

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA ESTIMAR
ADERÊNCIA DE BACTÉRIAS RUMINAIS À
PARTÍCULAS DE FORRAGENS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mariana Patricia Mezzomo

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA ESTIMAR ADERÊNCIA
DE BACTÉRIAS RUMINAIS À PARTÍCULAS DE
FORRAGENS**

Mariana Patricia Mezzomo

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em
Produção Animal/Nutrição de Ruminantes, da Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Vilmar Kozloski

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Mezzomo, Mariana Patricia
Avaliação de métodos para estimar aderência de
bactérias ruminais à partículas de forragens. / Mariana
Patricia Mezzomo.-2014.
78 p.; 30cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, RS, 2014

1. Aderência. 2. Bactérias ruminais. 3.
Digestibilidade. 4. Forragem. 5. Marcadores. I.
Kozloski, Gilberto Vilmar II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Mariana Patricia Mezzomo. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: mariana_mezzomo@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA ESTIMAR ADERÊNCIA DE
BACTÉRIAS RUMINAIS À PARTÍCULAS DE FORRAGENS**

elaborada por
Mariana Patricia Mezzomo

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Gilberto Vilmar Kozloski, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

João Batista Teixeira da Rocha, PhD (UFSM)

Lisandre Oliveira, Dra. (UNIJUÍ)

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente em minha vida, me guiando e fortalecendo a minha fé.

À minha família, em especial aos meus pais Roberto e Teruko pelo amor, apoio incondicional e dedicação à família. As minhas irmãs Cristina e Juliana que mesmo de longe sempre torceram por mim... Vocês são um exemplo de força e determinação para mim! Ao meu irmão Leonardo, o meu muito obrigada por estar por perto e por estar cuidando tão bem e com tanto carinho da memória dos nossos avós. Ao meu cunhado Olivier e meus sobrinhos Matheus e Eric por tornarem os dias mais leves e alegres.

Ao Grégori pelo amor, companheirismo, incentivo e por aguentar as ausências. Obrigada por sempre procurar me mostrar o lado bom das coisas. Eu te amo!

Ao professor Gilberto, pela orientação, oportunidade de realizar o mestrado no LABRUMEN e pela paciência e ensinamentos transmitidos durante esses anos.

Às minhas amigas Suka, Carla, Fernanda, Simone, Mônica e Roberta pela amizade, cumplicidade e palavras de apoio em todos os momentos! E aos amigos Tiago e Cristiano pela boa convivência e disponibilidade em me ajudar durante o mestrado.

À toda equipe LABRUMEN: Lisandre, Diego, Thaís, Caroline, Marcelo, Bruno, Laís, Alsiane, Flaiane, Romulo, Elissandra, Rafael e Vinícius (*in memoriam*) pela ajuda e dedicação na realização das atividades! A técnica Gisele, pelo auxílio na preparação e execução das análises. Sem vocês tudo seria muito mais difícil.

Ao pesquisador Luiz Antônio Suita de Castro e os técnicos Nara e Valter do Laboratório de Imunologia e Microscopia Eletrônica, pertencente a Embrapa Clima Temperado pelas análises realizadas.

À Universidade Federal de Santa Maria por toda estrutura disponibilizada.

À CAPES pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de estudos.

À todos vocês o meu muito obrigada!

*Se as coisas são inatingíveis... Ora!
Não é motivo para não querê-las
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!*

Mário Quintana

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

AValiação de Métodos para Estimar Aderência de Bactérias Ruminais a Partículas de Forragens

AUTOR: MARIANA PATRICIA MEZZOMO

ORIENTADOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

Local e data da defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2014

Foram conduzidos ensaios de digestibilidade *in vitro* com o objetivo de avaliar o uso de potenciais marcadores de aderência bacteriana a partículas de forragens, nos quais foram incubadas amostras de azevém (*Lolium multiflorum*), *Cynodon* spp., alfafa (*Medicago sativa*) e amendoim forrageiro (*Arachis pintoi*) por 24 horas. Nos resíduos da incubação foram analisados a digestibilidade da matéria seca e a concentração dos marcadores de aderência: N¹⁵, purinas, fósforo (P) e atividade enzimática e suas variáveis. Foram realizadas incubações para avaliar o grau de solubilização do fósforo de amostras de forragem ao longo de 24 horas e coletas de digesta ruminal com o objetivo de isolar bactérias ruminais e analisar a composição química das bactérias associadas à fase líquida (BAL) e bactérias aderidas à partícula (BAP). Também foi avaliado se a metilcelulose, utilizada no processo de extração das BAP, interfere na composição química das bactérias extraídas. Os dados foram analisados utilizando modelos que incluíram o tipo de amostra ou de bactéria como bloco (blocos ao acaso). Os resultados do teste de solubilização do fósforo indicam que nas primeiras 3 horas de incubação as concentrações de fósforo nas amostras diminuíram de forma acentuada e após esse período tenderam a permanecer constantes. Verificou-se diferença (P<0,05) na composição química das BAP e BAL em relação aos teores de nitrogênio, purinas, DAPA e fósforo. Os dados obtidos com os ensaios avaliando o efeito da metilcelulose na composição química das bactérias associadas à fase líquida demonstraram que os teores de nitrogênio e purinas quando expressos na proporção de matéria orgânica não foram afetados pelo tratamento com metilcelulose (P>0,05). No entanto, observou-se diferença em relação ao teor de P (P<0,05). Não foi observada correlação entre digestibilidade e os marcadores de aderência bacteriana e entre os marcadores de aderência indicou correlação entre N¹⁵ e açúcares redutores com substrato carboximetilcelulose e (P=0,001), N¹⁵ e açúcares redutores com substrato xilano (P<0,0001). Concluiu-se que a composição química das bactérias associadas a fase líquida difere das bactérias aderidas a partículas de forragem e, em geral, não é afetada pelo tratamento com metilcelulose. A concentração dos marcadores testados não apresentou correlação consistente entre si ou com a degradabilidade das amostras de forragem. Exceção foi a relação entre N¹⁵ e atividade enzimática, indicando que o isótopo foi incorporado principalmente em proteínas enzimáticas bacterianas.

Palavras-chave: Aderência. Bactérias ruminais. Digestibilidade. Forragem. Marcadores. Metilcelulose.

ABSTRACT

Master Degree Dissertation
Post-Graduate Program in Animal Science
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF METHODS FOR ESTIMATING RUMINAL BACTERIAL ADHESION TO FORAGE PARTICLE

AUTHOR: MARIANA PATRICIA MEZZOMO

ADVISOR: GILBERTO VILMAR KOZLOSKI

Place and Date of evaluation: Santa Maria, February 26, 2014

In vitro assays were conducted to evaluate the use of potential markers of bacterial adherence to particles of forage, in which samples of ryegrass (*Lolium multiflorum*), *Cynodon spp.*, alfalfa (*Medicago sativa*) and perennial peanut (*Arachis pintoi*) were incubated for 24 hours. In the residue of incubation were analyzed the digestibility of dry matter and concentrations of markers of adherence: N¹⁵, purines, phosphorus (P) and enzymatic activity and its variables. Incubations were performed to evaluate the degree of phosphorus solubilization from the forage samples over 24 hours and samples of ruminal digesta were collected in order to isolate rumen bacteria and analyzing the chemical composition of the liquid phase associated bacteria (LAB) and bacteria adhered to particle (BAP). It was also assessed whether methylcellulose, used in the extraction of the BAP process, interfere with the chemical composition of bacteria extracted. Data were analyzed using a model that included the type of sample or bacteria as a block (randomized blocks). The results of the solubility test indicated that at the first 3 hours of incubation the concentration of phosphorus in the samples dropped sharply and thereafter tended to remain constant. There was difference (P <0.05) in the chemical composition of the BAP and BAL in relation to concentration of nitrogen, purine, DAPA and phosphorus. The data obtained from the trials evaluating the effect of methylcellulose on the chemical composition of bacteria associated with the liquid phase showed that the levels of nitrogen and purine when expressed in proportion of organic matter were not affected by treatment with methylcellulose (P > 0.05). However, a difference was observed in relation to the content of P (P <0.05). No correlation was observed between digestibility and bacterial adhesion markers and between the markers indicated correlation between N¹⁵ and reducing sugars with the substrate carboxymethylcellulose (P = 0.001), and N¹⁵ with reducing sugars substrate xylan (P <0.0001). In conclusion, the chemical composition of the liquid phase bacteria associated differs from the adherent bacteria and particulate material in general was not affected by treatment with methylcellulose. The concentration of the tested markers showed no consistent correlation between themselves or with the degradability of forage samples. The exception was the relationship between N¹⁵ and enzymatic activity, indicating that the isotope was incorporated mainly in bacterial enzymatic proteins

Keywords: Adherence. Digestibility. Forage. Markers. Methylcellulose. Rumen bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Procedimentos adotados para separar as bactérias associadas a fase líquida (BAL) e bactérias aderidas a partículas (BAP). 34
- Figura 2 – Solubilização do fósforo em amostras de forragens e concentrados ao longo de 24 horas..... 42
- Figura 3 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de resíduo de forragens incubadas *in vitro* por 24 horas. (A) *Lolium multiflorum*, (B) *Cynodon* spp., (C) *Medicago sativa* e (D) *Arachis pintoi*..... 47
- Figura 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de resíduo de forragens incubadas *in vitro* por 24 horas. (E) *Sorghum bicolor*, L. Moench. As amostras (F) *Lolium multiflorum*, (G) *Cynodon* spp. e (H) *Medicago sativa* foram submetidas a sonicação..... 48
- Figura 5 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de resíduo de forragens incubadas *in vitro* por 24 horas. (I) *Lolium multiflorum*, (J) *Cynodon* spp., (L) *Medicago sativa* e (M) *Sorghum bicolor*, L. Moench.. 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química de populações bacterianas ruminais (mg/g MS)	19
Tabela 2 – Composição química das forragens	31
Tabela 3 – Composição química de bactérias associadas à fase líquida e bactérias aderidas a partículas de forragem	43
Tabela 4 – Efeito da metilcelulose na composição química de bactérias associadas à fase líquida	43
Tabela 5 – Correlação entre os marcadores de aderência bacteriana a partículas de forragem	45

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Solução tamponante.....	66
ANEXO B – Solução complexante	67
ANEXO C – Solução redutora	68
ANEXO D – Solução tampão fostafo.....	69
ANEXO E – Solução DNS	70
ANEXO F – Solução comassie brilhante blue	71
ANEXO G – Solução tampão citrato-HCl	72
ANEXO H – Solução tampão ninhidrinha	73

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Resultados e cálculos do excesso de N ¹⁵ nos resíduos de incubação.....	76
APÊNDICE B - Resultados e cálculos da digestibilidade <i>in vitro</i> e aderência bacteriana a partículas de forragem	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Fermentação e microrganismos ruminais	16
2.2 Aderência de bactérias fibrolíticas a partículas de forragem	21
2.3 Metodologias para estimar aderência bacteriana a partículas de forragem	23
2.3.1 Marcadores externos	24
2.3.2 Marcadores internos:	25
3 HIPÓTESES	28
4 OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo geral	29
4.2 Objetivos específicos	29
5 MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1 Local e época	30
5.2 Avaliação de marcadores para estimar aderência bacteriana ruminal	30
5.3 Isolamento de bactérias ruminais	32
5.4 Efeito do uso da metilcelulose na composição química das bactérias ruminais	33
5.5 Teste de solubilização do fósforo	35
5.6 Análises químicas	35
5.7 Análises químicas dos marcadores de aderência bacteriana ruminal	36
5.7.1 Determinação de purinas	36
5.7.2 Determinação de N ¹⁵	37
5.7.3 Determinação de Fósforo.....	37
5.7.4 Atividade Enzimática	38
5.7.5 Proteína total.....	38
5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura	39
5.9 Análise da composição química de bactérias aderidas a partícula (BAP) e bactérias associadas a fase líquida (BAL)	40
5. 10 Análise estatística	41
6 RESULTADOS	42
6.1 Solubilização do fósforo	42

6.2 Composição química das bactérias associadas à fase líquida e bactérias aderidas a partícula.....	42
6.3 Marcadores de aderência bacteriana ruminal	44
6.3.1 Correlação entre os marcadores de aderência bacteriana ruminal.....	44
5.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	46
7 DISCUSSÃO	50
7.1 Solubilização do fósforo	50
7.2 Composição química das bactérias associadas à fase líquida e bactérias aderidas a partícula.....	50
7.3 Efeito da metilcelulose no isolamento de bactérias aderidas a partícula	52
7.4 Marcadores de aderência bacteriana ruminal	53
8 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS.....	65
APÊNDICES	74

1 INTRODUÇÃO

A fermentação em ruminantes é um processo decorrente da atividade física e microbiológica que converte os componentes dietéticos a ácidos graxos voláteis, proteína microbiana, vitaminas do complexo B, metano, dióxido de carbono, amônia, nitrato, entre outros (OWENS e GOETSCH, 1993).

O primeiro passo para que ocorra a fermentação ruminal é a aderência dos microrganismos às partículas de alimento, sendo esta uma etapa fundamental para o processo de degradação dos alimentos (RODERICK e WITHE, 1990). Dessa forma, quantificar e conhecer os fatores que afetam o grau de aderência e colonização bacteriana nas partículas de alimento, particularmente nas de forragem, é tema relevante em nutrição de ruminantes. Alguns métodos têm sido descritos para se realizar esta quantificação, através da utilização de marcadores externos como os isótopos S^{32} e N^{15} e/ou por meio de marcadores internos como bases púricas e ácido diaminopimélico (CARRO, 2001). No entanto, a maior parte desses métodos é de difícil execução, demandam a realização de uma série de etapas para o preparo das amostras, a utilização de padrões e reagentes caros e equipamentos que utilizam procedimentos analíticos complexos.

Nesse contexto, a utilização do fósforo como marcador poderia ser uma alternativa. O fósforo está presente em todas as células vivas, desempenhando papel tanto estrutural quanto funcional. A técnica para determinação de fósforo utiliza etapas para o preparo da amostra que são de execução simples e requer o uso de reagentes e equipamentos convencionais presentes em laboratórios de pesquisa. Este marcador já foi utilizado para medir grau de aderência bacteriana em amostras puras de celulose ou algodão incubadas *in vitro* (MOURIÑO et al., 2001). Contudo, não existe um marcador padrão e não foi encontrado na literatura estudos em que o fósforo tenha sido utilizado como marcador do grau de aderência bacteriana em partículas de forragem.

O presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar potenciais marcadores de aderência bacteriana a partículas de forragem incubadas *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fermentação e microrganismos ruminais

O rúmen é um ecossistema aberto e contínuo, sendo considerado um ambiente ideal para a manutenção de uma população microbiana. A oferta constante de substratos provenientes dos alimentos consumidos pelo animal e a grande capacidade de armazenamento do rúmen proporcionam o volume e tempo de retenção necessários para que componentes complexos da dieta possam ser digeridos e fermentados pelos microrganismos ruminais (YOKOYAMA e JOHNSON, 1988).

Os polissacárido e proteínas da dieta são geralmente degradados pelos microrganismos em produtos finais fornecendo os nutrientes para o metabolismo do animal hospedeiro. Assim, a extensão e o tipo de transformação dos alimentos é que irão determinar a performance produtiva do animal. A qualidade e quantidade de produtos fermentados no rúmen dependem do tipo e da atividade dos microrganismos ruminais (RODERICK e WITHE, 1990).

Entre os principais carboidratos que compõem a parede celular das plantas, a celulose, hemicelulose e a pectina constituem a principal fonte de energia para os ruminantes. O aproveitamento desses compostos ocorre através de uma relação simbiótica entre os microrganismos que estão presentes no rúmen, sendo que a fauna microbiana do rúmen é constituída por bactérias ($10^{10} - 10^{11}$ por mL), fungos ($10^3 - 10^6$ por mL) e protozoários ($10^4 - 10^6$ por mL) (HESPELL et al., 1997). Devido a sua maior biomassa e alta atividade, as bactérias ruminais desempenham um importante papel na degradação biológica da porção fibrosa da planta (KOIKE e KOBAYASHI, 2009).

A digestão da parede celular no rúmen ocorre, predominantemente, pela ação de bactérias celulolíticas (WINDHAM, 1984). Entre as bactérias que habitam o rúmen, as *Fibrobacter succinogeneses*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium cellulosolvens* e *Eubacterium ruminantium* são reconhecidas como espécies de bactérias fibrolíticas (STEWART et al., 1997). As espécies *F. succinogeneses*, *R. flavefaciens* e *R. albus* encontram-se no total de bactérias celulolíticas presentes no rúmen na proporção de 33,0%, 2,6% e 46,0%, respectivamente.

Essas três espécies, por possuírem uma maior habilidade em digerir celulose que as demais espécies celulolíticas ruminais, são consideradas as representantes das espécies celulolíticas no rúmen (KOIKE e KOBAYASHI, 2009).

O conteúdo ruminal é heterogêneo, constituído por uma complexa massa sólida de digesta suspensa em uma fase líquida, a qual produz vários microambientes (WILLIAMS e STRACHAN, 1984). Assim, de acordo com a forma que as bactérias interagem com as partículas de forragem que chegam ao rúmen, estas podem ser classificadas em três populações distintas: 1) Bactérias associadas ao fluido ruminal, 2) Bactérias fracamente aderidas à partícula de alimento e 3) Bactérias fortemente aderidas à partícula de alimento (CZERKAWSKI e CHENG, 1988).

A população associada ao fluido ruminal corresponde a uma mistura de bactérias que se separaram das partículas de alimentos e de bactérias que sobrevivem de componentes da fração solúvel dos alimentos. As bactérias presentes na porção líquida do rúmen correspondem a aproximadamente 20% do total de bactérias ruminais (MIRON, 2001) e não apresentam grande participação na degradação da fração insolúvel dos alimentos (LATHAM, 1980). As enzimas envolvidas na utilização dos carboidratos não estruturais são mais ativas nos microrganismos presentes na fase líquida e população não aderida.

As bactérias fracamente aderidas à partícula de alimento são facilmente removidas, por uma lavagem delicada, enquanto que, as fortemente aderidas permanecem aderidas. Essas duas populações são numericamente predominantes correspondendo entre 70 a 80% do total das bactérias ruminais e do ATP produzido pelos microrganismos ruminais (FORSBERG e LAM, 1977; CRAIG et al., 1987). Além disso, são responsáveis por 80% da atividade de endoglucanase, 70% da atividade de amilase e 75% da atividade de protease. Elas também apresentam valores muito superiores na atividade da hemicelulase e celulase em relação à população associada ao fluido (WILLIAMS e STRACHAN, 1984). Essas porcentagens sugerem que as populações aderidas a partículas de alimento são primordiais na digestão dos alimentos no rúmen (MIROM, 2001).

Willian et al. (1989) observaram que nas dietas ricas em forragens a atividade das glicosidases é máxima na população associada a fase líquida entre 1 – 2 horas após a alimentação, enquanto que as enzimas proteolíticas são mais ativas na população aderida ao final do período pós-prandial. Em estudo avaliando a distribuição da atividade de enzimas fibrolíticas no conteúdo ruminal em relação à composição de bactérias celulolíticas envolvidas no processo de degradação de polissacarídeos, Michael-Doreau et al. (2001) observaram que as bactérias podem não estar distribuídas igualmente no conteúdo ruminal, de

forma que no somatório das espécies fibrolíticas *F. succinogeneses*, *R. flavefaciens* e *R. albus* estariam presentes em maior proporção na porção sólida do rúmen em relação a fase líquida. Segundo os autores, essa distribuição heterogênea das bactérias poderia explicar a maior atividade fibrolítica dos microrganismos associados a fase sólida.

Devido à distribuição das espécies bacterianas de forma diferente nas frações de bactérias associadas à fase líquida (BAL) e de bactérias aderidas a partícula de alimento (BAP) isoladas do conteúdo ruminal (MERRY e MCALLAN, 1983), observou-se que a composição química e as funções metabólicas dessas duas populações são muito distintas (LATHAN, 1980). Diversos estudos na literatura demonstraram diferenças nos valores relacionados à matéria mineral, nitrogênio, bases púricas, ácido diaminopimélico (DAPA), fósforo e na incorporação de isótopos como o N^{15} , entre essas duas populações. Martin et al. (1994) relataram que os maiores valores nas concentrações destes componentes observados nas BAL quando comparados com os presentes nas BAP podem refletir diferentes estágios de crescimento e nutrição, assim como as mudanças na composição dos microrganismos das diferentes populações microbianas. A composição das bactérias ruminais pode ser influenciada pela dieta e também pode sofrer alterações pela frequência na oferta de alimentos (MCALLAN e SMITH, 1976). Hvelplundet al. (1986) verificaram que as concentrações de N nas bactérias ruminais variaram de 6,2 a 9,0% quando vacas foram alimentadas ao longo de 24 horas com dietas diferindo em relação a fonte e nível de forragem.

No entanto, Merry e McAllan (1983) observaram que o conteúdo de lipídeos nas BAL foi significativamente menor que das BAP. Sabe-se que bactérias que crescem em um ambiente com alta concentração de acetato acumulam grandes quantidades de lipídios (LURIA, 1960) e que as concentrações de acetato presas ao redor das BAP na matriz da fibra são substancialmente maiores que na fração líquida da digesta (CZERKAWSKI e BRECKENRIDGE, 1982).

As diferenças em relação a composição química das populações associadas ao líquido ruminal e das bactérias aderidas a partículas podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1- Composição química de populações bacterianas ruminais (mg/g MS)

Autor	Dieta	Bactéria	MO	N	Purinas	DAPA	P	Lipídeos
Merry e McAllan, 1983	Cevada, palha de cevada e ureia	BAL	843	80	-	3,81	12,8	124
		BAP	913	70	-	2,20	9,7	244
Legay-Carmier e Bauchart, 1989	Feno de gramínea e concentrado	BAL	770	68	-	2,23	-	-
		BAP	836	66	-	1,39	-	-
	Feno de gramínea, concentrado e óleo de soja	BAL	752	69	-	2,11	-	-
		BAP	810	55	-	1,33	-	-
Olubobokun e Craig, 1990	Feno de Bermuda, feno de alfafa e concentrado	BAL	-	87*	-	1,92	-	-
		BAP	-	69*	-	1,53	-	-
Cecava et al, 1990	Forragem e concentrado	BAL	815	82	-	-	-	-
		BAP	825	77	-	-	-	-
Martin, et al., 1994	Feno	BAL	647	55	-	0,95	-	-
		BAP	772	58	-	0,59	-	-
	Feno e cevada	BAL	603	55	-	1,52	-	-
		BAP	783	66	-	0,86	-	-
Rodriguez, et al., 2000	Feno de bermuda, feno de alfafa e conc. (40g/kg de PV ^{0,75})	BAL	722	69	8,5	-	-	-
		BAP	793	70	6,1	-	-	-
	Feno de bermuda, feno de alfafa e conc. (80g/kg de PV ^{0,75})	BAL	740	72	10,8	-	-	-
		BAP	811	73	8,1	-	-	-
Ranila e Carro, 2003	Feno de alfafa e conc. (80:20)	BAP	-	73	3,39	-	-	-
	Feno de alfafa e conc. (20:80)	BAP	-	52	3,82	-	-	-

MS: Matéria seca, MO: Matéria orgânica, BAL: Bactérias associadas à fase líquida, BAP: bactérias aderidas a partículas, conc: concentrado.

*% na matéria orgânica

Tabela 1- Composição química de amostras de bactérias ruminais (mg/g MS)
(continuação)

Autor	Dieta	bactéria	MO	N	Purinas	DAPA	P	Lipídeos
Ramirez-Perez et al., 2009	Silagem de polpa de beterraba, feno de gramínea e concentrado	BAL	-	-	-	-	17,7	-
		BAP	-	-	-	-	5,8	-
González, et al., 2011	Azevem + silagem e concentrado (67:33)	BAL	689	72	-	-	-	97
		BAP	807	70	-	-	-	191
	Feno de alfafa e concentrado (45:55)	BAL	734	83	-	-	-	87
		BAP	852	87	-	-	-	195
	Feno de azevem e concentrado (40:60)	BAL	714	74	-	-	-	82
		BAP	843	79	-	-	-	168
Feno de aveia e concentrado (67:33)	BAL	728	72	-	-	-	116	
	BAP	803	75	-	-	-	213	

MS: Matéria seca, MO: Matéria orgânica, BAL: Bactérias associadas à fase líquida, BAP: bactérias aderidas a partículas, DAPA: ácido diaminopimélico.

*% na matéria orgânica.

2.2 Aderência de bactérias fibrolíticas a partículas de forragem

Para a degradação de um substrato com estrutura complexa, como a celulose, a ação de apenas uma espécie bacteriana seria incapaz de produzir a quantidade e diversidade de enzimas necessárias para a digestão química e estrutural dos tecidos vegetais. O processo digestivo é obtido através da complementação fisiológica de espécies bacterianas que combinadas formam um complexo consórcio na superfície do tecido da planta (CHENG et al., 1991).

O primeiro passo para a degradação do substrato insolúvel é a aderência bacteriana à partícula de alimento. Esse processo garante que a população aderida permaneça mais tempo no rúmen, uma vez que, a partícula de alimento fica retida e então essas bactérias são capazes de se manter a uma taxa de crescimento mais lenta. Além disso, permite que as enzimas que estão presentes na membrana externa das bactérias entrem em contato com os substratos, garantindo que os produtos finais da fermentação estejam preferencialmente disponíveis para as bactérias aderidas (RODERICK e WITHE, 1990).

O fenômeno da aderência é um importante fator na competição e sobrevivência dos organismos ruminais, permitindo que eles alcancem a dominância sobre um ambiente. As bactérias podem se aderir à superfície de longas partículas disponíveis não apenas para evitar serem lavadas junto com o fluido, o qual apresenta taxa de passagem mais rápida, mas também para ter domínio sobre o seu substrato específico e garantir o controle sobre a fonte de alimento (VAN SOEST, 1994). O processo de aderência pode ser descrito dividindo-o em 4 fases: 1) O transporte da bactéria ao substrato fibroso; 2) Adesão não específica de bactérias em áreas do substrato; 3) Adesão específica entre a bactéria aderida e o tecido digestível através da produção de ligantes mais extensivos ou adesinas; 4) Proliferação de bactérias aderidas e a formação de biofilmes em locais específicos do tecido vegetal. Cada uma dessas fases depende que a etapa anterior seja completada com sucesso. (MIRON et al., 2001).

A formação dos biofilmes na superfície da partícula de alimento é um processo dinâmico. Enquanto a sequência de etapas que leva a formação dos biofilmes permanece exatamente a mesma, a participação dos microrganismos pode ser modificada a medida que novos substratos insolúveis são introduzidos no rúmen (MCALLISTER, 1994). Na fase inicial de contato das bactérias com o substrato observa-se uma adesão não específica, a qual é definida como a combinação de processos reversíveis ou irreversíveis, sem o envolvimento de adesinas específicas ou ligantes entre as bactérias e receptores do substrato. A interação entre

as bactérias e o substrato vai envolver a ação de forças de van der Waals, iônicas e eletrostáticas (PELL e SCHOFIELD, 1993). Depois de concluída a fase da adesão não específica, ocorre então a adesão específica que é caracterizada como um processo no qual ligantes ou adesinas presentes na superfície celular das bactérias reconhecem receptores no tecido do substrato. Miron et al. (2001) sugerem que as bactérias ruminais aderidas recebem sinais estimulantes durante a digestão inicial da parede celular de polissacarídeos, para a formação de ligantes e adesinas entre a camada externa do glicocálice da bactéria e o tecido digestível e para a produção de enzimas celulolíticas.

Entre as estratégias utilizadas pelas bactérias ruminais para realizar a degradação do material vegetal, a mais importante é a organização das enzimas em celulosomas (BAYER et al., 2004). Os celulosomas são estruturas moleculares sofisticadas que facilitam o processo de aderência (KRAUSE et al., 2003). Estas estruturas extracelulares parecem ser em muitos casos essencial para a degradação da celulose cristalina e de polissacarídeos associados à parede celular da planta. O celulosoma é uma estrutura complexa constituída por diferentes tipos de enzimas produzidas por vários organismos ruminais celulolíticos. Eles estão associados à superfície da célula bacteriana mediando a aderência da célula com o substrato insolúvel e degradando os produtos solúveis para então serem absorvidos. As múltiplas unidades dos celulosomas são compostas por glicoproteínas, que integram vários tipos de celulases e xilanases (KRAUSE et al., 2003).

Muitos fatores que podem afetar o processo de aderência tanto de bactérias não específicas quanto das específicas, tais como: fatores relacionados à bactéria como idade, condição do glicocálice e competição microbiana; fatores relacionados ao substrato, incluindo cutícula de proteção, área superficial, hidratação, carga iônica e capacidade de troca catiônica, e fatores ambientais como pH, temperatura, presença de O₂, cátions (Na⁺, Ca⁺² e Mg⁺²) e carboidratos solúveis (MIRON et al., 2001).

A mastigação que ocorre durante a alimentação e ruminação pelo animal hospedeiro também desempenha um papel importante para romper as barreiras físicas associadas ao alimento como camadas protetoras de cutícula, expondo as porções mais digestíveis da planta (MIRON et al., 2001). Também contribui no processo mecânico de redução do tamanho das partículas do alimento, aumentando a área superficial disponível para a aderência bacteriana e ataque enzimático (BOWMAN e FISKINS, 1993). A salivação durante a mastigação serve para umidificação do alimento ingerido, a qual é um processo necessário para a associação das bactérias à partícula de alimento e iniciação da aderência. A saliva também atua como tampão para o fluido ruminal auxiliando na prevenção da queda do pH, sendo este de grande

importância pois as bactérias celulolíticas são particularmente sensíveis a baixos pH (RUSSEL e DOMBROWSKI, 1980).

Os fatores que influenciam no balanço entre bactérias aderidas e não aderidas incluem fatores intrínsecos do substrato e do meio ambiente. A aderência a superfícies é um mecanismo competitivo por substrato, que pode resultar na substituição de células mais velhas por células mais jovens, uma vez que a superfície é o local de maior atividade metabólica e síntese celular. Dessa forma uma maior quantidade de substrato mais facilmente degradável significa um rápido desaparecimento da superfície e uma maior quantidade de fragmentos de substratos aparecendo na solução, o que favorece a secreção extracelular de enzimas e uma maior quantidade de bactérias livres fermentando fibra (VAN SOEST, 1994).

2.3 Metodologias para estimar aderência bacteriana a partículas de forragem

A observação de resíduos de digesta através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) deu suporte ao conceito de que a aderência e a colonização de partículas de grãos são o primeiro passo para a digestão do amido (MCALLISTER et al., 1990).

A MEV possibilita a visualização da extensão da degradação da parede celular por diferentes tipos de microrganismos aderidos à partícula em resíduos de incubação. Lamed (1987) demonstrou através da MEV a ocorrência de protuberâncias na superfície celular de várias espécies de bactérias celulolíticas gram-positivas e gram-negativas. Guimarães-Beelen et al. (2006) utilizaram a MEV para observar resíduos de forragens incubadas em ensaios de digestibilidade com o objetivo de caracterizar o efeito da presença de taninos na colonização bacteriana. Essa técnica apesar de oferecer uma comprovação visual do processo de aderência, no entanto não é possível quantificar o total de bactérias que estão associadas às partículas de alimento. Outra questão limitante relacionada ao emprego desse tipo de análise está relacionada à demanda por equipamentos especializados, uso de reagentes e fixadores de preço elevado e tempo para o preparo das amostras.

Na literatura são descritos vários métodos que podem ser utilizados para estimar a aderência bacteriana ao substrato, os quais se baseiam no uso de marcadores. O marcador ideal deve apresentar características como: ser fácil de determinar e quantificar; não deve fazer parte dos alimentos que serão fornecidos aos animais experimentais ou incubados *in vitro/in situ*; se distribuir de forma uniforme em todas as espécies de microrganismos

ruminais e ser biologicamente estável (BRODERICK e MERCHEN, 1992). Os marcadores utilizados para estimar aderência bacteriana podem ser classificados em dois grandes grupos: marcadores internos e marcadores externos.

Atualmente não existe um marcador específico que consiga atender todos esses requisitos citados anteriormente (BRODERICK e MERCHEN, 1992). Assim, a opção pelo uso de um determinado marcador deve levar em consideração as vantagens e limitações que este apresenta em relação a outros marcadores.

2.3.1 Marcadores externos

Os métodos que estimam a aderência bacteriana utilizando marcadores externos se baseiam no princípio de que estes devem ser administrados aos animais experimentais ou meio de incubação para que possam ser incorporados pelos microrganismos ruminais e formarem parte de sua estrutura (CARRO e MILLER, 2002).

Os principais marcadores externos empregados são o N^{15} , S^{35} e o P^{32} . Esses isótopos são administrados aos animais ou adicionados no meio de incubação de ensaios *in vitro*. A escolha pelo uso do N^{15} vem se intensificando devido às vantagens que ele apresenta em relação aos outros isótopos. Entre elas podemos citar que o N^{15} não é um isótopo radioativo, não apresentando assim riscos de contaminação ao meio ambiente; os alimentos ofertados aos animais e testados em digestibilidade *in vitro* não apresentam enriquecimentos por N^{15} superiores a sua abundância natural (a quantidade que esse isótopo está presente na natureza, é de 0,366%); e por último, todos os microrganismos ruminais conseguem incorporar o N^{15} a sua estrutura (CARRO, 2001).

O N^{15} é fornecido ou adicionado na forma de sais amoniacais como, $N^{15}H_4Cl$ e $(N^{15}H_4)_2SO_4$, os quais são facilmente solúveis em água. A determinação do enriquecimento por N^{15} é realizada por espectrofotômetro de massa e caracteriza-se por uma análise precisa e exata, podendo detectar enriquecimentos de até 0,001% acima do enriquecimento natural. Kamoun et al. (2007) avaliaram a incorporação do N^{15} na proteína microbiana de bactérias associadas a fase sólida, examinando como esta fração pode afetar a estimativa do total da contaminação microbiana nos resíduos de incubação.

No entanto, o elevado preço deste isótopo, que varia em função da fonte e da porcentagem de enriquecimento com o átomo (pureza), limita a sua utilização em

experimento *in vivo*, tornando mais viável a sua aplicação em estudos *in vitro*. Outro fator que deve ser levado em consideração é o custo para a realização das análises, que requerem equipamentos complexos e caros, ficando fora de alcance de muitos laboratórios (CARRO e MILLER, 2002).

2.3.2 Marcadores internos:

A principal característica dos marcadores internos é que eles são constituintes das células microbianas e, por isso, não há necessidade de serem administrados ao animal em experimentos *in vivo* ou no meio de incubação quando utilizados em experimentos *in vitro* e *in situ* (CARRO, 2001).

Os ácidos nucleicos (ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA)) e purinas são muito utilizados como marcadores de aderência bacteriana devido às altas concentrações de DNA e especialmente do RNA presentes nos organismos unicelulares (BRODERICK e MERCHEN, 1992). Os ácidos nucleicos são formados por nucleotídeos, os quais são constituídos por uma base nitrogenada, uma pentose e um fosfato. As bases nitrogenadas são derivadas de dois compostos parentais: pirimidinas e purinas. Tanto DNA quanto o RNA possuem duas bases púricas: adenina e guanina (NELSON e COX, 2002).

As dietas consumidas pelos ruminantes apresentam grandes quantidades de ácidos nucleicos que, ao chegar ao rúmen, são rapidamente degradados e utilizados pelos microrganismos ruminais. O emprego dos ácidos nucleicos como marcadores se baseia na ideia de que os ácidos nucleicos presentes na digesta são muito semelhantes aos encontrados em amostras de bactérias ruminais mistas, indicando que os ácidos nucleicos presentes na digesta são predominantemente de origem bacteriana (SMITH e MCALLAN, 1970; MCALLAN, 1982). As purinas são comumente utilizadas como marcadores de fluxo de proteína microbiana para o duodeno, no entanto são poucos os trabalhos que utilizam purinas como marcadores de aderência bacteriana a partículas de alimento.

O método de determinação estabelecido por Zinn e Owens (1986) utiliza o princípio da hidrólise oxidativa dos ácidos nucleicos e na precipitação das bases púricas com nitrato de prata (AgNO_3) a um pH entre 2-3. A quantificação é feita por colorimetria, oferecendo dessa forma um método conveniente para determinar purinas por ser robusto, simples, barato (MAKKAR e BECKER, 1999).

No entanto, o uso de purinas como marcador apresenta alguns inconvenientes como, a possibilidade de parte das purinas presentes no resíduo de incubação ser de origem dietética associada à porção indigestível do alimento no rúmen, ou seja, poderia superestimar a quantidade de purinas bacterianas, uma vez que, o método apenas faz a quantificação total e não identifica a origem das purinas. Outra limitação deste marcador está relacionado com as variações nas concentrações de purinas entre as espécies de bactérias ruminais. Obispo e Dehority (1999) observaram uma variação considerável na concentração de purinas de 10 culturas puras de bactérias ruminais, que variaram de 0,69 a 5,57% da matéria seca, com um valor médio de 2,98%. Já em amostras de culturas mistas Clark et al. (1992) encontraram variações ainda maiores com valores variando entre 2,4 e 13,02% , com média de 7,27%.

Ácido diaminopimélico (DAPA) representa outro marcador interno bastante utilizado no estudo da aderência bacteriana. O DAPA é um aminoácido que está presente na parede celular de várias bactérias ruminais, sendo utilizado como indicador específico de proteína microbiana em amostras de digesta ruminal (WEBSTER et al., 1990). Merry e McAllan (1983) estimaram através do DAPA que 50% das bactérias estavam associadas a partículas indigestíveis após 16 horas no rúmen de novilhos consumindo dietas a base de cevada e feno.

O método tradicional utilizado para a quantificação do DAPA na digesta ruminal é realizado através de uma hidrólise inicial da amostra, seguida por uma separação dos aminoácidos por cromatografia de troca iônica e, na sequência, uma reação com ninhidrina. O método proposto por Czerkwaski (1974) oferece uma metodologia mais acessível para análise do DAPA e menos onerosa, no entanto, é bastante trabalhosa, envolve muitas etapas para o preparo das amostras e está suscetível a contaminação com aminoácido prolina.

Novas metodologias para a determinação do DAPA foram desenvolvidas, como a proposta por Webster et al. (1990) utilizando a cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Esta análise apresenta boa sensibilidade, boa reprodutibilidade para a determinação do DAPA em amostras de bactérias e digesta ruminal e tempo de preparo das amostras muito menor quando comparado com o método convencional de cromatografia por troca iônica. Contudo, para a execução desta técnica torna-se necessário a disponibilidade de equipamentos especializados o que tornam o custo para realização da análise elevado.

A população de bactérias colonizadas que degradam fibra pode ser estimada indiretamente através da medida da atividade de enzimas fibrolíticas dos microrganismos associados à partícula de alimento. As bactérias aderidas viabilizam o contato das enzimas que estão ligadas a sua membrana externa com o substrato, garantindo uma digestão eficiente.

A quantificação da atividade fibrolítica da carboximetilcelulase e xilanases são bons indicadores da digestão da fibra em dietas a base de gramíneas e silagens (HUHTANEN e KHALILI, 1992) e fornecem uma estimativa relativa da colonização de forragens por bactérias celulolíticas (BOWMAN e FIRKINS, 1993). Silva et al. (1987) ao medir a atividade da carboximetilcelulase de amostras incubadas no rúmen de ovinos por 24 ou 48 horas em sacos de nylon verificaram uma alta correlação com a digestibilidade, concluindo que estimativa da atividade enzimática dos microrganismos aderidos a partícula de alimento pode ser utilizada para prever a taxa e extensão da degradação da fibra no rúmen.

Mouriño et al. (2001) propuseram o uso do fósforo como marcador de aderência bacteriana. A colonização das bactérias foi estimada em culturas de celulose pura para garantir que todo fósforo presente no resíduo fosse considerado de origem bacteriana. Farenzena et al. (2014) também utilizou o fósforo como marcador microbiano em ensaios de digestibilidade *in vitro* para avaliar a influência do pH e concentrações solúveis no meio de incubação sobre o grau de aderência bacteriana a partículas de forragens.

O fósforo faz parte das células vivas, estando presente nos sistemas moleculares que envolvem o código genético (DNA e RNA) e o armazenamento e transporte de energia (ATP). Nas bactérias ruminais o fósforo desempenha papel tanto estrutural (ácido teicóico e fosfolípidios) quanto funcional (nucleosídeos, ATP, coenzimas). Dessa forma o fósforo é parte integrante de todos os tecidos metabólicos. Segundo Van Soest (1994), os microrganismos ruminais contêm altas proporções de DNA e RNA relacionados com a maior parte das células e assim possuem alta exigência por fósforo. Assim como o nitrogênio da ureia, o fosfato é reciclado via saliva e incorporado pelos microorganismos.

A estimativa da adesão bacteriana ao substrato baseia-se no pressuposto de que após a degradação ruminal o fósforo presente no resíduo é predominantemente de origem bacteriana. No entanto, deve ser considerada a possibilidade do resíduo conter fósforo que não seja de origem microbiana, como o fósforo associado a estruturas indigestíveis do alimento, como a lignina. A determinação do fósforo no resíduo de degradação ruminal pode ser realizada por colorimetria como o método proposto por Fiske e Subbarov (1925). Este método compreende uma primeira etapa na qual a amostra é queimada em mufla para obtenção da matéria mineral a qual passa por uma segunda etapa de digestão ácida, terminando com a análise colorimétrica do resíduo dessa digestão. A técnica apresenta algumas vantagens como, a facilidade na execução dos procedimentos, utilização de equipamentos convencionais e boa repetibilidade quando comparado com o uso de outros marcadores.

3 HIPÓTESES

Existe relação direta entre a concentração do marcador de aderência bacteriana no resíduo de incubação com a degradação da forragem;

Assim como N^{15} e purinas, o fósforo e atividade enzimática podem ser utilizados como marcadores internos de aderência bacteriana em amostras de forragem.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o uso de potenciais marcadores de aderência bacteriana a partículas de forragens incubadas *in vitro*.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o grau de solubilização do fósforo de amostras de forragem ao longo de 24 horas;
- Isolar bactérias ruminais e analisar a composição química das bactérias associadas à fase líquida (BAL) e bactérias aderidas a partículas de forragem (BAP);
- Avaliar se a metilcelulose, utilizada no processo de extração das BAP, interfere na composição química das bactérias extraídas;
- Comparar o fósforo e atividade enzimática com outros potenciais marcadores do grau de aderência bacteriana ruminal a partículas de forragem.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local e época

Os ensaios de digestibilidade *in vitro* foram conduzidos durante o período de dezembro de 2012 a junho de 2013, no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes (LABRUMEN) pertencente ao Departamento de Zootecnia da universidade Federal de Santa Maria.

5.2 Avaliação de marcadores para estimar aderência bacteriana ruminal

Os marcadores avaliados foram: N¹⁵, bases púricas, fósforo e variáveis extraídas por sonicação (proteína, atividade enzimática e açúcares solúveis). Também foi realizada a análise dos resíduos de incubação por microscopia eletrônica de varredura. As forragens utilizadas foram: azevém (*Lolium multiflorum* lam), *Cynodon* spp., alfafa (*Medicago sativa*) e amendoim forrageiro (*Arachi spintoi*). Foram utilizadas três amostras de azevém, quatro de *Cynodon*, quatro de alfafa e duas de amendoim forrageiro, uma de silagem de sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench). A maior parte das amostras foram obtidas/coletadas de diferentes áreas experimentais e ou laboratórios da UFSM. Uma amostra de *Cynodon* e a amostra de silagem foram provenientes de uma propriedade rural. A composição química das espécies forrageiras está apresentada na Tabela 2.

As amostras foram previamente secas em estufa com circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas, moídas em peneira com porosidade de 2mm e, depois, armazenadas para a condução dos ensaios. Para cada amostra de forragem foram realizados dois ensaios de incubação *in vitro*. Aproximadamente 5 g de amostra parcialmente seca (APS) das amostras de forragem foram pesadas e colocadas em saquinhos de poliéster com dimensões de 10 x 10 cm e porosidade de 50 µm. As amostras foram incubadas anaerobicamente em frascos de vidro equipados com válvula do tipo Bunsen, em uma incubadora *in vitro* (TE-150, Tecnal) com sistema de agitação e temperatura controlada de 39°C. O meio de incubação foi

composto de 1600 mL de solução tamponante (ANEXO A) e 400 mL de fluido ruminal, mantendo uma relação tampão/fluido ruminal de 8:2. Foi utilizada uma relação de 1g de amostra/100 mL de meio de incubação, de forma que cada frasco continha 20g de APS. O fluido ruminal foi coletado de um bovino fistulado no rúmen, pertencente ao LABRUMEN, cuja dieta foi a base de forragem (azevém e feno de tifton). Para identificação das bactérias aderidas a partícula de forragem utilizando o isótopo N¹⁵, no momento da incubação foram adicionados 10mg/L de sulfato de amônio (NH₃SO₄ com 99% dos átomos enriquecido com N¹⁵).

Tabela 2- Composição química¹ das forragens

Amostras	MS	MO	MM	FDN	FDA	N	P
		(% na MS)					
AZ 1	85,75	86,52	13,48	48,50	24,79	3,77	3,25
AZ 2	93,02	88,3	11,7	43,25	20,48	3,19	2,91
AZ 3	91,12	85,93	14,07	38,82	20,08	3,93	3,11
CY 1	93,20	91,68	8,32	70,63	28,95	2,29	1,64
CY 2	92,70	89,73	10,27	59,58	24,96	3,07	1,68
CY 3	93,35	91,87	8,13	65,93	28,22	2,47	1,64
CY 4	93,58	92,6	7,40	67,33	31,24	1,75	1,52
ALF 1	91,74	87,65	12,35	48,25	26,88	3,57	2,06
ALF 2	94,25	89,19	10,81	40,06	21,96	3,69	1,76
ALF 3	92,87	89,38	10,62	53,72	31,71	2,92	1,58
ALF 4	92,53	88,45	11,55	33,81	17,92	3,49	1,21
AM 1	91,33	89,49	10,51	30,34	17,91	4,04	2,23
AM 2	92,59	89,95	10,05	32,12	20,08	4,26	2,36
SS	95,25	94,48	5,52	35,65	19,25	1,5	1,36

¹MS= matéria seca; MO=matéria orgânica; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; N= nitrogênio total; P= fósforo; AZ=azevém; CY= Cynodon; ALF= alfafa; AM= Amendoim forrageiro; SS= silagem de sorgo.

Após 24 horas, a fermentação foi interrompida, os saquinhos contendo o resíduo das forragens incubadas foram lavados em água corrente e tratados com solução fisiológica, lavados novamente com água destilada. De cada frasco, dois saquinhos foram utilizados para realização da extração enzimática e os outros dois secos em estufa com circulação forçada de ar a 55°C para determinação da digestibilidade da matéria seca e análise dos demais

marcadores de aderência bacteriana. A digestibilidade da fração insolúvel da matéria seca também foi determinada. Para essa determinação foram pesados 1g das amostras de forragens separadamente em saquinhos de poliéster com dimensões de 10 x 10 cm e porosidade de 50 µm. Os saquinhos contendo as amostras foram mantidos por 3 horas em água destilada, a 39°C em sistema de agitação lento. Após esse período os saquinhos foram removidos e secos em estufa a 105°C.

5.3 Isolamento de bactérias ruminais

Nos dias em que foram realizados os ensaios *in vitro*, também foram coletadas amostras de conteúdo ruminal do mesmo animal, com o objetivo de analisar a composição química das bactérias associadas à fase líquida (BAL) e bactérias aderidas à partícula de alimento (BAP), somando um total de 12 coletas com intervalos de 15 dias entre as elas.

Para obtenção das amostras de BAL e BAP utilizou-se um protocolo adaptado de Ranilla e Carro (2003), no qual, no primeiro dia de processamento das amostras foram isoladas as BAL e no segundo dia de processamento foram isoladas as BAP (figura 1).

Em cada coleta foram removidos aproximadamente 3 kg de conteúdo ruminal, o qual foi filtrado através de duas camadas de gaze para separar a fase líquida da fase sólida, obtendo-se o filtrado 1 e resíduo sólido 1. Após a filtragem o resíduo sólido 1 foi tratado com solução salina 0,9% (1kg de resíduo: 2L de solução salina) durante 15 minutos, a 39°C, para remover as bactérias que não estavam fortemente aderidas à partícula de alimento. Após esse período a amostra foi novamente filtrada para se obter o resíduo sólido 2 e um filtrado 2, o qual foi adicionado ao filtrado 1. As BAL foram obtidas por meio de etapas de centrifugação com diferentes velocidades. A primeira centrifugação foi realizada uma velocidade de 1500 x g por 10 min para remover partículas de alimento e fungos ou protozoários os quais poderiam estar presentes na amostra. Foi coletado o sobrenadante e armazenado em tubos com tampas os quais passaram por uma segunda centrifugação a 20000 x g por 10 minutos, na qual descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 10 mL de solução salina. Depois os tubos foram agitados, passando então por uma terceira e última centrifugação a 20000 xg por 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante e coletado pellet de BAL.

O resíduo sólido 2 foi submetido a um segundo tratamento com uma solução salina 0,9 % contendo 0,1% de metilcelulose (1kg de sólido: 3L de solução salina + 0,1% de

metilcelulose) com o objetivo de remover as bactérias aderidas à partícula de forragem. Essa amostra permaneceu em repouso por 24 horas a 4°C. Após esse período de tratamento com metilcelulose a solução contendo as partículas de alimento e bactérias aderidas foram filtradas, a parte sólida retida foi descartada e o filtrado passou pelos mesmos procedimentos de centrifugação das amostras de BAL, para a obtenção das BAP.

As amostras de BAL e BAP foram congeladas e posteriormente liofilizadas e moídas. Foram realizadas as análises químicas de matéria seca, matéria orgânica, matéria mineral, nitrogênio, purinas, DAPA e fósforo.

5.4 Efeito do uso da metilcelulose na composição química das bactérias ruminais

A solução salina 0,9% contendo 0,1% de metilcelulose foi utilizada como tratamento químico com o objetivo de remover as bactérias aderidas à partícula de alimento. Para se analisar possíveis efeitos do uso da metilcelulose na composição química das bactérias foram realizadas três coletas de conteúdo ruminal nas quais foram analisadas apenas as bactérias associadas a fase líquida (BAL).

Após o conteúdo ruminal (aproximadamente 3 kg) ser filtrado, descartou-se a porção sólida e separadas duas amostras do filtrado. Uma amostra do filtrado seguiu os mesmos procedimentos realizados nos ensaios anteriores para a obtenção dos pellets de BAL, sendo o tratamento controle (T₁).

A segunda amostra do filtrado foi submetida a tratamento com solução salina 0,9% contendo 0,1% de metilcelulose por 24 horas, mantida em repouso a 4°C. Após esse período realizou-se os mesmos procedimentos de centrifugações realizados nos ensaios anteriores para a obtenção do pellet de BAL tratado com metilcelulose (T₂).

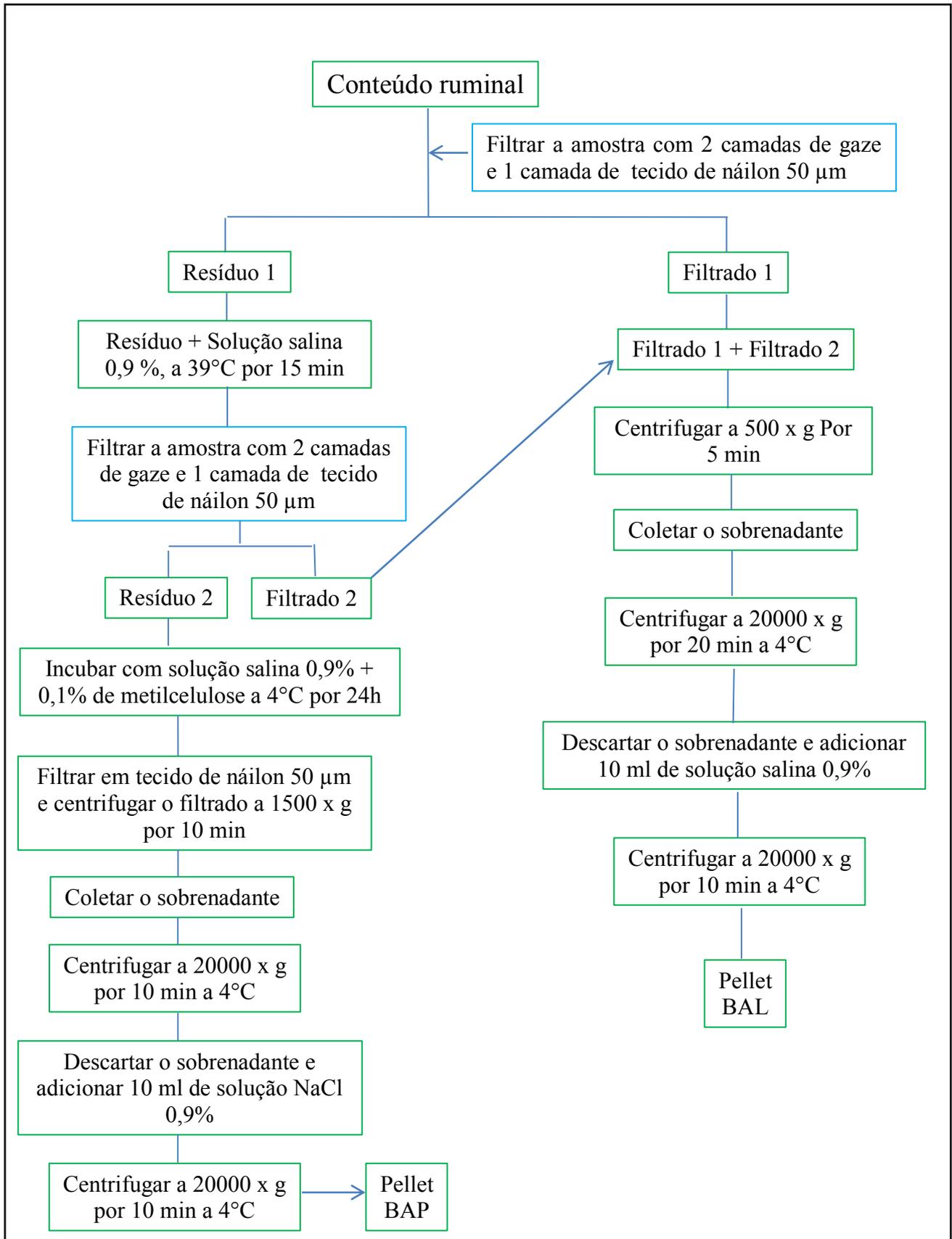


Figura 1 - Procedimentos adotados para separar as bactérias associadas a fase líquida (BAL) e bactérias aderidas a partículas (BAP).

5.5 Teste de solubilização do fósforo

Foram realizados testes para verificar a solubilização do fósforo das amostras de forragem utilizadas nos ensaios *in vitro* e duas amostras de grãos (farelo de milho e farelo de soja) ao longo de 24 horas. Foram testados três tempos de solubilização: 0h, 3h e 24h. Para cada amostra de forragem foram pesados aproximadamente 0,5g de APS em saquinhos de náilon (3x4 cm, 25 µm), em triplicatas para cada tempo de solubilização.

Cada saquinho foi colocado em frascos de vidro onde foram adicionados 50 mL de água mais 5 mL de álcool etílico 95%. Os frascos foram mantidos em banho-maria a 39°C e sistema de agitação constante. Após o período de solubilização as amostras foram lavadas em com água corrente e em seguida, as amostras foram colocadas em beakers de vidro e queimadas em mufla a 600°C por 4h. Posteriormente, foi realizada a análise para determinação do teor de fósforo no resíduo.

5.6 Análises químicas

Os teores de matéria seca (MS) das amostras de forragem foram obtidos por secagem em estufa a 105°C durante pelo menos 12 horas, e a matéria mineral (MM) pela queima em mufla a 600°C durante quatro horas. O nitrogênio (N) total foi determinado pelo método Kjeldhal (Método 984.13, AOAC, 1995) modificado conforme descrito por Kozloski et al. (2003). A análise da concentração de fibra em detergente neutro (FDN) foi realizada conforme Mertens (2002), exceto que as amostras foram pesadas em sacos de poliéster (KOMARECK, 1993) e tratadas com detergente neutro em autoclave a 110°C durante 40 minutos (SENGER et al., 2008). Os teores de fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados de acordo com AOAC (método 973.18, AOAC, 1995), mas sem uso de amianto.

5.7 Análises químicas dos marcadores de aderência bacteriana ruminal

5.7.1 Determinação de purinas

O teor de purinas nas amostras de resíduo de incubação foi quantificado de acordo com Makkar e Becker (1999). A técnica foi realizada como descrito a seguir:

Para a confecção do padrão foram utilizados 25 mg de adenina e 25 mg de guanina, as quais passaram pelos mesmos procedimentos que as amostras.

Foram pesados 200 mg de amostras de resíduo parcialmente seco, em duplicata para cada forragem e colocadas em tubos de 25 mL, vedados com tampa de vidro. A seguir foram adicionados 2,5 mL de HClO_4 e as amostras foram submetidas a banho-maria 90 – 95°C, por 1 hora sendo agitadas periodicamente.

Após essa primeira etapa foi adicionado 7,5 mL de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 28,5mM. As amostras foram novamente submetidas a banho-maria 90 – 95°C, por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4000 x g por 20 minutos.

Coletou-se uma alíquota de 0,250 mL do sobrenadante, pipetada em tubos de 25 mL. Depois foi adicionado 4,5 mL de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,2 M e as amostras foram agitadas e adicionado 0,25 mL de AgNO_3 0,4M. As amostras foram mantidas a 4°C em repouso por 12 horas.

Após esse período as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 20 minutos, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se 4,5 mL de água destilada com pH ajustado para 2,00. A seguir as amostras foram novamente centrifugadas a 12000 x g por 20 minutos.

Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em 5mL de HCl 0,5 M. As amostras foram agitadas vigorosamente e submetidas a banho-maria 90 – 95°C por 30 minutos. A seguir as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi analisado por colorimetria a 260 nm contra um branco de HCl 0,5 M. A aderência bacteriana foi expressa como mg de purinas/ g de MS residual.

5.7.2 Determinação de N¹⁵

As análises para determinação do isótopo N¹⁵ nos resíduos de incubação foram realizadas pelo Laboratório de Biotransformações de Carbono e Nitrogênio (LABCEN), pertencente ao Departamento de Solos da UFSM.

As amostras de resíduo foram previamente moídas com peneira de 5 mm e pesadas em balança de precisão, aproximadamente 5mg de amostra em cápsulas de estanho. Depois de fechadas as cápsulas foram introduzidas no espectrômetro de massa para razão isotópica (IRMS). O resultados e cálculos na determinação de excesso de N¹⁵ estão apresentados no APENDICE A. Os valores de aderência bacteriana obtidos foram expressos em Excesso N¹⁵ (µg/g MS residual).

5.7.3 Determinação de Fósforo

Para determinação do teor de fósforo (P) nas amostras residuais foi utilizado o método proposto por Fiske e Subbarow (1925). Foram pesados aproximadamente 0,200g de resíduo em duplicata por amostra em becker de vidro com capacidade de 20 mL e queimados em mufla a 600°C, por três horas. Após foram adicionados 10 mL de uma solução digestora ácida contendo 3 partes de ácido clorídrico (HCl) e 1 parte de ácido nítrico (HNO₃) 10 %. Para digestão ácida os beckers foram colocados em uma chapa de aquecimento e submetidos à fervura até evaporar e chegar a um volume residual no becker de aproximadamente 2 mL.

Em seguida o conteúdo foi transferido, lavando-se com água destilada para um balão volumétrico de 25 mL e completando o volume com água destilada. A solução foi filtrada com papel filtro para a posterior determinação colorimétrica do fósforo. Para esta análise foram pipetados 1000 µL do filtrado, 1000 µL de solução complexante (ANEXO B), 100 µL solução redutora (ANEXO C). Este meio de reação permaneceu em repouso em temperatura ambiente por 20 minutos.

Foi realizada a leitura da absorvância em um comprimento de onda de 660 nm, contra um branco utilizando padrão de concentração de 22,8 mg % (p/v) mais ácido clorídrico 0,1 N no lugar do filtrado. A aderência bacteriana foi expressa como mg de P/g de MS residual.

5.7.4 Atividade Enzimática

Para a extração das enzimas foi pesado aproximadamente 1 g de resíduo úmido de incubação de cada amostra em duplicata em beakers e depois adicionado 20 mL de solução tampão fosfato (ANEXO D), (pH 6,8) e 120 mL de mercaptoetanol. As amostras foram submetidas a 5 ciclos de sonicação sob gelo por 30 segundos e em seguida filtradas.

Após o processamento de extração das enzimas foi realizada a incubação do filtrado enzimático com o substrato carboximetilcelulose 2% (p/v) e xilano 2% (p/v). Em tubos de ensaio foi pipetado 1mL do filtrado mais 2 mL de carboximetilcelulose em triplicata, o material foi incubado em banho-maria a 39°C por um período de 240 minutos em um sistema de agitação lento. O mesmo procedimento foi realizado com o substrato xilano. Ao término da incubação os tubos foram submetidos a banho-maria em água fervente durante 6 minutos. Nesse material foi determinada a concentração de açúcares redutores por colorimetria, pelo método DNS (3,5-dinitro-salicilato), adaptado de Miller et al.(1960). Também foram pipetados 1mL do filtrado mais 2 mL de solução tampão em triplicatas, para se determinar a concentração de açúcares redutores presentes no extrato enzimático, seguindo o mesmo procedimento adotado com os substratos carboximetilcelulose e xilano.

Em um tubo de ensaio foram pipetados 1mL de amostra e 1 mL da solução DNS (ANEXO E), os tubos foram agitados e levados a incubação em banho-maria de aproximadamente 100°C por 10 minutos. O material foi resfriado e adicionados 8mL de água destilada. Em seguida foi realizada a leitura de absorvância em espectrofotômetro num comprimento de onda de 575 nanômetros contra branco (1mL de água + 1 mL de solução de DNS + 8 mL de água), o padrão a ser utilizado foi solução de glicose (1g/L)

A atividade enzimática foi expressa em nmol de açúcares redutores/g MS incubada/minuto de incubação.

5.7.5 Proteína total

A quantidade total de proteína presente no filtrado enzimático utilizado para medir a atividade enzimática, foi medida através do método colorimétrico proposto por Bradford (1976). Foram pipetados em tubos de ensaio 50 µL de amostra, adicionados 2,5 mL da

solução comassie brilhante blue (ANEXO F), agitados e feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Para a curva padrão foi utilizado como padrão albumina (1mg/mL). A aderência bacteriana foi expressa como μg proteína/mL de enzima

5.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

As análises dos resíduos de incubação por microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Laboratório de Imunologia pertencente a Embrapa Clima Temperado, em Pelotas.

Foi realizado um ensaio *in vitro* no qual foi incubada uma amostra de cada espécie de forrageira (azevém, feno de tifton, feno de alfafa, amendoim forrageiro e silagem de sorgo) seguindo o mesmo protocolo utilizado nos ensaios anteriores. Após 24 horas a incubação foi interrompida, os sacos contendo os resíduos foram retirados, lavados com água corrente e solução salina por 15 minutos e novamente lavados com água destilada. Foi coletada uma alíquota de cada resíduo ainda úmido sendo imediatamente colocada no fixador de Karnovsky e mantida refrigerada a 4°C por 16h. O volume de fixador utilizado foi de 20 vezes o volume de amostra. Depois o material foi retirado da solução fixadora e colocado em solução tampão de cacodilato de sódio 0,2M pH 7,2. Este procedimento foi repetido três vezes, com duração de 15 minutos cada banho (1mL/amostra).

A próxima etapa foi a realização da segunda fixação, na qual foi colocado 1 mL da solução tetróxido de ósmio 1%. Esta solução foi obtida a partir de uma diluição de tetróxido de ósmio 2% em solução de cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. As amostras permaneceram com a solução fixadora por 2 horas aproximadamente e depois foram lavadas duas vezes com H₂O tetradestilada por 10 minutos cada banho.

Em seguida, foram realizadas sucessivas desidratações com álcool nas concentrações de 30, 50, 70, 90, 95%. Para cada concentração foram realizados dois banhos com duração de 5 minutos. Para completar o processo de desidratação foi utilizado etanol 100%, com três trocas, por 10 min cada banho. Posteriormente as amostras foram colocadas no aparelho de PONTO CRÍTICO, com o uso de etanol 100% no aparelho. Neste ponto ocorreu a troca do etanol 100% por CO₂ líquido, depois o aparelho foi aquecido e o CO₂ transformado em gás. Após a secagem da amostra esta foi montada em *stub* com etiqueta adesiva previamente

colocada e o *stub* identificado. A seguir foi colocada a prata líquida ao redor do espécime, para a melhor condução dos elétrons no microscópio eletrônico. Após a secagem da prata, a amostra foi metalizada com pó de ouro e observada no microscópio eletrônico de varredura, modelo DSM 940 A ZEISS.

5.9 Análise da composição química de bactérias aderidas a partícula (BAP) e bactérias associadas a fase líquida (BAL).

Os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), nitrogênio (N) total, purinas e fósforo nas amostras de BAP e BAL, foram analisados utilizando as mesmas metodologias apresentadas anteriormente.

A determinação do teor de DAPA foi realizada de acordo com Czerkawski (1974). A primeira etapa consiste na hidrólise das amostras, no qual foram pesados aproximadamente 0,2 g de amostra em tubos de vidro com tampa, adicionados 5 ml de HCl 6 N e colocados em estufa à 105° C por 24 horas. Após esse período as amostras foram filtradas através de papel filtro tipo Whatman 42 ou similar. O resíduo foi lavado várias vezes com água destilada em ponto de ebulição, até completar em torno de 50 mL de filtrado. Depois as amostras foram secas em estufa a aproximadamente 55°C.

Na segunda etapa o resíduo do hidrolisado seco foi redissolvido com 5 ml de tampão citrato-HCl 0,2 M (pH 2,0) (ANEXO 7), homogeneizado e centrifugado a 12000 x g por 20 min. Foi utilizada uma coluna cromatográfica na qual ocorreu a separação dos aminoácidos presentes no resíduo, sob a infusão contínua de solução tampão citrato-HCl (pH 3,0) (ANEXO G) através do uso de uma bomba infusora, com um fluxo regulado para 50 ml/hora. Foi injetado na coluna cromatográfica 3mL do sobrenadante e após serem infundidos 30 mL do tampão citrato-HCl 0,2 M foram realizadas coletas em intervalos de 5 mL somando um total de 80 mL.

A determinação do DAPA no eluído foi realizada por colorimetria. Em um tubo de ensaio foram adicionados 1mL de amostra (eluído) mais 1 mL de ácido acético glacial e 1mL de solução ninhidrina (ANEXO H). Depois os tubos foram colocados por 5 minutos em água fervendo, com os tubos tampados (papel laminado) e realizada a leitura colorimétrica em comprimento de onda 420 nm. Os valores obtidos foram expressos como mg de DAPA /g MS residual.

5. 10 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando modelos que incluíram o tipo de amostra ou de bactéria como bloco (blocos ao acaso). A composição química dos dois grupos de bactérias ou do tratamento com metilcelulose foi comparada pelo teste F. Os marcadores foram comparados entre si, e com a degradabilidade das amostras de forragem, através de análise de correlação. Todas as análises foram realizadas através do programa estatístico SAS (2009).

6 RESULTADOS

6.1 Solubilização do fósforo

Os resultados obtidos com o teste de solubilização do fósforo apresentados na Figura 2, indicam que nas primeiras 3 horas de incubação as concentrações de fósforo nas amostras diminuíram de forma acentuada e após esse período tenderam a permanecer constantes.

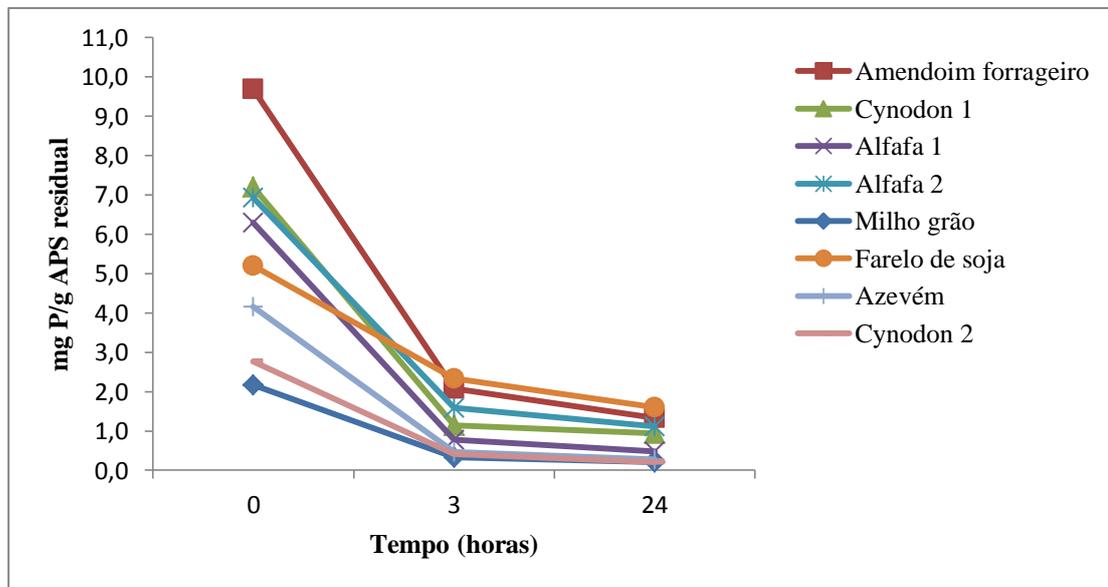


Figura 2 - Solubilização do fósforo em amostras de forragens e concentrados ao longo de 24 horas.

6.2 Composição química das bactérias associadas à fase líquida e bactérias aderidas a partícula

As bactérias associadas à fase líquida (BAL) e as aderidas à partícula (BAP), apresentaram diferenças ($P < 0,05$) com relação aos teores de nitrogênio, purinas, DAPA e fósforo, sendo os valores de todos compostos inferiores nas BAP (Tabela 3).

Tabela 3 - Composição química de bactérias associadas à fase líquida e bactérias aderidas a partículas de forragem

Item	MO % na MS	N % na MS	N % na MO	Pur % na MS	Pur % na MO	P % na MS	P % na MO	DAPA % na MS	DAPA % na MO
BAL	69.0	7.2	10.4	1.7	2.5	1.5	2.2	0.3	0.4
BAP	68.7	6.0	8.8	1.3	1.8	0,9	1.3	0.2	0.2
DP ¹	7.50	0.84	0.60	0.18	0.16	0.10	0.23	0.04	0.05
P ²	0.937	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.001

MO=matéria orgânica; MS=matéria seca; N=nitrogênio; Pur=purinas; P=fósforo; DAPA=ácido diaminopimélico; BAL= bactérias associadas à fase líquida; BAP= bactérias aderidas a partículas de forragem.

¹Desvio padrão onde n=24, exceto DAPA onde n=12.

²Probabilidade do erro Tipo I

Os dados obtidos com os ensaios avaliando o efeito da metilcelulose na composição química das bactérias associadas à fase líquida estão apresentados na Tabela 4. Os teores de nitrogênio e purinas quando expressos na proporção de matéria orgânica não foram afetados pelo tratamento com metilcelulose ($P > 0,05$). No entanto, observou-se diferença em relação ao teor de P ($P < 0,05$) sendo o valor médio do teor de P para o tratamento controle de 24,06 mg/g MO de resíduo e para o tratamento metilcelulose de 18,90 mg/g MO de resíduo.

Tabela 4 - Efeito da metilcelulose na composição química de bactérias associadas à fase líquida

Item	% MO na MS	% N na MS	N % na MO	Pur % na MS	Pur % na MO	P % na MS	P % na MO
CON	63.5	7.1	11.1	1.8	2.8	1.5	2.4
Metil	48.5	5.3	11.0	1.3	2.7	0.9	1.9
DP ¹	3.69	0.39	0.36	0.16	0.11	0.13	0.19
P ²	0.008	0.006	0.757	0.022	0.275	0.005	0.030

MO=matéria orgânica; MS=matéria seca; N=nitrogênio; Pur=purinas; P=fósforo; CON=controle, Metil=metilcelulose.

¹Desvio padrão onde n=6

²Probabilidade do erro Tipo I

6.3 Marcadores de aderência bacteriana ruminal

6.3.1 Correlação entre os marcadores de aderência bacteriana ruminal

Na Tabela 5 são apresentadas as correlações entre os marcadores de aderência bacteriana às partículas de forragens. Foi observada correlação significativa entre N^{15} e purinas ($P=0,015$), N^{15} e açúcares redutores com substrato carboximetilcelulose ($P=0,001$), N^{15} e açúcares redutores com substrato xilano ($P<0,0001$) e entre N^{15} e proteína total ($P=0,031$). Foi observada tendência na correlação entre purina e açúcares redutores no extrato enzimático ($P=0,097$).

Tabela 5 – Correlação entre os marcadores¹ de aderência bacteriana a partículas de forragem

	Digest. MS	Digest. FDN	Digest. FI	N ¹⁵	Pur	P	AR-CMC	AR-Xil	AR- CON	Prot
Digest. MS²	-	0,83 (<0,0001)	0,99 (<0,0001)	-0,29 (0,132)	-0,03 (0,865)	-0,05 (0,793)	-0,37 (0,055)	-0,21 (0,274)	0,09 (0,632)	-0,26 (0,183)
Digest. FDN	0,83 (<0,0001)	-	0,85 (<0,0001)	0,07 (0,732)	0,02 (0,912)	0,11 (0,561)	-0,04 (0,851)	0,11 (0,592)	0,12 (0,554)	0,01 (0,951)
Digest. FI	0,99 (<0,0001)	0,85 (<0,0001)	-	-0,26 (0,182)	-0,01 (0,962)	-0,09 (0,642)	-0,34 (0,075)	-0,19 (0,339)	0,07 (0,713)	-0,27 (0,160)
N¹⁵	-0,291 (0,132)	0,067 (0,732)	-0,26 (0,182)	-	0,46 (0,015)	-0,03 (0,896)	0,58 (0,001)	0,71 (<0,0001)	0,15 (0,442)	0,41 (0,031)
Pur	-0,03 (0,865)	0,02 (0,912)	-0,01 (0,962)	0,46 (0,015)	-	-0,19 (0,326)	0,07 (0,718)	0,26 (0,187)	0,32 (0,097)	0,07 (0,708)
P	-0,05 (0,793)	0,11 (0,561)	-0,09 (0,642)	-0,03 (0,896)	-0,19 (0,326)	-	0,09 (0,658)	-0,01 (0,950)	0,001 (0,996)	0,17 (0,388)
AR- CMC	-0,37 (0,055)	-0,04 (0,851)	-0,34 (0,075)	0,58 (0,001)	0,07 (0,718)	0,09 (0,658)	-	0,79 (<0,0001)	0,12 (0,524)	0,53 (0,004)
AR-Xil	-0,21 (0,274)	0,11 (0,592)	-0,19 (0,339)	0,71 (<0,0001)	0,26 (0,187)	-0,01 (0,950)	0,79 (<0,0001)	-	0,19 (0,342)	0,46 (0,014)
AR- COM	0,09 (0,632)	0,12 (0,554)	0,07 (0,713)	0,15 (0,442)	0,32 (0,097)	0,001 (0,996)	0,12 (0,524)	0,19 (0,342)	-	0,04 (0,853)
Prot	-0,26 (0,183)	0,01 (0,951)	-0,27 (0,160)	0,41 (0,031)	0,07 (0,708)	0,17 (0,388)	0,53 (0,004)	0,46 (0,014)	0,04 (0,853)	-

¹Marcadores: Pur = purinas, P = fósforo, AR-CMC = açúcares redutores substrato carboximetilcelulose, AR-Xil = Açúcares redutores substrato xilano, AR-Com= Açúcares redutores no extrato enzimático, Prot = Proteína total; Digest. MS=digestibilidade *in vitro* da matéria seca, Digest. FDN=digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro, Digest. FI=digestibilidade *in vitro* da fração insolúvel da matéria seca.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura

Os resultados das observações por microscopia eletrônica de varredura dos resíduos de incubação estão apresentados nas Figuras 3-A, 3-B, 3-C, 3-D e 4-E. As observações das amostras de azevém, feno de tifton e alfafa as quais foram submetidas à sonicação para a extração enzimática estão apresentadas nas Figuras 4-F, 4-G e 4-H.

Na Figura 5 é possível visualizar a presença de grande quantidade de fungos aderidos às partículas de forragem e a formação de hifas.

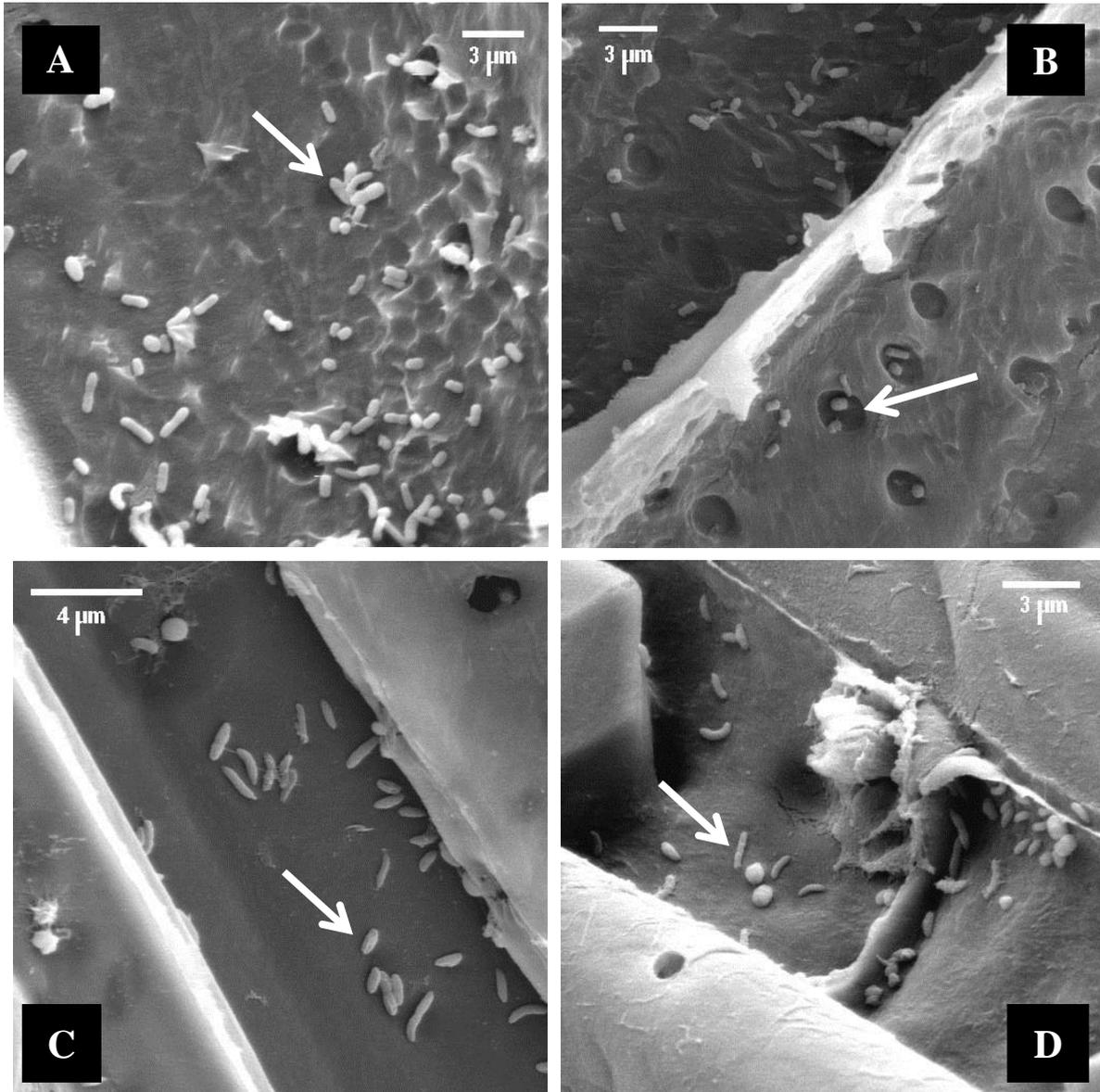


Figura 3 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de resíduo de forragens incubadas *in vitro* por 24 horas. (A) *Lolium multiflorum*, (B) *Cynodon* spp., (C) *Medicago sativa* e (D) *Arachis pintoi*. As setas indicam a presença de bactérias aderidas na superfície da parede interna das células vegetais.

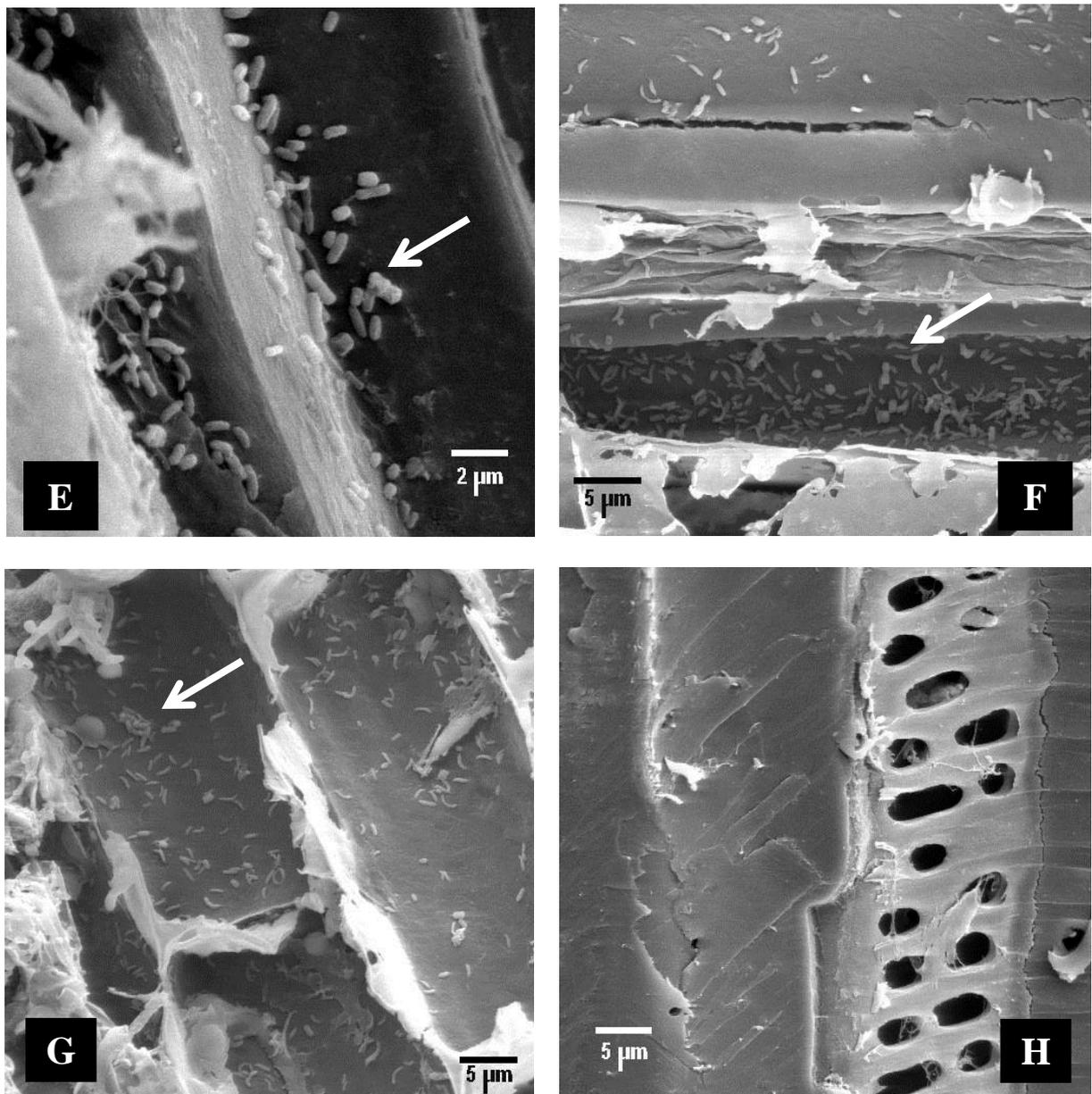


Figura 4 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de resíduo de forragens incubadas *in vitro* por 24 horas. (E) *Sorghum bicolor*, L. Moench. As amostras (F) *Lolium multiflorum*, (G) *Cynodon* spp., e (H) *Medicago sativa* foram submetidas a sonicação. As setas indicam a presença de bactérias aderidas na superfície da parede interna das células vegetais.

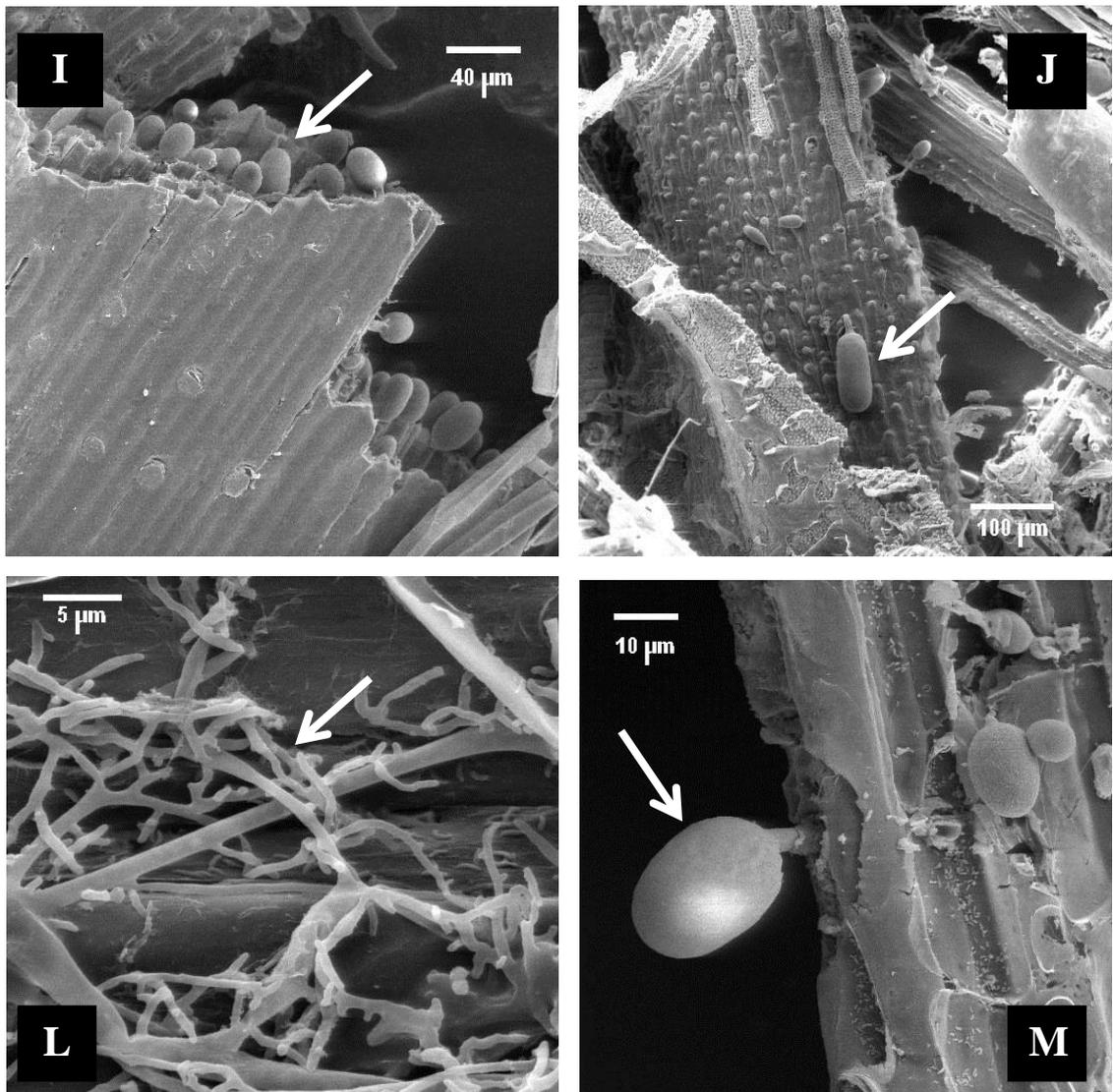


Figura 5 – Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de resíduo de forragens incubadas *in vitro* por 24 horas. (I) *Lolium multiflorum*, (J) *Cynodon* spp., (L) *Medicago sativa* e (M) *Sorghum bicolor*, L. Moench. As setas indicam a presença de esporângios aderidos na superfície da parede interna das células vegetais das amostras nas figuras I, J e M, e a formação de hifas na figura L.

7 DISCUSSÃO

7.1 Solubilização do fósforo

No presente estudo verificou-se que a maior parte do fósforo presente nas amostras testadas encontra-se disponível, sendo rapidamente solubilizado no meio de incubação nas primeiras três horas de ensaio. Após esse período a concentração de fósforo no resíduo se estabilizou até o final das 24 de incubação. Ramírez e Pérez (2009), ao estudar o efeito da solubilidade do fosfato na cinética e atividade da fermentação ruminal de caprinos leiteiros, observaram uma tendência global de diminuição da concentração de fósforo total e do fósforo disponível e que ambas as concentrações se tornaram estáveis noventa minutos após alimentação.

A alta solubilização do fósforo combinado com a rapidez com que esse processo ocorre, viabilizaria o uso do fósforo como marcador de aderência bacteriana. Uma vez que o fósforo presente no alimento está praticamente todo disponível para ser utilizado pelos microrganismos no rúmen, o fósforo medido no resíduo de incubação seria proveniente das bactérias aderidas a esse resíduo.

7.2 Composição química das bactérias associadas à fase líquida e bactérias aderidas a partícula

Os teores de N, Purinas, DAPA e P obtidos nas amostras de BAP e BAL observadas no presente estudo estão de acordo com resultados encontrados na literatura. Martin-Orúeet al. (1998) ao analisar os constituintes de amostras de BAL e BAP extraídas do conteúdo ruminal também verificaram diferenças nas concentrações de nitrogênio total, RNA, DAPA e P, sendo estes valores significativamente mais baixos na BAP quando comparados com os observados nas amostras de BAL.

A concentração de nitrogênio nas amostras de BAL foi superior à encontrada nas BAP. Os dados na literatura relacionados a concentração de N nas populações livres e aderidas são inconsistentes apesar de alguns autores não terem observado diferenças (CRAIG et al. (1987), CECAVA et al. (1990), GONZALEZ et al., (2011)), outros autores observaram

menores concentrações nas BAL (BENCHAAR et al., 1995) enquanto que para outros foram as BAP que apresentaram menores valores (MERRY e MCALLAN et al. (1983)

A influência da dieta na concentração de N nos microrganismos ruminais ainda é uma questão não resolvida na literatura. Alguns estudos demonstraram que a relação volumoso:concentrado na dieta não afetou o teor de N nos microrganismos (YANG et al., 2001). No entanto, Ranilla e Carro (2003), verificaram que alterações nas proporções de volumoso:concentrado não modificaram o conteúdo de N das BAL, no entanto quando a proporção de volumoso na dieta foi maior (80:20), a concentração de N nas BAP foi maior.

Mudanças nas concentrações de purinas estão associadas a diferentes espécies bacterianas. As bactérias gram-negativas apresentam maiores quantidades de RNA-N, em relação às bactérias gram-positivas (OBISPO e DEHORITY, 1999). Além disso, a menor concentração de purinas na PAB pode estar relacionada a menor taxa de crescimento desta população (CECAVA et al., 1990).

Rodriguez et al., (2000) verificou diferenças significativas entre as concentrações de purinas ($\mu\text{mol/mg}$ de MS) das populações bacterianas livres e aderidas de ovinos, sendo os valores das aderidas menores. Os dados também indicaram que o aumento do consumo produziu um aumento importante na concentração de purinas de aproximadamente 30% em média.

As concentrações mais baixas de DAPA nas amostras BAP comparados com os valores das amostras de BAL observadas no presente estudo, também foram previamente relatadas (MERRY E MCALLAN, (1983); OLUBOBOKUN et al., (1988) e MARTIM et al., (1994)) e podem ser explicadas pelo fato do DAPA não estar presente na parede celular de bactérias *coccus* gram-positivas, as quais constituem uma porção considerável das bactérias que estão associadas à parede celular das plantas que estão presentes no rúmen (LATHAM, 1980). As espécies gram-positivas também parecem formar a maior proporção da população bacteriana em vacas recebendo dietas a base de volumoso, quando comparadas com dietas ricas em concentrado (NAGARAJA et al., 1978). Segundo Merry e McAllan (1983) a concentração do DAPA em amostras de BAL e BAP pode variar de acordo com o tipo de dieta e contribuição de cada grupo de bactéria na população microbiana total.

Em relação a concentração de fósforo, esta foi maior nas amostras de BAL. As BAL representam aproximadamente 25% dos microrganismos ruminais e o seu teor de P (MERRY e MCALLAN, 1983; RAMÍEZ-PÉREZ, 2009) pode representar até 50% do fósforo bacteriano total. Essa maior concentração de P nas BAL pode estar relacionado com o volume celular e acúmulo de substâncias após alimentação (CRAIG et al., 1987).

7.3 Efeito da metilcelulose no isolamento de bactérias aderidas a partícula

As bactérias ruminais fazem uso de mecanismos de aderência para a promover uma interação específica ou não específica com o substrato. Dessa forma, a dissociação das bactérias com as partículas requer o uso de uma combinação de métodos químicos e físicos, capaz de interromper os vários mecanismos de aderência utilizados pelas bactérias (WHITEHOUSE et. al, 1994).

Neste estudo para a remoção das bactérias associadas às partículas da porção sólida da digesta ruminal foi utilizada uma adaptação do protocolo proposto por Ranilla e Carro (2003). Este protocolo utiliza a combinação de um tratamento com metilcelulose mais armazenamento e refrigeração por 24 horas, seguido por homogeneização. A metilcelulose é capaz de provocar o efeito de inibir o processo de aderência (KUDO et al, 1987) e também de separar as bactérias das partículas (MINATO e SUTO, 1978).

No entanto os mecanismos utilizados pela metilcelulose para promover a essa dissociação ainda não são bem compreendidos. Resultados previamente relatados na literatura indicaram que a metilcelulose demonstrou bons resultados em interromper as interações específicas e não específicas das bactérias aderidas com o substrato. Pell e Schofield (1993) observaram que a metilcelulose foi eficiente na separação de bactérias ruminais celulolíticas da celulose sem afetar a atividade enzimática e também bloqueou a degradação da celulose. Ranilla e Carro (2003) obtiveram uma remoção que variou entre 80,5 a 86,0% em dietas com 20 e 80% de concentrado respectivamente.

Para certificar que a inclusão de metilcelulose não provocaria alterações na estrutura das bactérias, optou-se por realizar um ensaio avaliando o efeito da metilcelulose em amostras de bactérias associadas à fase líquida. A utilização de dois tratamentos: T₁ que seria tratamento controle, utilizando somente solução salina e agitação para o isolamento das BAL e T₂: Neste tratamento as BAL passariam pelos mesmos procedimentos adotados para isolar as BAP.

Comparando os resultados obtidos com uso dos dois tratamentos, não foi observada diferença na composição química das BAL em relação aos teores de nitrogênio e purinas quando expressos na proporção de matéria orgânica, no entanto observou-se diferença em relação ao teor de P. Os dados relatados por Ranilla e Carro (2003) indicaram que as diferentes combinações de métodos químicos e físicos para isolar os microrganismos das

partículas parecem não ter causado efeitos adversos na integridade da célula bacteriana ou se produziram, os efeitos tiveram a mesma intensidade em todos os métodos avaliados.

7.4 Marcadores de aderência bacteriana ruminal

A relação entre aderência e digestibilidade baseia-se no princípio de que para ocorra que a degradação do alimento no rúmen, é necessário que as bactérias efetuem uma etapa inicial de adesão ao substrato e com o auxílio de seus complexos enzimáticos realizem a degradação do alimento. Dessa forma, uma maior colonização das partículas de alimento proporcionaria uma maior eficiência na degradação do mesmo.

Segundo Cheng et al. (1991), os quatro fatores principais que regulam a degradação da fibra pelo ruminante seriam: 1) a estrutura e composição da planta, que regula o acesso da bactéria ao nutriente; 2) a natureza da densidade da população de microrganismos que degradam preferencialmente a fibra; 3) fatores microbianos que controlam a adesão e hidrolise por complexos enzimáticos da população microbiana aderida e 4) fatores relacionados ao animal que aumentam a disponibilidade dos nutrientes através da mastigação e cinética da digesta.

No entanto no presente estudo após 24 horas de incubação, não foi observada correlação entre os marcadores de aderência avaliados e a digestibilidade dos alimentos incubados *in vitro*. Este resultado pode ser explicado pelo método adotado, onde foi feita a correlação dos marcadores entre si ou com a digestibilidade utilizando espécies forrageiras diferentes como unidade experimental. As diferentes forragens apresentam características químicas e histológicas diferentes, de forma que é provável que diferenças em sua digestibilidade não esteja diretamente associada à diferenças no grau de aderência bacteriana, e sim por fatores inerentes a forragem. Desse modo, é improvável que a quantidade de bactérias aderidas fosse a mesma em todas as amostras para um mesmo nível de degradação.

Da mesma forma, os diferentes marcadores ocupam diferentes compartimentos nas células bacterianas, os quais podem variar entre espécies bacterianas e com sua atividade metabólica. Em relação à este aspecto por exemplo, a alta correlação observada entre teor de N¹⁵ e atividade enzimática indica que este marcador foi utilizado preferencialmente para

síntese de enzimas associadas à digestão da fibra. Por outro lado, não existiu correlação entre atividade enzimática e degradabilidade da forragem.

Estes resultados indicam que a comparação de marcadores de aderência bacteriana deve ser feita dentro de cada tipo de amostra/espécie forrageira, utilizando procedimentos ou tratamentos que induzam variação da extensão da degradação *in vitro* destas forragens. Por exemplo, modificações no meio de incubação como pH, temperatura, presença de cátions (Na^+ , Ca^{+2} e Mg^{+2}), concentração de carboidratos solúveis (MIRON et al., (2001)), poderiam inibir ou reduzir a aderência das bactérias ao substrato.

Farenzena et al. (2013), ao avaliar os efeitos da alteração no pH sobre a aderência bacteriana às partículas de cynodon e azevém utilizando o fósforo como marcador de aderência, verificou que tanto a degradabilidade quanto o teor de fósforo no resíduo de incubação foram linearmente e positivamente afetados pelo pH. Guimarães–Beelen (2006), observaram que a presença de taninos condensados em espécies de leguminosas como *M. hostilis*, *M. caesalpinifolia* e *B. cheilantha*, afetou negativamente a degradabilidade ruminal da matéria seca, proteína bruta e FDN, e também reduziu a aderência microbiana e atividade da endoglucanase no conteúdo ruminal.

Segundo Bowman e Firkins (1993), o N^{15} distribui-se rapidamente e é utilizado por todas as espécies bacterianas, de modo que o enriquecimento do resíduo de incubação com N^{15} é representativo da biomassa total de bactérias aderidas a partículas. Por outro lado, a atividade carboximetilcelulásica é específica a algumas espécies bacterianas (CHESSON e FORSBERG, 1988), tendo limitações como marcador da biomassa bacteriana total aderida no resíduo (BOWMAN e FIRKINS (1993)).

7.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise dos resíduos de incubação por microscopia eletrônica de varredura permitiu uma estimativa visual do resultado da digestibilidade das forragens incubadas por 24 horas. As imagens demonstram a grande degradação dos tecidos vegetais e a presença das bactérias aderidas a partículas. Foi possível comprovar que mesmo após os resíduos passarem por ciclos de sonicação para a extração de enzimas bacterianas, ainda é possível identificar bactérias e fungos aderidos a partículas, quando o esperado era que com este procedimento

ocorresse o rompimento desses microrganismos, ou que estes tivessem a sua estrutura danificada.

A grande presença de fungos aderidos às partículas de forragem levantou questionamentos sobre a participação destes microrganismos no processo de degradação das forragens incubadas. Os fungos parecem ter uma importante função na digestão da fibra porque são capazes de penetrar na cutícula e na parede celular de tecidos lignificados (AKIN, 1986) através de seus filamentos de crescimento e também são capazes de degradar materiais mais recalcitrantes da parede celular como esclerênquima e tecido vascular (AKIN, 1989). Mesmo os fungos altamente especializados que degradam lignina, iniciarão a degradação dos carboidratos estruturais uma vez que a lignina for removida dos tecidos (TEM TIAVE e TEUNISSEN, 2001).

Contudo os fungos compreendem aproximadamente somente 8% da massa microbiana ruminal, além de apresentar uma taxa de crescimento e de degradação muito mais lenta em relação às bactérias. Apesar dos fungos preferencialmente colonizar tecidos lignocelulotílicos, o seu papel na degradação da lignina ainda não é bem compreendido e quantitativamente também ainda não se sabe muito sobre a contribuição dos fungos ruminais na degradação da parede celular e sobre o processo fermentativo em geral. Foi observado que em ensaios *in vitro* os fungos são capazes de solubilizar parte da lignina presente na parede celular e que a remoção dos fungos do rúmen reduziu a digestibilidade da matéria seca (FORD et al., 1987).

8 CONCLUSÕES

A composição química das bactérias associadas à fase líquida difere das bactérias aderidas a partículas de forragem e, em geral, não é afetada pelo tratamento com metilcelulose. A concentração dos marcadores testados não apresentou correlação consistente entre si ou com a degradabilidade das amostras de forragem. Exceção foi a relação entre N^{15} e atividade enzimática, indicando que o isótopo foi incorporado principalmente em proteínas enzimáticas bacterianas. Contudo, este resultado está associado provavelmente às limitações da metodologia utilizada no presente estudo, que utilizou diferentes amostras de forragem como unidade experimental. Futuros ensaios com tratamentos e desenho experimental mais adequado deverão ser conduzidos na perspectiva de melhor responder às hipóteses presentemente formuladas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIN, D.E. Interaction of ruminal bacteria and fungi with southern forages. **Journal of Animal Science**. v. 63: p. 962-977, 1986.

AKIN, D.E. et al. Comparative fiber degradation by mixed rumen fungi from Australian and U.S.A. cattle. **Animal Feed Science Technology**. v. 23, p. 305–321, 1989.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12 ed. Washington, D. C. 1995.

BAYER, E. A. et al. The cellulosomes: Multienzymes machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**. v. 58, p. 521-554, 2004.

BENCHAAR C, et al 1995. Composition chimique des bactéries libres ou adhérentes au contenu du rumen et du duodénum chez la vache (Chemical composition of free or attached bacteria from rumen or duodenum contents of cows). *Annales de Zootechnie* 44 (suppl.), 139.

BOWMAN, J. G., FIRKINS, J. L. Effects of forage species and particle size on bacterial cellulolytic activity and colonization in situ. **Journal of Animal Science**. V.71:p. 1623-1633. 1993.

BRODERICK, G. A., MERCHEN, N. R., Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. **Journal of Dairy Science**. v. 75, n. 9, 1992.

BRADFORD, MMA. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem**.v. 72. p. 248-254. 1976.

CARRO, M.D., La determinación de la síntesis de proteína microbiana em el rumen: comparación entre marcadores microbianos. **Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim**. v. 16 (1). 2001.

CARRO, M.D.; MILLER, E.L., Comparison of microbial markers (¹⁵N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. **Animal Science**. v.75, p.315-321, 2002.

CECAVA, M. J. et al. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. **Journal of Dairy Science**. v. 73, p. 2480, 1990.

CHENG, K.-J. et al. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. 1991. In: McALLISTER, T.A., BAE, H.D., JONES, G.A., CHENG, K.J. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**. v. 72, p. 3004–3018, 1994

CLARK, J. H. et al. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 75:p. 2304–2323, 1992

CRAIG, W. M., et al. Quantitation of Microorganisms Associated with the Particulate Phase of Ruminal Ingesta. **American Institute of Nutrition**. 1987.

CZERKAWSKI, J.W. Chemical composition of microbial matter in the rumen. **Journal of Science Food Agriculture**. v. 25, p. 45-55. 1974.

CZERKAWSKI, J. W.; BREKENRIDGE, G. Distribution and changes in urease (*EC 3.5.1.5*) activity in Rumen Simulation Technique (Rusitec). **British Journal of Nutrition**. v. 47, p. 331–348, 1982.

CZERKAWSKI, J. W.; CHENG, K. J. 1988. Compartmentation in the rumen. In: P. N. Hobson (Ed.) **The Rumen Microbial Ecosystem**. p 361. Elsevier Science Publishing, New York.

FARENZENA, R. et al. Forage degradability, rumen bacterial adherence and fibrolytic enzyme activity in vitro: effect of pH or glucose concentration. **Journal of Agricultural Science**, p. 1-8, 2013.

FISKE, C.H.; SUBBAROV, Y., The colorimetric determination of phosphorus. **J Biol.Chem.**v.66, p.375-400, 1925.

FORD, C. W., et. Al., The effect of chlorite delignification on digestibility of some grass forage and on intake and rumen microbial activity in sheep fed barley straw. **Journal of Agricultural Science**. Camb., 108. 129-136.

FORSBERG, C. W.; LAM, K. Use of adenosine 5-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 33, p. 528-537, 1977.

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M.; et al., Influence of condensed tannins from Brazilian semi-arid legumes on ruminal degradability, microbial colonization and ruminal enzymatic activity in Saanen goats. **Small Ruminant Research**.v.61, p.35-44, 2006.

GONZÁLEZ, J. et al. Composition of free and adherent ruminal bacteria: inaccuracy of the microbial nutrient supply estimates obtained using free bacteria as reference samples and ^{15}N as the marker. **Animal** .6:3, p. 468–475, 2011.

HESPELL, R.B. et al. (1997). Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. In: **Gastrointestinal Microbiology** (MACKIE, R.I.; WHITE, B.A.; ISAACSON, R.E., Eds.), pp. 59-141. Chapman and Hall, New York.

HUHTANEN, P.; KHALILI, H. The effect of sucrose supplements on particle-associated carboxymethylcellulase (**EC 3.2.1.4**) and xylanase (**EC 3.2.1 .8**) activities in cattle given grass-silage-based diet. **British Journal of Nutrition**.v.61,p. 245-255, 1992

HVELPLUND, T. The influence of diet on nitrogen and amino acid content of mixed rumen bacteria. **Acta Agric. Scand.** v. 36, p.325, 1986.

KRAUSE, D. O. et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 27, p. 663 – 693,2003.

KAMOUN, M. et al. Effect of feed ^{15}N incorporation into solid-associated bacteria on the *in situ* nitrogen degradability of ^{15}N labelled Italian ryegrass. **Animal Feed Science and Technology**. v. 135, p. 353–361, 2007

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Fibrolytic rumen bacteria: Their ecology and functions. **Asian-Australian journal of Animal Science**. v. 22, n.1, p. 131-138, 2009.

KOMAREK, A. R. A fiber bag procedure for improved efficiency of fiber analyses. **Journal of Dairy Science**, v.76, suppl. (1), p. 250. 1993.

KOZLOSKI, G.V. et al. Potencial nutritional assessment of dwarf elephant grass (*Pennisetumpurpureum* Schum. cv. Mott) by chemical composition, digestion and net portal flux of oxygen in cattle. **Animal Feed Science Technology**, v. 104, p. 29-40. 2003.

KUDO, H. et al. Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. **Can. J. Microbiol.** v. 35, p. 1166, 1987.

LAMED, K. et al. Specialized cell surface structures in cellulolytic bacteria. **Journal of Bacteriology**. v. 169, p. 3792-3800, 1987.

LATHAM, M. J. et al. Ruminococcus flavefaciens Cell Coat and Adhesion to Cotton Cellulose and to Cell Walls in Leaves of Perennial Ryegrass (Lolium perenne). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, N. 1, p. 156-165, 1978

LATHAM, M. J. (1980). Adhesion of rumen bacteria to plant cell walls. In **Microbial Adhesion to Surfaces**, pp. 339-350 [R. C. W. Berkeley, J. M. Lynch, J. Melliney, R. P. Rutter and B. Vincent, editors]. Chichester: Ellis Howard.

LEGAY-CARMIER, F., BAUCHART D., Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil, **British Journal of Nutrition**. v. 61 p. 725-740, 1989.

LURIA, S. E. (1960). In **The Bacteria**, vol. 1, pp. 1-34 p. C. Gunsalus and R. Y. Stanier, editors]. London: Academic Press.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. **British Journal of Nutrition**, v.81, p.107-112, 1999.

MARTIN, C., A. G. et al. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. **J. Anim. Sci.** v. 72, p. 2962-2968, 1994.

MARTÍN-URÚE, S. M. et al. Quantification and chemical composition of mixed bacteria harvested from solid fractions of rumen digesta: effect of detachment procedure. **Animal Feed Science and Technology**. v. 71, p. 269-282, 1998.

MCALLAN, A. B. The fate of nucleic acids in ruminants. **Proc. Nutr. Soc.** v. 41, p. 309, 1982.

MCALLAN, A. B.; SMITH, R. H. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge v. 86, p. 639-642, 1976

MCALLISTER, T. A. et al. Use of formaldehyde to regulate the digestion of barley starch. **Canadian Journal of Animal Science**. v. 70, p. 571, 1990.

MCALLISTER, T.A., et al. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**. v. 72, p. 3004–3018, 1994

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. **J. AOAC**, v. 85, p. 1217-1240. 2007.

MERRY, R. J.; MCALLAN, A. B. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. **British Journal of Nutrition**. v. 50, p. 701-9, 1983.

MICHALET-DOREAU, B. et al. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. **Reproduction Nutrition Development**. v. 41, p. 187–194, 2001.

MILLER, G. L., et al. Measurement of carboxymethylcellulase activity. **Analytical Biochemistry**. v. 2, p. 127-132, 1960.

MINATO, H.; SUTO, T. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. II. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to cellulose powder in vitro and elution of bacteria attached therefrom. **J. Gen. Appl. Microbiol.** v. 24: 1, 1978.

MIRON, J., BEN-GHEDALIA, D., MORRISON, M. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1294–1309, June. 2001

MOURIÑO, F., et al. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Dairy Science**. v. 84, p. 848-859, 2001.

NAGARAJA, T. G. et al. Relationship of rumen gram-negative bacteria and free endotoxin to lactic acidosis in cattle. **J. Anim. Sci.** v. 47, p. 1329, 1978.

NELSON, D. L.; COX, M. M., **Lehninger Princípios da Bioquímica**. 3ed, São Paulo, 2002

OBISPO, N. E.; DEHORITY, B. A. Feasibility of using total purines as a marker for ruminal bacteria. **Journal of Animal Science**. v. 77, p. 3084-3095, 1999

OLUBOBOKUN, J. A.; CRAIG, W. M. Quantity and characteristics of microorganisms associated with ruminal fluid or particles. **Journal of Animal Science**. v. 68, p. 3360, 1990.

OLUBOBOKUN J.A. et al. Characteristics of microorganisms associated with fluid or particles, **Journal of Animal Science**. v. 68 p.3360–3370, 1988.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L., Ruminal fermentation. In: CHURCH, D. C. (Ed). **The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition**. p. 145-171, 1993.

PELL, A. N.; P. SCHOFIELD.1993. Microbial adhesion and degradation of plant cell walls. In: H.G. Jung, D. R. Bwton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (Ed.) **Forage cell wall structure and digestibility**. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, WI

RAMÍREZ-PÉREZ, A.H. et al. Effect of phosphate solubility on phosphorus kinetics and ruminal fermentation activity in dairy goats. **Animal Feed Science and Technology**. v. 149, p. 209–227, 2009.

RANILLA, M. J.; CARRO, M. D., Rusitec fermenters influence chemical composition of microbes and estimation of microbial growth in Diet and procedures used to detach particle-associated microbes from ruminal digesta. **Journal of Animal Science**. v. 81, p. 537-544.2003.

RODERICK, I.; WITHE, B. A., Recent advances in Rumen Microbia Ecology and Metabolism: Potencial Impact on Nutrient Output. **Journal of Dairy Science**. v. 73, n.10, p. 2971-2995, 1990.

RODRÍGUEZ, C. A. et al. Composition of bacteria harvested from the liquid and solid fractions of the rumen of sheep as influenced by feed intake. **British Journal of Nutrition**. v. 84, p. 369-376, 2000.

RUSSELL, J.B., DOMBROWSKI, D.B. Effect of pH on the efficiency of growth by purecultures of rumen bacteria in continuous culture. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 39, p. 604-610, 1980.

SAS . Institute Inc. **SAS Language Reference**. Version 9.2. Cary, NC: SAS institute. 2009.

SENGER, C. C. D. et al. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, p. 169-174. 2008.

SILVA, A. T.; et al. Use of particle-bound microbial enzyme activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. **British Journal of Nutrition**. v. 57, p. 407 – 415, 1987.

SMITH, R.H.; MCALLAN, A.B. Nucleic acid metabolism in the ruminant. 2. Formation of microbial nucleic acids in the rumen in relation to the digestion of food nitrogen, and the fate of dietary nucleic acids. **British Journal of Nutrition**. v. 24, p. 545-556, 1970

STEWART, C. S. et al. The rumen bacteria. Pages 10–72 in **The Rumen Microbial Ecosystem**. P. N. Hobson and C. S. Stewart, eds. Blackie Academic and Professional Publishers, London. 1997.

TEN HAVE, R.; TEUNISSEN, P.J. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. **Chem. Rev.** v. 101, p. 3397-3413, 2001.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**, 2nd ed. Cornell University Press, New York, NY, USA, 476 p. 1994.

WEBSTER, P. M.; et al. Determination of 2,6diaminopimelic acid in biological materials using high performance liquid chromatography. **Animal Feed Science and Technology**, v. 30, p. 11-20, 1990.

WHITEHOUSE, N.L. et al. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. **Journal of Dairy Science**. v. 72, p. 1335–1343, 1994.

WILLIAMS, A. G. et al. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes in microbial populations from the digesta solids and liquor fractions of rumen contents. **J. Appl. Bacteriol.** v.66, p.15-26, 1989.

WILLIAMS, A. G., STRACHAN, N. H. The Distribution of Polysaccharide-degrading Enzymes in the Bovine Rumen Digesta Ecosystem. **Current microbiology**, v. 10 p. 215-220, 1984.

WINDHAM, W. R.; AKIN, D. E. Rumen fungi and forage fiber degradation. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 48, p. 473-476, 1984.

YANG, W. Z. et al. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. **Journal of Animal Science**. v. 7, p. 2736–2746, 2001.

YOKOYAMA, M. T., JOHNSON, K. A. Microbiology of the Rumen and intestine. Church, D.C. **The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition**. 1988. New Jersey.

ZINN, R. A.; OWENS, F. N. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. **Canadian Journal of Animal Science**. v. 66, p. 157-166, 1986.

ANEXOS

Anexo A – Solução tamponante

A solução tampão do meio de incubação era composta de uma solução de três soluções:

Composição da solução tampão	
Ingredientes:	ml/litro
Solução tampão 1	450
Solução tampão 2	450
Solução redutora	100
Total	1000

Solução tampão 1 (g/litro)

- 4,411g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 2.893g de KH_2PO_4
- 0.233g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0.025ml de CaCl_2^*

Solução tampão 2

- 3,127g de NH_4HCO_3
- 12,040g de NaHCO_3

Solução redutora:

- 3,9g de Cysteine HCL
- 1,0g de NaOH

Anexo B – Solução complexante

Os reagentes foram pesados separadamente em balança de precisão:

- 3,8 g de molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- 5 g ácido bórico (H_3BO_3)

Os reagentes foram diluídos em aproximadamente 500 mL de água destilada, adicionados 70,7 mL ácido clorídrico concentrado (HCl) e em seguida transferida a solução para um balão volumétrico de 1L e completado o volume com água destilada.

Anexo C – Solução redutora

Os reagentes foram pesados separadamente em balança de precisão:

- 0,25 g ácido amino - naftol – sulfônico ($\text{NH}_2\text{C}_{10}\text{H}_5(\text{OH})\text{SO}_3\text{H}$)
- 0,50 g sulfito de sódio (Na_2SO_3)
- 14,6 g de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)

Diluídos e transferidos para balão de 100 mL e completado o volume com água destilada

Anexo D- Solução tampão fosfato

Os reagentes foram pesados separadamente em balança de precisão:

- 0,625g de Fosfato de Potássio Dibásico Anidro (K_2HPO_4);
- 5g de Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4);
- 0,65g Cloreto de Sódio (NaCl);
- 0,045g de Cloreto de Cálcio ($CaCl_2$);
- 0,360 de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).

Após a pesagem, cada reagente foi diluído em aproximadamente 100 mL de água destilada, em seguida misturados e completado o volume de 1 litros.

Anexo E - Solução de 3,5-dinitro-salicilato (DNS 1%)

Para o preparo dessa solução era dissolvido com aquecimento:

- 5 g do ácido 3,5-dinitro-salicílico em 100 ml de NaOH 2N

-150 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 250 ml de água destilada.

As duas soluções foram misturadas e transferidas para um balão volumétrico de 500 mL e o volume foi ajustado com água destilada.

Anexo F – Solução de comassie brilhante blue

-50 mL de etanol 95%

-100 mL de ácido ortofosfórico 85%

-100 mg de comassie brilhante blue

Os reagentes foram diluídos em água destilada e depois transferidos para balão volumétrico de 1L e completado o volume com água destilada.

Anexo G – Solução tampão citrato-HCl

Foram pesados 58,82 g de citrato ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), adicionado água destilada até em torno de 850 ml. Em seguida foi adicionado HCl concentrado até atingir o pH desejado. A solução foi transferida para balão volumétrico de 1L e completado o volume com água destilada.

Anexo H - Solução ninhidrina:

Foram pesados 250 mg de ninhidrina p.a. adicionados 6 ml de ácido acético glacial e 4 ml de ácido fosfórico 6 M. A solução foi transferida para balão de 100 mL e completado o volume com água destilada.

APÊNDICES

Apêndice A – Resultados e cálculos do excesso de N¹⁵ nos resíduos de incubação

Amostra	Nº Ensaio	C (%)	N (%)	N (% na MS)	δ 15N ¹⁵	%MS Resíduo	δ 15N ¹⁵ corr*	atm%	Excesso de N15 (% do N total)	Excesso N15 (% na MS residual)	Excesso N15 (ug/g MS residual)
AZ 1	1	42.02768	1.417374	1.5838347	114.305	89.49	105.655	0.408	0.0417	0.000660503	6.61
	2	41.68699	1.4205	1.5873276	114.816		106.166	0.408	0.0419	0.000664917	6.65
AZ 2	1	42.71104	1.383583	1.5019356	209.932	92.12	208.042	0.443	0.0766	0.001149905	11.50
	2	41.69959	0.989402	1.0740357	134.144		132.254	0.415	0.0489	0.000525597	5.26
AZ 3	1	42.81497	1.566291	1.7002721	124.184	92.12	120.269	0.412	0.0453	0.000770309	7.70
	2	43.44759	1.338297	1.4527753	148.159		144.244	0.420	0.0540	0.000785171	7.85
CY 1	1	44.71081	1.991473	2.2161954	116.603	89.86	109.947	0.409	0.0425	0.000942786	9.43
	2	43.53923	1.674656	1.8636274	90.536		83.88	0.399	0.0330	0.00061564	6.16
CY 2	1	42.46912	1.53205	1.6924987	163.325	90.52	156.091	0.426	0.0596	0.001008306	10.08
	2	42.35001	1.684702	1.861138	186.354		179.12	0.434	0.0680	0.001264996	12.65
CY 3	1	44.29769	1.394649	1.5215459	192.713	91.66	188.743	0.437	0.0703	0.001069441	10.69
	2	44.14545	1.318902	1.4389066	166.979		163.009	0.427	0.0609	0.000876394	8.76
CY 4	1	44.00236	0.970255	1.0395959	231.138	93.33	228.348	0.451	0.0843	0.000876259	8.76
	2	44.25562	1.30701	1.4004183	282.279		279.489	0.469	0.1029	0.00144128	14.41
AF 1	1	43.77916	1.855476	2.0276211	57.912	91.51	57.408	0.387	0.0211	0.000428527	4.29
	2	44.51854	1.743237	1.9049689	75.118		74.614	0.394	0.0274	0.00052217	5.22
AF 2	1	44.41805	1.416196	1.549788	87.013	91.38	86.221	0.398	0.0317	0.000492051	4.92
	2	46.04796	1.401244	1.5334251	75.199		74.407	0.394	0.0274	0.000420779	4.21
AF 3	1	45.35084	1.305384	1.4408216	71.606	90.6	71.291	0.392	0.0261	0.000376485	3.76
	2	43.297	1.211499	1.3371953	60.687		60.372	0.388	0.0221	0.000296146	2.96
AF 4	1	45.59993	1.13902	1.2571962	77.642	90.6	78.017	0.395	0.0283	0.000356183	3.56
	2	44.03645	0.864356	0.9540357	91.184		91.559	0.400	0.0333	0.000317416	3.17

AZ: Azevém, CY: Cynodon, AF: alfafa

 δ 15N¹⁵corr*: descontado o valor de δ 15N¹⁵ do alimento; atm%: % de átomos no resíduo

Apêndice A – Resultados e cálculos do excesso de N¹⁵ nos resíduos de incubação (Continuação)

Amostra	Nº Ensaio	C (%)	N (%)	N (% na MS)	δ 15N ¹⁵	%MS Resíduo	δ 15N ¹⁵ corr*	atm%	Excesso de N15 (% do N total)	Excesso N15 (% na MS residual)	Excesso N15 (ug/g MS residual)
A.F 1	1	48.04746	1.469309	1.6354734	72.508	89.84	72.875	0.393	0.0265	0.000432728	4.33
	2	48.36497	1.72971	1.9253224	66.67		67.037	0.391	0.0243	0.000468418	4.68
A.F 2	1	49.60118	1.678397	1.871331	49.443	89.69	49.600	0.384	0.0180	0.000337678	3.38
	2	50.16559	1.79108	1.9969672	66.004		66.161	0.390	0.0241	0.000480997	4.81
SS	1	43.90488	1.158553	1.2847117	179.358	90.18	179.303	0.432	0.0654	0.000840446	8.40
	2	42.93323	0.879458	0.9752247	98.877		98.822	0.402	0.0361	0.000351827	3.52

A.F: amendoim forrageiro, SS: silagem de sorgo

MS; matéria seca; δ 15N¹⁵corr*: descontado o valor de δ 15N¹⁵ do alimento; atm%: % de átomos no resíduo

R isotópica do padrão

$$R_{\text{padrão}} = \left(\frac{0,366\% (15N)}{99,633\% (14N)} \right)$$

$$R_{\text{padrão}} = 0,0036765 \text{ ou } atm \% \text{ padrão} = 0,3663$$

Delta da amostra:

$$\delta_{\text{amostra}} = \left(\frac{\frac{15N}{14N} \text{ amostra} - \frac{15N}{14N} \text{ padrão}}{\frac{15N}{14N} \text{ padrão}} \right) \times 1000$$

% de átomos no resíduo

$$atm \% = \left(\frac{100 \times R_{\text{padrão}} \times \left(\frac{\delta_{\text{amostra}} + 1}{1000} \right)}{1 + R_{\text{padrão}} \times \left(\frac{\delta_{\text{amostra}} + 1}{1000} \right)} \right)$$

Excesso de N15 (% do N total)

$$\text{Excesso de N15 (\%)} = atm \% \text{ amostra} - atm \% \text{ padrão}$$

Excesso N15 (% na MS residual)

$$= \frac{\text{Excesso de N15 (\% do N total)} \times N (\% \text{ na MS})}{100}$$

Excesso N15 (ug/g MS residual)

$$= \frac{\text{Excesso de N15 (\% na MS residual)}}{100} \times 1000 \times 1000$$

Apêndice B – Digestibilidade *in vitro* e aderência bacteriana a partículas de forragens (marcadores: N¹⁵, Purinas, Fósforo e variáveis da atividade enzimática)

For.	Rep.	Ens.	Dig. MS	Dig. FDN	Dig. Fração insol	N ¹⁵ (ug/g MS residual)	Pur mg/g MS residual	P mg/g MS residual	nmol glic liber./g MS/min(CMC)	nmol glic liber./g MS/min(xil)	mg Proteína total	µg glic liber./ml Enzima
AZ	1	1	86.9	78.4	84.3	6.61	0.50	0.39	1834	808	0.28	62.6
AZ	1	2	86.6	77.9	83.9	6.65	0.46	0.69	1045	6020	0.34	57.4
AZ	2	1	88.1	78.3	81.9	11.5	0.57	0.82	1388	12179	0.33	86.7
AZ	2	2	88.8	78.6	83.1	5.26	0.43	0.53	428	5030	0.19	42.8
AZ	3	1	94.7	89.2	92.0	7.70	0.45	0.68	3052	16589	0.35	78.6
AZ	3	2	94.2	88.2	91.2	7.85	0.47	0.79	2364	13202	0.31	75.4
CY	1	1	54.8	41.6	45.0	9.43	0.54	0.49	3773	14443	0.30	121
CY	1	2	61.1	31.6	52.7	6.16	0.46	0.36	2397	10901	0.30	37.8
CY	2	1	73.2	66.1	65.1	10.1	0.58	1.47	2196	12303	0.54	103
CY	2	2	73.4	66.6	64.1	12.6	0.59	1.97	3246	14810	0.32	61.8
CY	3	1	70.7	63.4	63.2	10.7	0.84	0.71	1805	12114	0.29	78.0
CY	3	2	73.3	66.8	66.4	8.76	0.53	0.59	2393	12803	0.66	35.3
CY	4	1	66.5	57.6	57.7	8.76	0.32	0.70	1446	9314	0.25	50.6
CY	4	2	64.7	56.4	55.5	14.4	0.55	0.33	2310	11807	0.50	72.2

For=forragem; Rep=repetição; Ens=ensaio; Dig. MS=digestibilidade *in vitro* da matéria seca; Dig. FDN= digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro; Dig. Fração insol=digestibilidade *in vitro* da fração insolúvel do alimento; Pur=purinas, P=fósforo; nmol glic liber./g MS/min(CMC)= nmol de glicose liberada/g de MS/min substrato carboximetilcelulose; nmol glic liber./g MS/min(xil)= nmol de glicose liberada/g de MS/min substrato xilano; µg glic liber./ml Enzima= nmol de glicose liberada/g de MS/min no extrato enzimático; AZ=azevém; CY=Cynodon.

Apêndice B – Digestibilidade *in vitro* e aderência bacteriana a partículas de forragens (marcadores: N¹⁵, Purinas, Fósforo e variáveis da atividade enzimática (continuação)).

For.	Rep.	Ens.	Dig. MS	Dig. FDN	Dig. Fração insol	N ¹⁵ (ug/g MS residual)	Pur mg/g MS residual	P mg/g MS residual	nmol glic liber./g MS/min(CMC)	nmol glic liber./g MS/min(xil)	mg Proteína total	µg glic liber./ml Enzima
ALF	1	1	75.2	60.7	67.4	4.29	0.32	2.47	621	4064	0.22	48.9
ALF	1	2	74.2	57.3	65.2	5.22	0.32	2.34	1744	4471	0.39	72.7
ALF	2	1	78.8	63.6	68.4	4.92	0.45	1.01	618	4709	0.33	98.4
ALF	2	2	80.5	59.4	71.0	4.21	0.51	0.88	1093	4483	0.29	82.9
ALF	3	1	67.7	50.6	58.7	3.76	0.44	0.97	701	5630	0.32	53.9
ALF	3	2	66.8	49.2	57.6	2.96	0.42	0.95	1513	5844	0.31	57.6
ALF	4	1	83.8	61.8	74.4	3.56	0.39	1.01	1829	7927	0.46	101
ALF	4	2	83.7	61.6	74.3	3.17	0.36	0.80	1701	5773	0.34	50.7
AMF	1	1	91.0	76.4	87.5	4.33	0.37	0.40	555	6689	0.17	123
AMF	1	2	91.5	76.3	89.3	4.68	0.37	0.61	437	5030	0.17	45.0
AMF	2	1	90.3	75.4	86.9	3.38	0.57	0.60	506	4003	0.21	72.7
AMF	2	2	90.9	76.9	87.6	4.81	0.82	1.00	591	6800	0.25	92.1
SS	1	1	74.8	36.7	66.0	8.40	0.77	0.19	353	4480	0.22	89.6
SS	1	2	72.3	31.8	63.0	3.52	0.38	0.06	723	5226	0.19	44.0

For=forragem; Rep=repetição; Ens=ensaio; Dig. MS=digestibilidade *in vitro* da matéria seca; Dig. FDN= digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro; Dig. Fração insol=digestibilidade *in vitro* da fração insolúvel do alimento; Pur=purinas, P=fósforo; nmol glic liber./g MS/min(CMC)= nmol de glicose liberada/g de MS/min substrato carboximetilcelulose; nmol glic liber./g MS/min(xil)= nmol de glicose liberada/g de MS/min substrato xilano; µg glic liber./ml Enzima= nmol de glicose liberada/g de MS/min no extrato enzimático; ALF=alfafa; AMF=amendoim forrageiro; SS=silagem de sorgo.