

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

**Mariana Patricia Mezzomo**

**MARCADORES E FUNÇÃO DOS MICRORGANISMOS RUMINAIS  
ADERIDOS A PARTÍCULAS DE FORRAGEM**

**Santa Maria, RS  
2018**

**Mariana Patricia Mezzomo**

**MARCADORES E FUNÇÃO DOS MICRORGANISMOS RUMINAIS ADERIDOS A  
PARTÍCULAS DE FORRAGEM**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Zootecnia**.

**Orientador: Prof. Dr. Gilberto Vilmar Kozloski**

**Santa Maria, RS  
2018**

Mezzomo, Mariana Patricia  
Marcadores e função dos microrganismos ruminais  
aderidos a partículas de forragem / Mariana Patricia  
Mezzomo.- 2018.  
57 p.; 30 cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Zootecnia, RS, 2018

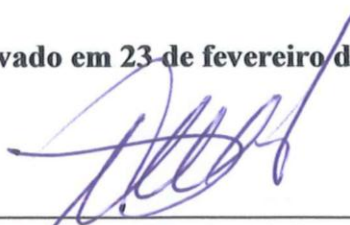
1. Degradabilidade 2. Bactérias 3. Fungos 4. Gramíneas  
5. Antimicrobianos I. Kozloski, Gilberto Vilmar II.  
Título.

**Mariana Patricia Mezzomo**

**MARCADORES E FUNÇÃO DOS MICRORGANISMOS RUMINAIS  
ADERIDOS A PARTÍCULAS DE FORRAGEM**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Zootecnia**.

**Aprovado em 23 de fevereiro de 2018:**



---

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



---

**Carla Joice Härter, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**



---

**Joao Batista Teixeira da Rocha, Dr. (UFSM)**



---

**José Luis Repetto, Dr. (UdelaR, Uruguay)**



---

**Silvio Teixeira da Costa, Dr. (UFSM)**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar e iluminar meus passos durante essa caminhada.

Aos meus pais Roberto e Teruko, pelo amor e apoio incondicional e por me incentivarem a sempre seguir estudando. Aos meus irmãos Cristina, Juliana e Leonardo, pelo carinho e companheirismo. Aos meus sobrinhos Matheus e Eric por serem uma fonte inesgotável de alegria em minha vida. Ao Cesar, pelo amor, parceria, bom humor e ajuda durante a realização deste trabalho. Não foi fácil, mas com a ajuda de vocês tudo fica mais leve. A vocês todo meu amor e gratidão!

Aos minhas amigas Simone, Suka, Mônica, Carol, Dessa, Carlinha, Júlia, Daniele, Mariana e Martinha, presentes que ganhei quando comecei a graduação. Obrigada pelo incentivo, pelas conversas, mates, jantas, viagens... Perto ou longe, vocês tornam os meus dias mais coloridos.

Ao meu orientador, Prof. Gilberto Kozloski, que durante esses dez anos de convivência me proporcionou muito aprendizado e desafios. Obrigada pela paciência, incentivo e principalmente por me fazer entender que o mundo é maior que o nosso estimado tambo. As professoras Leila e Luciana por toda ajuda, ensinamentos e conversas durante esses anos de convivência.

A equipe do LABRUMEN, Clóvis, Gisele, Vitor, Claudio, Gonzalo, Tiago, Marcelo, Flai, Letícia e todos estagiários, por colaborarem na realização desse Doutorado. Dividimos alegrias, plantões, infinitas coletas, frustrações e incertezas... Juntos conseguimos, vocês são parte essencial desse trabalho.

Aos professores Sandro Giacomini e João Batista Teixeira da Rocha por viabilizarem a realização das minhas análises e a técnica Ana Lúcia por toda ajuda e ensinamentos.

Ao professor Fernando Samodha e sua equipe que me acolheram em Lincoln, NE durante o Doutorado sanduíche. A UNL e o departamento da Animal Science pela experiência única de aprendizado e por poder conduzir parte da minha pesquisa nos seus laboratórios.

A Universidade Federal de Santa Maria, por oferecer uma infraestrutura incrível, aos professores e técnicos que foram tão importantes na minha formação. A capes pela bolsa de estudo para condução minha pesquisa de Doutorado e para realização do Doutorado Sanduíche pelo programa PDSE.

A todos você o meu muito obrigada!

*Utopia está en el horizonte.  
Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos  
y el horizonte se corre diez pasos más allá.  
Por mucho que yo camine, nunca la alcanzaré.  
Entonces para qué sirve la utopía?  
Para eso, sirve para caminar.*

*(Eduardo Galeano)*

## RESUMO

### MARCADORES E FUNÇÃO DOS MICRORGANISMOS RUMINAIS ADERIDOS A PARTÍCULAS DE FORRAGEM

AUTOR: Mariana Patricia Mezzomo  
ORIENTADOR: Gilberto Vilmar Kozloski

Na primeira etapa do estudo foi conduzido um experimento *in vitro* com o objetivo de avaliar a digestibilidade e uso de diferentes marcadores com potencial para estimar a massa microbiana aderida a partículas de forragens *in vitro*. Os marcadores utilizados foram N<sup>15</sup>, purinas, fosfato e atividade enzimática. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em que se testou o efeito de duas forragens (feno de Tifton 85 e Azevém) e quatro valores de pH inicial (5,5; 6,0; 6,5 e 7,0) em um arranjo fatorial 2x4. A digestibilidade *in vitro* da MS e da FDN aumentaram linearmente e positivamente com o aumento do pH inicial ( $p < 0,05$ ) e foram superiores para o Azevém ( $p < 0,05$ ). Os marcadores fosfato e purinas apresentaram correlação com a digestibilidade das forragens ( $p < 0,05$ ). Na segunda etapa do estudo foram realizados dois experimentos para avaliar o papel de fungos e bactérias ruminais na degradação *in vitro* de forragens em meios de incubação contendo ou não soluções antimicrobianas: Antibióticos (Ab) – solução contendo uma mistura de três antibióticos; Antifúngico (Af); Controle positivo (C+) – solução contendo Ab e Af; Controle negativo (C-) – sem a adição de antimicrobianos. No primeiro experimento foram realizados 3 ensaios *in vitro* utilizando um DIC em que se testou o efeito de duas forragens (Tifton 85 e azevém) e quatro meios de incubação em um arranjo fatorial 2x4. As variáveis avaliadas foram a digestibilidade; grau de aderência microbiana a partículas e atividade enzimática no resíduo de forragens incubadas durante 24 horas. No segundo experimento foram realizados 3 ensaios *in vitro* gás utilizado um DIC em um arranjo fatorial 2 x 4 x 8, avaliando 2 forragens, quatro meios de incubação e 8 tempos (3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 e 72 horas de incubação). Os resultados do primeiro experimento indicaram interação entre tipo de forragem e meio de incubação para a degradabilidade da MS e da FDN ( $p < 0,05$ ). Em relação ao meio de incubação C-, tanto o C+ quanto o meio com adição de Ab apresentaram redução na degradabilidade da MS, da FDN, na atividade da xilanase e nas concentrações de fosfato ( $p < 0,05$ ). A adição de Af no meio de incubação não afetou nenhuma das variáveis quando comparadas ao meio C-. No segundo experimento, para a variável volume de gás foi observada interação entre forragem x meio de incubação x tempo ( $p < 0,05$ ). O volume de gás acumulado nas duas espécies de forragem nos meios C- e Af apresentaram médias similares e superiores em relação aos meios Ab e C+ ( $p < 0,05$ ), no entanto para o feno de Tifton a partir de 24 horas de incubação o meio Ab apresentou médias superiores ao meio C+ ( $p < 0,05$ ). Os resultados indicam que fosfato e purinas podem ser utilizados como marcadores de aderência microbiana a partículas de forragem. No tempo fixo de 24 horas de incubação as bactérias foram determinantes na degradação das forragens. Em 72 horas de incubação as bactérias permaneceram desempenhando o papel mais importante na degradação das forragens, sua eficiência pode ser aumentada através da atividade dos fungos.

**Palavras-chave:** Degradabilidade. Bactérias. Fungos. Gramíneas. pH. Antimicrobianos.

## ABSTRACT

### MARKERS AND FUNCTION OF RUMINAL MICRORGANISMS ADHERED TO FORAGE PARTICLES

AUTHOR: Mariana Patricia Mezzomo  
ADVISER: Gilberto Vilmar Kozloski

The first part of this present study a set of trials were conducted to evaluate digestibility and the potential of different markers for estimating the microbial mass adhered to forage particles incubated *in vitro* during 24 hours at different pH. The experiment was conducted in a completely randomized experimental design in a 2×4 factorial arrangement, testing the effect of two forages (Tifton hay and ryegrass) and 4 values of initial pH (5.5, 6.0, 6.5 and 7.0). On average, forage degradation were higher for ryegrass than for Tifton hay ( $P<0.05$ ) and linearly and positively affected ( $P<0.05$ ) by increased pH. P and purines were the markers that showed correlation ( $P<0.05$ ) with forage degradation. In the second part of this study, two experiments were conducted to evaluate the interactive role of bacteria and fungi on forage degradation *in vitro* in medium containing or not of antimicrobial solutions: Antibiotic (Ab) - A mixture of three antibiotics; Antifungal (Af); Positive control (C+) - with both Ab and Af and Negative control (C-) - without antimicrobials. The first experiment *in vitro* 3 trials were conducted in a completely randomized experimental design in a 2×4 factorial arrangement, testing the effect of two forages (Tifton hay and ryegrass) and 4 incubation medium. The variables evaluated were forage digestibility, and microbial adherence to forage particles and enzymatic activity from the forage residue incubated during 24 hours. The second experiment it was conducted three *in vitro* gas trials in a completely randomized experimental design in a 2×4×8 factorial arrangement, testing the effect of two forages (Tifton hay and ryegrass), 4 incubation medium and 8 incubation times (3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 e 72 hours). The results from the first experiment indicate there was incubation media x forage type interaction for dry matter and FDN degradability ( $P<0.05$ ). Compared to negative control, the positive control or only Ab addition decreased dry matter and FDN degradability, xylanase activity and phosphate the concentration of decrease ( $P<0.05$ ). The addition of only Af in the incubation medium did not affect any variable compared to negative control. In the second experiment there was media incubation x forage type x incubation time interaction for gas production variable ( $P<0.05$ ). The accumulate gas production when was add only Af in the incubation medium had similar gas volume compared to negative control, and both medias presented higher values compare to Ab and C+ ( $P<0.05$ ). However, for Tifton hay the addition of Ab showed that the accumulated gas volume was higher than C+ ( $P<0.05$ ) after 24 hours. The results indicate that phosphate and purines can be used to estimate microbial adherence to forage particles, with phosphate having analytical and cost advantages over the other markers. At fixed 24 hours *in vitro* incubation bacteria activity was more relevant on determining forage degradation. In 72 hours of *in vitro* fermentation bacteria also had the most important role on forage degradation, however, was increased by fungi activity.

**Keywords:** Degradability, bacteria, fungi, grasses, pH, antimicrobials.



## LISTA DE FIGURAS

### 1 INTRODUÇÃO

Figura 1– Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de resíduo de (A) e (B) *Lolium multiflorum*, (C) e (D) *Cynodon spp.*, após 24 horas de incubação *in vitro*. Setas indicam a presença de bactérias (A e C) e fungos (B e C) na parede interna das células vegetais. (Fotografias publicadas previamente em Mezzomo, 2014)..... 16

### 4 CAPÍTULO 2 FUNÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS RUMINAIS NA DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS INCUBADAS *IN VITRO*

Figura 2 - Média da produção acumulada de gás de amostras de forragens incubadas *in vitro* sobre efeito dos meios de incubação antibiótico (Ab); antifúngico (Af); controle positivo (C+) e controle negativo (C-). Diferenças nas letras estabelece diferenças nas médias de volume de gás entre os meios de incubação dentro do mesmo horário. E.P.M: 12.06. ....43

## LISTA DE TABELAS

### **3 CAPÍTULO 1 AVALIAÇÃO DE MARCADORES PARA ESTIMAR O GRAU DE ADERÊNCIA MICROBIANA A PARTÍCULAS DE FORAGEM *IN VITRO***

- Tabela 1- Degradação da matéria seca (MS), concentração dos marcadores microbianos em amostras de Azevém (*Lolium multiflorum*) e feno de Tifton em amostras de Azevém (*Lolium multiflorum*) e feno de Tifton (*Cynodon ssp.*) após 24 horas de incubação *in vitro*. .....29
- Tabela 2 - Coeficientes de correlação de Pearson entre pH, digestibilidade e concentração dos marcadores microbianos em resíduos de forragens após 24 horas de incubação *in vitro*..... 30

### **4 CAPÍTULO 2 FUNÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS RUMINAIS NA DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS INCUBADAS *IN VITRO***

- Tabela 1 -Degradação da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN), aderência microbiana e atividade da xilanase no resíduo de amostras de Azevém (AZ) e feno de Tifton (FT) após 24 horas de incubação *in vitro* em resposta a adição de antibióticos e/ou antifúngico. ....42

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO</b> .....	<b>11</b>
2.1 FERMENTAÇÃO RUMINAL E MICRORGANISMOS FIBROLÍTICOS .....	11
2.2 ADERÊNCIA DE POPULAÇÕES MICROBIANAS FIBROLÍTICAS A PARTÍCULAS DE ALIMENTO .....	13
2.3 MÉTODOS UTILIZADOS PARA ESTIMAR ADERÊNCIA MICROBIANA A PARTÍCULAS DE ALIMENTO .....	15
2.4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS .....	20
2.5 OBJETIVOS .....	21
<b>3 CAPÍTULO 1 AVALIAÇÃO DE MARCADORES PARA ESTIMAR O GRAU DE ADERÊNCIA MICROBIANA A PARTÍCULAS DE FORAGEM <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>22</b>
RESUMO .....	22
ABSTRACT .....	22
INTRODUÇÃO .....	23
MATERIAL E MÉTODOS .....	24
RESULTADOS .....	28
DISCUSSÃO .....	30
CONCLUSÃO .....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
<b>4 CAPÍTULO 2 FUNÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS RUMINAIS NA DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS INCUBADAS <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>35</b>
RESUMO .....	35
ABSTRACT .....	35
INTRODUÇÃO .....	36
MATERIAL E MÉTODOS .....	37
RESULTADOS .....	41
DISCUSSÃO .....	43
CONCLUSÕES .....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47
<b>5 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>50</b>
<b>6 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>52</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A fermentação microbiana dos materiais vegetais no rúmen desempenha um papel central na digestão e nutrição de ruminantes. A habilidade do animal ruminante em utilizar carboidratos estruturais como fonte de energia é decorrente de uma relação simbiótica estabelecida com os microrganismos ruminais (KOIKE e KOBAYASHI, 2009). A etapa inicial para a degradação dos alimentos é a aderência dos microrganismos às partículas de alimento que chegam ao rúmen.

Entre os microrganismos ruminais envolvidos no processo de aderência, encontram-se as bactérias e fungos. No ecossistema ruminal, considera-se que as bactérias desempenham o papel principal devido a sua maior representatividade e capacidade de metabolizar diversos substratos (CHENG et al., 1991). No entanto, os fungos possuem a capacidade superior às bactérias em romper e degradar as barreiras estruturais da parede celular das plantas (AKIN e BORNEMAN, 1989). A colonização do material vegetal pelos zoósporos móveis é considerado uma etapa decisiva na degradação e também essencial para o ciclo de vida dos fungos anaeróbicos (EDWARDS et al., 2008). Devido à complexa natureza do ambiente ruminal ainda é difícil se estimar com precisão a real contribuição de cada um desses grupos na degradação e fermentação da parede celular das plantas (LEE et al., 2000).

A quantificação do grau de aderência microbiana a partículas de alimentos é uma questão de grande importância em estudos de nutrição de ruminantes, para que se possa ter uma melhor compreensão sobre participação e interações entre os microrganismos ruminais. Apesar de alguns métodos terem sido descritos na literatura para se realizar esta quantificação, através da utilização de marcadores externos e/ou por meio de marcadores internos não existe um marcador que seja considerado como padrão para estimar aderência microbiana a partículas de alimento e que possa ser utilizado de forma completamente satisfatória. A maior parte dos métodos disponíveis é de difícil execução, envolvem numerosas etapas para o preparo das amostras e/ou emprego de padrões e reagentes caros e equipamentos que utilizam procedimentos analíticos de grande complexidade (CARRO e MILLER, 2002).

Dessa forma visando melhorar os conhecimentos dos fatores e mecanismos envolvidos na fermentação ruminal dos alimentos, em especial os envolvidos na degradação dos componentes fibrosos, o presente estudo conduzido com o objetivo de avaliar o uso de potenciais marcadores de aderência microbiana a partículas de forragem incubadas *in vitro* e estudar as interações entre as populações microbianas ruminais.

## 2 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

### 2.1 FERMENTAÇÃO RUMINAL E MICRORGANISMOS FIBROLÍTICOS

Em sistemas de produção de ruminantes que utilizam dietas a base de forragem, a maior parte da energia é obtida através da fermentação dos carboidratos fibrosos. Além, de proporcionar energia para o animal, mesmo em sistemas intensivos de produção alimentos volumosos são incorporados a dieta para manter o funcionamento normal do rúmen e também por motivos econômicos (KRAUSE et al., 2003).

O aproveitamento dos compostos fibrosos é decorrente da atividade física e microbiológica, envolvendo a participação de uma complexa e densa população de microrganismos presente no rúmen (OWENS e GOETSCH, 1993). A microbiota do ecossistema ruminal é composta por bactérias ( $10^{10} - 10^{11}$ /ml), protozoários ( $10^4 - 10^6$ /ml) e fungos ( $10^3 - 10^5$ /ml) (KAMRA, 2005). Aumentar a capacidade dos microrganismos ruminais em degradar a parede celular dos vegetais é considerando um aspecto relevante, uma vez consequentemente proporcionaria ganho no desempenho do animal (FOX et al., 1995).

Entre os carboidratos fibrosos mais abundantes na parede celular das plantas encontra-se a celulose, dessa forma os microrganismos fibrolíticos desempenham um papel fundamental na nutrição de ruminantes que recebem dietas com grandes proporções de forragens (WEIMER, 1996). As bactérias ruminais por sua maior representatividade tem sido continuamente estudadas e são consideradas colonizadoras primárias da degradação da fibra, já os protozoários não são considerados essenciais no processo de digestão da fibra. Além disso, estudos indicam que na ausência dos protozoários observou-se aumento no número de bactérias e a digestão da fibra foi mantida (EADIE e GILL, 1971).

Entre as bactérias fibrolíticas ruminais estão as espécies *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium cellulosolvens* e *Eubacterium ruminantium* (STEWART et al., 1997). Baseado em seu maior número e maior habilidade em degradar a celulose das forragens as espécies *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* (33,0%, 2,6% e 46,0%, respectivamente) são consideradas as representantes das espécies celulolíticas no rúmen (KOIKE e KOBAYASHI, 2009).

A contribuição dos protozoários na digestão de carboidratos estruturais ocorre de forma diferente das observadas nas populações de bactérias e fungos. Os protozoários ingerem as partículas de forragem por fagocitose (Coleman, 1992) e a digestão da fibra ocorre

por um processo físico. As espécies de protozoários envolvidas na digestão de fragmentos de tecido vegetal são os do gênero *Diplodinium* e *Eudiplodinium* (ORPIN, 1988).

Até meados dos anos 70 acreditava-se que apenas bactérias e protozoários habitavam o rúmen, quando então foram apresentados os primeiros relatos sobre a existência dos fungos foi descrito por ORPIN (1975). Os fungos ruminais são divididos em dois grupos baseados no desenvolvimento dos esporângios: policentricos (*Orpinomyces*, *Anaeromyces* e *Cyllamyces*) e monocentricos (*Neocallimastix*, *Piromyces* e *Caecomyces*) (SIROHI et al., 2013). Antes da descoberta dos fungos acreditava-se que somente bactérias estavam envolvidas na hidrólise da biomassa vegetal, no entanto atualmente é bem estabelecido que os fungos participam efetivamente na digestão da fibra pelos ruminantes (LEE et al., 2004).

Entre os microrganismos ruminais os fungos anaeróbicos apresentam as mais potentes enzimas fibrolíticas e estas desempenham um papel catalítico importante na digestão da fibra das plantas, o qual ocorre por meio da quebra da fibra através da penetração e expansão das hifas (PAUL et al., 2010). Os fungos ruminais aparentam ser superiores as bactérias em sua capacidade romper e degradar barreiras estruturais do tecido vegetal (AKIN E BORNEMAN, 1989). Contudo, sua taxa de crescimento e digestão dos polissacarídeos é mais lenta que a das bactérias, o que pode ser devido ao seu ciclo de vida mais complexo (DEHORITY e TIRABASSO, 2000). No entanto a extensão do envolvimento dos fungos na degradação dos alimentos ainda não está bem esclarecida, devido às dificuldades em se estimar a biomassa dos fungos ruminais. A determinação do tamanho da população de um microrganismo é considerada uma etapa fundamental na compreensão de sua função e atividade desempenhada (LWIN et al, 2010).

As relações de sinergismo ou antagonismo entre os diferentes tipos de microrganismos ruminais e também entre os diversos gêneros pertencentes ao mesmo grupo são variadas e complexas o que torna difícil de mensurar a função específica de um grupo de microrganismo no rúmen (KARMA, 2005). Alguns estudos conduzidos artificialmente em laboratório, simulando as condições do ambiente ruminal têm procurado elucidar as lacunas envolvendo a participação de bactérias, fungos e protozoários na degradação da parede celular das forragens.

Lee et al. (2000) avaliou a contribuição relativa de bactérias, protozoários e fungos através do uso de tratamentos físicos como homogeneização, centrifugação, filtração e esterilização por calor e ou químicos através da adição agentes antimicrobianos para manipular o crescimento e seleção de um grupo específico de microrganismo. Os resultados obtidos demonstraram que os sistemas contendo bactérias e protozoários apresentaram relação

de sinergismo, com uma maior atividade enzimática quando comparado com o sistema de monocultura contendo apenas fungos.

Dehority e Tirabasso (2000) monitoraram o crescimento de fungos e bactérias e a digestão de amostras pura de celulose e amostras de alfafa em meios de incubação com a adição de antibióticos (penicilina e estreptomicina) ou antifúngico (cicloheximida). Os resultados por eles indicaram que o crescimento dos fungos foi inibido na presença de bactérias e que a taxa de crescimento e digestão da celulose foi menor pelos fungos. Kamra (2005) relatou que estudos *in vitro* indicaram que ao remover os fungos ruminais do conteúdo ruminal foi observada uma significativa redução na produção de gás e na degradação de alimentos fibrosos, indicando uma função positiva dos fungos na degradação da fibra.

## **2.2 ADERÊNCIA DE POPULAÇÕES MICROBIANAS FIBROLÍTICAS A PARTÍCULAS DE ALIMENTO**

A aderência microbiana representa a etapa inicial para que ocorra a degradação da fração insolúvel do substrato. Esse processo permite aumentar o tempo de retenção dos microrganismos no rúmen, possibilita que as enzimas presentes na membrana externa das bactérias entrem em contato com os substratos, garantindo que os produtos finais da fermentação estejam preferencialmente disponíveis para os microrganismos aderidos (RODERICK e WITHE, 1990). Também permite o desenvolvimento das populações aderidas às partículas de alimento e a sua estabilidade no meio ambiente ruminal. O crescimento das bactérias fibrolíticas e fungos ruminais está intimamente associado à parede celular dos materiais por eles colonizados (CHENG et al., 1991), enquanto que os protozoários são fracamente associados as partículas de forragem.

Os microrganismos aderidos as partículas de alimento são numericamente predominantes, representando cerca de 75 % do total da população microbiana ruminal e da produção de ATP (CRAIG et al., 1987; MIRON et al., 2001; KIM et al., 2013). A produção de celulasas e hemicelulasas também são maiores nessas populações quando comparadas as associadas ao fluido ruminal (WILLIAMS e STRACHMAN, 1984). Os microrganismos aderidos são responsáveis pela maior parte da digestão dos alimentos no rúmen.

O processo de aderência está organizado em quatro fases: 1) O transporte da bactéria ao substrato fibroso; 2) Adesão não específica de microrganismos 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 íntima associação com a parede celular das plantas parece ser realizada através de uma estrutura molecular denominada celulosoma a qual facilita o processo de aderência (KRAUSE et al., 2003; BAYER et al., 2004). O celulosoma é um complexo multienzimático grande e estável especializado na adesão e degradação da celulose, fornecendo uma vantagem competitiva direta as células microbianas em utilizar os produtos solúveis liberadas pela hidrólise do substrato (SCHWARZ, 2001). É possível que assim como as bactérias, os fungos ruminais também possuam uma estrutura semelhante aos celulosomas envolvidas no seu processo de adesão a celulose (STEENBAKKERS et al., 2001; FREELOVE et al., 2001).

Segundo MIRON et al. (2001), diversos fatores podem interferir no processo durante a aderência dos microrganismos aos substratos, os quais podem estar relacionados: aos microrganismos; podem envolver características do substrato (cutícula de proteção, tecidos internos, compostos fenólicos, área superficial, hidratação, carga iônica e capacidade de troca catiônica) e fatores aspectos relacionados ao meio ambiente ruminal (pH, temperatura, presença de O<sub>2</sub>, cátions e carboidratos solúveis).

Entre os fatores ambientais, o pH ruminal exerce forte impacto sobre as populações fibrolíticas. Muitos aspectos do metabolismo dos microrganismos podem ser influenciados pelas variações do pH ruminal, entre eles estão a utilização de carbono e fontes de energia, a eficiência com que degradam os substratos e a síntese de proteína (GOTTSCHALK, 1986). Hu et al. (2004) avaliou a fermentação da celulose por diferentes microrganismos ruminais sob diferentes valores de pH e estudou também a cinética da fermentação. Os resultados demonstraram que a queda do pH resultou em um atraso no *lag time*, redução na taxa de hidrólise e mudança na relação acetato:propionato, sugerindo que as variações no pH levam a uma mudança na distribuição dos produtos da fermentação.

A qualidade das forragens utilizadas pode afetar a atividade dos microrganismos fibrolíticos, impactando a degradação da forragem, o processo de aderência e a atividade das enzimas fibrolíticas. A extensão desses efeitos estão relacionadas às diferentes estruturas anatômicas e características químicas das forragens utilizadas como substrato (AKIN, 1989, WILSON, 1994). A parede celular das plantas é composta primariamente por açúcares arranjados em polissacarídeos com composições e estruturas diferentes, lignina, proteína, cátions e água.

Gramíneas C<sub>3</sub> são mais digestíveis em relação as C<sub>4</sub> devido as diferentes proporções e



arranjos dos tecidos da parece celular. O mesófilo e floema de ambas gramíneas são degradados rapidamente, no entanto a digestão das C<sub>4</sub> é mais lenta em função da maior concentração de compostos fenólicos e a disposição justaposta e compacta dos tecidos (AKIN, 1989), o que dificulta o acesso dos microrganismos ruminais.

A mastigação e os processamentos mecânicos contribuem para redução do tamanho das partículas de alimento e aumentam a área superficial disponível para a aderência microbiana e a atividade enzimática (BOWMAN e FIRKINS, 1993). A salivação durante a mastigação tem como papel umedecer o alimento ingerido, o qual é necessário para a associação do microrganismo com a partícula de alimento e iniciar o processo de aderência. A salivação também serve como um tampão do fluido ruminal prevenindo o desenvolvimento de pH baixos (MCALLISTER, 1994).

### **2.3 MÉTODOS UTILIZADOS PARA ESTIMAR ADERÊNCIA MICROBIANA A PARTÍCULAS DE ALIMENTO**

Kozloski et al. (2007), conduziram ensaios *in vitro* utilizando diferentes forragens e diferentes tempos de incubação e determinaram por diferença de peso a quantidade de microrganismos aderidos a partículas de forragem. Para a remoção dos microrganismos dos resíduos de incubação foi utilizado tratamento químico. Os resultados observados permitiram identificar diferenças nas forragens e o tempo máximo de colonização dos microrganismos as partículas de forragem .

O uso da microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem demonstrado ser uma ferramenta importante em estudos que envolvem a qualidade das forragens utilizadas na nutrição de ruminantes. Através de imagens (Figura 1) obtidas com a MEV é possível avaliar as configurações anatômicas dos tecidos vegetais e sua susceptibilidade dos mesmos ao ataque dos microrganismos ruminais, identificar dos grupos de microrganismos envolvidos na etapa inicial da degradação da fibra e as interações físicas que os microrganismos e o alimento (AKIN, 1986; MEZZOMO, 2014).

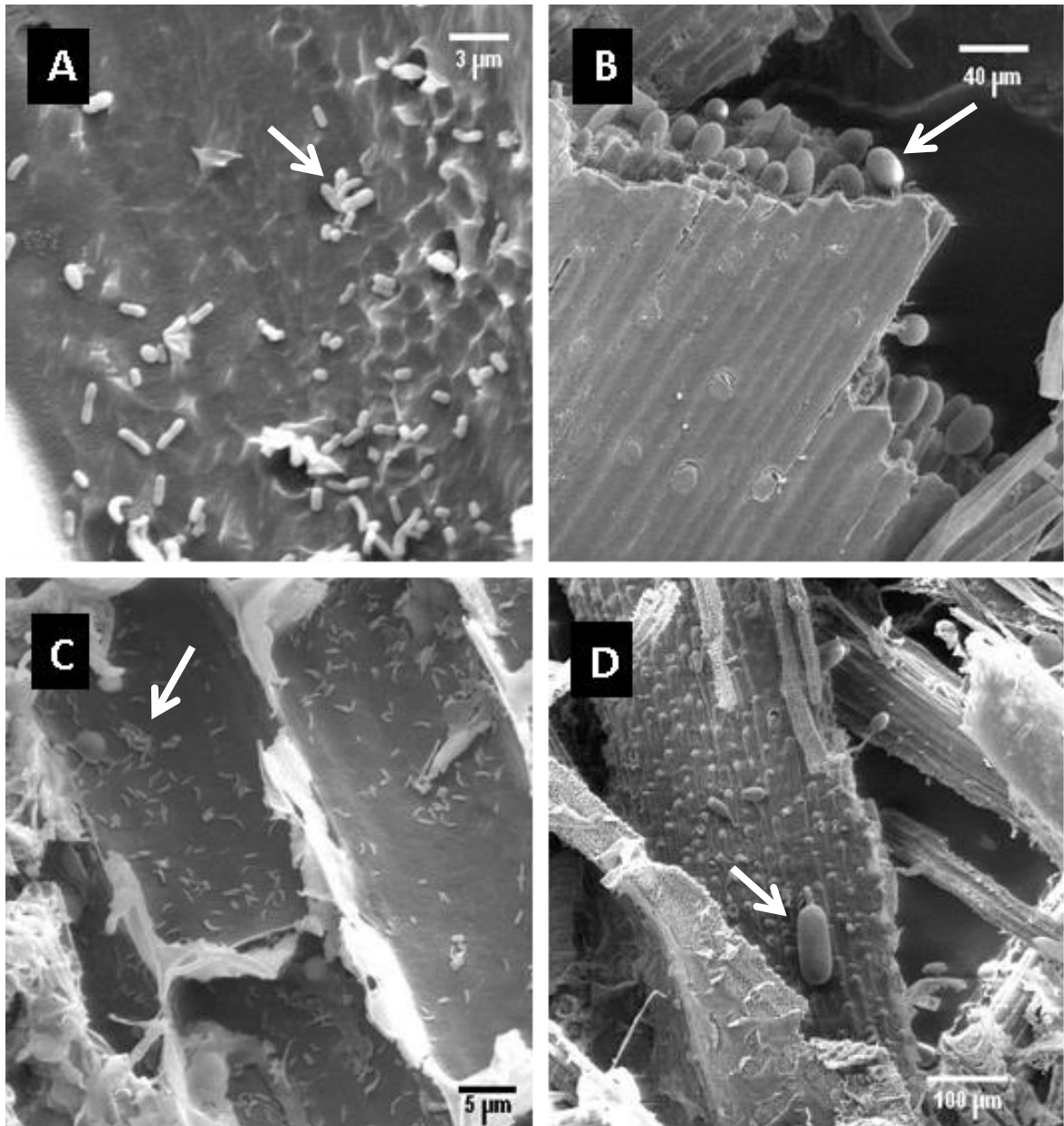


Figura 1– Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de resíduo de *Lolium multiflorum* (A e B) e *Cynodon spp.* (C e D), após 24 horas de incubação *in vitro*. Setas indicam a presença de bactérias (A e C) e fungos (B e D) na parede interna das células vegetais. (Fotografias publicadas previamente em Mezzomo, 2014).

Merry e McAllan (1983) utilizaram MEV como método complementar para avaliar a eficiência no uso de tratamentos para a remoção de microrganismos aderidos a fibra. Akin e Borneman (1989) identificaram os tecidos nos quais os fungos ruminais preferencialmente iniciam o processo de colonização. Guimarães-Beelen et al. (2006) identificaram através da MEV o efeito da presença de taninos em espécies brasileiras de leguminosas sobre a colonização microbiana. Essa técnica proporciona uma comprovação visual do processo de aderência, sendo considerado um método qualitativo.

Ao se avaliar a aderência microbiana a partículas de alimento não possível realizar a quantificação de forma direta, sendo então utilizados marcadores microbianos externos e internos. Apesar do processo de aderência ser considerado como o ponto crítico na etapa inicial da degradação de forragens ainda não existe nenhum método que seja utilizado como padrão para medir a aderência microbiana a amostras de alimentos, de forma que várias metodologias e marcadores têm sido utilizados para estudar esse parâmetro (FARENZENA et al., 2013).

O emprego de marcadores externos utiliza o princípio de que estes devem ser fornecidos aos animais experimentais ou adicionados ao meio de incubação para que possam ser incorporados pelos microrganismos ruminais e utilizados em suas estruturas (CARRO e MILLER, 2002). O  $N^{15}$  é um dos marcadores externos mais amplamente empregado em estudos *in situ* (Kaumon et al., 2006) e *in vitro* (FIRKINS et al.; 1991; CARRO e MILLER, 2002; RANILLA e CARRO 2013).

A preferencia pelo uso do  $N^{15}$  em relação aos outros marcadores externos está relacionada a características que esse marcador apresenta, tais como: ser um isótopo estável, portanto não apresenta riscos ao meio ambiente; os alimentos fornecidos aos animais não apresentam enriquecimentos de  $N^{15}$  superiores a sua abundância natural (0,366%) e são incorporados por todos microrganismos ruminais (CARRO, 2001). O  $N^{15}$  é administrado na forma de sais amoniacais como,  $N^{15}H_4Cl$  e de ureia ( $N^{15}H_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sendo rapidamente solubilizados em água.

As análises envolvendo a determinação de enriquecimento por  $N^{15}$  nas amostras são realizadas por espectrofotometria de massa. A vantagem desta análise está relacionada com a precisão e exatidão de sua análise, permitindo a detecção de enriquecimentos de até 0,001% acima do enriquecimento natural. No entanto, o uso do  $N^{15}$  pode apresentar algumas desvantagens relacionadas ao elevado preço deste isótopo (variando em função da fonte e da percentagem de enriquecimento com o átomo); preparo das amostras é trabalhoso e o custo para a realização das análises, uma vez que requer equipamentos complexos e caros, tornando essa técnica menos acessível a muitos laboratórios (CARRO, 2001).

Em contra partida o uso de marcadores internos baseia-se no princípio de serem substâncias que constituem as células microbianas, não havendo assim a necessidade de serem administrados ao animal em experimentos *in vivo/in situ* ou no meio de incubação quando utilizados em experimentos *in vitro*.

O emprego dos ácidos nucleicos (ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA)) e purinas como marcadores internos de aderência bacteriana é devido à presença de

altas concentrações dessas substâncias nos organismos unicelulares (BRODERICK e MERCHEN, 1992). Os ácidos nucleicos são constituídos por nucleotídeos, os quais são formados por uma base nitrogenada, uma pentose e um fosfato. As bases nitrogenadas são derivadas de dois compostos parentais: pirimidinas e purinas. O DNA e o RNA possuem duas bases púricas principais: adenina e guanina (NELSON e COX, 2002).

Uma das vantagens do uso de purinas como marcador seria o método empregado para a sua determinação. O método proposto por Zinn e Owens (1986) é amplamente utilizado em estudos para a quantificação de purinas devido a sua simplicidade, menor custo e por não utilizar equipamentos sofisticados quando comparado a análise de outros marcadores. Neste método utiliza-se o princípio da hidrólise oxidativa dos ácidos nucleicos e na precipitação das bases púricas com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) em um pH variando entre 2-3 (MAKKAR e BECKER, 1999).

Outro marcador microbiano relatado na literatura em estudos de aderência é o ácido diaminopimélico (DAPA). O DAPA é um aminoácido que está presente na parede celular de várias bactérias ruminais. Koike e colaboradores (2003) avaliaram o efeito da mastigação no acesso dos microrganismos ruminais ao colmo de feno do gênero *Dacylis*, utilizando DAPA como marcador de aderência bacteriana. Merry e McAllan (1983) avaliaram diferentes procedimentos para remover bactérias associadas à fração sólida da digesta ruminal. A eficiência dos procedimentos para realizar a remoção das bactérias da fibra foi determinada através da quantidade total de DAPA removido, assumindo que todo DAPA contido nos resíduos de fibra era de origem microbiana .

A determinação do DAPA pode ser realizada por métodos tradicionais como o proposto por Czerkwaski (1974). Neste método a quantificação do DAPA na digesta ruminal é realizada por meio de uma hidrólise inicial da amostra, seguida pela separação dos aminoácidos por cromatografia de troca iônica e por último a determinação com ninhidrina. Apesar deste método ser menos oneroso, sua aplicação apresenta limitações por ser uma análise bastante trabalhosa, requer inúmeras etapas para preparação das amostras e está sujeita a contaminação com aminoácido prolina.

Em contra partida novas metodologias para a determinação do DAPA foram desenvolvidas, como apresentada por Webster et al. (1990). Este método utiliza a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), apresentando boa sensibilidade e reprodutibilidade para a determinação do DAPA em amostras de bactérias e digesta ruminal. O tempo para preparo das amostras é menor quando comparado ao método convencional de

cromatografia por troca iônica. No entanto, este método emprega equipamentos especializados aumentando o custo da análise do DAPA.

O uso atividade enzimática dos microrganismos fibrolíticos também se apresenta como um promissor marcador de aderência. Bactérias e fungos produzem uma grande variedade de enzimas ativas na degradação dos tecidos fibrosos das plantas (KOIKE e KOBAYASHI, 2009). A quantificação da atividade fibrolítica da carboximetilcelulase e xilanases podem ser bons indicadores da digestão da fibra em dietas a base de gramíneas e silagens (HUHTANEN e KHALILI, 1992).

Firkins et al., 1991 concluiu que a atividade da carboximetilcelulase pode fornecer uma avaliação qualitativa sobre a colonização de bactérias celulolíticas relativa ao total celulose presente no substrato. Os resultados obtidos por Silva et al. (1987) ao medir a atividade da carboximetilcelulase de amostras incubadas *in situ* por 24 e 48 horas indicaram alta correlação com a digestibilidade. No entanto, a validação da atividade enzimática como marcador demanda mais estudos envolvendo culturas mistas de microrganismos e comparativo com outros marcadores.

Baseado na mesma premissa do uso dos ácidos nucleicos e das purinas, fosfato apresenta um grande potencial de ser utilizado como marcador de aderência microbiana. O fosfato está presente em grandes quantidades nas células vivas, constituindo sistemas moleculares relacionados ao código genético (DNA e RNA) e desempenha papel estrutural (fosfolípidios) representando assim um elemento chave no metabolismo celular. As concentrações de fósforo nas células microbianas ruminas variam entre 6 a 19 g/Kg de matéria seca (RAMIREZ-PÉREZ et al., 2009).

Estudos conduzidos previamente relatam o uso do fósforo para medir grau de aderência bacteriana em amostras puras de celulose ou algodão (Mouriño et al., 2001) e de gramíneas (*Lolium multiflorum* e *Cynodon spp*) (Farenzena et al. (2013) incubadas *in vitro*, contudo os resultados obtidos com o P não foram comparados com outros marcadores validados na literatura. A técnica para determinação de fosfato pelo método proposto por Fiske e Subbarov (1925) utiliza etapas para o preparo da amostra que são de execução simples e faz uso de reagentes e equipamentos convencionais presentes em laboratórios de pesquisa.

Grande parte dos estudos realizados no século 20 na área da microbiologia do rúmen envolveu o uso de técnicas convencionais de cultura, nas quais era necessário realizar o cultivo dos microrganismos e quantificação e identificação, demandando muito tempo e trabalho (MCSWEENEY et al., 2009). A dificuldade em identificar os microrganismos está relacionada ao fato de 70% das bactérias ruminais estarem fortemente aderidas às partículas

de alimento (FORSBERG e LAM, 1977). Os microrganismos ao se aderirem estabelecem à formação de biofilmes, tornando-se estáveis o que dificulta a sua remoção das partículas (MCALLISTER, 1994).

Atualmente, com o avanço das técnicas moleculares, as técnicas convencionais vêm sendo substituídas por métodos que analisam os ácidos nucleicos, em especial os que envolvem os genes 16S/18S rRNA, os pesquisadores têm sido capazes de realizar o monitoramento das espécies de bactérias e fungos anaeróbicos ruminais e a compreensão da função complexo ecossistema ruminal (MCSWEENEY et al., 2009). Uma das vantagens dos métodos moleculares seria possibilidade de quantificar os microrganismos aderidos ao substrato, sem a necessidade de realizar procedimentos prévios para removê-los das partículas de alimento.

Entre as diversas técnicas moleculares, a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) é uma poderosa ferramenta que permite a rápida quantificação de uma sequência de DNA alvo, através do desenho de um conjunto de primers específicos. Essa técnica tem sido empregada com sucesso em amostras extraídas do conteúdo ruminal (TAJIMA et al., 2001). Edwards et al. (2007; 2008) utilizando a qPCR caracterizou a dinâmica da colonização inicial realizada por bactérias e fungos ruminais em amostras frescas de forragens. Assim como os métodos tradicionais estas técnicas também apresentam desvantagens relacionadas ao elevado custo dos reagentes utilizados para realizar as extrações de DNA e técnicos e equipamentos especializados para determinação das análises.

Dos métodos clássicos ou tradicionais apresentados anteriormente, nenhum demonstrou ser capaz de atender todas as características ideais de um marcador microbiano para estimar aderência. 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.

## **2.4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS**

Existe relação direta entre a concentração de qualquer marcador de aderência microbiana no resíduo de incubação com a degradação da forragem.

Existe interação positiva entre a atividade dos fungos e bactérias ruminais sobre a degradação ruminal de gramíneas forrageiras.

## 2.5 OBJETIVOS

Avaliar o uso de potenciais marcadores (N15, purinas, fosfato e atividade da enzima xilanase) de aderência microbiana ruminal a partículas de forragens incubadas *in vitro*;

Avaliar o papel dos fungos e sua interação com as bactérias ruminais na degradação *in vitro* de forragens.

### 3 CAPÍTULO 1

## AVALIAÇÃO DE MARCADORES PARA ESTIMAR O GRAU DE ADERÊNCIA MICROBIANA A PARTÍCULAS DE FORAGEM *IN VITRO*

### RESUMO

A aderência microbiana a partículas de forragem é um processo que precede a utilização do substrato. Essa etapa inicial é essencial para a digestão de polissacarídeos estruturais da planta. O presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a digestibilidade e uso de diferentes marcadores com potencial para estimar a massa microbiana aderida a partículas de forragens incubadas *in vitro* por 24 horas em meios de incubação com diferentes valores iniciais de pH. Os marcadores utilizados foram N<sup>15</sup>, purinas, fosfato e atividade da enzima xilanase. Foram realizados 3 ensaios para cada tipo de forragem, utilizado um delineamento inteiramente casualizado em que se testou o efeito de duas forragens (feno de Tifton 85 e Azevém) e quatro valores de pH inicial (5,5; 6,0; 6,5 e 7,0) em um arranjo fatorial 2 x 4. A degradação da MS e da FDN foram maiores para Azevém em relação ao feno de Tifton ( $p < 0,05$ ) e foram linearmente e positivamente afetados pelo aumento do pH do meio de incubação ( $p < 0,05$ ). As concentrações dos marcadores aumentaram linearmente e positivamente com o aumento do pH ( $p < 0,05$ ) e variaram com o tipo de forragem ( $p < 0,05$ ), exceto para atividade da xilanase. Os marcadores fosfato e purinas apresentaram correlação com a digestibilidade da MS e da FDN das forragens ( $p < 0,05$ ). Os resultados desse estudo indicaram que fósforo e purinas podem ser utilizados como marcadores de aderência microbiana a partículas de forragem. Contudo, o fosfato foi mais sensível em detectar diferenças entre espécies forrageiras e usa procedimento analítico mais simples do que purinas.

**Palavras-chave:** Microrganismos ruminais, digestibilidade, N<sup>15</sup>, purinas, atividade enzimática e fosfato.

## EVALUATION OF MARKERS TO ESTIMATE *IN VITRO* MICROBIAL ADHERENCE DEGREE TO FORAGE PARTICLES

### ABSTRACT

Microbial attachment to the feed particles it is a process that precedes the substrate utilization and is an essential step for the digestion of plant structural polysaccharides. The present study was conduct to evaluate digestibility and the potential of different markers for estimating the microbial mass adhered to forage particles incubated *in vitro* during 24 hours at different values of initial pH. The microbial markers used were <sup>15</sup>N, purines, phosphate and xylanase activity. The experiment was conducted in triplicate in a completely randomized experimental design in a 2×4 factorial arrangement, testing the effect of two forages (Tifton hay and ryegrass) and 4 values of initial pH (i.e. 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0). On average, forage degradation were higher for ryegrass than for Tifton hay ( $P < 0.05$ ) and linearly and positively affected ( $P < 0.05$ ) by increased pH. The markers concentration increased linearly and positively with increasing pH ( $P < 0.05$ ) and varied with forage type ( $P < 0.05$ ), except for xylanase activity. phosphate and purines showed correlation ( $P < 0.05$ ) with DM and NDF degradation. The



results indicate that phosphate and purines can be use to estimate microbial adherence to forage particles. However phosphate was more sensitive to detect differences between forage species and have analytical and cost advantages over purines.

**Key words:** Ruminal microorganisms, digestibility,  $^{15}\text{N}$ , purines, enzymatic activity and phosphate

## INTRODUÇÃO

Os polímeros de carboidratos presentes na parede celular vegetal são indigestíveis para a maior parte dos animais, contudo podem ser hidrolisados e fermentados por uma gama microrganismos do rúmen. A fermentação ruminal destes carboidratos tem como produto final os ácidos graxos, os quais constituem a principal fonte de energia para o animal ruminante (KRAUSE et al., 2003). Dessa forma, o melhor desempenho dos ruminantes está associado à capacidade que seus microrganismos possuem em utilizar os alimentos no rúmen (NAGPAL et al., 2010).

A aderência microbiana às partículas de alimento é um processo que precede a utilização do substrato e representa um passo essencial para a degradação de polissacarídeos estruturais (MORGAVI et al., 2004). Vários fatores podem afetar o processo de aderência microbiana, os quais podem estar relacionados à população microbiana; características do substrato e fatores relacionados ao meio ambiente ruminal (MIRON et al., 2001).

Estudos prévios tem procurado demonstrar a relação entre a degradação e a aderência microbiana as partículas da fibra. Kim et al. (2003) avaliaram o efeito da metilcelulose na aderência de bactérias fibrolíticas e na digestão ruminal da palha de arroz. A adição de metilcelulose no meio de incubação inibiu tanto a aderência das bactérias fibrolíticas ao substrato fibroso quanto a digestão da fibra, demonstrando a importância da aderência microbiana na digestão da fibra.

Roger et al (1992) avaliaram o efeito de diferentes níveis de inclusão de glicerol na dieta sobre o crescimento, aderência e a atividade de enzimas fibrolíticas de bactérias e fungos ruminais e verificaram que no nível de 5% o total de matéria seca degradada foi reduzida para *R. flavefaciens*, sendo o efeito glicerol ainda mais impactante para sobre os *N. frontalis*. Farenzena et al. (2013) estudaram o impacto do pH sobre a digestibilidade e aderência microbiana a gramíneas de clima tropical e temperado e observaram relação entre pH e digestibilidade e entre aderência e digestibilidade da FDN.

Kozloski et al. (2007), avaliaram a colonização microbiana, degradação e cinética da

produção de gás de diferentes forragens. Para a quantificação dos microrganismos aderidos ao resíduo de incubação as amostras de resíduo receberam tratamento químico para realizar a remoção dos microrganismos aderidos e o total de microrganismos aderidos foi estimado por diferença de peso. Os resultados obtidos permitiram identificar diferenças nas quantidades de microrganismos entre as forragens e o tempo máximo de colonização de 24 horas.

A avaliação da aderência microbiana a partículas de forragem não pode ser realizada de forma direta, sendo necessário o uso de marcadores para quantificar o total de microrganismos aderidos. Apesar de vários trabalhos já terem sido conduzidos abordando este tema, não foi observado um estudo que tenha analisado todos eles de forma sistemática. Entre métodos descritos para se realizar a quantificação de microrganismos aderidos estão o uso 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, elevado custo financeiro e equipamentos que utilizam procedimentos analíticos complexos.

O presente trabalho realizou um estudo comparativo com o objetivo de avaliar o potencial de quatro marcadores microbianos (N15, purinas, fosfato e atividade da enzima xilanase) para estimar o total de microrganismos aderidos de às partículas de forragem.

## MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio *in vitro* foram conduzidos com o objetivo de medir a digestibilidade de forragens quando submetidas a diferentes pH iniciais e avaliar o uso dos marcadores  $N^{15}$ , purinas, fosfato e atividade enzimática para estimar o grau de aderência microbiana a partículas de forragem.

### Caracterização e preparação de amostras para incubações *in vitro*

Amostras de feno de Tifton 85 (*Cynodon* spp. contendo por kg de matéria seca 780,8 g de fibra em detergente neutro, 424,2 g de fibra em detergente ácido, 50 g proteína bruta, 12,5 g fosfato) e Azevém (*Lolium multiflorum* contendo por kg de matéria seca 473,1 g fibra em detergente neutro, 249,9 g de fibra em detergente ácido, 168,2 g proteína bruta, 34,8 g fosfato) foram utilizados como substrato nos ensaios *in vitro*.

Previamente a incubação e análises químicas as amostras foram secas a 55°C em estufa de ar forçado e moídas a 2mm. O teor de MS foi determinado secando as amostras

foram secas em estufa a 105°C. O teor de N total foi determinado pelo método Kjeldahl (984.13, AOAC, 1997). A determinação da FDN foi baseada nos procedimentos descritos por Mertens (2002), com exceção que as amostras foram pesadas em sacos de poliéster (porosidade de 16 µm) e tratadas com solução detergente neutra em autoclave a 110°C por 40 minutos conforme descrito por Senger et al. (2008). O teor de fósforo foi analisado por colorimetria pelo método adaptado de Fiske & Subbarow (1925) descrito por Farenzena et al (2013).

#### Incubação *in vitro* e avaliação dos marcadores microbianos

Ensaio *in vitro* foram conduzidos para avaliar o uso de marcadores microbianos de aderência a partículas de forragens. Os marcadores estudados foram N<sup>15</sup>, purinas, atividade enzimática da xilanase e fosfato. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em que se testou o efeito de duas forragens (Tifton 85 e Azevém) e quatro valores de pH inicial em um arranjo fatorial 2 x 4.

As fermentações *in vitro* foram realizadas em triplicata para cada tipo de amostra de forragem, de forma anaeróbica, em sistema de agitação lenta, utilizando um total de 4 frascos de vidro (capacidade de 3 L) equipados com válvula tipo Bunsen e tiveram duração de 24 horas. Cada frasco recebeu um meio de incubação (composto por 1600 mL de solução tampão (Tilley & Terry, 1963), 10 mg/L de SO<sub>4</sub>(<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> e 400 ml de fluido ruminal). Os meios incubação de cada frasco foram ajustados para os valores de pH inicial 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0 pela adição de uma solução ácida (uma mistura de ácido sulfúrico 0.5 M (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido clorídrico (HCl) 0.5 M e ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)) 0.5 M, ou pela adição de solução de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (10 g L<sup>-1</sup>).

Em cada frasco foram colocados um total de 4 sacos (10x10 cm, porosidade de 40 micras) com aproximadamente 5 g de amostra. O fluido ruminal foi obtido de um bovino da raça brangus com peso vivo médio de 800 Kg canulado no rúmen, recebendo uma alimentação a base de Tifton (*Cynodon* spp.).

Após 24 horas de incubação a fermentação os sacos removidos dos frascos e lavados em água corrente. Posteriormente os sacos foram tratados com solução salina (NaCl) 9 g L<sup>-1</sup> por 10 minutos para remover os microrganismos não aderidos ao resíduo, e novamente lavados com água destilada. Dos 4 sacos utilizados, 2 foram secos a 55°C em estufa de ar forçado para estimar a digestibilidade da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN). Os outros 2 sacos foram utilizados para coleta de duas sub amostras de resíduo úmido

para obtenção do extrato enzimático por meio de sonicação e posteriormente usadas para medir a atividade enzimática da xilanase. O restante dos resíduos úmidos foram secos a 55°C para determinação de N<sup>15</sup>, purinas e fosfato.

Para a obtenção do extrato enzimático e realizar as estimativas da atividade da enzima xilanase foi utilizado o protocolo descrito em Farenzena et al (2013). A atividade enzimática do extrato enzimático para cada tipo de forragem nos diferentes pH iniciais foi determinada utilizando xilano (Sigma X0627, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) como substrato, o qual foi diluído (20 g L<sup>-1</sup>) em uma solução tampão fosfato. Para medir a quantidade de açúcares redutores liberados foi utilizado o método ácido 3,5-dinitrosalicílico de Miller et al (1960), utilizando glicose como padrão. Atividade enzimática foi expressa como mmol de açúcares redutores liberados por g de MS residual por min.

O teor de purinas nas amostras de resíduo de incubação foi quantificado de acordo com Makkar e Becker (1999) e os valores expressos como ug de purinas/ g de MS residual.

O teor de fosfato microbiano nos resíduos foi analisado por colorimetria pelo método adaptado de Fiske & Subbarow (1925) descrito por Farenzena et al (2013). Aproximadamente 0.2 g de resíduos MPS e dos resíduos tratados com solução de FDN de cada forragem e seus respectivos tratamentos, foram pesados em beakers de vidro (20 mL) queimados em mufla a 600°C por 3 horas. Após foi adicionado 10 mL de uma solução contendo 3/4 de ácido clorídrico (HCl) 2,76N e 1/4 de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 1,59N e colocado em chapa de aquecimento a 200°C, permanecendo até se obter um volume residual de aproximadamente 2 mL. O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL com papel filtro, e completado o volume com água destilada. O filtrado foi mantido refrigerado a -20°C para posterior determinação da análise colorimétrica. Considerou-se que após 24 horas todo fosfato presente no resíduo insolúvel em detergente neutro era proveniente da forragem e todo fosfato solúvel era proveniente das células microbianas aderidas ao resíduo. A aderência microbiana foi calculada pela diferença da concentração de fosfato na MS residual descontado o valor de fosfato no resíduo de FDN. Os resultados foram expressos como concentração de fosfato em ug/g MS residual.

A determinação da abundância de N<sup>15</sup> nos resíduos foi realizada por espectrômetro de massas de razão isotópica (DELTA V Advantage, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) acoplado a um analisador elementar (Flash 2000 IRMS, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). O excesso de N<sup>15</sup> foi calculado assumindo a abundância natural de 0,3663 atm % para o padrão (3.663 mg N<sup>15</sup>/g N). O resultado final foi expresso como ug Excesso N<sup>15</sup> /g MS residual. Foram utilizadas as seguintes equações:

1. Razão isotópica do padrão:

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

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

2. Delta da amostra:

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

3. Estimativa da % de átomos no resíduo:

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

4. Excesso de N15 % do N total:

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

5. Excesso N15 (% na MS residual):

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

6. Excesso N15 (ug/g MS residual):

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

#### Análise estatística

Os resultados da digestibilidade da MS, atividade enzimática e concentração de marcadores microbianos no resíduo incubado foram analisados pelo procedimento mixed do SAS (v. 9.4 SAS Inst. Inc., Cary, NC) considerando os efeitos fixos do tipo de forragem e dos diferentes pHs. Testes ortogonais para avaliar o efeito linear e quadrático dos diferentes pHs foram realizados através do comando CONTRAST do PROC MIXED do SAS. Significância foi declarada significância foi declarada para valores de  $P \leq 0,05$ . O modelo matemático utilizado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + pH_i + F_j + (pH \times F)_{ij} + e_{ijk}$$

Onde:  $pH$ ,  $F$  são pH inicial, tipo de forragem respectivamente. Interação testada encontra-se entre parênteses,  $\mu$  é a média geral,  $e_{ijk}$  é o erro residual.

Correlações de Pearson foram realizadas para avaliar a correlação entre pH, digestibilidade e concentração dos marcadores microbianos nos resíduos das forragens incubadas por 24h. Foi utilizado o procedimento CORR do SAS (v. 9.4 SAS Inst. Inc., Cary, NC), significância foi declarada para valores de  $P \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

Após 24 horas de fermentação ocorreu um decréscimo no valor final do pH dos meios de incubação para  $5,33 \pm 0,09$ ;  $5,64 \pm 0,13$ ;  $6,14 \pm 0,11$  e  $6,54 \pm 0,23$ , para os valores de pH inicial 5,5; 6,0; 6,5, 7,0 respectivamente. Não foi observada interação entre pH x espécies de forragem para nenhuma das variáveis estudadas (tabela 1). A digestibilidade *in vitro* da MS e da FDN aumentaram linearmente e positivamente com o aumento do pH inicial de 5,0 para 7,0 ( $p < 0,05$ ). A digestibilidade da MS e da FDN do azevém foi superior a do feno de tifton ( $p < 0,05$ ).

Assim como os valores de digestibilidade, as concentrações dos marcadores aumentaram linearmente e positivamente com o aumento do pH ( $p < 0,05$ ). As concentrações dos marcadores variaram com o tipo de forragem ( $p < 0,05$ ), exceto para atividade da xilanase.

Foi observada correlação positiva entre digestibilidade da FDN das forragens e pH do meio de incubação ( $p < 0,05$ ) (tabela 2). Todos marcadores apresentaram correlação com o pH do meio de incubação ( $p < 0,05$ ), exceto purinas. Os marcadores fosfato e purinas apresentaram correlação com a digestibilidade da MS e da FDN das forragens ( $p < 0,05$ ). As concentrações fosfato apresentaram correlação com purinas e atividade enzimática ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1-** Degradação da matéria seca (MS), concentração dos marcadores microbianos em amostras de Azevém (*Lolium multiflorum*) e feno de Tifton (*Cynodon ssp.*) após 24 horas de incubação *in vitro*.

Variável	F	pH				EPM	P			
		5.5	6.0	6.5	7.0		F	pH*	F x pH	
<b>Degradabilidade</b>										
MS	CY	0.241	0.283	0.351	0.367	0.012	<0.001	<0.001 (L)	0.433 (Q)	0.399
	AZ	0.621	0.668	0.724	0.774					
FDN	CY	0.106	0.158	0.242	0.269	0.023	<0.001	<0.001 (L)	0.739 (Q)	0.063
	AZ	0.367	0.436	0.528	0.612					
<b>Aderência microbiana</b>										
N <sup>15</sup> (excesso ug/g MS residual)	CY	3.98	6.61	10.0	11.2	1.41	0.029	<0.001 (L)	0.498 (Q)	0.171
	AZ	1.71	3.41	4.30	5.70					
Purinas (ug/g MS residual)	CY	226	292	371	449	263	<0.001	<0.001 (L)	0.263 (Q)	0.184
	AZ	1705	2057	222	227					
Atividade da xilanase (mmol glicose/g MS residual /min)	CY	1.40	2.30	5.36	7.08	0.654	0.412	<0.001 (L)	0.072 (Q)	0.382
	AZ	1.63	2.36	3.51	7.07					
Fosfato (ug/g MS residual)	CY	216	239	295	360	503	0.004	<0.001 (L)	0.118 (Q)	0.609
	AZ	412	452	477	622					

AZ=Azevém; FT= Feno de tifton; F= forragem; EPM=erro padrão da média; MS=matéria seca

Tabela 2 - Coeficientes de correlação de Pearson entre pH, digestibilidade e concentração dos marcadores microbianos em resíduos de forragens após 24 horas de incubação *in vitro*.

	<b>pH</b>	<b>DIMS</b>	<b>DIFDN</b>	<b>N<sup>15</sup></b>	<b>Purinas</b>	<b>Atividade da xilanase</b>	<b>Fosfato</b>
<b>pH</b>	1.00000	0.27 (<0.208)*	0.47 (0.021)	0.58 (0.003)	0.15 (0.478)	0.88 (<0.001)	0.44 (0.032)
<b>DIMS</b>		1.00000	0.96 (<0.001)	-0.38 (0.069)	0.92 (<0.001)	0.16 (0.464)	0.84 (<0.001)
<b>DIFDN</b>			1.00000	-0.21 (0.313)	0.91 (<0.001)	0.35 (0.095)	0.91 (<0.001)
<b>N<sup>15</sup></b>				1.00000	-0.48 (0.016)	0.60 (0.019)	-0.11 (0.603)
<b>Purinas</b>					1.00000	0.07 (0.756)	0.86 (<0.001)
<b>Atividade da xilanase</b>						1.00000	0.46 (0.024)
<b>Fosfato</b>							1.00000

<sup>a</sup> Valores entre parênteses são a probabilidade do erro tipo 1.

DIVMS= Digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIFDN= Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro.

## DISCUSSÃO

A diminuição do pH inicial do meio de incubação, assim como em estudos prévios (Kozloski et al., 2008; Farenzena et al., 2013) exerceu impacto negativo sobre a degradação das forragens e a degradação da MS e da FDN do Azevém foi superior a do feno de tifton, atendendo assim requisitos importantes para este estudo que procura estabelecer entre degradação e a concentração de marcadores aderência microbiana a partículas de forragens. A redução na eficiência da degradação das forragens pode ser atribuída à inibição da aderência microbiana as partículas de alimento. Estudos *in vitro* e *in situ* demonstraram que a atividade fibrolítica de culturas puras ou mistas de microrganismos ruminais é dependente do pH ruminal (DIJKSTRA et al., 2012).

Os resultados obtidos indicaram que a concentração de todos marcadores avaliados apresentaram efeito de pH, no entanto nem todos marcadores foram claramente diferenciados



pelo tipo de forragem. Assim como os resultados obtidos com a degradação, os marcadores fosfato e purinas apresentaram concentrações maiores nos resíduos de Azevém em relação aos do feno de Tifton. A atividade enzimática utilizando a enzima xilanase como referência e os valores das concentrações de  $N^{15}$  não apresentaram o mesmo padrão dos outros marcadores.

Diferentes marcadores têm sido empregados para quantificar os microrganismos aderidos às partículas de alimento, no entanto não existe na literatura um marcador que seja considerado padrão. No presente estudo utilizamos como padrão a digestibilidade das forragens, de forma que a indicação do uso do marcador estaria baseada na sua correlação com a digestibilidade da forragem.

Os resultados obtidos com o marcador externo  $N^{15}$  apresentaram alta variabilidade e não apresentou correlação com a digestibilidade da MS e da FDN. O  $N^{15}$  é um marcador externo amplamente empregado em estudos *in vitro* (Firkins et al., 1991; Carro e Miller, 2002) por apresentar vantagens como ser incorporado por todos microrganismos ruminais; a ausência enriquecimentos em  $N^{15}$  superiores a abundância natural (0,3663) nos alimentos ofertados aos animais e a determinação do  $N^{15}$  por espectrometria de massas é uma análise alta precisão e exatidão, capaz de detectar enriquecimentos de até 0,001% (FIRKINS et al., 1991).

Levando em consideração que neste estudo as estimativas do grau de aderência microbiana foram realizadas diretamente nos resíduos de incubação a menor proporção de microrganismos na relação microrganismos ruminais:material indigestível nas amostras e o reduzido volume de amostra utilizado para a determinação de  $N^{15}$  (entre 3 a 5 mg) é possível que a combinação deste aspectos tenham contribuído para alta variabilidade dos nossos dados obtidos com o  $N^{15}$ .

A atividade enzimática da xilanase, não apresentou correlação com a digestibilidade da MS e da FDN. Sendo observada apenas correlação com pH, fosfato e  $N^{15}$ . Em relação à este aspecto é possível dizer, a correlação observada entre teor de  $N^{15}$  e atividade enzimática indica que este marcador pode ter sido utilizado preferencialmente para síntese de enzimas associadas à digestão da fibra.

Fosfato e purinas foram os marcadores que apresentaram correlação com a digestibilidade da MS e da FDN e também apresentaram correlação entre si. Os resultados com fosfato foram similares os apresentados por Farenzena et al., (2013). Fosfato e purinas são marcadores internos e baseiam-se no princípio de serem constituintes das células e encontram-se altas concentrações nos microrganismos ruminais (BRODERICK e MERCHEN, 1992). Os valores de fósforo de presente nas células da bactérias associadas as

partículas variam entre 5,8 a 9,7 mg/Kg de MS (MERRY e MCALLAN, 1983; RAMIREZ-PEREZ et al., 2009) e de purinas variam entre 6,1 a 8,1 mg/Kg de MS (RODRIGUEZ et al., 2000).

O uso do fosfato como marcador de aderência microbiana a partículas de forragem apresenta vantagens em relação a purinas uma vez que sua determinação envolve procedimentos analíticos simples. A técnica para determinação de fosfato pelo método proposto por Fiske e Subbarov (1925) utiliza etapas para o preparo da amostra que são de execução simples e faz uso de reagentes e equipamentos convencionais presentes em laboratórios de pesquisa.

No presente estudo ao avaliarmos o potencial do uso dos marcadores microbianos N15, purinas, fosfato e atividade da xilanase, utilizamos como valor de referência a digestibilidade das forragens. A escolha do marcador microbiano de aderência deve levar em consideração os procedimentos experimentais adotados no estudo, tipo de substrato utilizados e os métodos utilizados para determinação do marcador, visando com isso diminuir a variabilidade dos resultados.

## CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo indicaram que fosfato e purinas podem ser utilizados como marcadores de aderência microbiana a partículas de forragem. Contudo, o fosfato foi mais sensível em detectar diferenças entre espécies forrageiras e usa procedimento analítico mais simples do que purinas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 16<sup>th</sup>, 3. ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD. 1997.

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

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 (<sup>15</sup>N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. **Animal Science**, v.75, p.315-321, 2002.

DIJKSTRA, J. et al. Ruminant pH regulation and nutritional consequences of low pH. **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, p. 22–33, 2012.

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**, press, p. 1-8, 2013.

FIRKINS, J.L. et al. Effects of Protein, Carbohydrate, and Fat Sources on Bacterial Colonization and Degradation of Fiber In Vitro. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.4273-4283, 1991.

FISKE, C.H.; SUBBAROV, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **The Journal of Biological Chemistry**, v.66, p.375-400, 1925.

KIM, M. J. et al. Effects of methylcellulose on fibrolytic bacterial detachment and in vitro degradation of rice straw. **Asian Australas Journal Animal Science**, v. 26, n. 10, p. 1459-1465, 2013.

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.

KOZLOSKI, G.V. et al. Microbial colonization and degradation of forage samples incubated in vitro at different initial pH. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 356-367.  
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.

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.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. **Journal of AOAC**, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

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

MIRON, J. et al. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1294-1309, 2001.

MORGAVI, D.P. et al. *Trichoderma* enzymes promote *Fibrobacter succinogenes* S85 adhesion to, and degradation of, complex substrates but not pure cellulose. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1083- 1090, 2004.

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.

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.

ROGER, V. et al. Effects of Glycerol on the Growth, Adhesion and Cellulolytic Activity of Rumen Cellulolytic Bacteria and Anaerobic Fungi. **Current Microbiology**, v. 25, p. 197-201, 1992.

NAGPAL, R. et al. 2010. Singh Influence of bacteria and protozoa from the rumen of buffalo on *in-vitro* activities of anaerobic fungus *Caecomyces* sp. isolated from the feces of elephant. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 1(8), p. 152-156.

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.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crop. **Journal of the British Grassland Society**, Aberystwyth, v. 18, n.2, p. 104-111. 1963.

## 4 CAPÍTULO 2

### FUNÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS RUMINAIS NA DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS INCUBADAS *IN VITRO*

#### RESUMO

No presente estudo foram realizados dois experimentos para avaliar o papel de fungos e bactérias ruminais na degradação *in vitro* de forragens em meios de incubação contendo ou não soluções antimicrobianas: Antibióticos (Ab) – solução contendo uma mistura de três antibióticos - penicilina, cloranfenicol e estreptomicina); Antifúngico (Af) - cicloheximida; Controle positivo (C+) – solução contendo Ab e Af; Controle negativo (C-) – sem a adição de antimicrobianos. No primeiro experimento utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em que testou o efeito de duas forragens (Tifton 85 e Azevém) e quatro meios de incubação em um arranjo fatorial 2x4. As variáveis avaliadas foram a degradabilidade das forragens; o grau de aderência microbiana a partículas e atividade da xilanase no resíduo de forragens incubadas *in vitro* durante 24 horas. No segundo experimento foi utilizado um DIC em um arranjo fatorial 2x4x8, avaliando 2 forragens, quatro meios de incubação e 8 tempos de incubação. No primeiro experimento, quando comparados ao meio C-, tanto o C+ quanto o meio com adição de Ab apresentaram a degradabilidade, concentração de fosfato e a atividade da xilanase diminuídas ( $p < 0,05$ ). A adição de Af no meio de incubação não afetou nenhuma das variáveis quando comparadas ao meio C-. No experimento 2, houve interação entre forragem, meio de incubação e tempo de incubação ( $p < 0,05$ ). Tanto para o Azevém quanto para o feno de Tifton, a produção de gás os meios C- e Af apresentaram médias similares e superiores em relação aos meios Ab e C+ ( $p < 0,05$ ). Para o feno de Tifton após 24 horas a produção de gás acumulada no meio Ab foi maior que no meio C+ ( $p < 0,05$ ). Os resultados indicam que no tempo fixo de 24 horas de incubação as bactérias foram determinantes na degradação das forragens. Em 72 horas de incubação as bactérias permaneceram desempenhando o papel mais importante na degradação das forragens, contudo sua eficiência pode ser aumentada através da atividade dos fungos.

**Palavras-chave:** Digestibilidade, microrganismos ruminais, aderência, antimicrobianos.

### FUNCTION OF RUMEN BACTERIA AND FUNGI ON FORAGE DEGRADATION *IN VITRO*

#### ABSTRACT

In the present study two experiments were conducted to evaluate the interactive role of bacteria and fungi on forage degradation *in vitro* in medium containing or not of antimicrobial solutions: Antibiotic (Ab) - A mixture of penicillin, chloramphenicol and streptomycin; Antifungal (Af) - cycloheximide; Positive control (C+) - with both Ab and Af and Negative control (C-) - without antimicrobials. In the first experiment it was used a completely randomized experimental design in a 2x4 factorial arrangement, testing the effect of two forages and 4 incubation medium. The variables evaluated were forage digestibility, and microbial adherence to forage particles and xylanase activity from the forage residue

incubated during 24 hours. The second experiment *in vitro* gas trials was conducted in a completely randomized experimental design in a 2×4×8 factorial arrangement, testing the effect of two forages, 4 incubation medium and 8 incubation times. The results from the first experiment indicate that compared to negative control, the positive control or only Ab addition decreased digestibility, the concentration of phosphate and xylanase activity ( $P < 0.05$ ). The addition of only Af in the incubation medium did not affect any variable compared to C- treatment. In the second experiment there was interaction between forage type, incubation medium and incubation ( $P < 0.05$ ). For both forage species the addition of only Af in the incubation medium had similar gas volume compared to negative control and were higher than Ab e o C+ ( $P < 0.05$ ). For Tifton hay after 24 hours the accumulated gas volume in Ab was higher than C+ ( $P < 0.05$ ). These results indicate that, at fixed 24 hours *in vitro* incubation bacteria activity was more relevant on determining forage degradation. In 72 hours of *in vitro* fermentation bacteria also had the most important role on forage degradation, however, was increased by fungi activity.

**Key words:** Digestibility, ruminal microorganisms, adherence, antimicrobials.

## INTRODUÇÃO

O rúmen é um ecossistema complexo no qual os microrganismos que nele habitam são capazes de converter alimento em massa microbiana e produtos finais da fermentação que serão utilizados pelo animal hospedeiro (KONG et al., 2010). Essa relação de simbiose entre o animal ruminante e microrganismos ruminais, permite a utilização de polissacarídeos estruturais como principal fonte de energia.

Observações por microscopia eletrônica de varredura demonstraram que partículas forragens incubadas no rúmen foram colonizadas por microrganismos que se diferenciam pela sua morfologia (BAUCHOP, 1979; GUIMARÃES-BEELLEN et al., 2005). O crescimento de bactérias e fungos está fortemente associado à parede celular dos materiais por eles colonizados (CHENG ET AL., 1991). Os microrganismos aderidos as partículas de alimento são numericamente predominantes, representando cerca de 75 % do total da população microbiana ruminal e da produção de ATP (CRAIG et al., 1987; MIRON et al., 2001; KIM et al., 2013).

As bactérias demonstram serem os microrganismos mais ativos na degradação da fibra (Windhan e Akin, 1984), no entanto os fungos apresentam uma maior capacidade para colonizar e degradar tecidos lignificados da parede celular que não são acessíveis para outros microrganismos (TRINCI et al., 1994). Os fungos ruminais são capazes de romper fisicamente o tecido vegetal, criando aberturas para a ação das enzimas (EDWARDS et al., 2008).

Os microrganismos podem estabelecer interações que variam entre sinergismo e antagonismo, os quais podem estar relacionados com os tipos de populações microbianas envolvidas e os substratos por elas utilizados (LEE et al., 2000). Estudos em nutrição de ruminantes tem procurado compreender melhor como essas interações ocorrem durante a degradação da fibra (WINDHAN e AKIN, 1994; DEHORITY e TIRABASSO, 2000; JOBLIN et al., 2002).

No entanto, devido às limitações para se conseguir separar e quantificar as populações dos microrganismos ruminais associadas às partículas de alimento é difícil se estimar a contribuição específica de bactérias e fungos na degradação da parede celular das plantas (LEE et al., 2000). O presente estudo foi conduzido com o objetivo avaliar a participação de fungos e bactérias na degradação *in vitro* de forragens.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

No presente estudo foram conduzidos dois experimentos *in vitro* com objetivo de avaliar a degradabilidade de forragens, grau de aderência microbiana a partículas de forragens, atividade da enzima xilanase e produção de gás decorrentes das interações entre os bactérias e fungos ruminais durante o processo de degradação de forragens.

### *Caracterização e preparação de amostras para incubações in vitro*

Amostras de feno de Tifton 85 (*Cynodon* spp. contendo por kg de matéria seca 780,8 g de fibra em detergente neutro, 424,2 g de fibra em detergente ácido, 50 g proteína bruta, 12,5 g de fosfato e Azevém (*Lolium multiflorum* contendo por kg de matéria seca 473,1 g fibra em detergente neutro, 249,9 g de fibra em detergente ácido, 168,2 g proteína bruta, 34,8 g de fosfato) foram utilizados como substrato nos ensaios *in vitro*.

Previamente a incubação e análises químicas as amostras foram secas a 55°C em estufa de ar forçado e moídas a 2 mm. O teor de matéria seca (MS) foi determinado secando as amostras foram secas em estufa a 105°C. O teor de Nitrogênio (N) total foi determinado pelo método Kjeldahl (984.13, AOAC, 1997). A determinação da fibra em detergente neutro FDN foi baseada nos procedimentos descritos por MERTENS (2002), com exceção que as amostras foram pesadas em sacos de poliéster (porosidade de 16 µm) e tratadas com solução detergente neutra em autoclave a 110°C por 40 minutos conforme descrito por SENGER et al.

(2008). O teor de fosfato foi analisado por colorimetria pelo método adaptado de FISKE E SUBBAROW (1925) descrito por FARENZENA et al. (2013).

Experimento 1: Degradação de forragens e aderência microbiana em resíduos de forragem incubados *in vitro*.

Ensaio *in vitro* foram conduzidos para avaliar a degradabilidade de forragens, atividade da enzima xilanase e o grau de aderência microbiana a partículas de forragens, em meios de incubação contendo ou não soluções antimicrobianas. Para determinar a aderência microbiana, foram utilizados os marcadores:  $N^{15}$ , fosfato, DNA microbiano. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em que se testou o efeito de duas forragens (feno de Tifton 85 e Azevém) e quatro meios de incubação em um arranjo fatorial 2 x 4.

Foram conduzidos 3 ensaios *in vitro*, nos quais foram incubadas amostras Azevem e feno de Tifton 85, sendo que cada ensaio foi considerado uma replicata. Cada ensaio foi conduzido de forma anaeróbica, em sistema de agitação lenta, utilizando um total de 4 frascos de vidro (capacidade de 3 L) equipados com válvula tipo Bunsen e de 24 horas. Cada frasco recebeu um meio de incubação (composto por 1600 mL de solução tampão (Tilley & Terry, 1963), 10 mg/L de  $SO_4(^{15}NH_4)_2$  e 400 ml de fluido ruminal) com adição ou não de substâncias antimicrobianas: Antibióticos (Ab) – solução contendo uma mistura de três antibióticos: penicilina, cloranfenicol e estreptomicina (500 mg/L de cada antibiótico); Antifúngico (Af) – cicloheximida (50 mg/L); Controle positivo (C+) – solução contendo Ab e Af; Controle negativo (C-) – sem a adição de antimicrobianos. Em cada frasco foram colocados um total de 8 sacos, dos quais para cada tipo de forragem foram utilizados 2 sacos (5x5 cm, porosidade de 40 micras) com 1 g de amostra para medir a digestibilidade da forragem e 2 sacos (10x10 cm, porosidade de 40 micras) com 4 g de amostra para estimar a atividade da xilanase e o grau de aderência microbiana as partículas de forragem. O fluido ruminal foi obtido de um bovino da raça brangus com peso vivo médio de 800 kg canulado no rúmen, recebendo uma alimentação a base de Tifton (*Cynodon* spp.).

Após 24 horas de incubação, os sacos removidos dos frascos e lavados em água corrente. Posteriormente os sacos foram tratados com solução salina (NaCl) 9 g/L por 10 minutos para remover os microrganismos não aderidos ao resíduo, e novamente lavados com água destilada. Os sacos que continham inicialmente 1g de amostra foram secos a 55°C em estufa de ar forçado para estimar a degradabilidade da MS. Para cada tipo de forragem nos seus respectivos meios de incubação foram coletadas duas sub amostras de resíduo úmido dos



sacos que continham inicialmente 4 gramas, sendo uma para obtenção do extrato enzimático por meio de sonicação e posteriormente usados para medir a atividade enzimática da xilanase e a outra congelada em nitrogênio líquido para posteriormente realizar a extração do DNA microbiano. O restante dos resíduos úmidos foi seco a 55°C para determinação de N<sup>15</sup>, fosfato e degradabilidade da FDN.

#### Quantificação dos marcadores de aderência microbiana

A obtenção do extrato enzimático e as estimativas da atividade da enzima xilanase foi utilizado o protocolo descrito em Farenzena et al (2013). A atividade enzimática do extrato enzimático para cada tipo de forragem nos diferentes meios de incubação foi determinada utilizando xilano (Sigma X0627, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) como substrato, o qual foi diluído (20 g/L) em uma solução tampão fosfato. Para medir a quantidade de açúcares redutores liberados foi utilizado o método ácido 3,5-dinitrosalicílico de Miller et al (1960), utilizando glicose como padrão. Atividade da xilanase foi expressa como mmol de açúcares redutores liberados por g de MS de resíduo por min.

O DNA dos microrganismos aderidos as partículas de resíduo das forragens foi extraído com o Kit PureLink™ Microbiome DNA Purification. Foram seguidas as diretrizes do fabricante, com algumas adaptações no primeiro passo do processo de extração do DNA relacionado ao preparo do lisado. Nesta etapa foram adicionados ao tubo: 200 mg de resíduo úmido, 700 µL de solução S1 e 500 µL de uma solução de lise (1,16g de cloreto de sódio; 1,21 g de Tris e 0,74 g de EDTA), o tubo foi agitado e colocado em banho maria a 37°C por 30 minutos. A segunda modificação foi no processo de homogeneização das amostras no aparelho bead beating em que foram processadas por 5 ciclos de 1 min, com intervalos de 1min incubadas em gelo. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose e o DNA quantificado utilizado o equipamento NanoDrop2000™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

A determinação da abundância de N<sup>15</sup> nos resíduos foi realizada por espectrômetro de massas de razão isotópica (DELTA V Advantage, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) acoplado a um analisador elementar (Flash 2000 IRMS, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

O teor de fosfato microbiano nos resíduos foi analisado por colorimetria pelo método adaptado de Fiske & Subbarow (1925) descrito por Farenzena et al (2013). Aproximadamente 0.2 g de matéria parcialmente seca (MPS) de resíduo e dos resíduos tratados com solução de

FDN de cada forragem e seus respectivos tratamentos, foram pesados em Becker de vidro (20 mL) queimados em mufla a 600°C por 3 horas. Após foi adicionado 10 mL de uma solução contendo 3/4 de ácido clorídrico (HCl) 2,76 N e 1/4 de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 1,59 N e colocado em chapa de aquecimento a 200°C, permanecendo até se obter um volume residual de aproximadamente 2 mL. O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL com papel filtro e completado o volume com água destilada e posteriormente realizada a determinação do teor de fosfato por análise colorimétrica. Considerou-se que após 24 horas todo fosfato presente no resíduo insolúvel em detergente neutro era proveniente da forragem e todo fosfato solúvel era proveniente das células microbianas aderidas ao resíduo. A aderência microbiana foi calculada pela diferença da concentração de fosfato na MS residual descontado o valor de fosfato no resíduo de FDN. Os resultados foram expressos como concentração de fosfato em ug/g de MS de resíduo.

#### Análise estatística

Os resultados de degradabilidade da MS e da FDN, aderência microbiana e atividade enzimática foram analisados pelo procedimento mixed do SAS (v. 9.4 SAS Inst. Inc., Cary, NC) considerando os efeitos fixos do tipo de forragem e dos antimicrobianos. As médias foram comparadas pelo teste de Fisher utilizando o a opção PDIFF do comando LSMEANS do SAS. Significância foi declarada a  $P < 0,05$ . O modelo matemático utilizado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + MI_i + F_j + (MI \times F)_{ij} + e_{ijk}$$

Onde:  $MI$ ,  $F$  são meio de incubação e tipo de forragem respectivamente. Interação testada encontra-se entre parênteses,  $\mu$  é a média geral,  $e_{ijk}$  é o erro residual.

Experimento 2: Avaliação da interação entre bactérias e fungos ruminais na degradação de forragens.

Foram conduzidos três ensaios *in vitro* gás com o objetivo de se estimar o volume de gás em quatro meios de incubação com a adição ou não de soluções antimicrobianas. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado em um arranjo fatorial 2 x 4 x 8, avaliando 2 forragens (Tifton 85 e Azevém), quatro meios de incubação e 8 tempos de incubação. As forragens utilizadas e o protocolo para preparo dos meios de incubação foram

os mesmos adotados no experimento 1. Foram pesados individualmente em torno de 1,5 g de amostra em frascos de vidro (capacidade de 160 mL), incubados por 72 horas em um meio de incubação (80 mL de tampão e 20 mL de fluido ruminal) contendo ou não substâncias antimicrobianas. As fermentações *in vitro* gás foram conduzidas de forma anaeróbica, em banho maria a 39°C, com sistema de agitação lenta. Foram realizados 3 ensaios para cada tipo de forragem, sendo que em cada ensaio foram usadas 3 garrafas para cada tipo de amostra e meio de incubação e 3 garrafas para o branco (o meio de incubação composto por 80 mL de tampão e 20 mL de fluido ruminal, sem adição de amostras). O volume de gás foi medido nos tempos 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 e 72 horas de incubação.

#### Análise estatística

Os dados foram analisados como medidas repetidas no tempo utilizando o procedimento mixed do SAS (v. 9.4 SAS Inst. Inc., Cary, NC), incluindo como efeitos fixos tipo de forragem, meios de incubação e o tempo. As médias foram comparadas pelo teste de Fisher utilizando a opção PDIFF do comando LSMEANS do PROC MIXED do SAS. Significância foi declarada a  $P < 0,05$ . O modelo matemático utilizado foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + MI_i + F_j + T_k + (MI \times F)_{ij} + (MI \times T)_{ik} + (F \times T)_{jk} + (MI \times F \times T)_{ijk} + e_{ijkl}$$

Onde:  $MI$ ,  $F$ ,  $T$  são os efeitos de meio de incubação, tipo de forragem e tempo, respectivamente. As interações testadas encontram-se entre parênteses,  $\mu$  é a média geral,  $e_{ijk}$  é o erro residual.

## RESULTADOS

### Degradabilidade, aderência microbiana e atividade da xilanase

No experimento 1 no tempo fixo de 24 horas de incubação foi observada interação entre tipo de forragem e meio de incubação para a degradabilidade da MS e da FDN ( $p < 0,05$ ). Entretanto para atividade da xilanase e os marcadores de aderência microbiana não foi observada interação entre tipo de forragem e meio de incubação. Os valores médios para fósforo e DNA foram superiores para o Azevém em relação aos do feno de Tifton ( $p < 0,05$ ). Em relação ao meio de incubação C-, tanto o C+ quanto o meio com adição de Ab

apresentaram redução na degradabilidade da MS, da FDN, na atividade da xilanase e nas concentrações de fosfato ( $p < 0,05$ ). A adição de Af no meio de incubação não afetou nenhuma das variáveis quando comparadas ao meio controle negativo (Tabela1).

Tabela 1 - Degradação da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN), aderência microbiana e atividade da xilanase no resíduo de amostras de Azevém (AZ) e feno de Tifton (FT) após 24 horas de incubação *in vitro* em resposta a adição de antibióticos e/ou antifúngico.

Variáveis	F	Meio de incubação*				EPM	P		
		C -	Ab	Af	C+		MI	F	MI × F
Degradabilidade									
MS	AZ	0.83 <sup>A</sup>	0.55 <sup>B</sup>	0.82 <sup>A</sup>	0.54 <sup>B</sup>	0.021	<0.001	<0.001	<0.001
	FT	0.38 <sup>a</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.37 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>				
FDN	AZ	0.74 <sup>A</sup>	0.29 <sup>B</sup>	0.72 <sup>A</sup>	0.28 <sup>B</sup>	0.031	<0.001	<0.001	<0.001
	FT	0.29 <sup>a</sup>	0.16 <sup>b</sup>	0.27 <sup>a</sup>	0.09 <sup>c</sup>				
Aderência microbiana ( $\mu\text{g}$ de marcador microbiano/g de MS residual):									
N <sup>15</sup>	AZ	8.06	2.2	7.21	3.91	2.83	0.056	0.884	0.722
	FT	6.38	4.2	6.54	3.57				
Fosfato	AZ	844	755	732	665	90	0.035	<0.001	0.687
	FT	486	377	459	236				
DNA	AZ	991	397	859	498	243.6	0.068	0.004	0.831
	FT	448	129	306	118				
Atividade da xilanase (mmol de açúcares redutores/ g de MS residual/minuto):									
	AZ	15.42 <sup>A</sup>	4.53 <sup>B</sup>	15.24 <sup>A</sup>	3.23 <sup>B</sup>	2.383	<0.001	0.344	0.628
	FT	12.76 <sup>a</sup>	5.73 <sup>bc</sup>	11.42 <sup>ab</sup>	2.80 <sup>c</sup>				

MI= Meio de incubação; F=forragem

\*Antibiótico (Ab); Antifúngico (Af); Controle negativo (C-), sem adição de Ab e Af; Controle positivo (C+), com adição de Ab e Af.

Diferenças nas letras na mesma linha estabelece diferenças nas médias entre os meios de incubação dentro do mesmo tipo de forragem.

### Produção de gás

No experimento 2, para a variável volume de gás foi observada interação entre forragem x meio de incubação x tempo para variável volume de gás (Figura 1). A partir de 9 horas de incubação foram observadas diferenças entre o volume de gás acumulado para a forragem Azevém, no qual os meios C- e Af apresentaram médias similares e superiores em

relação aos meios Ab e C+ ( $p<0,05$ ), permanecendo assim até o final das 72 horas de incubação.

Para o Feno de tifton foi detectada diferença na média de volume de gás acumulado entre os meios de incubação a partir de 12 horas, sendo o volume de gás acumulado nos meios C-, Af e Ab similares e superiores ao meio C+ ( $p<0,05$ ). A partir de 24 horas de incubação os meios C- e Af apresentaram médias semelhantes e superiores aos meios Ab ( $p<0,05$ ). O meio C+ apresentou médias inferiores aos demais meio de incubação ( $p<0,05$ ).

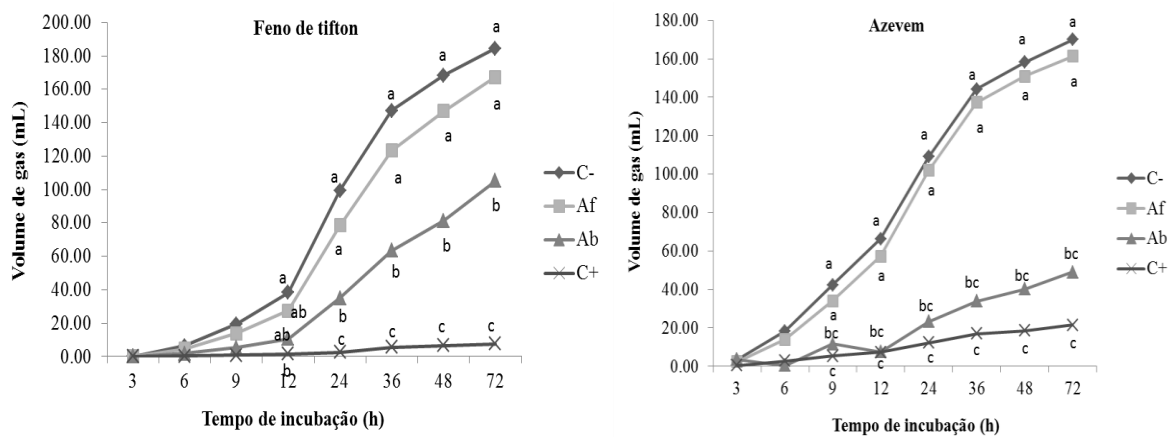


Figura 2 - Média da produção acumulada de gás de amostras de forragens incubadas in vitro sobre efeito dos meios de incubação antibiótico (Ab); antifúngico (Af); controle positivo (C+) e controle negativo (C-). Diferenças nas letras estabelece diferenças nas médias de volume de gás entre os meios de incubação dentro do mesmo horário. E.P.M: 12.06.

## DISCUSSÃO

Os resultados do primeiro experimento obtidos com as variáveis degradabilidade da MS e da FDN, grau de aderência microbiana e atividade enzimática no resíduo de incubação demonstraram que nas primeiras 24 horas de incubação a participação dos fungos foi pouco significativa, enquanto as populações bacterianas desempenharam papel importante na degradação das forragens, independente do substrato avaliado. A melhor compreensão sobre como ocorre à colonização microbiana ao longo do tempo é considerado um ponto decisivo no processo de degradação dos tecidos vegetais pelos microrganismos ruminais, contribuindo assim para identificar os aspectos que limitam a eficiência do funcionamento do rúmen (EDWARDS et al., 2008).

A maior digestibilidade da FDN observada no Azevém em relação ao feno de tifton pode ser atribuída a diferenças anatômicas e estruturais entre gramíneas C3 e C4. Gramíneas temperadas (C3) normalmente contêm menor proporção de tecidos lentamente degradados como bainha parenquimática do feixe e células da epiderme e maior proporção de tecidos rapidamente degradáveis como células do mesófilo, quando comparadas as folhas de gramíneas tropicais (C4) (AKIN, 1989). A qualidade da forragem está associada a fatores relacionados à quantidade de parede celular e a habilidade dos microrganismos ruminais em degradar componentes específicos da parede celular.

Os valores similares obtidos entre os meios contendo bactérias e fungos e os contendo apenas bactérias podem estar relacionados a diferenças nos mecanismos utilizados para iniciar a adesão às partículas de forragens e a eficiência com que fungos e bactérias degradam os componentes da parede celular vegetal. As partículas de forragens ingeridas são localizadas pelos zoósporos em resposta a fatores quimiotáticos como a presença de açúcares solúveis. Após encontrar o tecido vegetal os zoósporos podem se aderir, realizar o encistamento e germinação, seguido pela penetração dos rizoides dos fungos pelo tecido vegetal (ORPIN e JOBLIN, 1997).

Em contra partida, as bactérias ruminais utilizam rapidamente os açúcares solúveis de forragens. Estudos avaliando a dinâmica da colonização a forragens indicaram que as bactérias iniciam o processo de colonização entre 5 minutos após a entrada do alimento no rúmen (EDWARDS et al., 2007). Adicionalmente, a disposição das células de mesófilo das gramíneas C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> também contribui para diferenças na eficiência com que as bactérias degradam as forragens. As células dos mesófilos das gramíneas C<sub>3</sub> encontram-se mais dispersas e espaçadas, permitindo que os microrganismos penetrem com uma maior velocidade no tecido das folhas e proporcionando uma digestão mais rápida em relação as C<sub>4</sub> (CARVALHO et al., 2008).

Para compreender a participação dos microrganismos aderidos as partículas na degradação das forragens foram realizadas as estimativas por meio do uso dos marcadores N<sup>15</sup>, fosfato e DNA microbiano. O N<sup>15</sup> é um marcador externo empregado em estudos *in vitro* (CARRO e MILLER, 2002) por apresentar vantagens como ser incorporado por todos os microrganismos ruminais; a ausência enriquecimentos em N<sup>15</sup> superiores a abundancia natural (0,3663) nos alimentos ofertados aos animais e pelo fato da determinação do N<sup>15</sup> por espectrometria de massas ser uma análise alta precisão e exatidão (CARRO, 2001). No entanto os dados obtidos com o N<sup>15</sup> em nosso estudo apresentaram alta variabilidade, não sendo observado o efeito de meio de incubação e forragem.

Ao se analisar as concentrações de fosfato nos resíduos foi observado uma diminuição na quantidade de microrganismos aderidos nos meios controle positivo e Ab quando comparados com o meio controle negativo. Estes resultados indicam uma maior quantidade de microrganismos presentes nesses dois meios, apresentando assim coerência com os resultados obtidos com a degradabilidade da MS e da FDN. No entanto, o uso de marcadores microbianos tradicionais como os empregados neste estudo não é capaz de detectar diferenças nas biomassas de microrganismos aderidos, uma vez que não são específicos para fungos ou bactérias.

Ao se avaliar a atividade da xilanase no tempo fixo de 24 horas, as médias nos meios com bactérias e fungos e os contendo somente bactérias foram similares e superiores ao meio contendo apenas fungos. Este resultado pode estar associado ao fato dos microrganismos apresentarem taxas de crescimento diferentes e ao ciclo de vida mais complexo dos fungos. O tempo de geração dos fungos ruminais pode variar de 24 a 30 horas (BAUCHOP, 1981).

No segundo experimento, a produção de gás ao longo de 72 horas nos meios contendo bactérias e fungos e os contendo somente bactérias em média foram similares e mais altas em relação aos meios contendo somente fungos para as duas forragens avaliadas. Este resultado indica as bactérias permanecem desempenhando o papel principal na degradação da fibra, mesmo em períodos mais longos de incubação. No entanto, ao se aumentar o tempo de incubação das amostras foi possível observar diferença na participação dos fungos entre as duas forragens ao longo das 72 horas.

Diferente do que ocorreu no Azevém onde não foi observada diferença entre os meios Ab e controle positivo, nas amostras de feno Tifton, a partir de 24 horas de incubação as médias de produção de gás no meio contendo fungos foi maior que o meio no qual bactérias e fungos foram removidos. As gramíneas C<sub>4</sub> possuem uma maior proporção de feixes vasculares nas folhas, com nervuras centrais lignificadas e conseqüentemente uma maior quantidade de tecidos com menor digestibilidade (CARVALHO e PIRES, 2008), resultado a importância do papel dos fungos ruminais na degradação de materiais mais lignificados.

Os resultados do segundo experimento indicam que os fungos quando comparados às bactérias, necessitam de um tempo maior para degradar os substratos. BORNEMAN et al (1989) avaliaram a atividade enzimática de 5 de culturas puras de fungos ruminais incubados com *Cynodon dactylon* e verificaram que a concentração inicial de xilanase variou entre 24 e 48 horas e foi atingiu seu máximo após 96 horas de incubação. A retenção das partículas de

alimentos no rúmen por períodos mais prolongados também é importante para permitir que os fungos possam se aderir as partículas de alimento (MCALLISTER et al., 1994).

Os dados relativos ao meio sem fungos e bactérias demonstraram que a adição de soluções contendo antibióticos e antifúngico fez com que a maior parte das populações associadas às partículas fosse eliminada, permanecendo apenas os protozoários. A participação isolada dos protozoários não resultou em progresso na degradação das forragens. Lee et al., (2000) avaliaram as contribuições relativas de cada população microbiana e suas interações na degradação *in vitro* de feno de Dáctilo. Os autores relataram que ao atuarem sozinhos, os protozoários não foram capazes de absorver as grandes partículas insolúveis do alimento e a atividade da enzima xilanase não apresentou aumento na liberação de açúcares redutores ao longo do tempo, ao contrário das outras frações. Esses resultados enfatizam a importância da aderência de bactérias e fungos às partículas na degradação de alimentos com altos teores de fibra.

Os resultados obtidos neste estudo auxiliaram na compreensão sobre a participação de bactérias e fungos na degradação das forragens. Fatores relacionados a estrutura anatômica das forragens podem estar responsáveis pela diferença na atuação desses microrganismos na degradação das forragens. O uso de novas técnicas biomoleculares como as de sequenciamento do DNA utilizadas para avaliar a dinâmica das populações microbianas do rúmen (FERNANDO et al., 2010; MONTEILS et al., 2011) poderiam auxiliar na identificação e quantificação de espécies específicas de bactérias e fungos envolvidas na degradação de forragens.

## CONCLUSÕES

Em um tempo fixo de 24 horas de incubação *in vitro* as bactérias foram determinantes na degradação das forragens e função dos fungos foi pouco significativa. Em períodos mais longos de incubação (i.e. 72 horas) as bactérias permanecem desempenhando um papel mais importante na degradação das forragens o qual, contudo, foi potencializado pelos fungos. Adicionalmente, a participação dos fungos foi maior na degradação da forragem de menor digestibilidade.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIN, D.E. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. **Agronomy Journal**, v. 81, p. 17-25, 1989.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 16<sup>th</sup>, 3. ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD. 1997.
- BAUCHOP, T. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Applied Environmental Microbiology*, v. 38, p. 148-158, 1979.
- BAUCHOP, T. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agric. Environ.* v. 6, p. 339-348, 1981.
- 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 (<sup>15</sup>N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. **Animal Science**, v.75, p.315-321, 2002.
- CARVALHO, G.G.P., PIRES, A.J.V. Organização dos tecidos de plantas forrageiras e suas implicações para os ruminantes. **Arch. Zootec.** 57 (R): 13-28. 2008.
- CHENG, K. J., FORSBERG, C. W., MINATO, H, COSTERTON, J. W. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen, p. 595–624. *In* T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawashima (ed.), **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. Academic Press, Toronto, Ontario, Canada.
- CRAIG, W. M., et al. Quantitation of Microorganisms Associated with the Particulate Phase of Ruminal Ingesta. **American Institute of Nutrition**.1987.
- DEHORITY, B.A.; TIRABASSO, P.A. Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, p. 2921–2927. 2000.
- FERNANDO, S.C. et al. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p. 7482-7490, 2010.
- LEE, S.S. et al. Relative Contributions of Bacteria, Protozoa, and Fungi to In Vitro Degradation of Orchard Grass Cell Walls and Their Interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, No. 9, p 3807–3813. 2000.
- MCALLISTER, T.A. et al. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**. v. 72, p. 3004–3018, 1994
- MONTEILS, V. et al. Random changes in the heifer rumen in bacterial community structure, physico-chemical and fermentation parameters, and in vitro fibre degradation. **Livestock Science**. v.141, 104–112, 2011.

JOBLIN, K.N. et al. Degradation of Fresh Ryegrass by Methanogenic Co-Cultures of Ruminant Fungi Grown in the Presence or Absence of *Fibrobacter succinogenes*. *Current Microbiology*, v. 45, p. 46-53, 2002.

EDWARDS, J.E. et al. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 62, p. 323-335, 2007.

EDWARDS, J.E. et al. Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 66, p. 537-545, 2008.

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*, press, p. 1-8, 2013.

FIRKINS, J.L. et al. Effects of Protein, Carbohydrate, and Fat Sources on Bacterial Colonization and Degradation of Fiber In Vitro. *Journal of Dairy Science*, v.74, p.4273-4283, 1991.

FISKE, C.H.; SUBBAROV, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*, v.66, p.375-400, 1925.

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.

KIM, M. J. et al. Effects of methylcellulose on fibrolytic bacterial detachment and in vitro degradation of rice straw. *Asian Australas Journal Animal Science*, v. 26, n. 10, p. 1459-1465, 2013.

KONG, Y. et al. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiology Ecology*. v.74, p. 612-622, 2010.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: a collaborative study. *Journal of AOAC*, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

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

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, 2001

ORPIN, C.G; JOBLIN, K.N. 1997. The rumen anaerobic fungi. p 140-195. In: Hobson PN, Stewart CS (eds). *The rumen microbial ecosystem*. London: Chapman and Hall.

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.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crop. **Journal of the British Grassland Society**, Aberystwyth, v. 18, n.2, p. 104-111. 1963.

TRINCI, A.P.J. et al. Anaerobic fungi in herbivorous animals. **Mycological Research**, 98, p. 129-52. 1994.

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

## 5 DISCUSSÃO GERAL

A habilidade com que os microrganismos ruminais realizam degradação de carboidratos fibrosos é uma área estudo de grande importância na nutrição de ruminantes, principalmente em sistemas de produção com dietas a base de volumosos. Dessa forma, identificar fatores e mecanismos que interferem na função dos microrganismos fibrolíticos ruminais podem auxiliar na elaboração de estratégias nutricionais que aumentem eficiência com que os carboidratos fibrosos são degradados no rúmen.

O rúmen é composto por uma população microbiana diversa, onde bactérias e fungos são os principais microrganismos envolvidos na degradação da fibra. No entanto é difícil de se estimar de forma precisa a contribuição específica de cada grupo microbiano, devido a dificuldades em realizar a separação de cada grupo de microrganismos no rúmen e de se medir a biomassa de fungos ruminais com precisão (LEE et al, 2000).

Para que a degradação das forragens ocorra é necessário que ocorra uma etapa inicial de aderência dos microrganismos as partículas insolúveis (MCALLISTER, 1994). Contudo, não existe um método que seja considerado como padrão para estimar aderência microbiana em amostras de alimentos, de forma que várias metodologias têm sido utilizadas para quantificar o total de microrganismos aderidos.

No primeiro capítulo deste trabalho estão apresentados os resultados do estudo que avaliou o potencial dos marcadores  $N^{15}$ , purinas, fosfato e atividade da enzima xilanase para estimar aderência microbiana a partículas de forragens, utilizando como padrão a digestibilidade das forragens avaliadas. Os resultados obtidos indicaram que purinas e fosfato foram os marcadores que apresentaram correlação com a digestibilidade da matéria seca e da FDN.

Os resultados satisfatórios obtidos com fosfato e purinas indicam que estes marcadores podem ser para estimar aderência microbiana a partículas de forragens. No entanto, o fosfato apresenta vantagem em relação às purinas, em função dos procedimentos analíticos mais simples como o método proposto por Fiske & Subbarow (1925) utilizado neste estudo.

No segundo capítulo deste trabalho foi avaliado o papel de bactérias e fungos ruminais na degradação *in vitro* de forragens. Os resultados indicaram que tempo fixo de 24 horas, não foi observada diferença entre as médias de degradação das forragens dos meios contendo bactérias e fungos em relação ao meio contendo apenas bactérias, sendo superiores ao meio que continham apenas fungos e o meio onde os fungos e bactérias foram inibidos pela adição de antibióticos e antifúngico. Para compreender o envolvimento das populações aderidas nos

resultados de degradabilidade foram utilizados os marcadores  $N^{15}$ , fosfato e DNA para realizar a estimativa do total de microrganismos aderidos aos resíduos de incubação. Entre os marcadores utilizados o fosfato foi o que apresentou relação direta com a degradabilidade. Os resultados obtidos no tempo fixo de 24 horas indicaram que as bactérias desempenharam o papel mais importante na degradação das forragens, enquanto que o envolvimento dos fungos foi pouco significativo.

Ao se avaliar a produção de gás ao longo de 72 horas de incubação, foi observado efeito de meio de incubação, forragem e tempo de incubação. Os resultados indicaram que tanto para Azevém quanto o feno de Tifton as bactérias continuaram exercendo o papel mais significativo, no entanto foi possível identificar a participação dos fungos na degradação, sendo este resultado mais evidente para o feno de Tifton.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do primeiro estudo demonstraram que fosfato e purinas podem ser utilizados como marcadores de aderência microbiana a partículas de forragem. Contudo, o fósforo foi mais sensível em detectar diferenças entre espécies forrageiras e utiliza procedimento analítico mais simples do que purinas.

Os resultados do estudo avaliando função dos microrganismos ruminais na degradação de forragens indicaram que em um tempo fixo de 24 horas de incubação *in vitro* as bactérias foram determinantes na degradação das forragens e não foi observado função dos fungos. Em períodos mais longos de incubação (i.e. 72 horas) as bactérias permanecem desempenhando um papel mais importante na degradação das forragens o qual, contudo, foi potencializado pelos fungos. Adicionalmente, a participação dos fungos foi maior na degradação da forragem de menor digestibilidade.

## 7 REFERÊNCIAS

- AKIN, D. E. 1986. Chemical and biological structure in plants as related to microbial degradation of forage cell walls. p. 139-157. In: MILLIGAN, L. P. (ed). **Control of digestion and metabolism in ruminants**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- AKIN, D. E. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. **Agronomy Journal**, v. 81, p. 17-25, 1989.
- AKIN, D. E., BORNEMAN. Role of rumen fungi in fiber degradation. **Journal of Dairy Science**. v.73, p. 3023 – 3032. 1989
- 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.
- 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.
- 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 (<sup>15</sup>N and purine bases) and bacterial isolates for the estimation of rumen microbial protein synthesis. **Animal Science**, v.75, p.315-321, 2002.
- CHENG, K. J., FORSBERG, C. W., MINATO. H, COSTERTON, J. W. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen, p. 595–624. In T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawashima (ed.), **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. Academic Press, Toronto, Ontario, Canada.
- COLEMAN, G. S. The rate of uptake and metabolism of starch grains and cellulose particles by *Entodinium* species, *Eudiplodinium maggii*, someother *entodiniomorphid* protozoa and natural protozoa populations taken from the ovine rumen. **Journal of Applied. Bacteriology**, v.73. p. 507-13, 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 and Agricrigulture**. v. 25, p. 45-55. 1974
- DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P.A., Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, p. 2921–2927. 2000.

- EADIE, J. M., GILL, J. C. The effect of the absence of rumen ciliate protozoa on growing lambs fed on a roughage-concentrate diet. **British Journal of Nutrition**, v. 26, p.95-107, 1971.
- EDWARDS, J. E, HUWS, S. A., KIM, E. J., KINGSTON, A. H. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 62, p. 323-335, 2007.
- EDWARDS, J. E. et al., Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, p. 537-545, 2008.
- FARENZENA, R. ET AL. Forage degradability, rumen bacterial adherence and fibrolyticenzyme activity in vitro: effect of pH or glucose concentration. **Journal of Agricultural Science**, v. press, p. 1-8, 2013.
- FIRKINS, J. L.; BOWMAN, J.G.P.; WEISS, W. P.; NADERER, J. Effects of Protein, Carbohydrate, and Fat Sources on Bacterial Colonization and Degradation of Fiber In Vitro. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.4273-4283, 1991.
- FISKE, C.H.; SUBBAROV, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **The Journal of Biological Chemistry**, v.66, p.375-400, 1925.
- 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.
- FOX, D. G. et al. Application of the Cornell net carbohydrate and protein model for cattle consuming forages. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 267-277, 1995.
- FREELOVE, A.C., BOLAM, D.N., WHITE, P., HAZLEWOOD, G.P., GILBERT, H.J. A novel carbohydrate-binding protein is a component of the plant cell wall-degrading complex of *Piromyces equi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 43010-43017, 2001.
- 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.
- GOTTSCHALK, G. 1986. **Bacterial Metabolism**, 2 ed., Springer-Verlag, New York.
- HU, Z.H., Wang, G., Yu, H.Q. Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. **Biochemistry Engineering Journal**, v.21, p. 59–62. 2004
- KAMRA, D. N. Rumen Microbial Ecosystem **Current Science**., v.89, n.1 p. 124-134, 2005.
- KAMOUN, M. et al. Effect of feed 15N incorporation into solid-associated bacteria on the *in situ* nitrogen degradability of 15N labelled Italian ryegrass. **Animal Feed Science and Technology**. v. 135, p. 353–361, 2007



KIM, M. J. et al. Effects of methylcellulose on fibrolytic bacterial detachment and in vitro degradation of rice straw. **Asian Australas Journal Animal Science**, v. 26, n. 10, p. 1459-1465, 2013.

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.

KOIKE, S et al. Effect of mastication on degradation of Orchardgrass hay stem by rumen microbes: Fibrolytic enzyme activities and microbial attachment. **Animal Feed Science Technology**, v. 106, 69-79, 2003.

KOZLOSKI, G.V. et al. Microbial colonization and degradation of forage samples incubated in vitro at different initial pH. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 356-367.

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.

LEE, S. S., HA, J. K., AND CHENG, K.-J. Relative Contributions of Bacteria, Protozoa, and Fungi to In Vitro Degradation of Orchard Grass Cell Walls and Their Interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 66, No. 9, p 3807–3813. 2000.

LEE, S.S., CHOI, C. K., AHN, B. H., MOON, Y. H., KIM, C. H., HA, J. K. *In vitro* stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, p. 215-226. 2004.

LWIN, K. O. et al. Real-Time PCR Assays for Monitoring Anaerobic Fungal Biomass and Population Size in the Rumen. **Current Microbiology**, v.62, p. 1147-1151, 2011.

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

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.

MCSWEENEY, C. et al. Recent developments in nucleic acid based techniques for use in rumen manipulation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 241-351, 2009.

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.

MEZZOMO, M. P. Avaliação de métodos para estimar aderência microbiana a partículas de forragens. 2014. 79p. (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria,RS. 2014.

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, 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.

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

ORPIN, C. G. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. **Journal of General Microbiology**, v. 91, p. 249-262. 1975.

ORPIN, C. G. 1988. Genetic approaches to the improvement of lignocellulose degradation in the rumen. In **Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation**, ed. Aubert, J. P., Béguin, P., Millet, J. Academic Press, London, p. 172-179.

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

PAUL, S. S., KAMRA, D. N., SASTRY, V. R. B. Fermentative characteristics and fibrolytic activities of anaerobic gut fungi isolated from wild and domestic ruminants. **Archives of Animal Nutrition**, v. 64, n. 4, p. 279-292, 2010.

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: Potential Impact on Nutrient Output. **Journal of Dairy Science**. v. 73, n.10, p. 2971-2995, 1990.

SCHWARZ, W.H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, p.634-649, 2001

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.

SIROHI, S. K. et al. Isolation, characterization and fibre degradation potential of anaerobic rumen fungi from cattle. **Annals of Microbiology**. v. 63, p.1187-1194, 2013.

STEENBAKKERS, P.J., LI, X.L., XIMENES, E.A., ARTS, J.G., CHEN, H., LJUNGDAHL, L.G., OP DEN CAMP, H.J. Noncatalytic docking domains of cellulosomes of anaerobic fungi. **Journal of Bacteriology**. v. 183, p. 5325-5333, 2001.

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

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.

WEIMER, P. J. Why Don't Ruminant Bacteria Digest Cellulose Faster? **Journal of Dairy Science**, v. 79:p. 1496-1502, 1996.

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.

WILSON, J. R. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. **Agric. Sci.** v. 122, p. 173-182, 1994.

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.