

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

Dérick Cantarelli Rösler

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

Santa Maria, RS
2021

Dérick Cantarelli Rösler

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

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

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Vilmar Kozloski

Santa Maria, RS
2021

Rösler, Dêrick Cantarelli
FUNÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS RUMINAIS NA DEGRADAÇÃO DE
FORRAGENS *IN VITRO* / Dêrick Cantarelli Rösler. - 2021.
79 p.; 30 cm

Orientador: Gilberto Vilmar Kozloski
Coorientadora: Leila Picolli da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Zootecnia, RS, 2021

1. Aderência 2. Cynodon sp. 3. Lolium multiflorum 4.
qPCR 5. Microrganismos I. Vilmar Kozloski, Gilberto II.
Picolli da Silva, Leila III. Título.

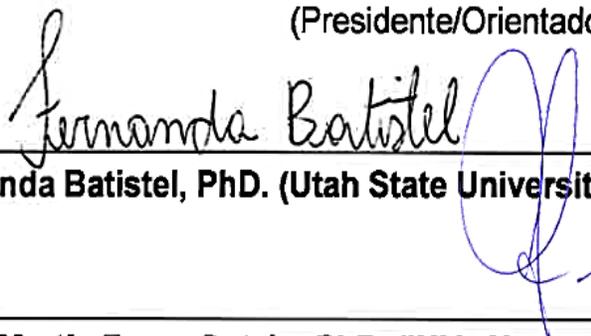
Dérick Cantarelli Rösler

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

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

Aprovado em 23 de fevereiro de 2021:

Gilberto Vilmar Kozloski, PhD. (UFSM) - Videoconferência
(Presidente/Orientador)



Fernanda Batistel, PhD. (Utah State University, EUA) - Videoconferência

Martín Fraga Coteló, PhD. (INIA, Uruguai) - Videoconferência

**Santa Maria, RS
2021**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família. Meus avós Nelda, Ingomar, Milton e Helda, meus pais Viviane e Rogério, e minha irmã Kimberlly. Obrigado pelo apoio incondicional em minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

À equipe do Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes, aos técnicos Clóvis, Gisele, Renata e Vítor, pelo auxílio técnico proporcionado.

Aos graduandos e estagiários Camila, Jailson, Luiz, João, Mateus e Tainan pela ajuda sempre que necessária, pelas conversas, pela paciência e pela amizade.

Aos meus colegas de pós-graduação Christina e Cláudio, parceiros de caminhada científica, por todos os momentos em que dividimos alegrias, apreensões e por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho.

À Mariana Mezzomo, crucial para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pelos ensinamentos, pela paciência e pela total disponibilidade de ajuda.

À Letícia Wlodarski, a melhor família que Santa Maria poderia me dar, por todos os momentos felizes, pela parceria no trabalho e na vida e por me acolher sempre que necessário. Obrigado por estar ao meu lado.

Ao meu orientador, professor Gilberto Kozloski, por cada conhecimento transmitido, pela demonstração de como trabalham os grandes pesquisadores, pelas oportunidades, pelos desafios, pela confiança e pela paciência. Obrigado também pelo acompanhamento de percussão nos churrascos do laboratório.

Ao professor Jean F. Tourrand, pela possibilidade de conhecer novos lugares e expandir meus horizontes, pelas conversas e pela amizade.

Aos meus amigos Endrio Chaves, Pedro Becker, Alexandre Mariani, Patrícia Rosa, Leila Cardozo, Yuri Katagiri, Letícia Santos, Rafael Lüdtkke, Lucas Maffei, Ravana Cargnelutti, Camille Domingues, Mauren Burin, Maicon Bender e Sharine Descovi.

Ao professor João Batista Teixeira da Rocha, por financiar parte do material necessário à pesquisa.

Ao Laboratório de Pesquisas Micológicas e ao Laboratório de Biologia Molecular e Sequenciamento por fornecer suporte técnico. Obrigado à Lara Baccarin pela ajuda, e à técnica Monica Medeiros, por auxiliar em todo processo de análise molecular.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo fornecimento da bolsa de estudos, bem como à Universidade Federal de Santa Maria, por toda sua infraestrutura. Grato por tê-la em minha vida acadêmica.

Galadriel:

Mithrandir... Why the Halfling?

Gandalf:

I don't know. Saruman believes it is only great power that can hold evil in check. But that is not what I have found. I've found it is the small things, everyday deeds of ordinary folk that keeps the darkness at bay. Simple acts of kindness and love. Why Bilbo Baggins? Perhaps it is because I am afraid... and he gives me courage.

*The Hobbit - An Unexpected Journey
(Adaptado da obra de J. R. R. Tolkien)*

RESUMO

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

AUTOR: Dérick Cantarelli Rösler
ORIENTADOR: Gilberto Vilmar Kozloski

O estudo foi conduzido para avaliar o papel interativo de bactérias e fungos na degradação de forragens C3 e C4 *in vitro*. Amostras secas e moídas (1 mm) de *Cynodon spp.* (Tifton 85) e *Lolium multiflorum Lam.* (Azevém) foram pesadas (1,5 g) em triplicata em frascos de 160 mL e incubadas *in vitro* por 48 h em meio (50 mL tampão + 50 mL inóculo ruminal) contendo ou não substâncias antimicrobianas. Uma mistura de penicilina, cloranfenicol e estreptomicina (500 mg/L de cada) foi usada como antibiótico e a cicloheximida (50 mg/L) foi usada como antifúngico. As fermentações *in vitro* foram conduzidas anaerobicamente em sistema de agitação lenta em banho-maria a 39°C. Os tratamentos foram: antibiótico (F), antifúngico (B), controle positivo (BF+, sem antimicrobianos) e controle negativo (BF-, com antimicrobianos). Foram realizados três ensaios para cada forragem e, em cada ensaio, o volume de gás foi medido às 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas de incubação. Para 24, 36 e 48 horas, houve uma triplicata de frascos de cada tratamento, no qual o resíduo sólido teve seu DNA extraído. O DNA de bactérias e fungos ruminais em cada tratamento e horário foi quantificado por análise de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). A atividade fibrolítica de cada tratamento, em cada tempo, foi avaliada através de incubação com xilano e posterior análise de açúcares redutores pelo método Somogyi-Nelson. Os dados da produção cumulativa de gás em cada frasco em cada ensaio foram ajustados a um modelo logístico de um pool que gerou três parâmetros cinéticos: produção total de gás (V, mL), taxa de produção de gás (Kd,%/h) e *lag time* (L, horas). Os dados foram analisados através de procedimento GLM do SAS e as médias comparadas através de teste T Student, com valor de significância de 5%. Bactérias ruminais possuem maior papel sobre a degradação de forragens. Para tifton 85, fungos e bactérias interagiram sinergicamente, permitindo maior degradação e aderência bacteriana. Houve menor degradação e aderência de fungos para azevém, sendo as bactérias as principais responsáveis pela adesão e degradação desta forragem. Maior atividade fibrolítica foi observada para tifton 85 comparado ao azevém. A interação de bactérias e fungos tende a possuir maior atividade fibrolítica, não houve diferença entre as populações isoladas quanto à produção de enzimas. Os resultados deste estudo contribuem para um melhor entendimento da atividade de fungos no rúmen, bem como sua interação com a população bacteriana sobre a degradação de forragens.

Palavras-chave: Aderência. *Cynodon sp.* *Lolium multiflorum*. qPCR. Microrganismos. Rúmen.

ABSTRACT

THE ROLE OF RUMINAL BACTERIA AND FUNGI ON FORAGE DEGRADATION *IN VITRO*

AUTHOR: Dérick Cantarelli Rösler
ADVISOR: Gilberto Vilmar Kozloski

The study was conducted to evaluate the interactive role of bacteria and fungi on the degradation of forages C3 and C4 *in vitro*. Dry and ground (1 mm) samples of *Cynodon spp.* (Tifton 85) and *Lolium multiflorum Lam.* (Azevém) were weighed (1.5 g) in triplicate in 160 mL flasks and incubated *in vitro* for 48 h in medium (50 mL buffer + 50 mL ruminal inoculum) containing or not antimicrobial substances. A mixture of penicillin, chloramphenicol and streptomycin (500 mg/L each) was used as an antibiotic and cycloheximide (50 mg/L) was used as antifungal. *In vitro* fermentations were carried out anaerobically in water-bath slow-stir system at 39 °C. The treatments were: antibiotic (F), antifungal (B), positive control (BF+, without antimicrobials) and negative control (BF-, with antimicrobials). Three replicate assays were performed for each forage and, in each assay the gas volume was measured at 3, 6, 9, 12, 24, 36 and 48 hours of incubation. For 24, 36 and 48 hours there was a three replicate of flasks of each treatment, which the solid residue had its DNA extracted. The DNA of bacteria and rumen fungi at each treatment and hour was quantified by Polymerase Chain Reaction real time (qPCR) analysis. The enzymatic activity of each treatment, at each time, was evaluated through incubation with xylan and subsequent analysis of reducing sugars by the Somogyi-Nelson method. Data of cumulative gas production in each flask in each assay was fitted to an one-pool logistic model which generated three kinetic parameters: total gas production (V, mL), rate of gas production (Kd, %/h) and lag time (L, hours). The data were analyzed using the GLM procedure of the SAS and the means compared using the T Student test, with a significance value of 5%. Ruminant bacteria had the greater role in the degradation of forages. For tifton 85, fungi and bacteria interacted synergistically and allowed greater degradation and bacterial adherence. There was poor degradation and adherence of fungi to azevém, and bacteria was the main responsible for the adhesion and degradation of this forage. Greater enzymatic activity was observed for tifton 85, compared to azevém. The interaction of bacteria and fungi tends to have greater enzymatic activity and there was no difference between isolated populations about the production of enzymes. The results of this study contribute to a better understanding of the activity of fungi in the rumen, as well as its interaction with the bacterial population on the degradation of forages

Keywords: Adherence. *Cynodon sp.* *Lolium multiflorum Lam.* qPCR. Microorganisms. Rumen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação do consórcio microbiano e formação do biofilme sobre a superfície de partículas de alimento.....	19
Figura 2 - Representação esquemática e disposição sobre a superfície celular bacteriana de um celulosoma, neste caso do celulosoma da bactéria <i>Acetivibrio cellulolytics</i>	21
Figura 3 - Representação do ciclo de vida dos fungos ruminais (monocêntricos).....	25
Figura 4 - Sequência de processos para obtenção da amostra padrão de bactérias ruminais.....	37
Figura 5 - Cinética da produção de gases de capim-elefante (A) e azevém (B) em incubação <i>in vitro</i> gás no período de 24 horas.....	45
Figura 6 - Aderência de microrganismos ruminais ao capim-elefante (A) e azevém (B) através da concentração de P microbiano nas diferentes proporções de IR ruminal utilizado no MI.....	46
Figura 7 - Cinética da produção de gases de tifton 85 (A) e azevém (B) em incubação <i>in vitro</i> gás no período de 48 horas.....	50
Figura 8 - Aderência bacteriana (μg de DNA bacteriano/g de MS de forragem incubada) a tifton 85 (A) e azevém (B) avaliada em três tempos (24, 36 e 48 horas) nos diferentes meios de incubação.....	52
Figura 9 - Aderência de fungos (μg de DNA bacteriano/g de MS de forragem incubada) a tifton 85 (A) e azevém (B) avaliada em três tempos (24, 36 e 48 horas) nos diferentes meios de incubação.....	53
Figura 10 - Atividade fibrolítica (nmol de glicose equivalente liberada/grama de MS/minuto) de tifton 85 (A) e azevém (B) avaliada em três tempos (24, 36 e 48 horas) nos diferentes meios de incubação.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características morfológicas dos gêneros de fungos anaeróbios. Descrições referentes a características morfológicas mais frequentemente observadas.....	23
Tabela 2 - Composição química de azevém e capim-elefante utilizados nos ensaios.....	32
Tabela 3 - Sequência de primers utilizados em Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real.....	40
Tabela 4 - Produção final de gás, taxa de degradação, <i>lag Time</i> , pH e aderência microbiana em 24 horas de incubação <i>in vitro</i> gás de azevém e capim-elefante incubados com diferentes Meios de Incubação.....	44
Tabela 5 – Parâmetros da fermentação ruminal de azevém e tifton 85 em resposta aos diferentes meios de incubação utilizados.....	48
Tabela 6 – Concentração dos reagentes de meio de incubação.....	77
Tabela 7 - Concentração dos reagentes de meio de incubação para posterior análise de aderência microbiana.....	78
Tabela 8 – Solução tampão fosfato.....	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE RUMINAL	15
2.2	CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES DA MICROBIOTA RUMINAL	16
2.2.1	Bactérias ruminais.....	16
2.2.1.1	<i>A degradação da fibra pelas bactérias ruminais</i>	<i>17</i>
2.2.1.2	<i>Celulossoma: o complexo multienzimático bacteriano</i>	<i>20</i>
2.2.2	Fungos ruminais.....	22
2.2.2.1	<i>Ciclo de vida dos fungos ruminais</i>	<i>23</i>
2.2.2.2	<i>A atividade enzimática dos fungos ruminais.....</i>	<i>26</i>
2.2.3	A importância da aderência dos microrganismos a fibra vegetal.....	27
2.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TECIDOS DA PAREDE CELULAR VEGETAL DE GRAMÍNEAS TEMPERADAS E TROPICAIS	29
3	HIPÓTESES	30
4	OBJETIVOS	31
4.1	GERAL	31
4.2	ESPECÍFICOS.....	31
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL EXPERIMENTAL.....	32
5.2	ENSAIO PRELIMINAR: AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE INÓCULO NO MEIO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ADERÊNCIA MICROBIANA E DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS INCUBADAS <i>IN VITRO</i>	33
5.3	ENSAIO EXPERIMENTAL: IMPACTO DAS POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS E FUNGOS NA FERMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS .	34
5.3.1	Incubações <i>in vitro</i>.....	34
5.3.2	Extração de DNA.....	35
5.3.3	Amostra padrão de bactéria	36
5.3.4	Amostra padrão de fungo	37
5.3.5	Análise de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real.....	39
5.3.6	Determinação da atividade fibrolítica no resíduo de incubação	41
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42

6	RESULTADOS	43
6.1	A PROPORÇÃO DE INÓCULO RUMINAL NO MEIO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ADERÊNCIA MICROBIANA E DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS <i>IN VITRO</i>	43
6.1.1	Parâmetros da fermentação e cinética da produção e gases	43
6.1.2	Aderência microbiana a forragens	45
6.2	PARTICIPAÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS RUMINAIS NA DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS.....	47
6.2.1	Parâmetros da produção de gás <i>in vitro</i>	47
6.2.2	Cinética da produção de gás <i>in vitro</i>	48
6.3	ADERÊNCIA MICROBIANA E ATIVIDADE FIBROLÍTICA.....	51
6.3.1	Aderência bacteriana a fibra vegetal	51
6.3.2	Aderência de fungos a fibra vegetal	52
6.3.3	Atividade fibrolítica da microbiota ruminal	54
7	DISCUSSÃO	55
7.1	A PROPORÇÃO DE INÓCULO RUMINAL SOBRE A DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS E ADERÊNCIA MICROBIANA	55
7.1.1	Degradação de forragens	55
7.1.2	Aderência dos microrganismos a forragem	56
7.2	BACTÉRIAS E FUNGOS ADERIDOS, DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS E ATIVIDADE FIBROLÍTICA.....	58
7.2.1	Degradação de forragens <i>in vitro</i>	58
7.2.2	Aderência microbiana	59
7.2.3	Aderência microbiana e degradação da fibra vegetal	61
7.2.4	Atividade fibrolítica	63
8	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	APÊNDICE I	77
	APÊNDICE II	78
	APÊNDICE III	79

1 INTRODUÇÃO

As gramíneas forrageiras são os principais componentes da dieta dos animais na maior parte dos sistemas de produção de ruminantes (HACKMANN e SPAIN, 2010). A sua degradação e utilização no rúmen depende primariamente da aderência dos microrganismos presentes nesse compartimento às partículas de forragem (MCALLISTER, 1994).

Várias espécies de bactérias ruminais que degradam fibra já foram previamente identificadas e a maior parte dos estudos que visam avaliar os mecanismos e fatores que afetam a atividade fibrolítica no rúmen foram focados na atividade bacteriana (STEWART et al. 1997; MIRON et al. 2001; CHENG et al. 2017). Contudo, embora com biomassa bem menor que as populações de bactérias (ORPIN e JOBLIN, 1997), várias espécies de fungos que também habitam o rúmen parecem ser mais eficientes em degradar partículas fibrosas (BAUCHOP, 1979; LEE et al. 2000; JOBLIN et al. 2002). Estudos prévios identificaram que os fungos ruminais atuam expressivamente sobre partículas pouco digestíveis e lignificadas. Sua alta capacidade de degradação ocorre devido ao rompimento físico da parede celular vegetal por parte de sua estrutura de adesão a fibra, sendo capaz de degradar porções pouco digestíveis de caules e folhas (AKIN, 1988; AKIN e BORNEMANN, 1990; BAUCHOP, 1979). Microrganismos ruminais ainda se diferem quanto à adesão e degradação dos tecidos da parede celular vegetal de gramíneas tropicais (C4) e temperadas (C3) (AKIN, 1980). Além da degradação física, fungos produzem enzimas de grande capacidade catalítica que impactam na degradação da fibra e tecido lignificado (PAUL et al. 2004; 2010).

Existe divergência na literatura sobre a interação de bactérias e fungos no rúmen. A reprodução e a atividade enzimática de fungos ruminais podem ser inibidos devido presença de bactérias (AKIN, 1987; BERNALIER et al. 1993; DEHORITY e TIRABASSO, 2000), porém, a ausência dos fungos parece não impedir a atuação destes microrganismos (WINDHAM e AKIN, 1984). A sinergia dos fungos com bactérias ocorre entre determinadas espécies e possibilita maior degradação da celulose que seus cultivos isolados (BERNALIER et al. 1992), a interação com microrganismos metanógenos (*Archaea*) possibilita aumento da biomassa de fungos, maior atividade

enzimática e degradação da celulose (FONTY e JOBLIN, 1991; ORPIN e JOBLIN, 1997).

Métodos para quantificação dos microrganismos aderidos à fibra têm sido amplamente utilizados, dentre eles os métodos de microscopia eletrônica, uso de marcadores internos e externos, contagem visual e método “número mais provável” (AKIN, 1983; 1986; MEZZOMO, 2018; OBISPO e DEHORITY, 1992; ORPIN, 1975; 1977). A maioria destes métodos baseia-se na contagem visual de microrganismos e por isso estão sujeitas a erro humano. O método molecular Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), envolvendo o gene 16S/18S rRNA, permite quantificar o DNA de microrganismos aderidos ao substrato através de primers específicos, não havendo a necessidade de procedimentos prévios para sua remoção das partículas do alimento (TAJIMA et al. 2001). Os autores Edwards et al. (2007; 2008) quantificaram com precisão bactérias e fungos ruminais aderidos a forragem fresca através do método quantitativo da Reação em Cadeia da Polimerase (qPCR).

Com isso, o presente estudo busca avaliar através de qPCR a quantidade de bactérias e fungos ruminais aderidos a partículas, suas interações e efeito destas sobre a degradação de forragens C3 e C4.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE RUMINAL

O trato gastrointestinal superior de herbívoros ruminantes é composto por quatro câmaras destinadas à degradação alimentar, rúmen, retículo, omaso e, o estômago verdadeiro, abomaso. As três câmaras pré-estomacais são responsáveis pela fermentação anaeróbica do alimento ingerido bem como absorção de vários de seus produtos. O rúmen caracteriza a maior das câmaras fermentativas e pode ocupar 2/4 do lado esquerdo da cavidade abdominal, com volume de até 200 litros em um grande ruminante. A superfície interna do rúmen é revestida por uma mucosa composta de papilas que atuam como órgão de absorção dos produtos da fermentação (HILL, 1988; HOFMANN, 1988). O pH ruminal, em condições normais, varia de 5,5 a 6,9, enquanto sua temperatura se mantém em cerca de 39°C (CHOUDHURY et al. 2015). A fermentação pré-gástrica realizada por estas câmaras, bem como características anatômicas e químicas permitiu o eficiente uso de carboidratos estruturais de plantas como fonte de energia e de compostos nitrogenados como fonte proteica, possibilitando adaptação dos ruminantes as mais diversificadas condições terrestres (VALADARES FILHO e PINA, 2011).

A fermentação ruminal ocorre devido atuação de microrganismos anaeróbicos presentes no rúmen, estes ao degradarem o alimento produzem, dentre outras substâncias, ácidos graxos voláteis (AGV's), tais como acetato, propionato e butirato, que serão absorvidos pela parede ruminal, adentrando a corrente sanguínea dos ruminantes e servindo como fonte de energia. Evidentemente, os ruminantes e seus microrganismos possuem uma benéfica relação de simbiose (HUNGATE, 1966). A microbiota ruminal é composta por três grandes populações: bactérias, protozoários, fungos e microrganismos *Archaea*. As bactérias se encontram em maior número (10^{10-11} por grama) e ultrapassa mais de 200 espécies já conhecidas, a segunda maior população é detida pelos protozoários (10^{4-6} por grama) que se dividem em 25 gêneros, enquanto os fungos ruminais se dividem em 6 gêneros e compõem a terceira maior população (10^{3-5} por grama) (CHOUDHURY et al. 2015). A degradação do alimento

presente no rúmen ocorre através de enzimas produzidas por estes microrganismos (ASCHENBACH et al. 2011), sendo essencial que para ação das enzimas fibrolíticas que a microbiota do rúmen se encontre aderida a partículas do alimento, onde além da produção de AGV's produzirão gases como dióxido de carbono (CO_2), gás que serve como precursor de metano (CH_4), produzido pelos microrganismos *Archaea* (RUSSEL e HESPELL, 1981).

Protozoários são responsáveis pelo controle populacional de microrganismos através de uma relação de predação entre espécies, porém, é estabelecido que sua ausência no ambiente ruminal não possui relevância significativa ao hospedeiro ruminante, não havendo consenso sobre a importância real deste microrganismo (MORGAVI et al. 2010; WILLIAMS e COLEMAN, 1997). A presença de protozoários no rúmen aumenta a produção total de AGV's e digestibilidade da fibra quando carboidratos estruturais formam a base da dieta (BELANCHE et al. 2011), contudo, ainda não se faz claro se o incremento da digestibilidade da fibra pode ser atribuído aos protozoários ou a sinergia entre todos os microrganismos (CHAUDHARY et al. 1995), ainda que haja atividade enzimática por parte dos protozoários, estes se encontram pouco aderidos a partículas de plantas (MARTIN et al. 1993; COLEMAN, 1985).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES DA MICROBIOTA RUMINAL

2.2.1 Bactérias ruminais

Bactérias ruminais possuem formatos de bacilo ou cocos e 0,5 a 2,0 μm de diâmetro e 1,0 a 6,0 μm de comprimento. São classificadas quanto ao tipo de parede celular, onde as gram-positivas possuem uma membrana externa simples, protegida por uma espessa camada glicopeptídica, enquanto bactérias gram-negativas possuem duas membranas externas interligadas por uma camada menos espessa de glicopeptídeos (KOZLOSKI, 2011).

Visto que as bactérias possuem maior quantidade populacional e que a associação à fibra é central na degradação, pode-se classificar estes microrganismos como: 1) bactérias livres no ambiente ruminal, 2) pouco aderidas a partículas de

alimento, 3) fortemente aderidas a partículas do alimento, 4) bactérias ligadas ao epitélio ruminal, 5) bactérias em adesão a fungos e protozoários ruminais (CHENG e COSTERTON, 1980; MCALLISTER et al. 1994). Dentro de condições normais de alimentação, a população bacteriana no rúmen associada às partículas de alimento pode ocupar cerca de 75% do total da microbiota ruminal (CRAIG et al. 1987). Em geral, observa-se que espécies bacterianas que degradam carboidratos fibrosos têm maior grau de afinidade pelos substratos (menor concentração de substrato é necessária para alcançar taxas de crescimento relativamente altas) bem como um custo energético de manutenção cerca de três vezes menos que bactérias não-fibrolíticas (KOZLOSKI, 2011), o que explica a predominância de determinadas espécies em uma dieta rica em fibra e de menor degradabilidade.

Bactérias ruminais que utilizam os polissacarídeos estruturais da parede celular vegetal (fibrolíticas) incluem principalmente espécies como *Prevotella ruminicola*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, e em menor quantidade, *Eubacterium cellulosolvens*. Os produtos originados desta degradação, além dos já citados anteriormente, são formato, succinato, etanol e lactato. O hidrogênio (H₂) pode ser captado pelo grupo de microrganismos *Archaea*, principalmente *Methanobrevibacter sp.* e *Methanobacterium sp.* para produção de CH₄ (RUSSEL e HESPELL, 1981; STEWART et al. 1997).

2.2.1.1 A degradação da fibra pelas bactérias ruminais

O primeiro passo para a degradação de um alimento no rúmen é a aderência e colonização das partículas vegetais pelas células bacterianas. Este processo é estabelecido através de matrizes compactas de populações bacterianas aderidas entre si e a superfície da partícula, estas denominadas biofilmes (KOZLOSKI, 2011).

De acordo com Cheng e Costerton (1980), a aderência à fibra ocorre principalmente através de uma estrutura denominada glicocálix, esta que estabiliza a ligação microrganismo-partícula através das enzimas associadas à sua estrutura. O processo de aderência e digestão é progressivo e sequencial, a ruptura da parede celular vegetal e proliferação das bactérias formando o biofilme depende não só de sua

composição química como também da capacidade de adesão destes microrganismos. Além das colônias iniciais de bactérias, outras espécies com mesma afinidade de substrato podem se aderir ao glicocálix da primeira espécie, formando um consórcio bacteriano de modo que uma população distinta e em camadas seja construída. Ao estudar as bactérias aderidas a partículas, Czerkowski (1980) demonstrou que parte das bactérias se move entre o fluido ruminal e as partículas de alimento, apresentando diferentes níveis de adesão. Também se verificou uma maior atividade enzimática em bactérias mais fortemente aderidas. O tempo necessário para que a colonização bacteriana a células vegetais ocorra geralmente é de cerca de 5 minutos, ainda que esta primeira adesão à fibra vegetal ocorra sem especificidade de espécies pelo substrato por até 30 minutos (EDWARDS et al. 2007).

A formação do biofilme (figura 1) começa com a aderência de bactérias a superfície celular vegetal pelo glicocálix, estas se multiplicam produzindo células irmãs e então passam a produzir enzimas digestoras que atacam o substrato até então insolúvel, formando espaços já degradados e liberação de nutrientes solúveis, os quais atraem um segundo grupamento de bactérias que dependem da liberação de substratos das primeiras espécies colonizadoras da partícula. Algumas espécies deste segundo grupamento se fixam ao glicocálix das bactérias já aderidas, ato que acaba recobrando a partícula de alimento, formando o biofilme. Dentro do biofilme ocorre concentração de nutrientes e repasse a outras bactérias, além disso, a formação do biofilme evita a ação de bacteriófagos presentes no rúmen e predação por parte dos protozoários. Quando a partícula vegetal é totalmente digerida, as bactérias se encontram novamente livres para colonizar partículas recém-chegadas ao rúmen. Bactérias aderidas a partículas que passam ao resto do trato gastrointestinal servirão de fonte de carboidratos e aminoácidos ao animal hospedeiro (MCALLISTER et al. 1994; KOZLOSKI, 2011).

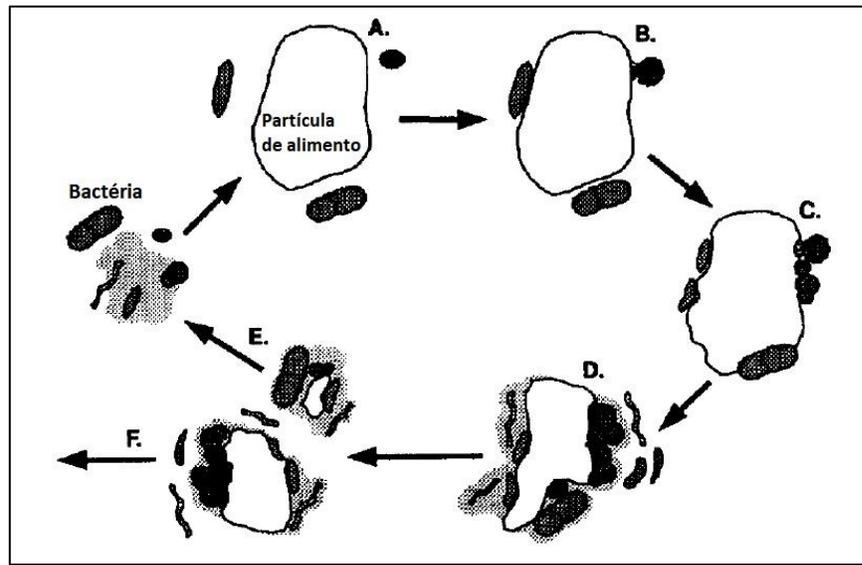


Figura 1 - Representação do consórcio microbiano e formação do biofilme sobre a superfície de partículas de alimento. (A) bactérias associadas aleatoriamente. (B) bactérias aderidas através de glicocálix e proteínas de ligação que a acompanham. (C) Bactérias se dividem para produzir células irmãs e espaços provenientes da digestão se tornam visíveis na superfície da partícula alimentícia. (D) Bactérias adicionais (segundo grupo) combinadas com colonizadoras primárias formando biofilme. (E) Partes do biofilme se dissociam das partículas de alimento. (F) Outras porções permanecem aderidas e passam do rúmen para o trato digestivo inferior. Adaptado de McAllister et al. (1994).

Embora enzimas celulases sejam limitadas a serem produzidas por alguns microrganismos, os produtos da hidrólise de celulose colaboram para o crescimento de várias espécies que são incapazes de usá-la diretamente. Muitos produtos da degradação da parede celular vegetal podem servir para crescimento de outras espécies, como por exemplo, bactérias aminolíticas. O crescimento bacteriano a partir do uso de produtos hidrolisados depende da taxa de transporte para o interior da célula bacteriana e sua taxa de conversão em produto, bem como um pool de enzimas com alta afinidade pelo substrato. Diferenças na capacidade das enzimas bacterianas e transporte intracelular podem ter significativa influência sobre a composição da comunidade microbiana do biofilme (WOLIN e MILLER, 1997).

2.2.1.2 Celulossoma: o complexo multienzimático bacteriano

As enzimas provenientes dos microrganismos ruminais são necessárias para hidrólise dos polímeros que formam a parede celular vegetal. Mais de 85% da atividade de celulase, hemicelulase e glicosidase estão ligadas a frações da digesta, sendo bactérias celulolíticas e hemicelulolíticas firmemente aderidas ao material vegetal (WILLIAMS e STRACHAN, 1984). Além de celulasas e hemicelulasas, enzimas xilanases e glucanases são encontradas em várias espécies fibrolíticas (CHESSON e FORSBERG, 1997).

Bactérias ruminais possuem estruturas em sua superfície que comportam uma série de enzimas atuantes na degradação da célula vegetal, este conjunto de estruturas é denominado celulossoma e foi descrito pela primeira vez por Edward Bayer em bactérias celulolíticas *Clostridium thermocellum* (BAYER et al. 1983). A importância do celulossoma foi demonstrada por Stewart et al. (1990) quando células de *Ruminococcus flavefaciens* com protuberâncias em sua superfície permitiram degradação da celulose presente no algodão e crescimento bacteriano. O celulossoma e todas suas estruturas especializadas na adesão e degradação à fibra são quem dão às bactérias fibrolíticas a vantagem adaptativa na degradação de tecido fibroso, visto que cada espécie bacteriana tem diferentes composições de celulossoma (MIRON et al. 2001)

Pode-se entender o celulossoma (figura 2) como um conjunto de unidades interligadas, sendo a principal delas denominada escafoldinas. A escafoldina primária é uma grande proteína integradora de enzimas, sua estrutura é composta por uma série de estruturas menores denominadas coesinas (geralmente em módulos de múltiplas cópias) que incorporam as enzimas à escafoldina principal (escafoldina primária). Para a ligação enzima-coesina-escafoldina, um módulo complementar denominado dockerina se faz presente em cada uma destas enzimas, este que se acopla aos módulos de coesina em um sistema chave-fechadura. A escafoldina primária ainda conta com um módulo de ligação a celulose chamado CBM (*carbohydrate/celulose-binding module*). Outras escafoldinas podem desempenhar papel relevante na estrutura do celulossoma, a escafoldina de ancoragem, por exemplo, realiza a função de manter

toda a estrutura do celulosoma presa à superfície celular bacteriana. O módulo SLH (*S-layer homology*) caracteriza uma escafoldina de ancoragem, ligando-a a superfície celular bacteriana. A ligação entre escafoldinas é dependente também da ligação coesina-dockerina. A escafoldina adaptadora, compondo outro grupo funcional, efetivamente multiplica o número de enzimas possíveis de serem incorporadas no complexo do celulosoma. A razão pelo qual uma grande variedade de enzimas é produzida pode ser explicada pela composição de polissacarídeos da parede celular vegetal, sendo necessárias diversas enzimas para sua degradação (BAYER et al. 2004).

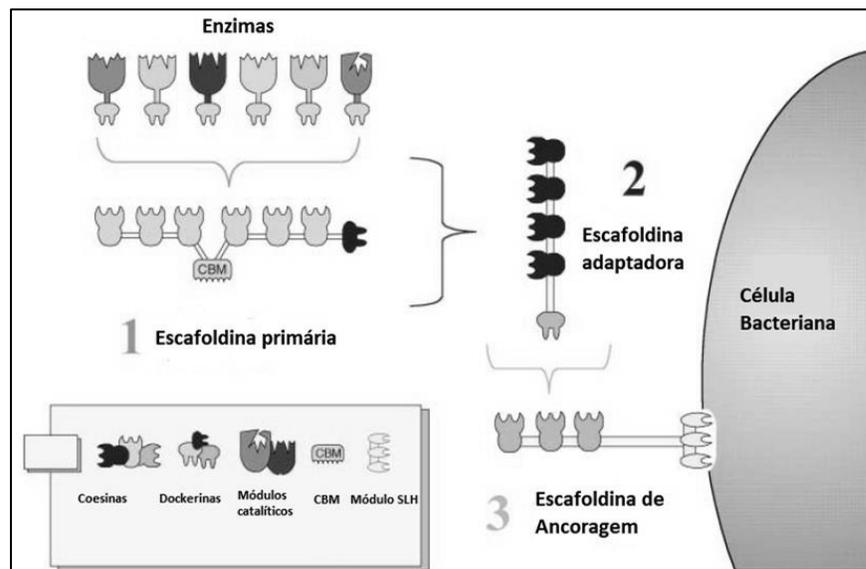


Figura 2 – Representação esquemática e disposição sobre a superfície celular bacteriana de um celulosoma, neste caso do celulosoma da bactéria *Acetivibrio cellulolyticus*. O conjunto de enzimas é incorporado a escafoldina primária por suas coesinas interagindo com as dockerinas. A escafoldina adaptadora amplia a capacidade de suporte de enzimas. O módulo SLH presente na escafoldina de ancoragem realiza a aderência do celulosoma a superfície celular bacteriana. O CBM presente na escafoldina primária encontra e conecta toda a estrutura do celulosoma ao substrato de celulose. Adaptado de Bayer et al. (2004).

Coesinas e dockerinas são compostas por conjuntos de dezenas de aminoácidos, a interação coesina-dockerina é a base fundamental para a montagem do complexo do celulosoma, esta ligação não covalente é uma das mais fortes presentes na natureza (ANDRADE, 2017; ARTZI et al. 2016; NASH et al. 2016). Estudos recentes demonstram que o celulosoma também atua na degradação da hemicelulose, quitina e pectina, devido seu conjunto multienzimático. Porém, ainda existe muito a ser descoberto a respeito de sua estrutura, função, regulação e mecanismos de ação (DOI et al. 2003).

2.2.2 Fungos ruminais

Sendo os últimos microrganismos a serem descobertos, os fungos ruminais (família *Neocallimastigaceae*), foram por muito tempo confundidos com protozoários ciliados devido sua morfologia. A espécie *Neocallimastix frontalis*, a primeira a ser descoberta, foi central nos primeiros estudos sobre esta população e ajudou a caracterizar a reprodução dos fungos no ambiente ruminal, evidenciando fases cíclicas compostas por etapas de flagelos (10 µm) de vida livre, fase vegetativa (formação de talo e rizoide), caracterizada pela adesão a célula vegetal, e reprodutiva (esporângio, de 5 a 30 µm) (HUNGATE, 1966; ORPIN, 1975; ORPIN e JOBLIN, 1997).

Dentre os gêneros de fungos ruminais, os principais são *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces* e *Anaeromyces* (ORPIN e JOBLIN, 1997). Os gêneros podem ser divididos em grupos baseados na morfologia do talo (monocêntrica ou policêntrica), que originará o rizoide, e morfologia de flagelos (monoflagelado ou poliflagelado), estruturas dos fungos responsáveis pela reprodução e adesão à fibra (NAGPAL et al. 2009). A tabela 1 demonstra um resumo das características morfológicas dos fungos. Os produtos da fermentação são AGV's, gases e pouca quantidade de etanol e lactato (VAN SOEST, 1994).

Tabela 1 – Características morfológicas dos gêneros de fungos anaeróbicos. Descrições referentes a características morfológicas mais frequentemente observadas. Adaptado de Arcuri et al. (2011) e Paul et al. (2018).

Gênero	Nº de flagelos	Forma do zoósporo	Talo ou hifa (rizoide)
<i>Neocallimastix</i>	Poliflagelado (7 – 17)	Elipsóide	Abundantes e muito ramificados
<i>Piromyces</i>	Mono a tetraflagelado	Ovoide a piriforme	Pequenos e muito ramificados
<i>Caecomyces</i>	Mono a biflagelado	Esférica	Ausência de sistema de hifas ramificadas
<i>Orpinomyces</i>	Poliflagelado	Ovoide	Policêntrico
<i>Anaeromyces</i>	Monoflagelado	Ovoide	Policêntrico

Fungos ruminais não possuem mitocôndria dentre suas organelas, mas sim uma hidrogenossoma presente nas hifas e zoósporos fúngicos. Esta estrutura substitui a mitocôndria em suas funções, sendo uma organela voltada ao metabolismo energético, capaz de produzir H₂, CO₂, Acetato e ATP. A hidrogenossoma é uma variação da mitocôndria adaptada à condição anaeróbica (MULLER, 1993; YARLET e HACKSTEIN, 2005).

2.2.2.1 *Ciclo de vida dos fungos ruminais*

Zoósporos representam a fase de vida livre do ciclo de vida dos fungos, em determinado momento, a adesão do zoósporo à célula vegetal passa a formar talo e rizoide, estes como sendo parte do estágio vegetativo. Com o estabelecimento da fase vegetativa, o surgimento do esporângio (porção responsável pela produção de zoósporos), caracteriza o estágio de multiplicação celular. Os rizoides originados a

partir da adesão e encistamento do zoósporo a fibra vegetal conseguem penetrar no tecido com mais eficiência que bactérias e protozoários ruminais, ganhando acesso a regiões da planta indisponíveis aos demais microrganismos (ORPIN e JOBLIN, 1997).

O ciclo de vida dos fungos ruminais (figura 3) deve produzir uma massa microbiana suficiente para suprir a diminuição dos fungos ruminais por morte ou saída do rúmen para o restante do trato gastrointestinal (DIJKSTRA et al. 2002). Os zoósporos liberados no fluido ruminal buscam sua fonte de energia nos carboidratos, sendo que carboidratos solúveis do tecido vegetal funcionam como agentes de atração química para estes zoósporos, fixando-os à parede celular vegetal através de seus vários receptores químicos (atuantes sobre glicose, manose, por exemplo). Os zoósporos atacam principalmente estômatos, pontas laterais e tecido danificado da planta, iniciando o estágio vegetativo. A aderência do zoósporo ocorre de maneira muito rápida, cerca de 15 a 30 minutos após incubação de alimento no rúmen, já as fases seguintes (germinação, zoosporogênese, liberação do zoósporo) que posteriormente darão origem e eclosão de novos zoósporos, podem levar cerca de 8 horas, caracterizando o tempo do ciclo de vida dos fungos (AKIN e BERNER, 1988; ORPIN, 1975; 1977). O processo de formação do cisto e germinação, em meio contendo glicose, pode ocorrer a partir de 30 minutos da adesão dos zoósporos, porém, baixas concentrações de glicose podem resultar em atraso de até 6 horas desta germinação (ORPIN e BOUNTIFF, 1978). Fungos podem demonstrar esporângios de tamanho uniforme após 6 horas de incubação *in situ*. Após 24 horas de incubação, esporângios são encontrados nas folhas e esclerênquima das células vegetais. Após 48 horas, esporângios estão aderidos em tecido lignificado, esclerênquima e células vasculares do caule. A entrada de fungos no tecido vegetal ocorre através dos estômatos, bem como penetram a cutícula, uma barreira estrutural rígida da epiderme da planta (AKIN et al. 1983).

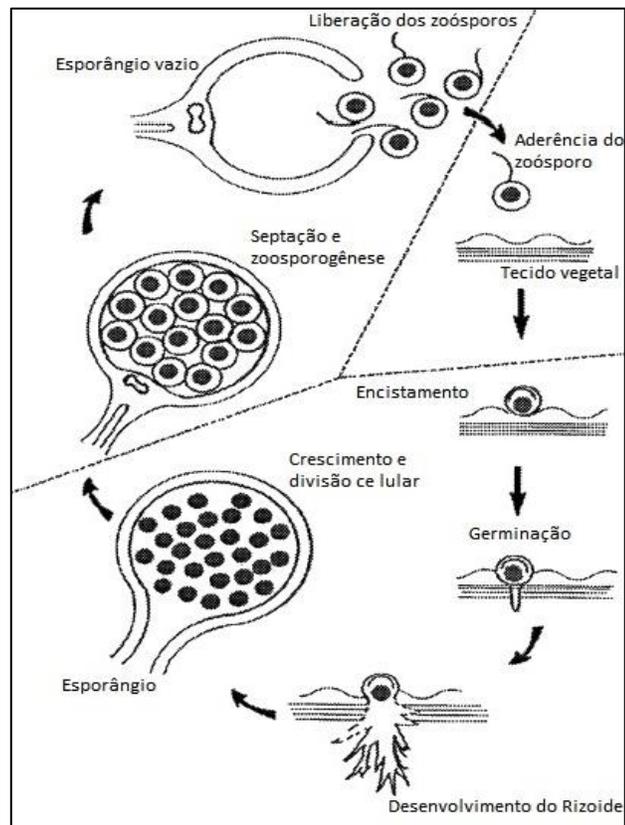


Figura 3 - Representação do ciclo de vida dos fungos ruminais (monocêntricos). Adaptado de Dijkstra et al. (2002).

A dinâmica de colonização do material vegetal pelos fungos ruminais é mediada pelo tempo necessário a localizar, atacar, fixar e formar um cisto sobre o tecido vegetal (EDWARDS et al. 2008), sendo que estes microrganismos são capazes de hidrolisar completamente tecido não lignificado das plantas (mesófilo, parênquima e floema) e degradar parcialmente tecido lignificado (xilema e anéis de esclerênquima dos caules) (AKIN e BENNER, 1988), já o esclerênquima das folhas é extensivamente hidrolisado pelos fungos (AKIN et al. 1989). A maior eficiência na penetração do tecido vegetal pode levar a uma mais rápida e completa degradação das células vegetais que adentram no rúmen (BAUCHOP e MOUNTFORT, 1981), bem como o fato de realizar degradação da lignina, esta, uma das mais importantes características dos fungos ruminais (MOUNTFORT et al. 1982).

A colonização dos fungos no tecido vegetal se dá em diferentes tempos, visto que diferentes estágios de seu ciclo foram encontrados aderidos às porções menos digestíveis de caules e lignina (BAUCHOP, 1979). Os fungos exibem uma menor taxa cíclica de vida no rúmen comparados as bactérias, e seu resultado em termos de massa total são menores ainda que não totalmente conhecidos. Comparados aos protozoários, por exemplo, os fungos estão mais associados às partículas bem como envolvidos na digestão fibrolítica. Os rizoides por eles formados podem penetrar na parede celular vegetal e superfícies lignificadas, causando ou facilitando o desaparecimento da parede celular vegetal, sendo capazes de fermentar partículas espessas mais rapidamente que bactérias devido à formação de hifas que penetram na célula (VAN SOEST, 1994).

Fungos podem ser de extrema relevância na degradação de forragens tropicais, atuando eficientemente sobre tecido fibroso e degradando a parede celular vegetal. Em ensaios *in vitro*, na ausência de bactérias, fungos foram capazes de remover cerca de 62% do material incubado (AKIN et al. 1983). Dentre forragens tropicais, o gênero *Cynodon* é capaz de suportar maior colonização de esporângios (AKIN et al 1987).

2.2.2.2 A atividade enzimática dos fungos ruminais

Fungos ruminais também possuem celulosoma, suas dockerinas e escafoldinas diferem das usualmente encontradas em bactérias ruminais. O celulosoma já foi evidenciado em gêneros como *Anaeromyces*, *Neocallimastix* e *Piromyces*, porém devido à falta de dados referentes a seu genoma, mais estudos são necessários para caracterização desta estrutura (HAITJEMA et al. 2017).

As enzimas produzidas pelos fungos têm alta capacidade na degradação da lignina presente na parede celular vegetal, cerca de 33.6% da lignina presente no caule de *Sorghum sp.* foi solubilizada por fungos (McSweeney et al. 1994). Diferente das bactérias ruminais celulolíticas, fungos possuem proteases que facilitam a penetração do rizoide sobre componentes proteicos da planta (Engels e Brice, 1985).

Para que os produtos oriundos da fermentação possam ser obtidos a partir da degradação de uma planta, enzimas são produzidas por estes microrganismos

ruminais, dentre elas celulase, carboximetilcelulase (CMCase), β -glicosidase, xilanase, β -xilanase e avicelase. Estas enzimas podem suportar pH's de 5,5 a 7,0 quando produzidas por fungos monocêntricos e a partir de 6,4 tratando de fungos policêntricos. Dentre as enzimas produzidas, a atividade da xilanase se mostrou maior que as demais enzimas quando fungos foram incubados individualmente com glicose, quando submetidos à incubação com *Cynodon spp.* a atividade da xilanase foi sete vezes maior que a atividade da CMCase, demonstrando a grande capacidade dos fungos na degradação do xilano presente na parede celular vegetal. O pico de atividade enzimática dos fungos ruminais ocorre cerca de 96 horas após início de uma incubação *in vitro* para xilanase e CMCase, enquanto a avicelase passa por sua maior atividade somente após 120 horas de incubação. Fungos monocêntricos produzem enzimas em maior quantidade e rapidez que fungos policêntricos (BORNEMAN et al. 1989; SIROHI et al. 2013).

Ao avaliar a atividade enzimática entre os gêneros *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* e *Anaeromyces*, Paul et al. (2010) demonstraram que o gênero *Neocallimastix* foi responsável pela maior atividade das enzimas CMCase, xilanase e avicelase, seguido sempre pelo gênero *Piromyces*, este que possuiu maior atividade de proteases quando comparado aos demais gêneros. Os gêneros *Orpinomyces* e *Anaeromyces*, sendo policêntricos, demonstraram menor atividade que os outros dois monocêntricos.

2.2.3 A importância da aderência dos microrganismos a fibra vegetal

A aderência dos microrganismos é essencial para a digestão na fibra no rúmen, desenvolvimento das populações microbianas e possibilidade de atuação das enzimas fibrolíticas (MCALLISTER et al. 1994). A microbiota aderida a partículas pode representar mais de 80% do total de microrganismos no rúmen 1 hora após contato com o alimento (CRAIG et al. 1987). São nos microrganismos aderidos a partículas que a maior parte do ATP é produzido, Fosberg e Lam (1977) evidenciaram que 75% da produção de ATP provêm de origem microbiana aderida ao alimento.

Além da produção de ATP, microrganismos aderidos à fibra são os responsáveis pela maior produção e atividade de enzimas capazes de degradar carboidratos estruturais da célula vegetal (WILLIAMS e STRACHAN, 1984). Sabe-se que uma maior disponibilidade de enzimas provenientes de bactérias ruminais incrementa não só o consumo, mas também a degradação da matéria seca (DMS), atuando sobre o crescimento microbiano e possibilitando, inclusive, uma maior produção de leite (YANG et al. 1998; GADO, et al. 2009). Em estudo *in vitro*, uma maior disponibilidade de enzimas aumentou a produção de gás ao longo do período de incubação, bem como aumentou a degradação da matéria orgânica (DMO) de forragens (ELGHANDOUR, et al. 2013).

A aderência a carboidratos estruturais é crucial para crescimento de bactérias fibrolíticas, Gong e Forsberg (1989) ao cultivarem células mutantes de *Fibrobacter succinogenes* sem a capacidade de realizar adesão, observaram que este seria um fator determinante na degradação da celulose. Quando células de *Ruminococcus albus* com e sem capacidade de adesão foram expostas a celulose, a capacidade de crescimento das células mutantes foi comprometida, bem como sua atividade enzimática e papel na degradação (MIRON et al. 1998). Ao avaliar 13 variedades celulolíticas e 10 não-celulolíticas de *Ruminococcus albus* quanto a sua capacidade de adesão, Morris e Cole (1987) obtiveram adesão entre 0 a 49% de variedades celulolíticas e 0,8% de variedades não-celulolíticas aderidas. A adesão de bactérias fibrolíticas é necessária não só para sua própria sobrevivência como também para benefício de bactérias não-fibrolíticas, como por exemplo, *Treponema bryantii*, que utiliza de fontes de carbono provenientes da degradação da celulose, o consórcio de espécies colabora com aumento da DMS e produção de AGV's (KUDO et al. 1987).

Assim como nas bactérias ruminais, a adesão à fibra por parte dos fungos é essencial para a degradação do tecido vegetal. Sem adesão de fungos à celulose, sua degradação por parte destes microrganismos não ocorre (CHENG et al. 1991b), além disso sua sinergia com bactérias depende da aderência à fibra, esta adesão pode assumir maior relevância na degradação da fibra a partir de 36 horas (ZHANG et al. 2007). Sinergia entre fungos e bactérias na degradação da fibra também foi

evidenciada por Lee et al. (2000), porém, alguns autores evidenciam competição entre estas populações (AZAD et al. 2020; DEHORITY e TIRABASSO, 2000).

As interações entre microrganismos aderidos é parte importante no processo de degradação, a adesão a diferentes porções do tecido vegetal pode promover maior degradação da fibra. Os fungos demonstram maior capacidade na degradação de caules que as próprias bactérias ruminais, quando combinados com microrganismos *Archaea*, podem digerir até 30% do total incubado. Em compensação, a porção folhosa demonstrou ser pouco atacada por fungos (JOBLIN, 2002). Além disso, o benéfico consórcio interespecie entre microrganismos *Archaea* e fungos ruminais é capaz de prover melhor degradação e utilização de xilose, bem como estimular a atividade enzimática fúngica (JOBLIN et al. 1990).

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TECIDOS DA PAREDE CELULAR VEGETAL DE GRAMÍNEAS TEMPERADAS E TROPICAIS

Gramíneas tropicais possuem epiderme menos degradável pelos microrganismos quando comparadas a gramíneas temperadas. O mesófilo situado abaixo da epiderme permite maior espaço intercelular em gramíneas temperadas, permitindo maior acesso às bactérias. O mesófilo é um tecido de fácil digestão presente nas folhas, possuindo baixo teor de lignina e estando majoritariamente em gramíneas temperadas. O parênquima interfere na degradação da parede celular por dois motivos, um destes é o amplo espaço ocupado por este tecido na parede celular. A segunda razão é a contribuição no desenvolvimento de uma parede celular secundária altamente lignificada ao passo que a maturação da planta ocorre, reduzindo sua degradação pelos microrganismos ruminais. Gramíneas tropicais apresentam maior teor de parênquima quando comparadas com gramíneas temperadas. De modo geral, gramíneas temperadas são mais digestíveis que tropicais, a degradação da parede celular vegetal é impactada pela proporção de cada tecido e sua respectiva degradabilidade. Tecidos como o esclerênquima e o xilema, formados por células de parede secundária espessada, são os que mais contribuem para a baixa qualidade da forragem (WILSON, 1993).

3 HIPÓTESES

Bactérias constituem os principais microrganismos aderidos e possuem a maior atividade na degradação de partículas de forragens no rúmen. Contudo, os fungos ruminais também colonizam e contribuem de forma interativa com as bactérias para a degradação das forrageiras, principalmente das gramíneas tropicais, as quais são mais fibrosas que as gramíneas temperadas.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Determinar o grau de participação de bactérias e fungos ruminais na biomassa aderida e sua função na degradação *in vitro* de gramíneas C₃ e C₄.

4.2 ESPECÍFICOS

Avaliar o impacto da presença de bactérias e/ou fungos na cinética de produção de gases de amostras de azevém e tifton 85 incubadas *in vitro* ao longo de 48 horas.

Quantificar a proporção de DNA de bactérias e fungos aderidos às partículas de azevém e tifton 85 após 24, 36 e 48 horas de incubação *in vitro*.

Avaliar a atividade fibrolítica presente nos resíduos de azevém e tifton 85 após 24, 36 e 48 horas de incubação *in vitro*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL EXPERIMENTAL

O presente estudo utilizou amostras de azevém (*Lolium multiflorum*), capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), e tifton 85 (*Cynodon sp.*) cortados em seu estágio vegetativo de pastagens implantadas localmente. As amostras foram secas em estufa com ventilação forçada a 55°C e posteriormente moídas (peneira com porosidade de 1 mm) e conservadas para posterior análises e incubações.

Os teores de matéria seca (MS) das amostras de forragem foram obtidos por secagem em estufa a 110°C durante pelo menos 8 horas e, a matéria mineral (MM) foi obtida pela queima em mufla a 600°C durante 4 horas. O nitrogênio (N) total foi analisado por método Kjeldahl (método 984.13, AOAC, 1997) e o teor de proteína bruta (PB) calculado com $N \times 6,25$. O teor de fibra em detergente neutro (FDN) foi determinado conforme Mertens (2002), exceto que as amostras foram pesadas em sacos de poliéster (KOMARECK, 1993) e tratadas com detergente neutro em autoclave a 110 °C durante 40 minutos (SENGER et al. 2008). Os teores de fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados de acordo com AOAC (método 973.18, AOAC, 1995), sem uso de amianto. Para obtenção do teor de lignina (LDA), o resíduo da FDA foi tratado com solução de H₂SO₄ 12 M. Os resultados das análises bromatológicas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química¹ das gramíneas forrageiras utilizadas nos ensaios.

Forragem	MM	PB	FDN	FDA	LDA
	% na MS				
Azevém	11,0 ± 0,05	22,1 ± 0,17	53,4 ± 0,84	28,1 ± 1,01	5,6 ± 1,26
C. Elefante	11,0 ± 0,08	13,6 ± 0,02	64,3 ± 0,97	35,2 ± 1,17	3,5 ± 0,42
Tifton 85	10,4 ± 0,04	15,5 ± 0,18	71,0 ± 2,52	37,4 ± 1,56	6,5 ± 1,07

¹Onde: C. Elefante = Capim Elefante; MS = Matéria Seca; MM = Matéria Mineral; PB = Proteína Bruta; FDN = Fibra em Detergente Neutro; FDA = Fibra em Detergente Ácido; LDA = Lignina em Detergente Ácido. Médias dos valores seguidas do desvio-padrão.

5.2 ENSAIO PRELIMINAR: AVALIAÇÃO DA PROPORÇÃO DE INÓCULO NO MEIO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ADERÊNCIA MICROBIANA E DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS INCUBADAS *IN VITRO*

Amostras de azevém (C₃) e capim-elefante (C₄), previamente secas em estufa com circulação de ar forçada a 55°C e moídas em peneira de 1mm, foram pesadas (1,5 g) em triplicata de frascos de vidro transparente com capacidade de 160 mL, posteriormente foram adicionados em cada frasco 100 mL de meio de incubação (MI) com diferentes proporções de inóculo ruminal (IR) e solução tampão (ST), sob fluxo constante de CO₂. As proporções de IR:ST testadas foram: 10:90 (T10), 20:80 (T20), 30:70 (T30), 40:60 (T40) e 50:50 (T50). A seguir, os frascos foram vedados com tampa de borracha e inseridos em incubadora em banho-maria com temperatura de 39°C e com agitação lenta e contínua, onde foram mantidos por um período de 24 horas, tempo que é esperado máximo grau de aderência microbiana no resíduo de incubação (KOZLOSKI et al. 2008). O inóculo ruminal foi obtido de um bovino Brangus fistulado, mantido em uma pastagem de gramínea tropical, e recebendo suplementação com concentrado. O inóculo ruminal foi coletado com uma mangueira plástica acoplada a um Kitasato mantido em banho-maria com água morna e com uso de bomba de vácuo. Imediatamente após a coleta o inóculo foi filtrado através de dupla camada de gaze sob injeção contínua de CO₂ e mantido em banho-maria a 39°C durante os procedimentos de incubação. As concentrações dos reagentes das diferentes ST estão descritas no Anexo I.

Foram utilizados 2 frascos brancos (sem amostra) para cada um dos níveis de inóculo utilizados, a fim de descontar valores de produção de gás oriundos do inóculo ruminal. Após o início da incubação, a avaliação da degradabilidade de ambas as forragens se deu através da medição da produção de gases oriunda da fermentação ocorrida no frasco. O volume de gás foi medido pelo deslocamento de uma solução aquosa presente em uma bureta graduada (50 mL) após inserção no frasco de uma agulha conectada à bureta através de uma mangueira de silicone. Os gases acumulados na primeira hora após início da incubação foram descartados a fim de eliminar possíveis gases da fermentação remanescente do ambiente ruminal. Após a

liberação destes gases foi considerada a hora 0 (início da fermentação das amostras incubadas). O volume de gases foi medido nos tempos de 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas de incubação. Ao final de 24h a incubação foi interrompida, e o conteúdo dos frascos de cada forragem em cada tratamento foram misturados e então filtrados através de tecido de porosidade 40 micras. O pH do filtrado foi medido e os resíduos sólidos foram coletados e armazenados em potes plásticos em freezer a -20°C. Os resíduos foram posteriormente secos a 55°C em estufa com ventilação forçada e armazenados para posterior análise. Os dados de produção de gás acumulada nos respectivos horários foram submetidos à análise de modelo logístico unicompartmental de Schofield et al. (1994), o qual gerou três parâmetros cinéticos: produção total de gás (mL), taxa de produção de gás (%/h) e *lag time* (h). O grau de aderência microbiana foi estimado com base na quantidade de fósforo (P) insolúvel em detergente neutro presente no resíduo de incubação, cujo princípio e análise foram detalhadamente descritos por Farenzena et al. (2013).

5.3 ENSAIO EXPERIMENTAL: IMPACTO DAS POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS E FUNGOS NA FERMENTAÇÃO *IN VITRO* DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS

5.3.1 Incubações *in vitro*

Baseado nos resultados do ensaio pré-experimental, os ensaios experimentais foram conduzidos com proporção de inóculo de 50%, que resultou em maior grau médio de aderência microbiana e maior produção de gases. Foram utilizados como material experimental amostras de azevém (C₃) e tifton (C₄).

Foram conduzidos três ensaios *in vitro* para cada tipo de amostra, sendo cada ensaio considerado uma replicata. Em cada ensaio foram incubados nove frascos para cada tratamento, sendo que os procedimentos de incubação foram os mesmos descritos anteriormente, exceto que os meios de incubação incluíram ou não substâncias antimicrobianas. Os tratamentos experimentais foram os seguintes: Controle positivo (BF+), sem adição de antimicrobianos (população de bactérias e fungos); Fungos (F, somente população de fungos, inclusão de antibióticos penicilina,

cloranfenicol e estreptomicina com concentração de 500 mg/L de cada antibiótico); Bactérias (B, somente população de bactérias, inclusão de antifúngico cicloheximida com concentração de 50 mg/L); Controle negativo (BF-), inclusão de ambos antimicrobianos (ausência de bactérias e fungos) (DEHORITY e TIRABASSO, 2000; JOBLIN, 1981; LEE et al. 2000; WINDHAM e AKIN, 1984). Cada frasco recebeu adição de 1 mL de cada antimicrobiano, de acordo com o tratamento, ou seja, quando determinada população desejava ser mantida o antimicrobiano correspondente era substituído por água destilada. Os antibióticos utilizados foram efetivos no controle populacional de bactérias gram-positivas e gram-negativas. O volume de gases foi medido nos tempos 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas de incubação como descrito anteriormente.

Para análise do grau de aderência microbiana e atividade fibrolítica, três frascos de cada tratamento foram retirados da incubação nos tempos 24, 36 e 48h. O conteúdo dos três frascos foi misturado, filtrado através de tecido com 40 µm de porosidade seguido de lavagem com solução salina (NaCl, 9 g/L) a fim de remover as bactérias não aderidas ao resíduo. Após a lavagem, o resíduo foi imediatamente inserido em N líquido. Parte do resíduo congelado foi então armazenados em tubos de ultracentrifugação com tampa de 5 mL enquanto outra parte restante foi em potes plásticos com tampa. Os tubos foram armazenados em *ultrafreezer* -80°C e os potes em freezer convencional a -20°C.

O pH do MI foi medido no início da incubação e em cada retirada de frascos (horas 24, 36 e 48).

5.3.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído do resíduo presente nos tubos de 5 mL armazenados em *ultrafreezer* -80°C com o kit *PureLink™ Microbiome DNA Purification*. Foram seguidas as diretrizes do fabricante, com algumas adaptações no primeiro passo do processo de extração relacionado ao preparo do lizado. Nesta etapa foram adicionados a cada *bead tube* do kit: 200 mg de resíduo úmido, 700 µL de solução S1 e 500 µL de uma solução de lise. A solução de lise continha 200 mg de lisozima em 10 mL de solução tampão

autoclavada e preparada com água ultra pura, contendo (em 100 mL): 1,16g de NaCl; 1,21 g de Tris e 0,74 g de EDTA. O tubo foi agitado em vórtex 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*, sendo que foram processadas por 5 ciclos de 1 minuto, intercalados com intervalos de 1 minuto, quando eram mantidas em gelo. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose e a concentração de DNA quantificada em equipamento Nanodrop2000TM (Thermo Fisher *Scientific*, Waltham, Massachusetts, EUA).

5.3.3 Amostra padrão de bactéria

Para a quantificação de DNA bacteriano das amostras com base em uma curva padrão, foi necessária uma amostra pura de bactérias. Esta amostra foi obtida de inóculo ruminal, sendo coletada conforme descrito anteriormente para os ensaios *in vitro* gases.

Foram coletados cerca de 2 litros de inóculo, que posteriormente foram filtrados através de duas camadas de gaze e uma camada de tecido de náilon com porosidade de 50 µm. O protocolo utilizado (figura 4) foi adaptado de Ranilla e Carro (2003), o filtrado foi inserido em tubos Falcon com tampa de rosca (± 48 g) e então centrifugados a 1000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, inserido em novos tubos, sendo submetidos à nova centrifugação a 20000 x g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, adicionado 10 mL de solução salina, misturado para lavar o pellet e centrifugado novamente a 20000 x g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi armazenado em frascos com tampa em *ultrafreezer* a -80°C. A amostra padrão de bactéria foi submetida à extração de DNA, conforme descrito anteriormente.

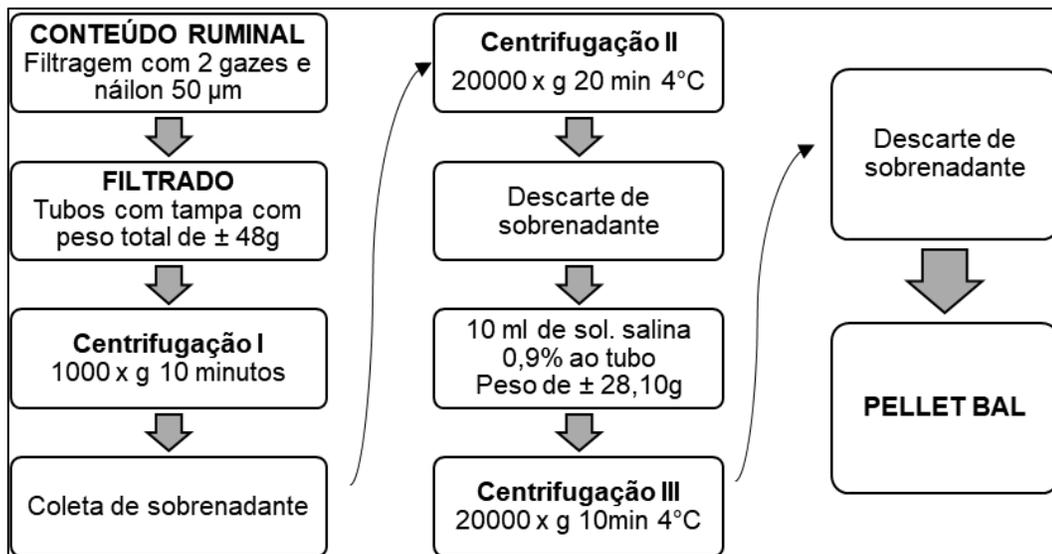


Figura 4 – Sequência de processos para obtenção da amostra padrão de bactérias ruminais. Adaptado de Ranilla e Carro (2003). Onde: BAL = bactérias associadas à fase líquida.

5.3.4 Amostra padrão de fungo

Assim como para a população bacteriana, uma amostra padrão da população de fungos foi necessária para quantificação de DNA presente nas amostras. Estarão citados abaixo todos os testes realizados para obtenção da amostra padrão e ao final o método que se fez adequado para extração e amplificação de DNA em qPCR.

Como o primer utilizado no qPCR é considerado de uso geral para fungos aeróbicos e anaeróbicos, a primeira tentativa de isolamento ocorreu com o gênero aeróbico *Rizophus*. Amostras deste gênero foram obtidas no LAPEMI (Laboratório de Pesquisas Micológicas, UFSM) em tubo contendo ágar batata dextrose, o cultivo deste gênero ocorreu em placa de petri com cerca de 20 mL de ágar batata dextrose dispostos sobre sua superfície. Após cerca de 4 dias em estufa de 55°C, a quantidade de hifas produzidas por *Rizophus* se mostrou bastante evidente. O processo de extração e avaliação do teor de DNA foram os mesmos utilizados nas amostras, porém, a amplificação em qPCR não ocorreu.

Além do cultivo em ágar batata dextrose, ocorreu a tentativa de cultivo de *Rizophus*, obtido do LAMPEMI, em meio líquido de caldo Sabouraud (3 g de Dextrose,

1,5 g de Peptona/150 mL de água destilada). O caldo, contido em um becker de 500 mL, foi autoclavado por 15 minutos em temperatura de 121°C, após resfriamento, uma pequena quantidade de fungo foi adicionada com uma pinça, também esterilizada. O cultivo permaneceu em banho-maria a 39°C por 96 horas, sendo agitado manualmente de 3 a 4 vezes por dia, por 30 segundos. Após, o *Rizophus* multiplicado dentro do becker foi filtrado com auxílio de funil e papel filtro e transferido a um balão volumétrico de 500 mL, o acúmulo da amostra filtrada foi colocado em gral de porcelana esterilizado e recebeu adição de N líquido, sendo macerado com pistilo esterilizado até que se tornasse de aspecto granuloso e seco. A amostra foi submetida a processo de extração e avaliação do teor de DNA conforme descrito anteriormente. Com este método de cultivo, houve pouco DNA contido na amostra e nenhuma amplificação ocorreu quando submetida à qPCR.

Incubações *in vitro* gás utilizando tifton 85 também foram conduzidas a fim de se obter uma amostra padrão, a incubação foi realizada conforme descrito anteriormente, sendo utilizada três vezes a quantidade de antibióticos do tratamento F, para meio livre de bactérias. Três frascos foram incubados por mais de 96 horas, após este período, o meio líquido de cada frasco foi descartado e os frascos foram mantidos com a tampa aberta em banho-maria a 39°C. Após cerca de uma semana, foi possível notar aumento na quantidade de fungos sobre o resíduo incubado, quando o acúmulo de fungos presente nos frascos foi considerada suficiente, este foi retirado, pesado na quantidade 200 mg e submetido à extração e avaliação do teor de DNA. Ainda que existisse DNA íntegro presente nas amostras, de acordo com o NanoDrop®, nenhuma amplificação ocorreu quando esta amostra foi submetida à qPCR.

A fim de avaliar se os métodos de cultivo e extração utilizados poderiam influenciar na amplificação em qPCR, amostras de DNA fungos aeróbicos *Rizophus* e *Fusarium* extraídas pelo método de MS Al-Hatmi et al. (2016) foram submetidas à qPCR. Ainda que a integridade e quantidade de DNA presente fossem adequadas, não houve amplificação dos pontos de diluição da curva.

A maneira encontrada para obter amplificação de DNA de fungos foi utilizar umas das amostras do tratamento F proveniente dos ensaios *in vitro* gás. Como a quantificação de DNA bacteriano já havia ocorrido, a amostra do tratamento F escolhida

foi a que continha a menor quantidade de DNA de bactéria, assumiu-se que todo DNA presente na amostra provinha de fungos ruminais. Sendo assim, a amostra foi diluída nos pontos de 32,6; 16,3; 8,2; 4,1; 2,0; 1,0 ng/μl de DNA, resultando em equação de regressão utilizada em todas as amostras dos ensaios *in vitro*.

5.3.5 Análise de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

A quantidade de DNA microbiano foi obtida da amostra de DNA extraída dos resíduos de incubação. Foram utilizados primers específicos para cada população (tabela 3), provenientes do gene 16S rRNA, para quantificação de bactérias (CASTILLO-LOPEZ et al. 2013), e genes 18S ribossômico e ITS1, para quantificação de fungos (DENMAN e MCSWEENEY, 2006). Todas as amostras foram diluídas para mesma concentração de 10 ng/μl. Os reagentes utilizados foram: *SYBR Green Quantitative PCR Assay* (SYBR) para quantificação de fungos, e *TaqMan MasterMix* (TaqMan) e *SsoAdvanced Universal Probes Supermix (sonda)* para quantificação de bactérias. O equipamento utilizado foi o *StepOnePlus Real Time PCR System* da *Applied Biosystems* com suporte para placa de 96 poços de 0,1 mL.

O volume final de reação (por poço) foi de 10 μl, que possuiu composição distinta para curvas padrão e amostras. Na curva padrão de bactéria, a composição da mistura de reação (por poço) foi de 3 μl de água ultrapura, 5 μl de TaqMan, 0,25 μl de cada primer (*Foward* e *Reverse*), 0,5 μl de sonda e 1 μl de amostra padrão de DNA bacteriano. A quantificação do DNA bacteriano se deu através de uma curva de diluição seriada de 5 pontos com proporção de 1:10, onde os pontos da curva englobaram concentrações de DNA de 50, 10, 0,2, 0,4 e 0,08 ng/μl. Nas amostras, a mistura de reação se deu com 5 μl TaqMan, 0,25 μl de cada primer (*Foward* e *Reverse*), 0,5 μl de sonda e 4 μl de amostra de DNA, sem necessitar o uso de água ultrapura.

Para a curva padrão de fungo, os componentes da reação foram 3,7 μl de água ultra pura, 5 μl de SYBR, 0,15 μl de cada primer (*Foward* e *Reverse*) e 1 μl de DNA (concentração inicial de 32,6 ng/μl), a sequência de diluição dos pontos da curva seguiu com 5 pontos em diluição 1:2, sendo as concentrações de DNA de 32,6, 16,3, 8,2, 4,1, 2,0 e 1 ng/μl. Já para as amostras, a quantidade de componentes para a reação foi de

0,7 µl de água ultra pura, 5 µl de SYBR, 0,15 µl de cada primer e 4 µl de amostra de DNA. Todas as placas continham amostra branco para curva e amostras, sendo a quantidade de amostra de DNA substituída por água ultra pura.

Tabela 3 – Sequência de primers e sonda utilizados em Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativa.

Micr.	Nome dos Primers e Sonda		Sequência
Bactéria ¹	FJ715623	Foward	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'
		Reverse	5'-GACTACCAGGGTATCTAATCC-3'
	Sonda Taqman		5'FAM/TGCCAGCAGCCGCGGTAATAC/TAMRA-3'
Fungo ²	GAF-F	Foward	5'-GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC-3'
	GAF-R	Reverse	5'-CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT-3'

Onde: Micr.=microrganismo alvo, A= adenina, G= guanina, C=citosina e T=timina. ¹Castillo-Lopez et al. (2013). ²Denman e McSweeney (2006).

Cada placa foi submetida às seguintes condições de ciclo: um ciclo a 50°C por 2 minutos seguidos de um ciclo a 95°C por 2 minutos para a desnaturação inicial. Para anelamento e extensão foram utilizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos seguidos de 60°C por 1 minuto.

Para a quantificação de microrganismos ruminais, os valores obtidos nas curvas foram dispostos em gráfico de regressão linear, onde o eixo Y foi composto pelo logaritmo 10 da concentração de cada ponto da curva e o eixo X foi composto pelo *Threshold cycle* (CT) fornecido pela análise de qPCR através do software *StepOne*[®]. Com estes valores compondo o gráfico de regressão linear, foi gerada a equação de regressão e valor do coeficiente de determinação (R^2), a equação teve seu valor de x substituído pelo CT de cada amostra, que ao gerar um valor provindo da equação foi elevado à potência de 10, resultando ao final na quantidade (ng) de DNA fúngico ou bacteriano contido nos 40 ng de DNA dispostos em cada poço da placa.

A eficiência de reação média na quantificação de cada uma das populações foi de 68,45% para bactérias e de 96,4% para fungos. Os resultados foram expressos em µg de DNA bacteriano/g de MS de forragem incubada.

5.3.6 Determinação da atividade fibrolítica no resíduo de incubação

Os resíduos das incubações *in vitro* gás de tifton 85 e azevém foram avaliados quanto à atividade fibrolítica presente nos meios de incubação e em cada tempo de retirada de frascos. Os resíduos de incubação foram submetidos à extração das enzimas, incubação do extrato enzimático com xilano e posterior análise colorimétrica de açúcares redutores.

Para a extração, cada resíduo foi pesado 0,5 g em becker de vidro de 50 mL em duplicata (A e B), após foram adicionados 10 mL de ST (anexo III) e 60 µl de Mercaptoetanol. Os becker's foram submetidos à sonicação em banho-maria em 10 ciclos de 30 segundos cada, intercalados por pausas de 30 segundos, cubos de gelo foram adicionados à água para evitar aumento de temperatura durante o processo de sonicação. O conteúdo de cada becker foi filtrado com funil plástico e papel filtro diretamente em tubo de vidro com tampa de rosca, o conteúdo obtido no tubo foi denominado extrato enzimático.

Cada amostra possuiu A e B como duplicatas de extrato enzimático, cada uma das duplicatas foi incubada com xilano em mais dois tubos (A₁, A₂, B₁, B₂). Cada tubo destinado à incubação recebeu 1 mL de extrato enzimático e 2 mL de xilano 2% (2 g de xilano/100 mL de solução tampão), além disso, houve incubação de duplicata de tubos branco 1 (1 mL de extrato enzimático e 2 mL de solução tampão), estes sendo feitos para cada replicata de extrato enzimático, e incubação de duplicata de tubos brancos 2 (1 mL de tampão fosfato e 2 mL de xilano), estes totalizando 4 tubos para posterior análise colorimétrica. Os tubos brancos serviram para descontar possíveis quantidades de açúcares redutores já existentes. A incubação ocorreu em banho-maria a 39°C durante 240 minutos (4 horas), após este período as amostras foram submetidas por 6 minutos a imersão em água fervente para total cessão da atividade enzimática, seguido

de armazenagem em freezer convencional para posterior análise de açúcares redutores.

Para análise colorimétrica de açúcares redutores, o método utilizado foi o Somogyi-Nelson, adaptado por Maldonade et al. (2013). O padrão utilizado na curva foi Glicose (Dextrose, 0,1% p/v), sendo que os pontos tiveram concentrações de 25, 50, 75, 100 e 125 micrograma (μg) de glicose/tubo, com diluição feita com água destilada. As amostras foram diluídas 15 vezes, utilizando solução tampão fosfato, a diluição foi feita em tubos de ensaio menores no volume de 5 mL, sendo utilizados 1 mL da diluição em cada novo tubo. Após a adição de amostra, 1 mL de solução Somogyi-Nelson (SN) I (Cúprico Alcalina) foi adicionado a cada tubo, sendo estes agitados em vórtex e em seguida submetidos a 15 minutos em banho-maria a 100°C seguido de resfriamento em água a temperatura ambiente por 5 minutos. Após, 1 mL de SN II (Reativo de Nelson) foi adicionado, passando por agitação e adição de 7 mL de água destilada e nova agitação. Após estas etapas ocorreu leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm, contra branco (1 mL de água destilada ao invés de padrão de glicose). O mesmo procedimento que as amostras foram submetidas ocorreu para os tubos brancos I e II. Os reagentes SN-I e SN-II foram confeccionados de acordo com a versão adaptada do método.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do procedimento GLM do SAS (v. 9.0 SAS Inst. Inc. Cary, NC) utilizando um modelo que incluiu os efeitos fixos de tipo de amostra (tifton ou azevém), tratamento (com ou sem antimicrobianos) e tempo de incubação (24, 36 e 48 horas), além das possíveis interações e erro experimental. As médias foram comparadas pelo teste t de Student.

6 RESULTADOS

6.1 A PROPORÇÃO DE INÓCULO RUMINAL NO MEIO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ADERÊNCIA MICROBIANA E DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS *IN VITRO*

6.1.1 Parâmetros da fermentação e cinética da produção e gases

Os resultados referentes aos parâmetros da fermentação podem ser visualizados na tabela 4. Para produção total de gás houve efeito de forragem ($p < 0,05$), tratamento ($p < 0,05$) e interação forragem x tratamento ($p = 0,004$). O T10 registrou o menor acúmulo de gás, enquanto que os maiores valores foram observados para T40 e T50, em ambas as forragens. O capim-elefante, em todos os tratamentos, foi responsável por maior acúmulo de gás, quando comparado ao azevém ($p < 0,05$).

A taxa de degradação não foi afetada pela maior proporção de IR ruminal ($p = 0,087$), porém houve diferença significativa quando avaliada entre forragens ($p = 0,0003$) e interação forragem x tratamento ($p = 0,002$). O *lag time* não sofreu influência do tipo de forragem utilizada ($p = 0,069$), porém maiores quantidades de IR permitem sua redução ($p < 0,05$), sendo que também foi observada interação forragem x tratamento ($p = 0,009$).

Foi observado efeito de forragem ($p < 0,05$) e tratamento ($p = 0,0002$) para o valor de pH dos meios de incubação após 24 horas. Não foi observada interação forragem x tratamento ($p = 0,778$). Para a aderência microbiana através de P, não houve efeito de forragem ($p = 0,364$) nem interação forragem x tratamento ($p = 0,179$). A maior proporção de inóculo permite maior adesão microbiana ($p < 0,05$) sobre azevém.

Tabela 4 – Produção final de gás, taxa de degradação, *lag Time*, pH e aderência microbiana em 24 horas de incubação *in vitro* gás de azevém e capim-elefante incubados com diferentes Meios de Incubação.

VAR	F	T					EPM	p		
		T10	T20	T30	T40	T50		F	T	F x T
V	CE	166 ^d	186 ^c	193 ^b	201 ^a	204 ^a	4.98	<.0001	<.0001	0.0044
	AZ	132 ^c	148 ^b	141 ^{bc}	173 ^a	172 ^a				
S	CE	6.2 ^c	6.4 ^b	6.5 ^a	6.4 ^b	6.5 ^{ab}	0.20	0.0003	0.0873	0.0017
	AZ	6.4 ^a	6.3 ^a	5.6 ^b	6.2 ^a	6.0 ^{ab}				
L	CE	3.6 ^a	3.2 ^b	3.0 ^b	2.3 ^c	2.1 ^c	0.29	0.0690	<.0001	0.0086
	AZ	4.0 ^a	3.2 ^b	2.0 ^c	2.1 ^c	1.8 ^c				
pH	CE	6.4 ^b	6.4 ^b	6.4 ^b	6.4 ^b	6.6 ^a	0.08	<.0001	0.0002	0.7783
	AZ	6.5 ^b	6.5 ^b	6.6 ^{ab}	6.6 ^{ab}	6.8 ^a				
P	CE	4.0 ^a	3.9 ^a	5.1 ^a	4.7 ^a	5.1 ^a	0.89	0.3638	0.0036	0.1792
	AZ	3.5 ^c	4.2 ^{bc}	4.4 ^{bc}	5.5 ^{ab}	6.7 ^a				

Onde: VAR = variáveis, F = forragem incubada, T = tratamento utilizado, EPM = erro padrão da média, p = p-valor (0.05), F x T = interação entre forragem e tratamento, V = volume final de gás (mL), S = taxa de degradação (%/hora), L = *lag time* (hora), P = mg de P pertencente aos microrganismos ruminais aderidos por grama de matéria seca residual de forragem em incubação *in vitro* gás, CE = capim-elefante, AZ = azevém. Os tratamentos foram T10 = 10% de inóculo ruminal e 90% de ST, T20 = 20% de inóculo ruminal e 80% de ST, T30 = 30% de inóculo ruminal e 70% de ST, T40 = 40% de inóculo ruminal e 60% de ST, T50 = 50% de inóculo ruminal e 50% de ST.

Na figura 5, a cinética da produção de gases para ambas as forragens pode ser observada. O valor de produção de gás foi expresso em mL.

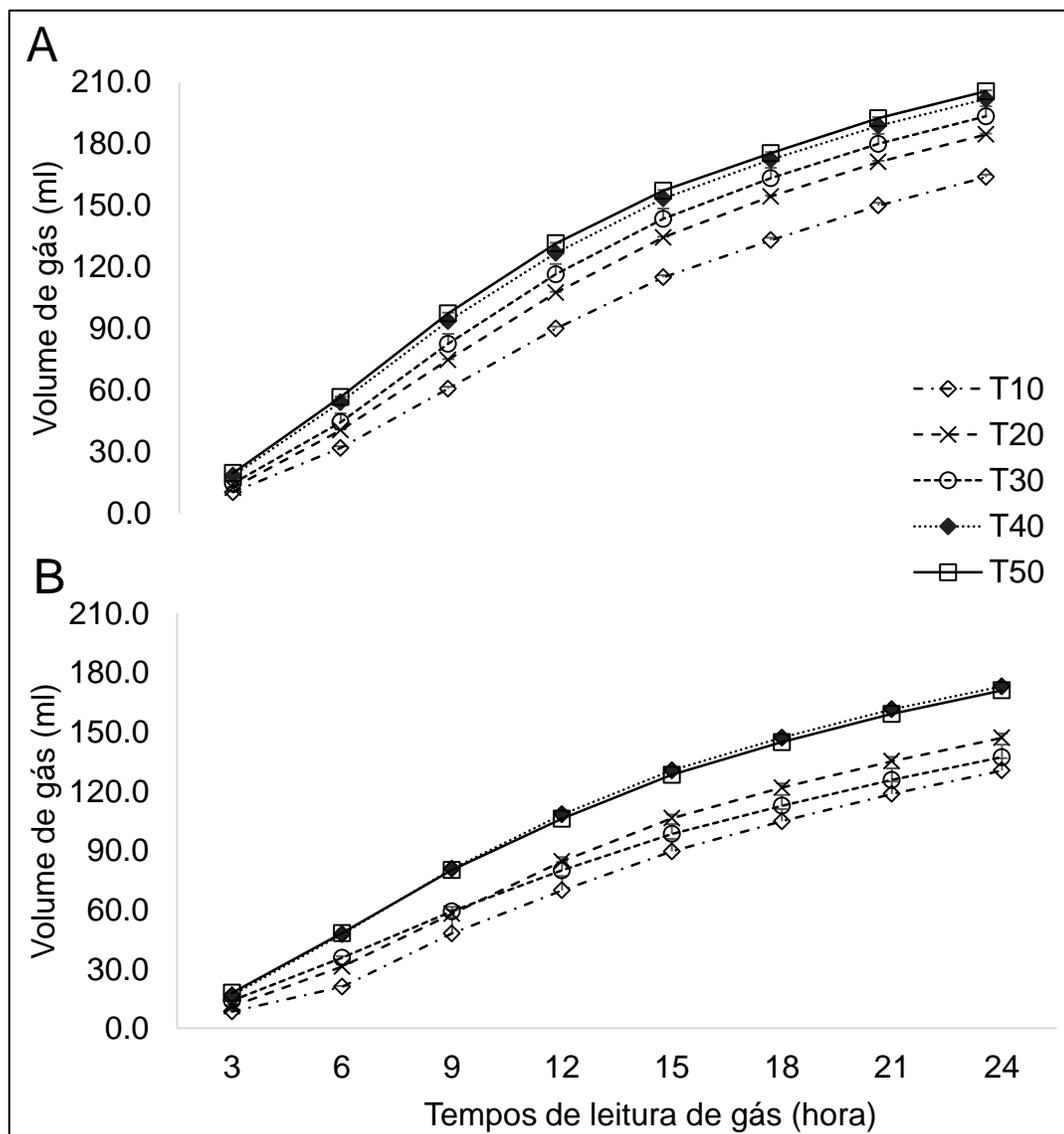


Figura 5 – Cinética da produção de gases de capim-elefante (A) e azevém (B) em incubação *in vitro* gás no período de 24 horas. Onde: T10 = 10% de inóculo ruminal e 90% de ST (solução tampão), T20 = 20% de inóculo ruminal e 80% de ST, T30 = 30% de inóculo ruminal e 70% de ST, T40 = 40% de inóculo ruminal e 60% de ST, T50 = 50% de inóculo ruminal e 50% de ST. Barras acima dos pontos de leitura de gás indicam o erro padrão da média.

6.1.2 Aderência microbiana a forragens

A aderência microbiana ao capim-elefante e ao azevém pode ser visualizada na figura 6. O coeficiente de determinação (R^2) obtido por regressão linear foi de 0,2033

para o capim-elefante, enquanto que para o azevém foi de 0,6891, sendo possível observar maior aderência como resposta a maior inclusão de inóculo no azevém.

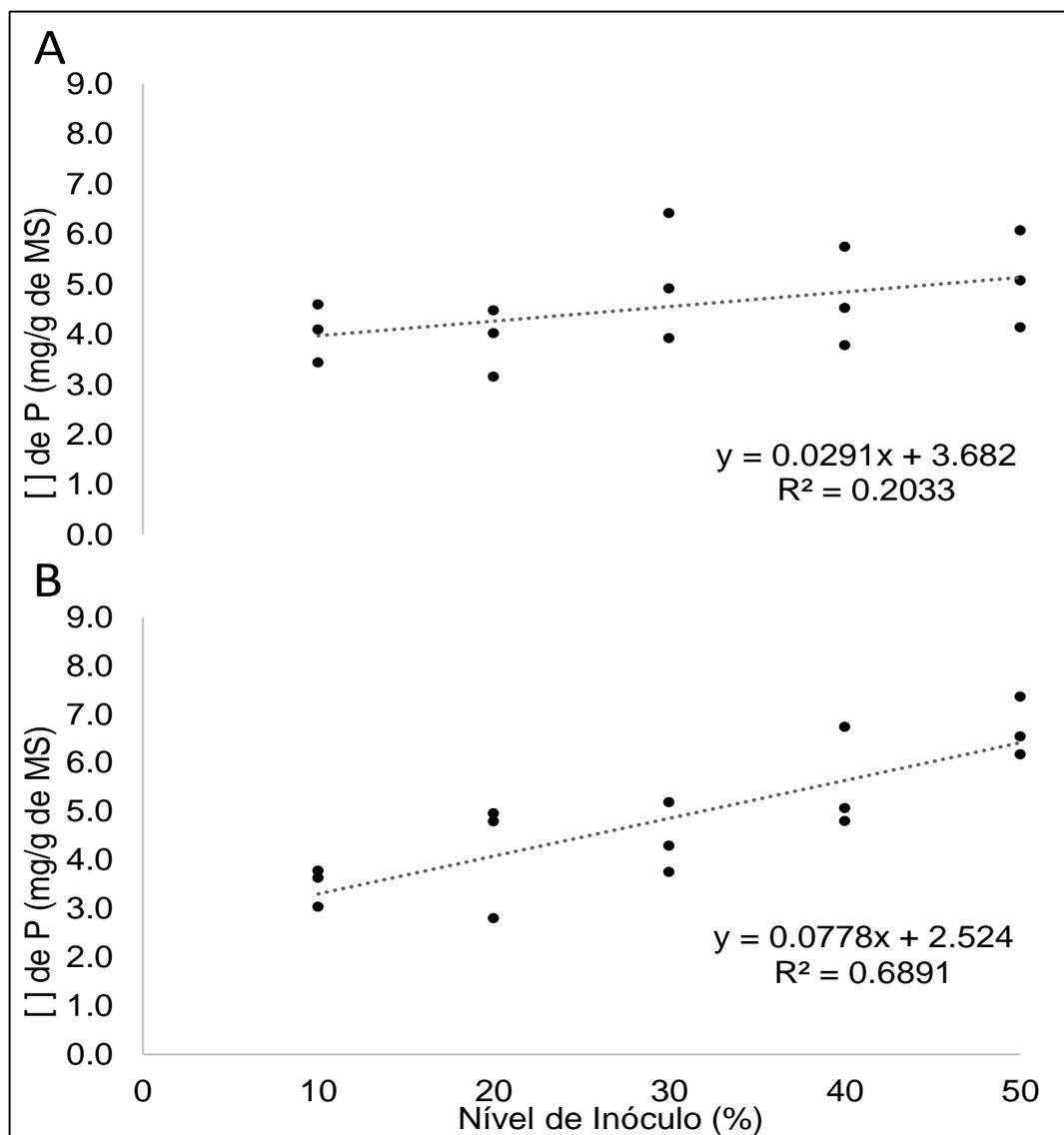


Figura 6 – Aderência de microrganismos ruminais ao capim-elefante (A) e azevém (B) através da concentração de P microbiano nas diferentes proporções de IR ruminal utilizado no MI. Onde: T10 = 10% de inóculo ruminal e 90% de ST (solução tampão), T20 = 20% de inóculo ruminal e 80% de ST, T30 = 30% de inóculo ruminal e 70% de ST, T40 = 40% de inóculo ruminal e 60% de ST, T50 = 50% de inóculo ruminal e 50% de ST. R^2 = Coeficiente de Determinação.

6.2 PARTICIPAÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS RUMINAIS NA DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS

6.2.1 Parâmetros da produção de gás *in vitro*

Com exceção do pH, houve efeito ($p < 0,05$) de MI, forragem e interação MI x F para todas as variáveis (tabela 6). Somente os meios de incubação influenciaram os valores de pH ($p < 0,05$). A adição de ambos antimicrobianos (BF-) não permitiu convergência estatística dos dados referentes aos parâmetros da fermentação de tifton 85.

A produção total de gás para tifton 85 se deu BF+>B>F, enquanto que para azevém os valores observados foram de BF+=B>F>BF-. O acúmulo da produção de gás proveniente das bactérias sempre foi maior que o da produção de gás pelos fungos ($p < 0,05$). Entre as forragens, o tifton 85 possibilitou maior produção de gás comparado ao azevém em todos tratamentos ($p < 0,05$).

Quanto à taxa de degradação de tifton 85, o maior valor foi observado para o tratamento BF+, seguido do tratamento F e B. Já para azevém, não foi observado diferença entre os tratamentos BF+, F e B, sendo que BF- obteve menor taxa de degradação. Para tifton 85, o menor *lag time* foi observado em B, seguido de BF+ e F. No azevém o tratamento BF+ não diferiu do tratamento B, sendo estes possuíram menor *lag time* que F.

Tabela 5 – Parâmetros da fermentação de azevém e tifton 85 em resposta aos diferentes meios de incubação utilizados.

VAR	FORR	MI				EPM	p		
		BF+	F	B	BF-		MI	F	MI x F
V	TF	142 ^a	105 ^c	135 ^b	N.C.	2.66	<.0001	<.0001	<.0001
	AZ	129 ^a	68 ^b	127 ^a	26 ^c				
S	TF	5.6 ^a	4.8 ^b	4.0 ^c	N.C.	0.40	0.0004	<.0001	0.0027
	AZ	3.4 ^a	3.6 ^a	4.3 ^a	2.6 ^b				
L	TF	1.8 ^b	7.3 ^a	0.8 ^c	N.C.	0.39	<.0001	<.0001	<.0001
	AZ	-3.0 ^b	-1.0 ^a	-2.9 ^b	-6.2 ^c				
pH	TF	5.5 ^b	5.7 ^b	5.5 ^b	6.6 ^a	0.21	<.0001	0.0678	0.0790
	AZ	5.6 ^b	6.3 ^b	5.7 ^b	6.6 ^a				

Diferentes letras estabelecem diferença entre as médias dos tratamentos em de cada forragem para as variáveis avaliadas. Onde: VAR = variáveis, FORR = forragem incubada, TF = Tifton 85, AZ = azevém, MI = Meio de Incubação, BF+ = controle positivo (sem adição de antimicrobianos, presença de bactérias e fungos), F = população de fungos (adição de antibióticos), B = população bacteriana (adição de antifúngicos) e BF- = controle negativo (com adição de antimicrobianos, ausência de bactérias e fungos). V = volume final de gás (mL), S = taxa de degradação (%/hora), L = *lag time* (hora). EPM = erro padrão da média, p = p-valor (0,05), MI x F = interação entre Meio de Incubação e forragem. N.C. = os dados não convergiram estatisticamente.

6.2.2 Cinética da produção de gás *in vitro*

Dentro dos tempos 6, 12, 24, 36 e 48, os quatro tratamentos foram avaliados quanto à produção de gás. Para tifton 85 os tratamentos diferiram entre si em todos os tempos, sendo BF+>B>F>BF- ($p<0,05$). Já para o azevém, dentro destes mesmos tempos, os tratamentos BF+ e B se mantiveram iguais, seguidos do tratamento F e posteriormente do BF-, sendo BF+=B>F>BF- ($p<0,05$).

Quando dentro de cada tratamento, os tempos 6, 12, 24, 36 e 48 foram avaliados, a produção de gás de tifton 85 diferiu entre todos os horários, para todos os tratamentos, sendo $6 < 12 < 24 < 36 < 48$ ($p < 0,05$), com exceção do tratamento BF- onde nenhuma diferença foi observada. O azevém possui aumento significativo na produção de gás nos tempos avaliados para todos os tratamentos, até o tempo 36 ($p < 0,05$), este que não diferiu do tempo 48.

Na comparação entre forragens, até seis horas após início da incubação o azevém produziu maior volume de gás que o tifton 85 em todos os tratamentos ($p < 0,05$), o mesmo ocorreu na hora 12 para o tratamento B ($p < 0,05$). A partir de 24 horas de incubação, o tifton 85 passou a produzir maior volume de gás que o azevém nos tratamentos BF+ e F, mantendo este comportamento até o final da incubação ($p < 0,05$). No tratamento B, esta diferença foi evidenciada a partir da hora 36 ($p < 0,05$). O tratamento BF- possui maior produção de gás para o azevém em todos os tempos avaliados ($p < 0,05$).

Devido à quantificação de microrganismos aderidos ocorrer nos tempos 24, 36 e 48 horas após início da incubação, os tempos foram comparados entre si, separadamente dos demais horários, quanto a acúmulo de gás. Os resultados podem ser visualizados na figura 7.

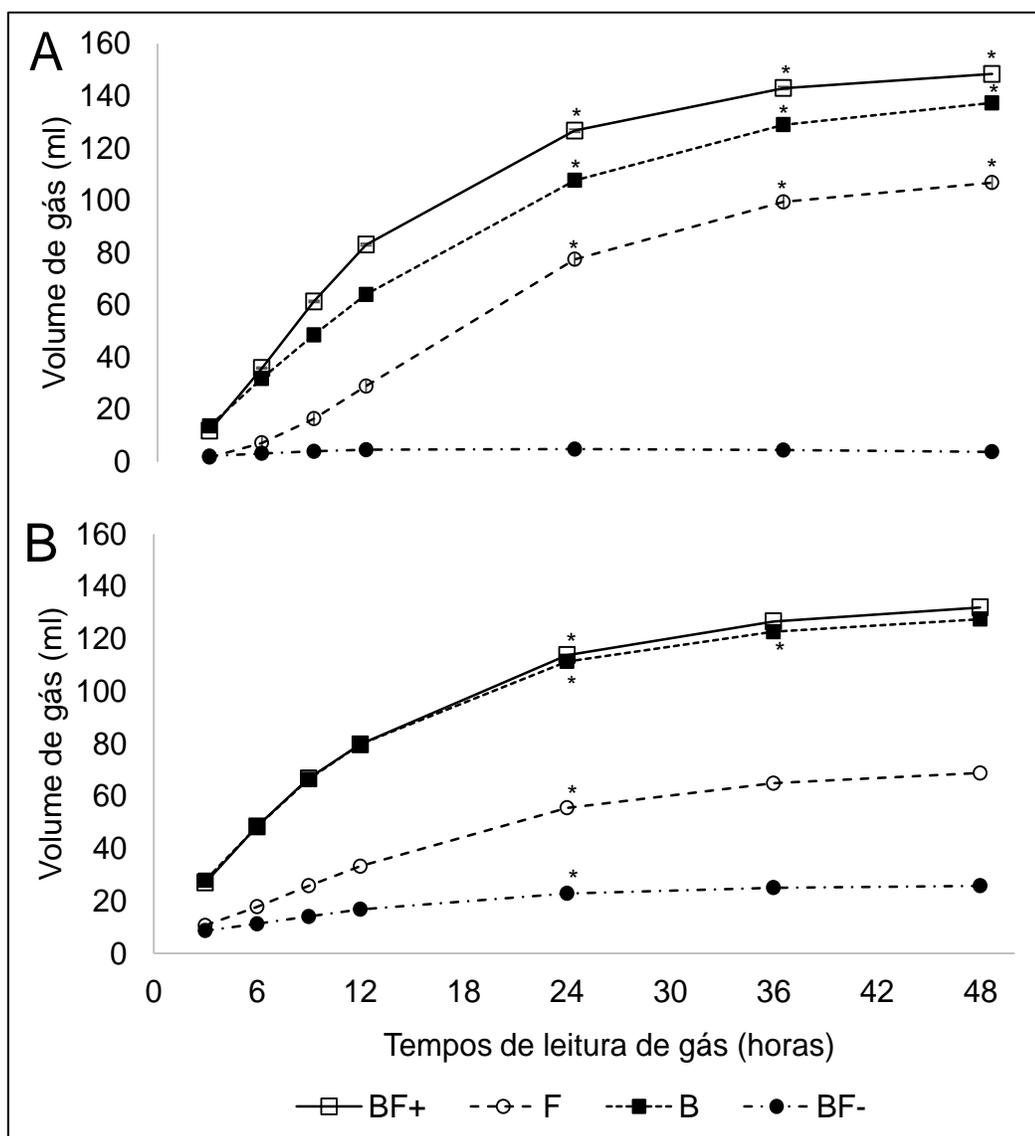


Figura 7 – Cinética da produção de gases de tifton 85 (A) e azevém (B) em incubação *in vitro* gás no período de 48 horas. Onde: BF+ = controle positivo (sem adição de antimicrobianos, presença de bactérias e fungos), F = população de fungos (adição de antibióticos), B = população bacteriana (adição de antifúngicos) e BF- = controle negativo (com adição de antimicrobianos, ausência de bactérias e fungos). Os asteriscos (*) representam diferença estatística entre as horas 24, 36 e 48 dentro de mesmo tratamento.

Se tratando do tifton 85, com exceção do BF- ($p=0,515$), o acúmulo de gás diferiu entre os três tempos avaliados para todos os tratamentos ($p<0,05$). Em ordem decrescente em relação à produção de gás, obteve-se $48>36>24$. Quando os

tratamentos foram comparados entre si dentro dos tempos 24, 36 e 48, todos diferiram entre si quanto à produção de gás, em todos os três tempos, sendo sempre $BF+ > B > F > BF-$ ($p < 0,05$).

Os resultados referentes à azevém demonstraram que, com exceção do tratamento B ($p < 0,05$), não houve diferença para produção de gás entre os tempos 36 e 48. Quando comparada com o tempo 24, o tempo 36 apresentou maior produção de gás em todos os tratamentos ($p < 0,05$). As comparações entre os tratamentos dentro dos tempos 24, 36 e 48 demonstraram semelhante produção de gás entre BF+ e B em todos os três tempos, os tratamentos F e BF- diferiram entre si e de BF+ e B em todos os horários ($p < 0,05$), em ordem decrescente de produção de gás, obteve-se $BF+ = B > F > BF-$.

6.3 ADERÊNCIA MICROBIANA E ATIVIDADE FIBROLÍTICA

As variáveis de aderência bacteriana e de fungos (μg de DNA/grama de MS de forragem) e atividade enzimática (nmol glicose equivalente liberada/grama de MS/minuto) foram avaliadas quanto a efeito de forragens (tifton 85 e azevém), meios de incubação (BF+, F, B e BF-) e tempos (24, 36 e 48), bem como suas possíveis interações.

6.3.1 Aderência bacteriana a fibra vegetal

Se tratando de aderência bacteriana, foi observado efeito de forragem ($p = 0,047$), MI ($p < 0,05$), interação forragem x MI ($p < 0,05$), interação forragem x tempo ($p = 0,013$) e interação forragem x MI x tempo ($p = 0,024$). Não foi observado efeito de tempo ($p = 0,141$), tampouco interação MI x tempo ($p = 0,272$). Os resultados referentes à aderência bacteriana podem ser observados na figura 8.

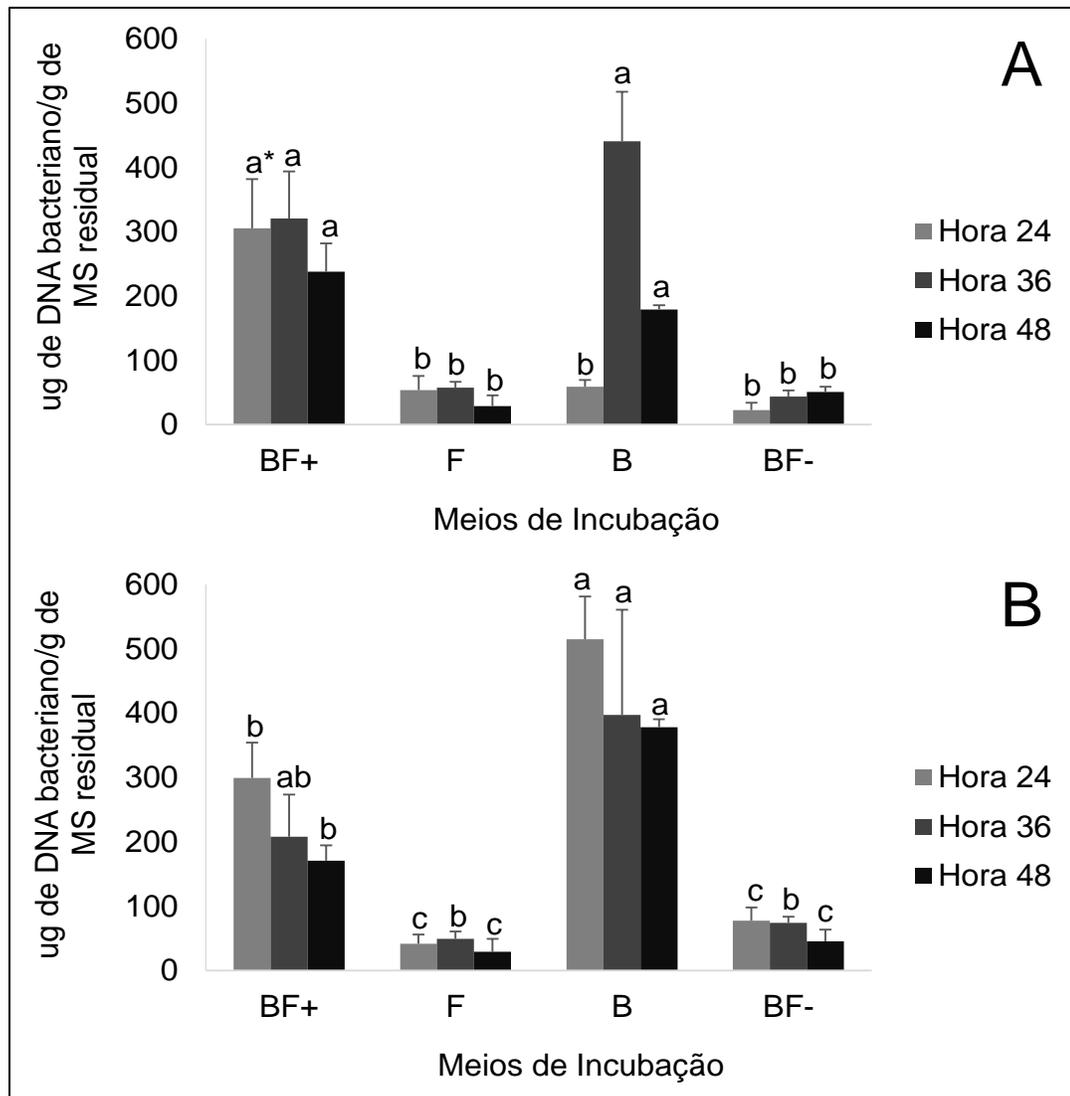


Figura 8 – Aderência bacteriana (μg de DNA bacteriano/g de MS residual de forragem incubada) a tifton 85 (A) e azevém (B) avaliada em três tempos (24, 36 e 48 horas) nos diferentes meios de incubação. Onde: BF+ = presença de bactérias e fungos, F = população de fungos, B = população bacteriana e BF- = ausência de bactérias e fungos. *letras minúsculas representam diferença estatística entre os quatro meios de incubação dentro de um mesmo tempo. O erro padrão da média é representado pelas barras acima das colunas.

6.3.2 Aderência de fungos a fibra vegetal

Quanto à aderência dos fungos ruminais, foi observado efeito de forragem ($p < 0,05$), MI ($p < 0,05$), tempo ($p = 0,007$), interação forragem x MI ($p < 0,05$), interação forragem x tempo ($p = 0,037$). Não houve efeito de interação MI x tempo ($p = 0,063$) e

interação forragem x MI x tempo ($p=0,996$). Os resultados para aderência de fungos a forragem podem ser vistos na figura 9.

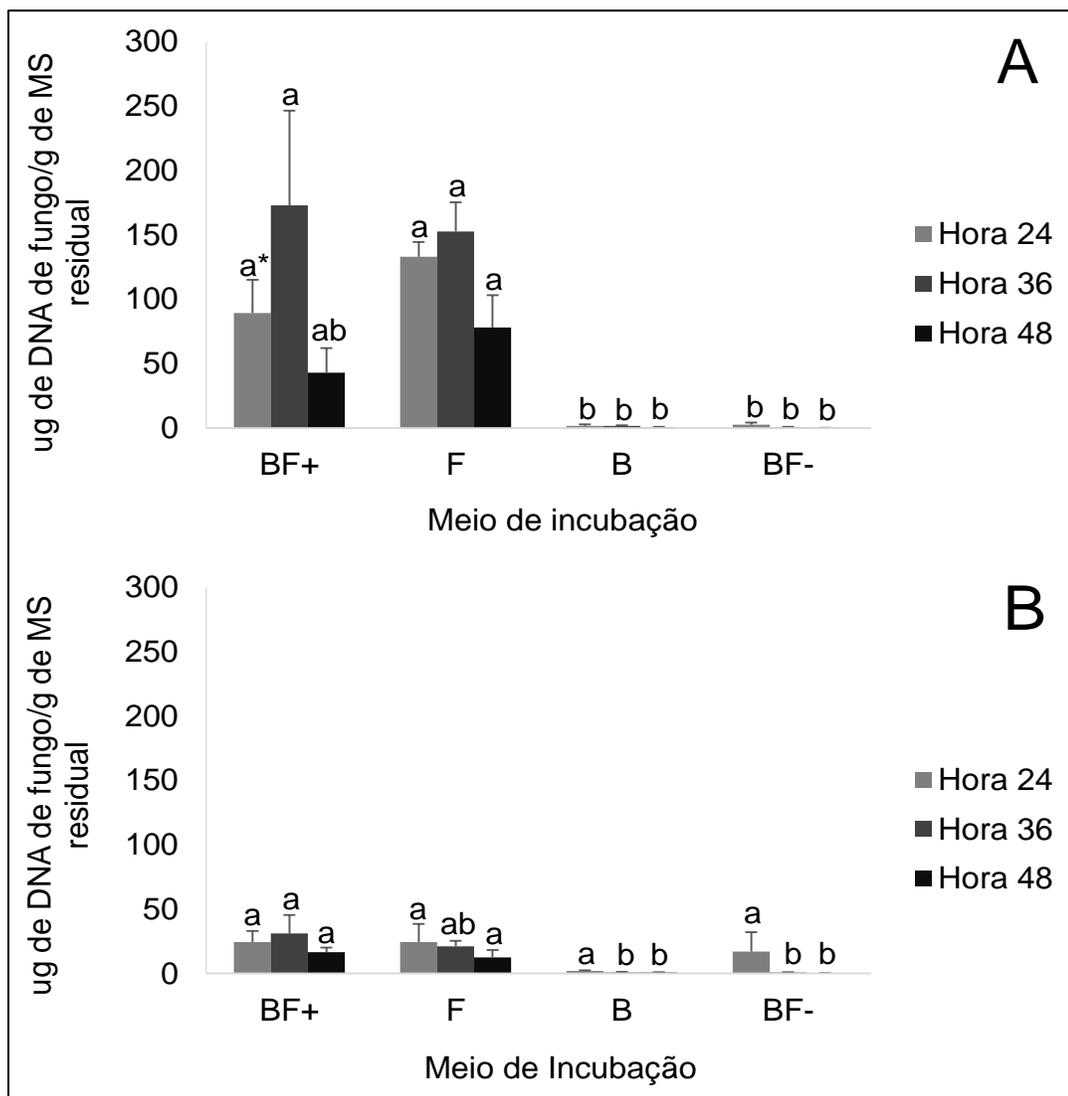


Figura 9 – Aderência de fungos (μg de DNA bacteriano/g de MS de forragem incubada) a tifton 85 (A) e azevém (B) avaliada em três tempos (24, 36 e 48 horas) nos diferentes meios de incubação. Onde: BF+ = presença de bactérias e fungos, F = população de fungos, B = população bacteriana e BF- = ausência de bactérias e fungos. *letras minúsculas representam diferença estatística entre os quatro meios de incubação dentro de um mesmo tempo. O erro padrão da média é representado pelas barras acima das colunas.

6.3.3 Atividade fibrolítica da microbiota ruminal

Com os resultados de atividade fibrolítica (figura 10), foi possível observar efeito de forragem ($p < 0,05$) e MI ($p < 0,05$). Houve tendência a efeito de tempo ($p = 0,051$). Nenhuma interação foi significativa.

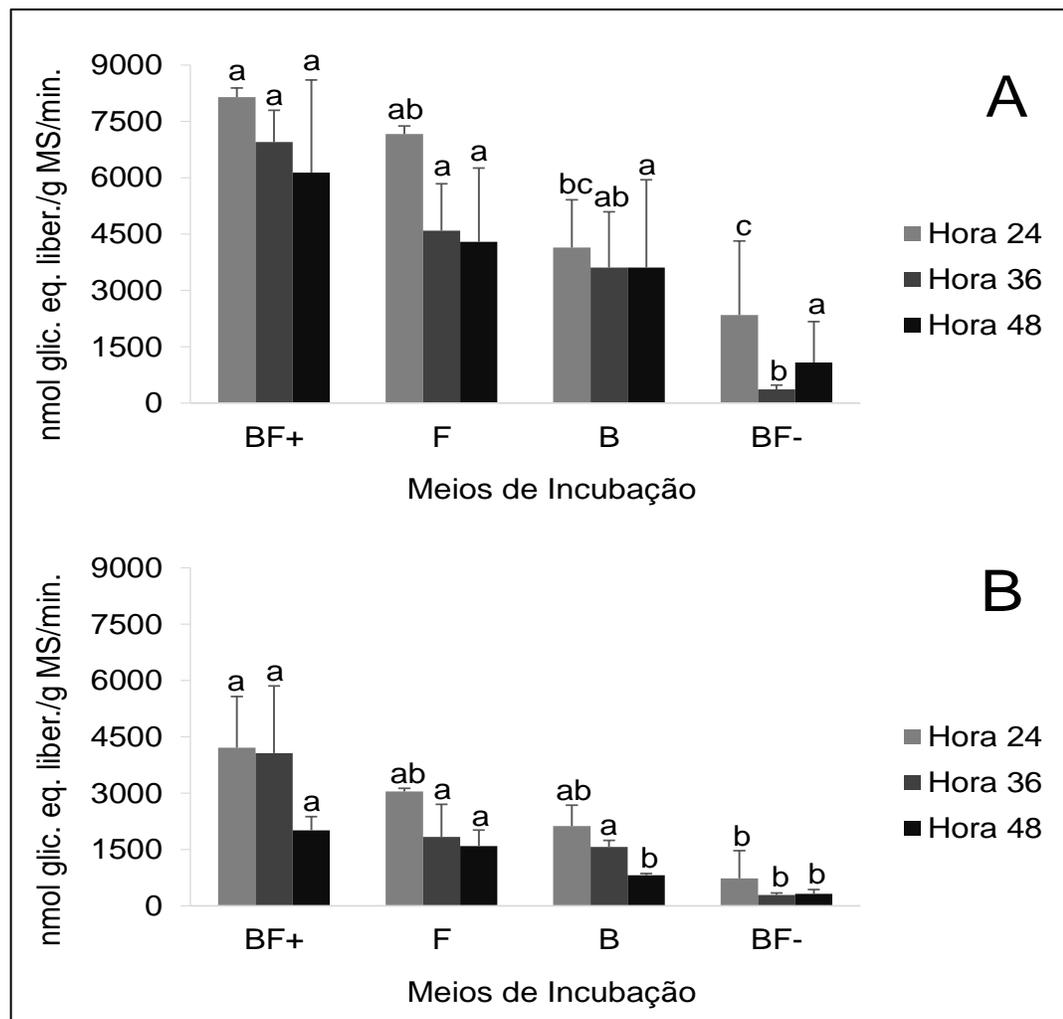


Figura 10 – Atividade fibrolítica (nmol de glicose equivalente liberada/grama de MS/minuto) de tifton 85 (A) e azevém (B) avaliada em três tempos (24, 36 e 48 horas) nos diferentes meios de incubação. Onde: BF+ = presença de bactérias e fungos, F = população de fungos, B = população bacteriana e BF- = ausência de bactérias e fungos. *letras minúsculas representam diferença estatística entre os quatro meios de incubação dentro de um mesmo tempo. O erro padrão da média é representado pelas barras acima das colunas.

7 DISCUSSÃO

7.1 A PROPORÇÃO DE INÓCULO RUMINAL SOBRE A DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS E ADERÊNCIA MICROBIANA

7.1.1 Degradação de forragens

Os resultados obtidos para produção final de gás corroboram com os obtidos por Sileshi et al. (1998), que ao aumentarem a proporção de IR possibilitaram maior produção de gás *in vitro* para diferentes forragens. Além disso, a taxa de degradação não foi alterada devido à inclusão de maior quantidade de IR. Ao avaliar inclusão de 100 a 400 mL/L de IR ao MI, Rymer e Givens (2000) também obtiveram maior produção de gás a adição de IR. A. Navarro-Villa et al. (2011) ao testarem relação IR e ST em 1:6, 1:4 e 1:2 obtiveram resultados de queda no pH bem como maiores diferenças entre pH ao início e ao fim das incubações *in vitro* com maiores concentrações de IR, além disso, foi evidenciada uma maior produção de gás quando mais IR foi utilizado. A maior emissão de CH₄ foi, para todos os volumosos, relacionada com o aumento do número de microrganismos disponíveis devido maior proporção de IR.

O *lag time* foi reduzido ao passo que maiores quantidades de IR eram utilizadas, isso pode ser explicado pelo aumento no número de bactérias disponíveis devido a maior quantidade de IR (PELL e SCHOFIELD, 1993). Quando Rymer et al. (1999) testaram porcentagens de IR de 5, 15 e 30% do total do MI sobre produção de gás, taxa de degradação, *lag time* e pH, obtiveram resultados que reforçam os deste estudo, onde a produção de gás aumentou em resposta a maior quantidade de IR e valores de pH e *lag time* diminuíram, sendo que a taxa de degradação ao final do período de incubação não sofreu alteração. A menor produção de gás em baixas concentrações de IR foi atribuída a possibilidade de os carboidratos degradados serem direcionados ao crescimento microbiano e não a produção de gás, considerando que a atividade microbiana seria fator mais limitante a fermentação que o tipo de alimento incubado. Com uma taxa de degradação semelhante, foi sugerido que o aumento da concentração de IR facilitou a ligação de microrganismos a partículas. Já Jessop e

Herrero (1998) observaram que a variação na atividade microbiana inicial foi mais relevante na produção de gás que a variação na taxa de degradação da FDN. A atividade microbiana inicial proporcionou largas diferenças na cinética de gases da fermentação, possivelmente sendo mais impactada pela quantidade de microrganismos que diferenças na taxa de degradação da FDN.

A diferença na produção total de gás entre as forragens pode ter sido atribuída ao mais alto teor de PB do azevém, este que possuiu uma correlação negativa com a produção de gás no período de 24 horas, sendo degradada, porém contribuindo pouco ou nada na fermentação (GETACHEW et al. 2004). Ao mesmo tempo, o maior teor de lignina presente no azevém pode ter contribuído para uma menor digestibilidade, e consequente produção de gás, visto que maiores teores de lignina afetam negativamente a fermentação dos carboidratos (JUNG, 1989).

7.1.2 Aderência dos microrganismos a forragem

Dentre os polissacarídeos pertencentes à parede celular vegetal, a celulose e a hemicelulose se fazem presentes em ampla quantidade, podendo a celulose alcançar 46% da composição total da parede em gramíneas (CHESSON e FORSBERG 1997; VAN SOEST, 1982). Sendo o crescimento de bactérias fibrolíticas e fungos intimamente relacionado à colonização da parede celular vegetal rica em celulose (CHENG et al. 1991), esperava-se que o teor de FDN pudesse permitir maior aderência da microbiota ruminal. Porém, a diferença na quantidade de FDN entre as forragens não foi suficiente a ponto de diferenciar a quantidade de microrganismos aderidos entre plantas.

Já sobre os tratamentos, a inserção de IR permitiu uma maior aderência de microrganismos para o azevém. Klevenhusen et al. (2017) evidenciaram que dietas com diferentes teores de FDN e PB não influenciaram na quantidade total de bactérias e fungos aderidos a partículas, porém sabe-se que a disponibilidade de aminoácidos e peptídeos, mesmo em baixas quantidades, estimula a multiplicação bacteriana no rúmen, sendo um dos principais fatores que afetam seu crescimento, juntamente com a disponibilidade de carboidratos (ARGYLE e BALDWIN, 1989). O azevém, possuindo maior quantidade de PB, pode haver fornecido maiores quantidades de aminoácidos e

peptídeos às bactérias, e ao passo que a quantidade de IR foi aumentada, maior número de bactérias pôde utilizar destes substratos para promover seu crescimento.

Visando monitorar a diversidade de espécies bacterianas aderidas à fibra em gramínea C3 anual e C4 perene, possuindo a C3 maior teor de proteína e menor teor de FDN, Pitta et al. (2010) demonstraram que os dez maiores grupos de bactérias presentes se encontravam mais aderidos à fibra de feno de C4 que de C3, contrapondo os dados obtidos neste trabalho. Os autores sugeriram que os principais gêneros encontrados possuíram uma Escafoldina (estrutura do celulosoma responsável pela aderência das bactérias à parede celular) capaz de se ligar-se mais facilmente ao feno de tifton, indicando que a aderência da microbiota do rúmen pode sofrer alteração em função da espécie vegetal utilizada. Uma maior disponibilidade de IR pode ter proporcionado uma diversificação maior na população de microrganismos e consequentemente de enzimas aptas a degradação das espécies forrageiras. Latham et al. (1978) já observavam que a interação de importantes espécies bacterianas colabora na aderência e degradação da parede celular vegetal, a atuação entre as mesmas se deu em diferentes regiões da célula devido a suas diferentes afinidades de adesão, sendo que o compartilhamento de determinadas áreas não interferiu na atuação de cada espécie.

Gramíneas C3 e C4 diferiram quanto à quantidade de bactérias aderidas a fibra em incubação *in vitro*. Se tratando de lâmina foliar, uma gramínea C3 obteve 60% a 80% mais aderência microbiana comparada a C4. Porém a proporção de microrganismos atacando a fibra vegetal nem sempre correspondeu em diferenças na digestibilidade, neste caso, constituintes da parede mais facilmente disponíveis as bactérias não fizeram da aderência um pré-requisito para a digestão, ainda que as bactérias estivessem sempre próximas a áreas degradadas (AKIN, 1980; 1986). Embora a relação folha:colmo não tenha sido explorada neste estudo, este pode ser um dos fatores referentes à estrutura das plantas que interferiu na aderência microbiana em resposta a quantidade de IR.

7.2 BACTÉRIAS E FUNGOS ADERIDOS, DEGRADAÇÃO DE FORRAGENS E ATIVIDADE FIBROLÍTICA

7.2.1 Degradação de forragens *in vitro*

De modo geral, gramíneas C3 são mais digestíveis que gramíneas C4 devido a estas últimas possuírem maior teor de tecido lignificado e maior quantidade de parênquima e epiderme (tecidos de difícil degradação) nas folhas, enquanto gramíneas C3 possuem maior quantidade de mesófilo (rapidamente degradável), este que por estar pouco organizado e com maior espaçamento entre feixes vasculares, permitiria maior degradação por parte dos microrganismos (AKIN, 1989). Maior produção de gás *in vitro* poderia ser esperada para uma gramínea C3, afirmação que contrapõe os valores observados neste estudo, no qual os maiores valores de produção de gás foram obtidos para tifton 85.

Uma maior na quantidade de PB na dieta é correlacionada negativamente com a produção de gás *in vitro*, conforme demonstrado por Soltan et al. (2012). Além disso, Van Dung et al. (2014) demonstraram menor produção de gás *in vitro* em 48 horas para tratamento com 19% de PB. Visto o alto teor de proteína do azevém (23,9%) neste trabalho, este pode ter sido o responsável por uma menor produção acumulada de gás em incubação de azevém.

Para tifton 85, o tratamento BF+ foi responsável pela maior produção de gás, enquanto que para o azevém, o tratamento B foi capaz de igualá-lo. Akin e Benner (1988) verificaram que toda microflora ruminal foi capaz de degradar totalmente o mesófilo da célula vegetal e parcialmente parênquima e epiderme, enquanto o xilema permaneceu intacto, gerando extensiva degradação das folhas, ocorrendo o mesmo fenômeno para uma população contendo somente bactérias. Ao mesmo tempo, pouca evidência de adesão de fungos às folhas foi encontrada, sendo esta espécie mais relevante em tecidos lignificados. Ainda que ambas as espécies se encontrassem aderidas a parede celular da planta, as bactérias demonstraram ser potencialmente suficientes na degradação observada. Os dados desse trabalho corroboram com as afirmações destes autores, visto que entre os tratamentos de populações isoladas,

bactérias sempre foram as responsáveis por maior produção de gás. Os fungos podem ter sido mais relevantes em relação à produção de gás para o tifton 85 devido à quantidade de FDN e tecido lignificado desta planta, sendo observado que sua ausência não permitiu que BF+ fosse estatisticamente igual à B.

Outro fator que pode interferir na produção de gás por parte dos fungos é sua forma de reprodução, esta que ocorre por zoósporos flagelados provenientes de um esporângio (HEAT et al. 1986), sendo seu ciclo de vida constituído uma fase de vida livre e outra de aglomerados fúngicos ligados a partículas (DIJKSTRA et al. 2002). A degradação da forragem pelos fungos se difere das bactérias quanto à dinâmica de colonização da célula vegetal, determinado tempo é necessário para que os zoósporos localizem, fixem e recubram o material vegetal (EDWARDS et al. 2008). Além de sua forma de reprodução ser diferente das bactérias, a preferência por tecidos menos digestíveis pode explicar a menor fermentação gerada pela população de fungos, Bauchop (1979) e Joblin et al. (2002) verificaram superioridade dos fungos na degradação de caules de forragens, sendo estes últimos autores avaliando a atuação dos fungos em incubação *in vitro* com azevém. Sendo que os caules de gramíneas possuem esclerênquima, epiderme e xilema, tecidos de difícil digestão (AKIN, 1989), estes microrganismos provavelmente necessitaram mais tempo para fermentar o material em que se aderiram.

7.2.2 Aderência microbiana

Ainda que sem diferença significativa, houve uma tendência de que, no tifton 85, a aderência de fungos possibilite maior aderência bacteriana, as bactérias exerceram menor influência sobre os fungos ainda que exista certa tendência de diminuir sua aderência nos tempos 24 e 48. O aumento na aderência bacteriana na presença de fungos pode ter ocorrido em função de sua penetração na parede celular vegetal através das hifas, o que permitiria diminuição no tamanho da partícula e maior possibilidade de acesso das bactérias a fibra, aumentando a aderência e a degradação (VAN SOEST, 1982; FLINT e BAYER, 2008).

No azevém, houve maior aderência de bactérias ruminais, sendo que os fungos, além de pouco aderidos, não possibilitaram sinergia com bactérias quanto à aderência. Ao avaliar dieta com baixo teor de fibra, Mavrommatis et al. (2020) evidenciaram superioridade bacteriana na aderência, comparada a fungos, corroborando nossos resultados. Bactérias são os microrganismos mais presentes no rúmen, e no azevém são capazes de triplicar sua população inicial nos primeiros 15 minutos de incubação, inclusive pelo rápido uso de açúcares solúveis do tecido vegetal (EDWARDS et al. 2007), enquanto que fungos necessitam de mais tempo para colonização, além de se fazerem presentes em menor quantidade (EDWARDS et al. 2008). A predominância da população bacteriana bem como sua maior capacidade de adesão ao azevém também são observados neste trabalho.

Quanto à diferença entre as forragens, a aderência de fungos foi expressivamente maior para tifton 85 que para azevém. A relação sinérgica entre fungo e bactérias demonstrada em tifton 85 não se repetiu para azevém. A grande capacidade de degradação da parede celular vegetal por parte dos fungos (LEE et al. 2000) pode ter sido o fato determinante para que estes estejam mais presentes em tecido vegetal mais fibroso. Bactérias podem inibir a reprodução e crescimento dos fungos (AKIN, 1987; DEHORITY e TIRABASSO, 2000), ainda que determinadas espécies possam colaborar entre si (BERNALIER et al. 1992), o fator inibitório pode ter levado a predominância bacteriana na adesão ao azevém.

Dentre os tempos avaliados, fungos tenderam a uma maior aderência a tifton 85 até o tempo 36, seguido de redução ao tempo 48. Estes resultados divergem dos obtidos por Denman e McSweeney (2006) que, em amostras de digesta coletadas *in vivo*, demonstraram estabilidade na população de fungos (μg de DNA/mg de biomassa) até 17 horas pós-alimentação, a partir disso, fungos policêntricos tiveram sua população reduzida até 30 horas, enquanto monocêntricos dispuseram de um leve aumento, ocorrendo estabilidade entre as horas 30 e 35. A diversidade populacional dos gêneros de fungos pode ter impactado em sua quantidade aderida ao longo dos tempos.

Valores de pH entre 5,6 e 5,7 são responsáveis por diminuição da população de bactérias fibrolíticas, reduzindo a população de *Ruminococcus albus* em 83%,

Fibrobacter succinogenes em 93% e *Butyrivibrio fibrisolvens* em 29%, além de reduzir a DMS, DMO, degradação da proteína e, inclusive, carboidratos não fibrosos quando comparado a pH entre 6,5 e 6,8 (MICKDAM et al. 2016). Visto que os meios de incubação apresentaram pH's ácidos próximos a estes números, é provável que a quantidade de microrganismos, suas interações e degradação das forragens tenham sido subestimados devido acidez do MI, que difere das condições usuais do rúmen quando um ruminante se alimenta de forragem. A menor degradação de celulose em pH 5,5 também foi demonstrada por Zhang et al. (2017), bem como menor produção de H₂. Os autores observaram pH ótimo para degradação da celulose entre 6 e 6.5. Fungos ruminais também são inibidos devido baixo pH, principalmente quanto à germinação e crescimento de flagelos (MATSUI et al. 1997; ORPIN, 1977).

7.2.3 Aderência microbiana e degradação da fibra vegetal

Para tifton 85, a degradação (produção de gás) se deu BF+>B>F>BF- para os três tempos em que a aderência microbiana foi avaliada. A adesão à fibra de ambas as populações permitiu uma maior degradação, e ainda que a ausência de fungos tenha tendência a uma menor quantidade de bactérias aderidas, esta apresentou maior degradação dentre as populações, seguida da população aderida de fungos. A importância da aderência de bactérias na digestão do tecido fibroso foi demonstrada por Cheng et al. (2017), evidenciando que a degradação por parte destes microrganismos ocorre principalmente entre 6 e 24 horas. Além disso, bactérias como *Butyrivibrio fibrisolvens* podem representar até 65% da população total de bactérias (ANGARITA et al. 2015), espécies como esta possuem alta versatilidade metabólica, atuando sobre celulose e proteínas (COTTA e HESPELL, 1986; KRAUSE e RUSSEL, 1996), e podem ter desempenhado importante papel na degradação, neste estudo. A maior produção de gás observada no tratamento controle positivo pode ser parcialmente explicada pela interação entre fungos e microrganismos metanógenos, estas que para produzir CH₄ utilizam do H₂ produzido pelos fungos. Além disso, a presença de microrganismos metanógenos pode vir a aumentar o metabolismo dos fungos, sua produção de AGV's e atividade fibrolítica (VINZELIJ et al. 2020), fato que

pode ter estimulado os fungos a uma degradação mais eficiente e uma sinergia com a população bacteriana. Até o tempo 24, os dados deste trabalho corroboram com os de Lee et al. (2000), estes que demonstraram superioridade de toda microbiota ruminal (controle) na degradação dos carboidratos estruturais, seguida da população de bactérias. Porém nos tempos 36, 48, e 96 os autores observaram maior degradação para tratamento controle e população de fungos, evidenciando que o papel desta população pode demandar mais tempo para se tornar a mais atuante sobre a fibra, ainda que bactérias possam permanecer em crescente degradação até 72 horas.

Em estudo *in vitro* gás, Zhang et al. (2007) demonstraram a superioridade fermentativa das bactérias sobre a forragens comparada aos demais microrganismos, ainda assim, os fungos possibilitaram uma benéfica interação com as bactérias, aumentando a produção de gás ao longo de 72 horas. Isoladamente, fungos ruminais aumentaram significativamente a produção de gás a partir de 40 horas de incubação, não alcançando um platô ao final de 72 horas. Embora bactérias ruminais possam ser atribuídas a uma maior degradação do alimento no rúmen por conta de sua predominância numérica e diversidade metabólica (CHENG et al. 1991a), os fungos ruminais degradam a parede celular vegetal de maneira mais eficiente, demonstrando assim sua afinidade pelo tecido fibroso. Ainda que as bactérias tenham possuído melhor desempenho nas primeiras horas de incubação *in vitro* gás, ao longo de 96 horas os fungos desempenharam papel mais relevante na degradação da fibra.

Quanto ao azevém, foi observada degradação BF+=B>F>BF-. A aderência de fungos demonstrou participação pouco relevante, enquanto bactérias, na ausência de fungos, foram capazes de igualar a degradação ocorrida no tratamento controle positivo. As bactérias ruminais demonstraram serem as grandes responsáveis pela degradação de azevém. A degradação imposta pelas bactérias pode ser explicada pelo fato de o azevém conter menor teor de FDN e FDA e pela eficiente fermentação do conteúdo celular pelas bactérias, sendo que após 24 horas, bactérias celulolíticas passariam a exercer maior papel na degradação (HERRERA-PEREZ et al. 2018). De acordo com Iqbal et al. (2018), o menor teor de FDA incubado possibilitou maior produção de gás, ainda que bactérias fibrolíticas e fungos estivessem com maior população em outras forragens tropicais. Mesmo que BF+ tendesse a uma redução na

população bacteriana comparado a B, a produção de gás pode não ter sido afetada devido à capacidade das bactérias em digerir compostos não fibrosos e fibrosos.

Para azevém, a maior versatilidade de bactérias na degradação de componentes da célula vegetal pode ter estimulado seu crescimento e aderência, a ausência de fungos permitiu ampla multiplicação bacteriana sobre o tecido fibroso, sendo esta população capaz de degradá-lo eficientemente, sem influência notável da população de fungos.

7.2.4 Atividade fibrolítica

Maior atividade fibrolítica foi observada para degradação de tifton 85 em comparação ao azevém. A maior atividade fibrolítica sobre tifton pode ser atribuída a sua composição química, visto que a quantidade de hemicelulose e celulose interfere tanto na aderência bacteriana como em sua atividade fibrolítica (OLSEN e MATHIESEN, 1998; RODRIGUEZ e GONZÁLEZ, 2006).

No tifton 85, a atividade fibrolítica do tratamento controle positivo tende a ser maior nos três tempos avaliados, seguida da população de fungos no tempo 24. Fungos e bactérias foram semelhantes nos tempos 36 e 48. Para azevém, o tratamento BF+ tende a possuir maior atividade fibrolítica nos tempos 24 e 36, já no tempo 48, maior atividade fibrolítica foi observada no tratamento controle positivo e no meio contendo fungos quando comparados às bactérias. A pouca atividade fibrolítica no controle negativo se deve a pouca presença de microrganismos ou monômeros de glicose contaminantes. Os resultados para o tempo 24 corroboram com Lee et al. (2000), que evidenciaram mesma atividade de xilanase para toda microbiota ruminal e populações isoladas de bactérias e fungos. Já no tempo 36, a microbiota ruminal total e meio contendo somente fungos se equipararam, enquanto no tempo 48 a atividade dos fungos foi expressivamente maior que qualquer outro tratamento.

A relevância dos fungos na produção de enzimas, se equiparando a bactérias, pode ter sido dada em função do uso de xileno como substrato na incubação avaliando atividade de enzimas. Além dos fungos possuírem, de modo geral, alta atividade fibrolítica sobre a parede celular vegetal, a xilanase se encontra entre as suas principais

enzimas produzidas. (WANG e DUAN, 2014). A atividade fibrolítica dos fungos pode ter sido otimizada pelo pH, visto que enzimas de fungos monocêntricos suportam pH abaixo de 6 (BORNEMAN et al. 1989; SIROHI et al. 2013).

8 CONCLUSÃO

Bactérias possuem maior relevância quanto à aderência e degradação de gramíneas em comparação aos fungos.

Ainda assim, os fungos ruminais também colonizam e contribuem de forma interativa com as bactérias para a degradação das forrageiras, principalmente das gramíneas tropicais, as quais são mais fibrosas que as gramíneas temperadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIN, D. E. Association of rumen fungi with various forage grasses. **Animal feed Science and Technology**, v.16, p.273-285, 1987.
- AKIN, D. E. Biological structure of lignocellulose and its degradation in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.21, p.295-310, 1988.
- AKIN, D. E. Chemical and biological structure in plants as related to microbial degradation of forage cell walls. In: MILLIGAN, L. P. **Control of digestion and metabolisms in ruminants**, ed. Prentice-hall, Englewood Cliffs, 1986, p.139-157.
- AKIN, D. E. et al. Physical degradation of lignified stem tissues by ruminal fungi. **Applied Environmental Microbiology**, v.55, p.611–616, 1989.
- AKIN, D. E. Evaluation by electron microscopy and anaerobic culture of types of rumen bacteria associated with digestion of forage cell walls. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, n.1, p.242-252, 1980.
- AKIN, D. E. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. **Agronomy Journal**, v.81, n.1, p.17–25, 1989.
- AKIN, D. E. Interaction of ruminal bacteria and fungi with southern forages. **Journal of Animal Science**, v.66, p.962–977, 1986.
- AKIN, D. E. Microscopic evaluation of forage digestion by rumen microorganisms – A review. **Journal of animal science**, v.48, n.3, p.701–710, 1979.
- AKIN, D. E.; BENNER, R. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, n.5, p.1117–1125, 1988.
- AKIN, D. E.; BORNEMAN, W. S. Role of rumen fungi in fiber degradation. **Journal Dairy Science**, v.73, p.3023-3032, 1990.
- AKIN, D. E.; GORDON, G. L. R.; HOGAN, J. P. Rumen bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with or without sulphur. **Applied Environmental Microbiology**, v.46, p.738-748, 1983.
- ANGARITA, E. et al. Quantitative analysis of rumen microbial populations by qPCR in heifers fed on *Leucaena leucocephala* in the Colombian Tropical Dry Forest. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v.37, n.2, p.135–142, 2015.
- ARGYLE, J. L.; BALDWIN, R. L. Effects of Amino Acids and Peptides on Rumen Microbial Growth Yields. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.2017-2027, 1989.

ASCHENBACH J. R. et al. Ruminant Nutrition Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of Animal Science**, v.89, p.1092-1107, 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis, 16th, 3. ed. **AOAC International**. Gaithersburg, MD., 1997.

AZAD, E. et al. Interrelationships of fiber-associated anaerobic fungi and bacterial communities in the rumen of bloated cattle grazing alfalfa. **Microorganisms**, v.8, p.1543-1560, 2020.

BAUCHOP, T. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. **Applied and Environmental Microbiology**, p.148-158, v.38, n.1, 1979.

BAUCHOP, T; MOUNTFORT, D. O. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and presence of rumen methanogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, p.1103-1110, 1981.

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

BAYER, E. A.; KENIG, R.; LAMED, R. Adherence of *Clostridium thermocellum* to Cellulose. **Journal of Bacteriology**, v.156, n.2, p.818-827, 1983.

BELANCHE, A. et al. Study of effect of presence or absence of protozoa on rumen fermentation and microbial protein contribution to the chime. **Journal of Animal Science**, v.89, p.4163-4174, 2011.

BERNALIER, A. et al. Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. **Current Microbiology**, v.25, p.143-148, 1992.

BERNALIER, A. et al. Inhibition of the cellulolytic activity of *Neocallimastix frontalis* by *Ruminococcus flavefaciens*, **Journal of General Microbiology**, v.139, p.873-880, 1993.

BORNEMAN, W. S.; AKIN, D. E.; LJUNGDAHL, L. G. Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.5, p.1066-1073, 1989.

CASTILLO-LOPEZ, E. et al. In vivo determination of rumen undegradable protein of dried distillers grains with solubles and evaluation of duodenal microbial crude protein flow. **Journal of Animal Science**, v.91, p.924-934, 2013.

CHAUDHARY, L. C.; SRIVASTAVA, A.; SINGH, K. K. Rumen fermentation pattern and digestion of structural carbohydrates in buffalo (*Bubalus bubalis*) calves as affected by ciliate protozoa. **Animal Feed Science and Technology**, v.56, p.111-117, 1995.

CHENG, K. J. et al. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In: TSUDA, T.; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. ed. Toronto: Academic Press, 1991. p.595–624. a.

CHENG, K. J. et al. Prevention of fungal colonization and digestion of cellulose by the addition of methylcellulose. **Canadian Journal of Microbiology**, v.37, p.484-487, 1991b.

CHENG, K. J.; COSTERTON, J. W. Adherent rumen bacteria: Their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. In: RUCKEBUSH, Y.; THIVEND, P. **Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants**, 3. ed. Lancaster: MTP Press, 1980. p.227-250.

CHENG, Y. et al. Progressive colonization of bacteria and degradation of rice straw in the rumen by Illumina sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1–10, 2017.

CHESSON, A.; FORSBERG, C. W. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial Ecosystem**, ed. London: Blackie Academic & Professional, v.2, 1997. p.329-381.

CHOUDHURY, P. K. et al. Rumen Microbiology: An overview. In: PUNIYA, A. K.; KAMRA, D. N. **Rumen Microbiology: from Evolution to Revolution**, ed. New Delhi: Springer, v.1, 2015. p.3-16.

COLEMAN, G. S. The cellulase content of 15 species of entodiniomorphid protozoa: mixed bacteria and plant debris from the ovine rumen. **Journal of Agricultural Science**, v.107, p.709-721, 1985.

COTTA, M. A.; HESPELL, R. B. Proteolytic activity of the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, n.01, p.51-58, 1986.

CRAIG, W. M.; BRODERICK, G. A.; RICKER, B. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. **Journal of Nutrition**, v.117, p.56–64, 1987.

CZERKAWSKI, J. W. Compartmentation in the rumen. **Hannah Research Institute Republican**, p.69-85, 1980.

DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P. A. Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.7, p.2921-2927, 2000.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v.58, n.3, p.572–582, 2006.

DIJKSTRA, J.; MILLS, J. A. N.; FRANCE, J. The role of dynamic modelling in understanding the microbial contribution to rumen function. **Nutrition Research Reviews**, v.15, n.01, p.67, 2002.

DOI, R. H. et al. Cellulosomes from Mesophilic Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.20, p.5907-5914, 2003.

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

EDWARDS, J. E. et al. Dynamics of initial colonization of non-conserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v.66, n. 3, p.537–545, 2008.

ELGHANDOUR, M. M. Y. et al. Effects of exogenous enzymes on *in vitro* gas production kinetics and ruminal fermentation of four fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.179, p.46-53, 2013.

ENGELS, F. M.; BRICE, R. E. A barrier covering lignified cell walls of barley straw that resist access by rumen microorganisms. **Current Microbiology**, v.12, p.217-224, 1985.

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

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

FLINT, H. J.; BAYER, E. A. Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1125, p.280–288, 2008.

FONTY, G.; JOBLIN, K. N. Rumen anaerobic fungi: Their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. In: TSUDA, T.; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**, ed. Academic Press, New York, 1991, p.655-680.

FORSBERG, C. W.; LAM, K. Use of Adenosine 5'-Triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, n.3, p.528-537, 1977.

GADO, H. M. et al. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in Dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.154, p.36-46, 2009.

GETACHEW, G. et al. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.111, p.57-71, 2004.

GONG, J.; FORSBERG, C. W. Factors affecting adhesion of *Fibrobacter succinogenes* S85 and adherence defective mutants to cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.3039–3044, 1989.

HACKMANN, T. J.; SPAIN, J. N. Invited review: Ruminant ecology and evolution: perspectives useful to ruminant livestock research and production. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.1320–1334, 2010.

HAITJEMA, C. H. et al. A parts list for fungal cellulosomes revealed by comparative genomics. **Nature Microbiology**, v.2, p.1-8, 2017.

HEATH, I. B.; KAMINSKYJ, S. G.; BAUCHOP, T. Basal body loss during fungal zoospore encystment: evidence against centriole autonomy. **Journal of Cell Science**, v.83, p.135–140, 1986.

HERRERA-PÉREZ, J. et al. *in vitro* fermentation of fibrous substrates by water buffalo ruminal cellulolytic bacteria consortia. **Revista MVZ Cordoba**, v.23, n.3, p.6860–6870, 2018.

HILL, D. H. The effects of climate on production. In: PAYNE, W.J.A. **Cattle and buffalo meat production in the tropics**, London: Longman Scientific & Technical, 1988. p. 6-17.

HOFMANN, R. R. Anatomía del conducto gastro-intestinal. In: CHURCH, C. D. **El rumiante fisiología digestiva y nutrición**, Zaragoza: Editorial Acribia, 1988, p.15-46.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York-London: Academic Express, 1966, 544 p.

IQBAL, M. W. et al. Ruminal fermentation and microbial community differently influenced by four typical subtropical forages *in vitro*. **Animal Nutrition**, v.4, n.1, p.100–108, 2018.

JESSOP, N. S.; HERRERO, M. Modelling fermentation in an *in vitro* gas production system: effects of microbial activity. **British Society of Animal Science**, n.22, p.81-84, 1998.

JOBLIN, K. N. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, n.6, p.1119-1122, 1981.

JOBLIN, K. N. et al. Degradation of fresh ryegrass by methanogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence or absence of *Fibrobacter succinogenes*. **Current Microbiology**, v.45, n.1, p.46–53, 2002.

JUNG, H. G. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. **Agronomy Journal**, v.81, p.33-38, 1989.

KLEVENHUSEN, F. et al. Changes in fiber-adherent and fluid-associated microbial communities and fermentation profiles in the rumen of cattle fed diets differing in hay quality and concentrate amount. **FEMS Microbiology Ecology**, v.93, 2017.

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

KOZLOSKI 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, 2008.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2011. 212 p.

KRAUSE, D. O.; RUSSELL, J. B. How many ruminal bacteria are there? **Journal of Dairy Science**, v.79, n.8, p.1467-1475, 1996.

KUDO, H.; CHENG, K. J.; COSTERTON, J. W. Electron microscopy study of the methyl-cellulose mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. **Canadian Journal of Microbiology**, v.33, p.267-272, 1987.

LATHAM, M. J. *et al.* Adhesion of *Bacteroides succinogenes* in pure culture and in the presence of *Ruminococcus flavefaciens* to cell walls in leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 6, p.1166-1173, 1978.

LEE, S. S.; HA, J. K.; 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**, v.66, n.9, p.3807-3813, 2000.

MALDONADE, I. R. et al. Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. **Comunicado Técnico 86 Embrapa**, v.1, p.1-4, 2013.

MARTIN, C. et al. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes of fluid and particle-associated ruminal microbial populations. **Current Microbiology**, v.27, p.223-228, 1993.

MATSUI, H.; USHIDA, K.; KOJIMA, Y. Effect of dietary concentrate on fungal zoosporogenesis in sheep rumen. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v.10, n.6, p.599-602, 1997.

MAVROMMATIS, A. et al. Alterations in the Rumen Particle-Associated Microbiota of Goats in Response to Dietary Supplementation Levels of *Schizochytrium spp.* **Sustainability**, v.13, n.2, p.607, 2021.

MCALLISTER, T. A. et al. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**, v.72, p.3004-30018, 1994.

MCSWEENEY, C. S. et al. Solubilization of lignin by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.2985-2989, 1994.

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.

MEZZOMO, M. P. **Marcadores e função dos microrganismos ruminais aderidos a partículas de forragem**. 2018. 67 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2018.

MICKDAM, E. et al. Rumen microbial abundance and fermentation profile during severe subacute ruminal acidosis and its modulation by plant derived alkaloids *in vitro*. **Anaerobe**, v.39, p.4–13, 2016.

MIRON J. et al. An adhesion defective mutant of *Ruminococcus albus* SY3 is impaired in its capability to degrade cellulose. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.249–254, 1998.

MIRON, J.; BEN-GHEDALI, D.; MORRISON, M. Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. **Journal of Animal Science**, v.84, p.1294-1309, 2001.

MORGAVI, D. P.; FORANO, E. MARTIN, C. NEWBOLD. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**, v.4, n.7, p.1024-1036, 2010.

MORRIS, E. J.; COLE, O. J. Relationship between cellulolytic activity and adhesion to cellulose in *Ruminococcus albus*, **Journal of General Microbiology**, v.133, p.1023-1032, 1987.

MOUNTFORT, D. O.; ASHER, R. A.; BAUCHOP, T. Fermentation of cellulose to methane and carbon dioxide by a rumen anaerobic fungus in a triculture with *Methanobrevibacter sp.* strain RA1 and *Methanosarcinia barkeri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, p.128-134, 1982.

MS AL-HATMI, A. et al. Global molecular epidemiology and genetic diversity of *Fusarium*, a significant emerging group of human opportunists from 1958 to 2015. **Emerging Microbes & Infections**, v.5, n.1, p.1-11, 2016.

MULLER, M. The Hydrogenosome. **Journal of General Microbiology**, v.139, p.2879-2889, 1993.

NAGPAL, R. et al. Anaerobic rumen fungi: Potential and Applications. **Agriculturally Important Microorganisms**, v.2, p.375-393, 2009.

NAVARRO-VILLA, A.; et al. Modifications of a gas production technique for assessing *in vitro* rumen methane production from feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v.166, p.163-174, 2011.

OBISPO, N. E.; DEHORITY, B. A. A most probable number method for enumeration of rumen fungi with studies on factors affecting their concentration in the rumen. **Journal of Microbiological Methods**, v.16, p.259-270, 1992.

OLSEN, M. A.; MATHIESEN, S. D. The bacterial population adherent to plant particles in the rumen of reindeer fed lichen, timothy hay or silage. **Rangifer**, v.18, n.2, p.55, 1998.

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

ORPIN, C. G. The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life cycle and invasion of plant material in the rumen. **Journal of General Microbiology**, v.99, p.107-117, 1977.

ORPIN, C. G.; BOUNTIFF, L. Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. **Journal of General Microbiology**, v.104, p.113-122, 1978.

ORPIN, C. G.; JOBLIN, K. N. The rumen anaerobic fungi. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. ed. **The Rumen Microbial Ecosystem**, p. 140–195. Chapman and Hall, 1997.

PAUL, S. S. et al. A phylogenetic census of global diversity of gut anaerobic fungi and a new taxonomic framework. **Fungal Diversity**, v. 89, p.253-266, 2018.

PAUL, S. S. et al. Effect of anaerobic fungi on *in vitro* feed digestion by mixed rumen microflora of buffalo. **Reproduction Nutrition Development**, v.44, p.313-319, 2004.

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.

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Microbial adhesion and degradation of plant cell walls. In: JUNG, H. G. et al. **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1993. p.397-423.

PITTA, D. W. et al. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from Bermuda grass hay to grazed winter wheat diets. **Microbial Ecology**, v.59, n.3, p.511–522, 2010.

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.

RODRÍGUEZ, C. A.; GONZÁLEZ, J. *In situ* study of the relevance of bacterial adherence to feed particles for the contamination and accuracy of rumen degradability estimates for feeds of vegetable origin. **British Journal of Nutrition**, v.96, n.2, p.316–325, 2006.

RUSSEL, J. B.; HESPELL, R. B. Microbial Rumen Fermentation. **Journal Dairy Science**, v.64, n.6, 1981.

RYMER, C.; GIVENS, D. I. Predicting the *in vitro* gas production profile of dried grass with strained rumen fluid from the *in vitro* gas production profile of dried grass with faeces. **ADAS nutritional Sciences Research Unit**, v.1, p.1, 2000.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J. A.; GIVENS, D. I. Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. **Animal Feed Science and Technology**, v.78, p.199-213, 1999.

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber degradation from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2980-2991, 1994.

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.

SILESHI, Z. et al. Factors affecting *in vitro* gas production from fermentation of forages as determined by pressure transducer technique. **Feed and Animal Nutrition**, v.6, p.250-263, 1998.

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

SOLTAN, Y. A. et al. Comparative *in vitro* evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.21, n.4, p.759-772, 2012.

STEWART, C. S.; DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. The properties of forms of *Ruminococcus flavefaciens* which differ in their ability to degrade cotton cellulose. **FEMS Microbiology Letters**, v.72, p.47–50. 1990.

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial Ecosystem**, 2. ed. London: Blackie Academic, v.2, 1997. p.10-72.

TAJIMA, K. et al. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2766-2774, 2001.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**, 2. ed. Jaboticabal: Editora FUNEP, p.161-192, 2011.

VAN DUNG, D.; SHANG, W.; YAO, W. Effect of crude protein levels in concentrate and concentrate levels in diet on *in vitro* fermentation. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.27, n.6, p.797–805, 2014.

VAN SOEST, P. J. Microbes in the Gut. In: **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Cornell University Press, v.2, p.253-281, 1994.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Corvallis, Oregon: O & B Books, 1982.

VINZELJ, J. et al. Employing anaerobic fungi in biogas production: Challenges & opportunities. **Bioresource Technology**, v.3, 2020.

WANG, G. R.; DUAN, Y. L. Studies on lignocellulose degradation by rumen microorganism. **Advanced Materials Research**, v.853, p.253–259, 2014.

WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. The rumen protozoa. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The Rumen Microbial Ecosystem**, Chapman and Hall, p.73-139, 1997.

WILLIAMS, A. G.; STRACHAN, N. H. Polysaccharide degrading enzymes in microbial populations from the liquid and solid fractions of bovine rumen digesta. **Journal of Animal Science**, v.64, p.58–59, 1984.

WILSON, J. R. Organization of forage plant tissues. In: JUNG, H. G. et al. **Forage Cell Wall Structure and Digestibility**, Wisconsin: American Society of Agronomy, p.1-27, 1993.

WINDHAM, W. R.; AKIN, D. E. Rumen fungi and forage fiber degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.3, p.473-476, 1984.

WOLIN, M. J.; MILLER, T. L. Microbe-microbe interactions. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. ed. **The Rumen Microbial Ecosystem**, Chapman and Hall, p.467-491, 1997.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Effects of an enzyme feed additive on extent of Digestion and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.391-403, 1998.

YARLETT, N.; HACKSTEIN, J. H. P. Hydrogenosomes: One organelle, multiple origins. **Bioscience**, v.55, p.657-668, 2005.

ZHANG, L. et al. Characteristics of rumen microorganisms involved in anaerobic degradation of cellulose at various pH values. **RSC Advances**, v.7, n.64, p.40303–40310, 2017.

ZHANG, Y.; GAO, W.; MENG, Q. Fermentation of plant cell walls by ruminal bacteria, protozoa and fungi and their interaction with fibre particle size. **Archives of Animal Nutrition**, v.61, n.2, p.114–125, 2007.

APÊNDICE I

Tabela 6 – Concentração dos reagentes de meio de incubação

Relação IR:ST (%)	% Solução tampão	Reagentes	[] g/litro
10/90	Solução 1 (45%)	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	3.92
		KH ₂ PO ₄	2.57
		MgCl ₂ .6H ₂ O	0.21
	Solução 2 (45%)	CaCl ₂	0.02
		NH ₄ HCO ₃	2.78
		NaHCO ₃	10.70
	Solução Redutora (10%)	CYSTEINE HCl	3.47
		NaOH	0.89
	20/80	Solução 1 (45%)	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O
KH ₂ PO ₄			2.89
MgCl ₂ .6H ₂ O			0.23
Solução 2 (45%)		CaCl ₂	0.03
		NH ₄ HCO ₃	3.13
		NaHCO ₃	12.04
Solução Redutora (10%)		CYSTEINE HCl	3.90
		NaOH	1.00
30/70		Solução 1 (45%)	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O
	KH ₂ PO ₄		3.31
	MgCl ₂ .6H ₂ O		0.27
	Solução 2 (45%)	CaCl ₂	0.03
		NH ₄ HCO ₃	3.57
		NaHCO ₃	13.76
	Solução Redutora (10%)	CYSTEINE HCl	4.46
		NaOH	1.14
	40/60	Solução 1 (45%)	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O
KH ₂ PO ₄			3.86
MgCl ₂ .6H ₂ O			0.31
Solução 2 (45%)		CaCl ₂	0.03
		NH ₄ HCO ₃	4.17
		NaHCO ₃	16.05
Solução Redutora (10%)		CYSTEINE HCl	5.20
		NaOH	1.33
50/50		Solução 1 (45%)	Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O
	KH ₂ PO ₄		4.63
	MgCl ₂ .6H ₂ O		0.37
	Solução 2 (45%)	CaCl ₂	0.04
		NH ₄ HCO ₃	5.00
		NaHCO ₃	19.26
	Solução Redutora (10%)	CYSTEINE HCl	6.24
		NaOH	1.60

Onde: IR = inóculo ruminal, ST = solução tampão, [] = concentração.

APÊNDICE II

Tabela 7 – Concentração dos reagentes de meio de incubação para posterior análise de aderência microbiana

Relação IR:ST	% Solução tampão	Reagentes	[] g/litro
50/50	Solução 1 (45%)	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1,76
		KH ₂ PO ₄	1,15
		MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,09
		CaCl ₂	0,01
		NH ₄ HCO ₃	1,25
	Solução 2 (45%)	NaHCO ₃	4,82
		CYSTEINE HCl	1,56
		NaOH	0,40
	Solução Redutora (10%)		

Onde: IR = inóculo ruminal, ST = solução tampão, 50/50 = relação IR/ST, [] = concentração.

APÊNDICE III

TABELA 8 – Solução tampão fosfato

Reagente	[] g/litro
K_2HPO_4	0.63
KH_2PO_4	5.00
NaCl	0.65
$CaCl_2$	0.05
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.36

Onde: [] = concentração.