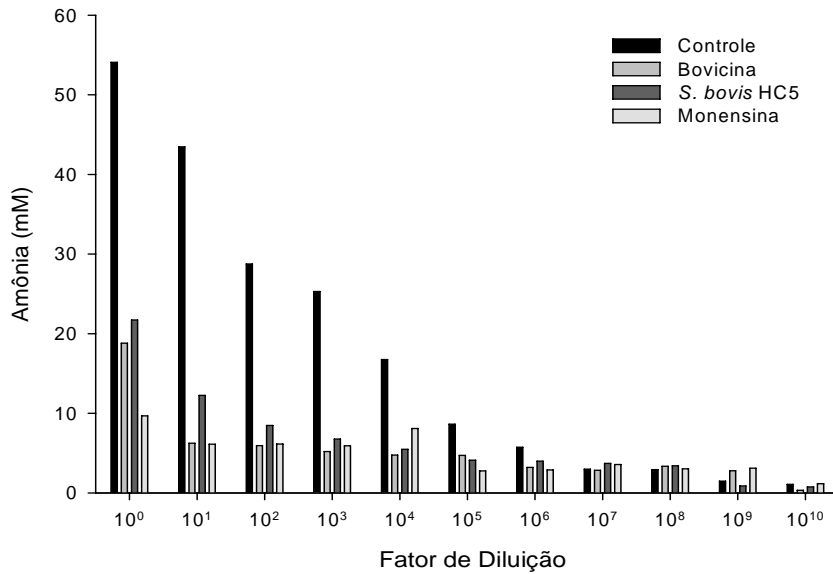
4.3.2 Análise do efeito de bovicina HC5 e monensina sobre a atividade de desaminação dos microrganismos ruminais após diluição seriada da microbiota ruminal

Quando a microbiota ruminal foi diluída serialmente, a concentração de amônia decresceu linearmente no tratamento controle. Foi observado inibição da produção de amônia em mais de 50 %, em comparação ao tratamento controle, nas primeiras diluições onde bovicina ou monensina foram adicionadas ao meio. As células de *S. bovis* HC5 também apresentaram inibição sobre a produção de amônia pela microbiota ruminal, porém, foi menos eficiente em diminuir a produção de amônia do que bovicina ou monensina (Figura 16A).

A densidade óptica decresceu rapidamente quando houve adição de bovicina ou monensina (10^{-1} e 10^{-2}). Os tratamentos com células de *S. bovis* HC5 mantiveram maior densidade óptica ao longo das diluições, indicando possível crescimento de *S. bovis* no

meio de cultura utilizado. A densidade óptica no tratamento controle apresentou decréscimo linear ao longo das diluições (Figura 16B).

A)



B)

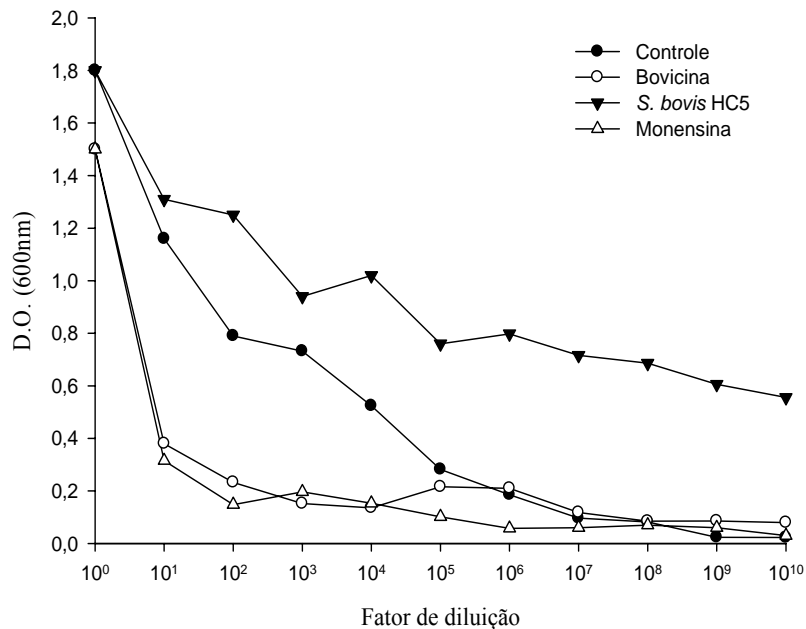


Figura 16. (A) Efeito da adição de bovicina HC5 (50 AU/mL), monensina (5 μ M) e células de *S. bovis* HC5 (5% v/v) sobre a produção de amônia pela microbiota ruminal cultivada em meio contendo Trypticase e sobre a densidade óptica ao final de 24 horas de incubação a 39 °C (B).

Monensina foi originalmente utilizada na inibição de archeas produtoras de metano (RUSSELL e STROLBEL, 1989), entretanto, trabalhos anteriores indicaram que monensina também era eficiente na diminuição da concentração de amônia *in vitro* e *in vivo* (RICHARDSON *et al.*, 1976). Estudos *in vivo* indicaram que monensina diminuiu a produção de amônia e a atividade específica de produção de amônia e foi eficiente contra espécies que fermentam aminoácidos e contribuem para a acumulação de amônia no rúmen (YANG e RUSSELL, 1993). Monensina é mais efetiva contra bactérias gram-positivas (RUSSELL, 1987). Espécies gram-negativas possuem uma membrana externa que confere um fator de proteção contra a ação de inibidores (RUSSELL *et al.*, 1988; RUSSELL e STROLBEL, 1989). Entretanto, trabalhos posteriores verificaram que bactérias gram-negativas necessitam de um período de adaptação para que haja efetiva ação da monensina e em contrapartida algumas linhagens de bactérias gram-positivas se mostraram relativamente resistentes à monensina (CALLAWAY e RUSSELL, 1999).

A habilidade de espécies de bactérias serem ou não sensíveis à ação de agentes antimicrobianos não é bem entendida, porém, uma bacteriocina isolada de *Streptococcus bovis* HC5, a bovicina HC5, vem demonstrando potencial para ser utilizada na manipulação da fermentação ruminal (MANTOVANI *et al.*, 2001), podendo ser uma alternativa ao uso da monensina, cuja utilização vem sendo criticada pela comunidade científica mundial. Trabalhos recentes indicam que a bacteriocina ligada à célula produtora é tão eficaz quanto aquela liberada no extrato livre de células ou no sobrenadante das culturas. Além disso, apresenta maior resistência à degradação (XAVIER *et al.*, 2008) uma vez que a bacteriocina livre está sujeita à degradação extracelular por meio de peptidases e proteínases (JACK *et al.*, 1995; MANTOVANI *et al.*, 2002). No presente trabalho, os resultados indicaram que a atividade inibitória de *S. bovis* HC5 foi similar aquela observada quando houve adição de monensina ou da bacteriocina semi-purificada.

4.3.3 Efeito de bovicina HC5 e monensina sobre a atividade de desaminação de microrganismos hiperprodutores de amônia

Os isolados produziram, em média, cerca de 56,3 mM de amônia após 24 horas de cultivo (Figura 17). Quando Bovicina HC5 (32 UA/mL) ou monensina (5 μ M) foram adicionadas ao meio de cultivo, a produção total de amônia reduziu, em média, cerca de 58,1% para os tratamentos com bovicina HC5 e 62,0% para os tratamentos com monensina em comparação aos controles. O isolado 102 foi o mais sensível à bovicina HC5 (74,1% de redução de produção de amônia), enquanto o isolado CT2 foi o menos sensível (30,5 % de redução de produção de amônia) em comparação com o controle. Comportamento similar foi observado também para monensina, sendo esta ligeiramente mais efetiva do que a bovicina HC5. O isolado 15A foi o mais sensível à monensina (74,5 % de redução de produção de amônia) (Figura 17).

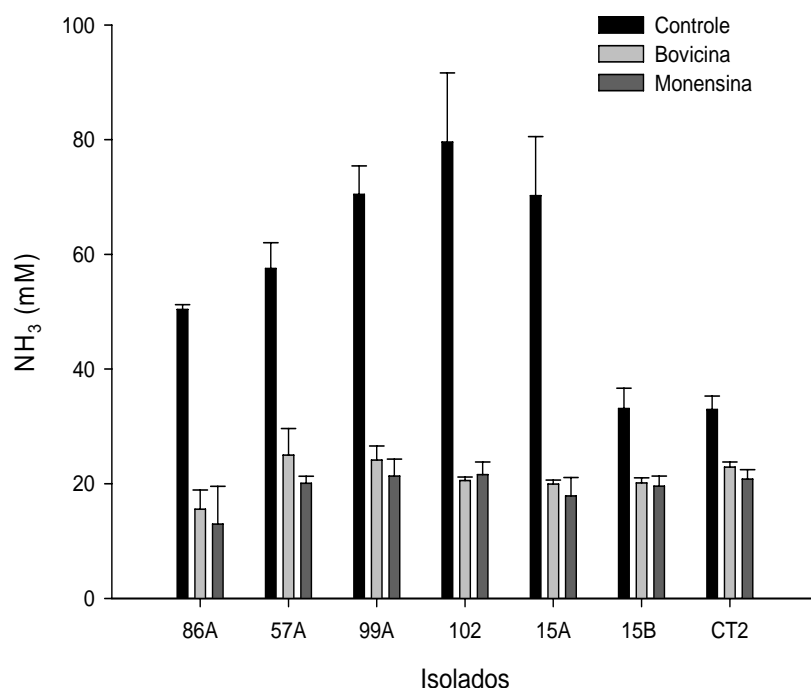


Figura 17. Efeito da Bovicina HC5 (32 UA/mL) e monensina (5 μ M) sobre a produção de amônia por microrganismos ruminais ressuspensos em meio mineral anaeróbio adicionado de 15 g/L de Trypticase. As culturas foram incubadas durante 24 horas a 39 °C.

Os isolados obtidos do rúmen bovino apresentaram atividade específica de produção de amônia (AEPA) média a partir de Trypticase de 695,9 nmoles de amônia/mg de proteína/minuto (Figura 18). A adição de bovicina HC5 reduziu, em média, 45 % da AEPA enquanto o tratamento com monensina reduziu, em média, 66,7 % da atividade de desaminação. A maior atividade específica de produção de amônia foi verificada para o isolado 86A (1105,6 nmoles de amônia/mg de proteína/minuto). A menor AEPA foi verificada para o isolado 15B (488,7 nmoles de amônia/mg de proteína/minuto).

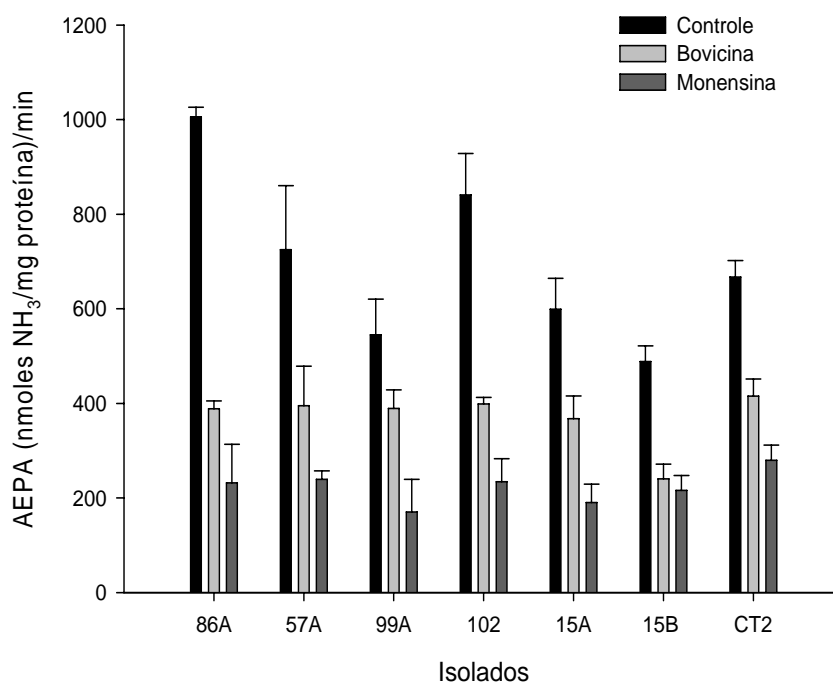


Figura 18. Efeito da Bovicina HC5 (32 AU/mL) e monensina (5 μ M) sobre a atividade específica de produção de amônia por microrganismos ruminais. As incubações foram realizadas em meio mineral anaeróbico adicionado de 15 g/L de Trypticase a 39 °C.

Quando bovicina HC5 ou monensina foram adicionados ao meio, houve redução da atividade de desaminação de todos os isolados testados. O isolado 86A foi o que apresentou menor AEPA em relação ao tratamento controle. A maior AEPA para o tratamento com bovicina foi verificada com o isolado CT2, com 415,4 nmoles de amônia/mg de proteína/minuto e a menor atividade específica de produção de amônia foi verificada para o isolado 15B que apresentou 240,4 nmoles de amônia/mg de proteína/minuto. Para o tratamento com monensina, a maior taxa de AEPA também foi verificada para o isolado CT2 enquanto o isolado 99A foi o que apresentou menor taxa de desaminação com 279,6 e 170,1 nmoles de amônia/mg de proteína/minuto, respectivamente (Figura 18).

Quando foram utilizados isolados hiperprodutores de amônia na ausência de bovicina HC5 ou monensina foi observado crescimento para todos os microrganismos após 24 horas de incubação. A cultura em que houve maior crescimento foi a 99A. Entretanto, quando bovicina HC5 (32 AU/mL) ou monensina (5 μ M) foi adicionadas ao meio de cultura foi observado redução na densidade óptica para todos os isolados. Os resultados indicam que bovicina HC5 apresentou maior efeito de lise celular nos isolados hiperprodutores de amônia do que monensina. O isolado 102 foi aquele que apresentou a maior redução na densidade óptica (77%) (Figura 19).

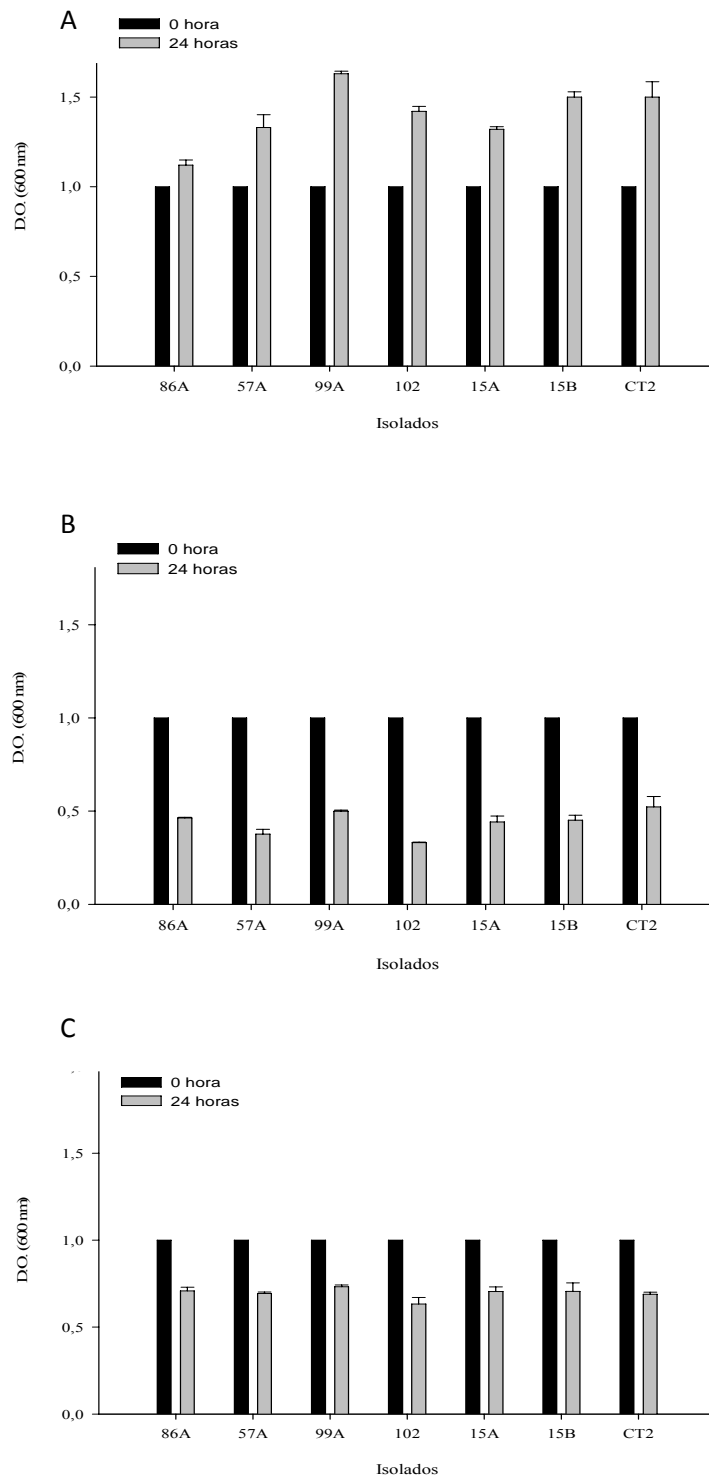


Figura 19. Efeito da adição de bovicina HC5 (B) e monensina (C) sobre o crescimento da microbiota ruminal. As bactérias foram incubadas em meio anaeróbio adicionado de Trypticase (15 g/L) a 39 °C por 24 horas. A mudança na densidade óptica foi monitorada por espectrofotômetro (600 nm). A densidade óptica inicial foi ajustada para 1,0 em todos os tratamentos. (A) Tratamento controle sem adição de bovicina HC5 ou monensina. (A) controle.

Durante a fermentação ruminal a amônia resultante da desaminação de aminoácidos é utilizada para a produção de proteína microbiana que fornece até 90% do nitrogênio orgânico para o animal. Entretanto, amônia também é produzida nesse processo, e o excesso de desaminação pode acarretar perdas de nitrogênio através da urina do animal, contribuindo para a contaminação do ambiente (RYCHLICK e RUSSELL, 2002). Bactérias com alta atividade específica de produção de amônia são fermentadoras obrigatórias de aminoácidos e parecem contribuir significativamente para as perdas de nitrogênio no rúmen.

Bactérias classificadas como hiperprodutoras de amônia que já foram caracterizadas são sensíveis à ação inibitória de monensina (RUSSELL e STROBEL, 1989; PASTER *et al.*, 1993). Porém, *Clostridium aminophilum* F, uma bactéria hiperprodutora de amônia, tem demonstrado ser relativamente resistente à ação deste ionóforo (KRAUSE e RUSSELL, 1996). Culturas adaptadas não apresentaram aumento da fase lag e toleraram melhor a adição de monensina ao meio em relação às culturas não adaptadas. Esses resultados sugerem que a utilização de ionóforos como promotores de crescimento na manipulação da fermentação ruminal pode selecionar fenótipos de resistência cruzada em *C. aminophilum* F (KRAUSE e RUSSELL, 1996; HOULIHAN e RUSSELL, 2003).

Alternativas, como a utilização de bacteriocinas vem sendo sugeridas para manipular parâmetros da fermentação ruminal (MANTOVANI *et al.*, 2002), uma vez que os ionóforos são tóxicos tanto para o homem quanto para animais e seu mecanismo de resistência não está totalmente esclarecido (HOULIHAN e RUSSELL, 2006). RYCHLIK E RUSSELL (2002) verificaram que a alta atividade específica de produção de amônia por *C. aminophilum* F não diminuiu com a adição de *Butirivibrio fibrisolvens* JL5, uma espécie produtora de bacteriocina, ou com a adição de monensina.

No presente trabalho, foi verificado que a bovicina HC5 foi eficiente em inibir a produção de amônia por isolados bacterianos do rúmen com alta atividade de desaminação de aminoácidos. Estudos anteriores verificaram que bovicina HC5 tem amplo espectro de ação. MANTOVANI e RUSSELL, (2003) verificaram que essa bacteriocina possui atividade de inibição contra *Clostridium*, *Listeria monocitogenes* e outras bactérias gram-positivas. Estudos recentes testaram também a atividade de bovicina HC5 contra *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* e linhagens de *Clostridium tyrobutyricum* isolados da polpa de manga deteriorada e verificaram que a adição de bovicina HC5 inibiu o crescimento desses microrganismos (CARVALHO *et al.*, 2007).

Os resultados deste trabalho indicam que a bovicina HC5 foi estável em culturas mistas de bactérias ruminais, reduzindo a desaminação de aminoácidos *in vitro*. Essas observações sugerem que a bovicina HC5 pode ser utilizada na manipulação da fermentação ruminal reduzindo a perda de constituintes protéicos da dieta animal.

4.4 LITERATURA CITADA

AGRICULTURAL AND FOOD REASERCH COUNCIL - AFRC. **Energy and protein requirements of ruminants**. Wallingford: CAB International, 159p. 1993.

ANNISON, E. F. Nitrogen metabolism in the sheep. **Biochem.J.** v. 64, p.705-714. 1956.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. Wiley, New York, NY 1987.

BERNSK, I. e THOMAS, C. A. Isolation of high molecular weight DNA from *Hemophilus injluenzae*. **Journal of Molecular Biology**. v. 2 , p. 476-490. 1965.

BRADFORD, M. Photometric methods for protein determination. Procedures and analysis. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254. 1976.

COTTA, M. A., e RUSSELL, J. B. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rúmen bacterial protein synthesis in continuous culture. **J. Dairy Sci.** v. 65, p. 226-234. 1982.

CALLAWAY, T. R. e RUSSEL, J. B. Selection of a highly monensin-resistance *Prevotella bryantii* sub-population with altered outer membrane characteristics. **Appl. Environ. Microbiol.** v.65, 4753-4759. 1999.

CARVALHO, A. A. T.; MANTOVANI, H.C. ; VANETTI, M.C.D. Bactericidal effect of bovicin HC5 and nisin against *Clostridium tyrobutyricum* isolated from spoiled mango pulp. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, p. 68-74, 2007.

CHANEY, A. L. e MARBACH, E. P. modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clin. Chem.** v. 8, p. 130-132. 1962.

HOULIHAN A. e RUSSELL, J. B. Factors affecting the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5: release, stability and binding to targeted bacteria. **J. Appl. Microbiol.** v.100, p. 168-174. 2006.

KLIEVE, A. V. e HEGARTY, R. S. Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural and Economic Resources**, v.50, p.1315-1319. 1999.

KRAUSE, D.O., RUSSELL, J.B.. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid degradation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 815-821. 1996.

JACK, R. N.; TAGG, J. R. e RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiol. Ver.** v. 59, p. 171-200. 1995.

JONKER, J.S.; KOHN, R.A.; ERDMAN, R.A. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2681-2692, 1998.

LANA, R. P.; FOX D. G.; RUSSELL, J. B. e PERRY, T. C. Influence of monensin on Holstein steers fed high-concentrate diets containing soybean meal or urea **J. Anim. Sci.** v.75, p. 2571-2579. 1997.

MANTOVANI, H. C.; KAM, D. K.. e RUSSELL, J. B. The antibacterial activity and sensitivity of *Streptococcus bovis* strains isolated from the rumen of cattle. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 37, p. 223-229. 2001.

MANTOVANI, H. C. e RUSSELL, J. B. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67, p. 808-813. 2001.

MANTOVANI, H. C., HU, H.; WOROBO, R. W. e RUSSELL, J. B. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiol.** V. 148, p. 3347-3352. 2002.

MANTOVANI, H. C. e RUSSELL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. **International J. of Food Microbiology** v. 89, p. 77-83, 2003.

MARTIN, S. A. e STREETER, M. N. Effect of malate on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. **J. Anim. Sci.** v.73, p. 2141-2145. 1995.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrients requirements of beef cattle.** 7.ed. Washington, D.C. 244p. 2001.

PASTER, B. RUSSELL, J. B., YANG, C. M. J., CHOW, J. M., WOESE, C. R. e TANNER R. Phylogeny of ammonia-producing ruminal bacteria, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* and *Clostridium aminophilum* sp. Nov. **Int. J. Sys Bacteriol.** v. 43, p.107-110. 1993.

PRESSMAN, B. C. e FAHIM, M. Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. **Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.** v. 22, p. 465-90. 1982.

RICHARDSON, L.F., RAUN, A.P., POTTER, E.L. et al. Effect of monensin on ruminal fermentation *in vitro* and *in vivo*. **Journal Animal Science**, v.43, p.657-664, 1976.

RUSSELL, J. B., STROBEL, H. J. e CHEN, G. Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 54, p. 872-877. 1988.

RUSSELL, J. B. e STROBEL, H. J. Mini-review: The effect of ionophores on ruminal fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 55, p. 1-6. 1989.

RUSSELL, J. B. e MANTOVANI, H. C. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** v. 4, p. 347-355. 2002.

RYCHLIK, J.L. e RUSSELL, J. B. Bacteriocin-like activity of *Butyrivibrio fibrisolvens* JL5 and its effect on other ruminal bacteria and ammonia production. **Appl. Environ. Microbiol.** V.3, p.1040-6. 2002.

TAMMINGA, S. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. **J. Anim. Sci.** n. 74 p. 3112-3124. 1996.

VAN DER BOGAARD, A. E. e STOBBERLING, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics. In: **Int. J. Antimicrob. Agents.** 14, p. 327-35. 2000.

VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.34, p.251-257, 1977.

VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N. (Ed.) **The rumen microbial ecosystem**. Essex: Elsevier, p.387-443. 1988.

XAVIER, B. M.; HOULIHAN, A. J. e RUSSELL. J. B. The activity and stability of cell associated activity of bovicin HC5. **FEMS Microbiol. Lett** v. 283, p. 162-166. 2008.

YANG, C. M. J. e RUSSELL, J. B. The effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen. **Appl. Environ. Microbiol.** v.59, p. 3250-3254. 1993

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A dieta animal tem influência sobre a atividade de desaminação, produção de proteína microbiana e produção de amônia de microrganismos de origem ruminal que utilizam aminoácidos como fonte de energia.
- O aumento de proteína bruta na dieta aumenta a concentração de amônia no rúmen e a atividade específica de produção de amônia por microrganismos ruminais.
- As espécies microbianas com elevada atividade específica de produção de amônia parecem estar presentes no rúmen em níveis menores do que 10^5 UFC/mL.
- O nível de proteína bruta na dieta não influencia a composição das comunidades microbianas do rúmen.
- Microrganismos do rúmen com elevada atividade específica de produção de amônia podem ser rapidamente selecionados pela transferência de líquido ruminal em meio contendo aminoácidos como fonte preferencial de energia.
- Os isolados obtidos neste trabalho são bastonetes gram positivos formadores de endósporos, relacionados filogeneticamente com o gênero *Clostridium* que apresentam alta atividade específica de produção de amônia.
- As bactérias ruminais com alta atividade específica de produção de amônia caracterizadas neste estudo utilizam carboidratos e são geneticamente distintas de culturas hiperprodutoras de amônia previamente descritas.

- As bactérias ruminais com alta atividade específica de produção de amônia isolados neste trabalho utilizam preferencialmente os aminoácidos fenilalanina, glutamina, isoleucina, leucina, serina, tirosina e treonina.
- Monensina e bovicina HC5 inibiram a desaminação de aminoácidos pela microbiota ruminal.
- Os isolados com alta atividade específica de produção de amônia caracterizados neste trabalho foram sensíveis à bovicina HC5 e monensina.

Espera-se que este trabalho tenha proporcionado maior entendimento da ecologia e dinâmica da microbiota que habita o rúmen, especificamente da população que hidroliza aminoácidos, verificando a ocorrência e a atividade específica de produção de amônia desse tipo de microrganismo em diferentes condições dietéticas. Desta maneira, este trabalho visou contribuir para que haja uma otimização na formulação da dieta animal e diminuição de perdas de nitrogênio protéico, já que esse é o componente da dieta mais oneroso para o pecuarista. Além disso, com a menor excreção de compostos nitrogenados pelo ruminante, também haverá diminuição dos impactos ambientais, uma vez que a uréia excretada na urina do animal acarreta a contaminação do solo e lençóis freáticos.