

DETECÇÃO DE 16S RRNA DE UMA COCULTURA DE *RUMINOCOCCUS ALBUS* E *FIBROBACTER SUCCINOGENES* NA PRESENÇA DE NÍVEIS DIFERENTES DE TANINOS CONDENSADOS¹

PEDRO B. ARCURI², ALICE N. PELL³, PETER SCHOFIELD³, MICHAEL L. THONNEY³

Publicado inicialmente como parte do trabalho de dissertação de Ph.D., Cornell University, Ithaca, NY

² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

³ Dept. Animal Science, Cornell University, Ithaca, NY, EUA

RESUMO: Uma cocultura de *Ruminococcus albus* 8 e *Fibrobacter succinogenes* S85 foi mantida em meio de cultura contendo *Cynodon plectostachyus* e tanino de *Desmodium ovalifolium*. Sondas de oligonucleotídeos para 16SrRNA foram usadas para detectar e quantificar as populações de cada espécie. Ambos organismos foram detectados em todas as amostras. A atividade microbiana foi monitorada pela produção de gás, ácidos graxos voláteis e desaparecimento de fibra detergente neutro (FDN).Concentrações crescentes de tanino causaram um significativo ($P<0,05$) aumento na fase lag das culturas, observado pelo desaparecimento da FDN e produção de gás. A produção de AGV não se correlacionou com o RNA estimado.

PALAVRAS-CHAVE: ecologia microbiana, nutrição de ruminantes, sondas moleculares.

DETECTION OF 16S rRNA OF A RUMINOCOCCUS ALBUS AND FIBROBACTER SUCCINOGENES COCULTURE UNDER INCREASING TANNIN LEVEL

ABSTRACT: A *Ruminococcus albus* and *Fibrobacter succinogenes* coculture was grown in culture medium containing *Cynodon plectostachyus* and *Desmodium ovalifolium* tannin. Oligonucleotide probes targeting 16S rRNA were used to detect and quantify either species populations. Both organisms were detected in all samples. Microbial growth was monitored by gas production, volatile fatty acids and neutral detergent fiber (NDF) disappearance. Increased tannin concentrations caused significant ($P<0,05$) longer lag phase as observed by NDF disappearance and gas production. There was no correlation between VFA production and estimated RNA.

KEYWORDS: microbial ecology, molecular probes, ruminant nutrition.

Introdução

O uso de sondas moleculares para estudos de ecologia microbiana representa um grande avanço sobre métodos baseados em morfologia ou cultivo em meio artificial, por permitirem a avaliação de microrganismos em amostras do ambiente. Apesar de algumas questões metodológicas não resolvidas Raskin et al., 1997, a técnica de sondas de oligonucleotídeos dirigidas para o 16S rRNA tem sido utilizada para o estudo da ecologia microbiana ruminal (Stahl et al., 1988; Forster et al., 1997; Shi et al., 1997) e de vários outros ecossistemas. Neste trabalho testou-se o uso de sondas moleculares para a detecção e quantificação de microrganismos ruminais em condições simuladas de pastejo de forrageiras tropicais.

Material e Métodos

Meio de cultura semi-complexo foi preparado anaerobiamente sem resazurina. Um volume de 110 ml foi transferido para garrafas de sôro contendo 100 ± 2 mg de *Cynodon plectostachyus*. A forragem seca e moída foi embebida por 12 hs em água destilada contendo 10% *t*-butanol a 39 °C para a extração de componentes solúveis. Butanol terciário foi usado para prevenir-se contaminação microbiana. O meio contendo forragem foi autoclavado a 121 °C por 15 min. Culturas crescendo exponencialmente com A₆₀₀ de aproximadamente 0.7 eram usadas como inóculos para a fermentação de forragem num sistema de produção de gás. Taninos condensados solúveis foram extraídos de folhas maduras de *Desmodium ovalifolium* Desv. (Leguminosae, Papillionidae) (Asquith et al., 1985). Um tampão (0,5M Tris, pH 7) contendo polivinilpirrolidona-4000 (PVP) (Sigma Co., St. Louis, MO, EUA) era adicionado a alíquotas de 1 ml das culturas para remover taninos que impediriam a extração de RNA (Arcuri et al., 1999). Os pellets de células resultantes eram armazenados a –80 °C. Um kit comercial foi utilizado para extração do RNA total (RNAqueous, Ambion Inc., Cupertino, CA, EUA) (Arcuri et al., 1999). Sondas utilizadas e condições de hibridização estão descritas em SCHOFIELD et al. (1997). Os resultados foram fotografados em filme de raios X e gravados digitalmente (AlphaImager imaging system IS-1000 versão 2.0, Alpha Inotech Corp., San Leandro, CA, EUA). Um fator de normalização foi calculado e usado para ajustar os dados dos números de pixels. Os sinais de hibridização de pelo menos duas membranas tiveram suas médias e desvios padrão calculados. O modelo geral linear do SAS (SAS system versão 6.12) foi usado nas análises estatísticas. O teste de Tukey foi usado para detectar diferenças entre médias. As médias foram comparadas em nível ($P<0,05$).

Resultados e discussão

Os parâmetros de monitoramento da cocultura indicaram a relação inversa entre digestibilidade verdadeira e concentração de taninos. A produção total de gás não diferiu entre concentrações diferentes de tanino. Foram observadas variações de até quatro vezes nos sinais de hibridização de quaisquer das sondas utilizadas. A sonda universal apresentou tendência de aumentar o RNA estimado de 0 até 24 h seguida por um decréscimo às 48 h. O mesmo pode ser dito a respeito da sonda R. A sonda S indicou que a população de *F. succinogenes* foi pequena mas relativamente constante até 24 h em qualquer concentração de tanino e aumentou em 48 h. Estes resultados foram parcialmente confirmados pelo aumento de ácido succínico neste tempo, um produto final do metabolismo de *F. succinogenes* mas não de *R. albus*. Não houve correlação estatística entre AGV produzidos e quantidades estimadas de rRNA. As percentagens obtidas somando-se as quantidades médias de rRNA estimadas pelas sondas R e S confirmaram o aumento relativo de *F. succinogenes* após 48 h de fermentação. Várias causas de variação são possíveis (Raskin et al. 1997), sendo uma delas o fato de a forragem, autoclavada durante o preparo dos frascos de fermentação, ser a origem de um ou mais compostos não identificados, extraídos juntamente com o RNA. Outros autores encontraram problemas semelhantes (Stahl et al., 1988; Amann et al., 1990).

Conclusões

As sondas de oligonucleotídeos utilizadas neste trabalho podem ser usadas como ferramentas para a detecção mas não para quantificar as proporções relativas entre *R. albus* e *F. succinogenes* durante a fermentação de *C. plectostachyus* na presença de concentrações crescentes de tanino condensado de *D. ovalifolium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.Amann, R. I., L. Krumholz, et al. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172: 762-770

2.Arcuri, P. B., M. L. Thonney, et al. (1999). Extração de RNA bacteriano na presença de taninos para o estudo da ecologia microbiana do rúmen. *Anais da XXXVI Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 1: 260

3.Asquith, T. N. and L. G. Butler (1985). Use of dye labeled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *Journal of Chemical Ecology* 11(11): 1535-1544.

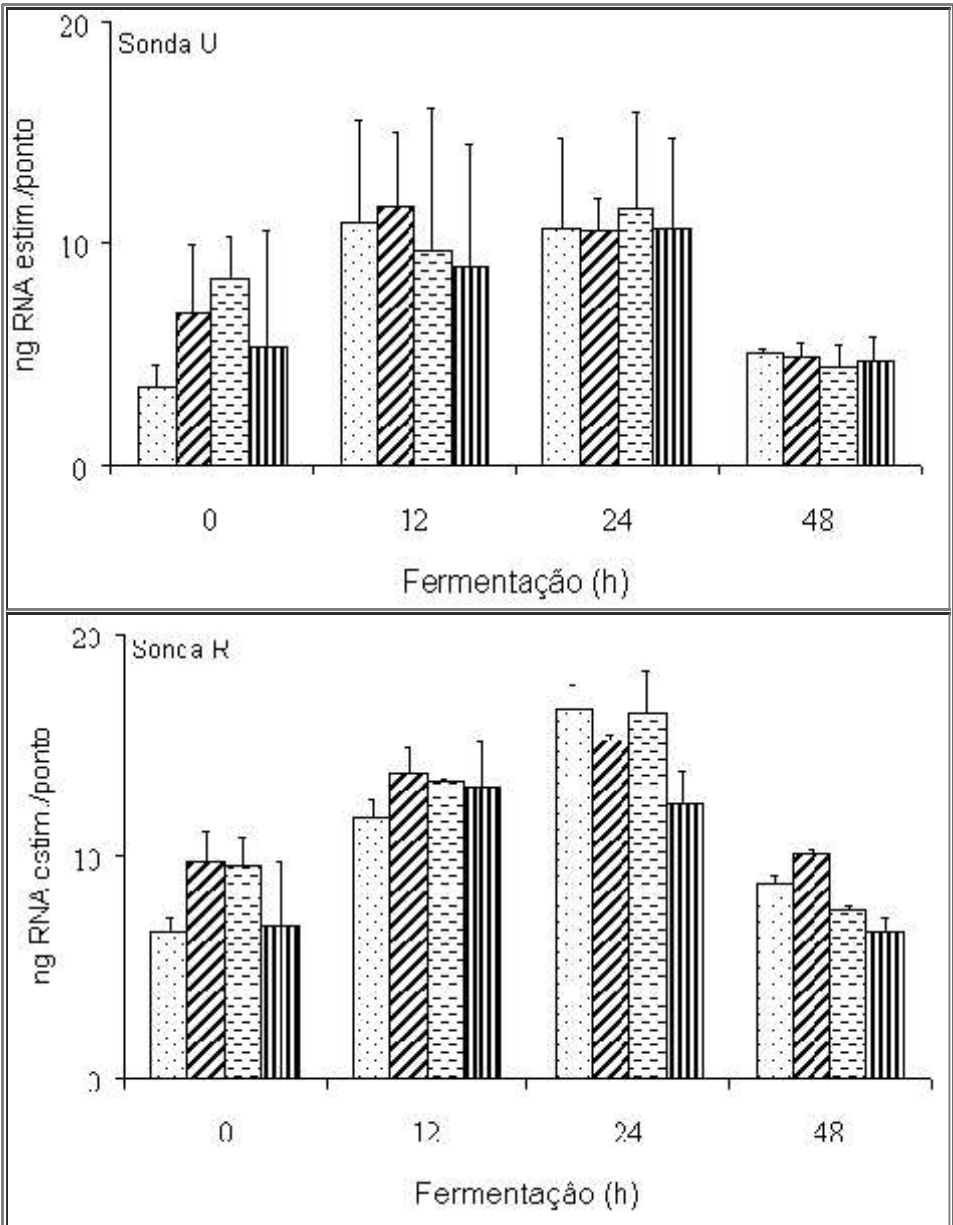
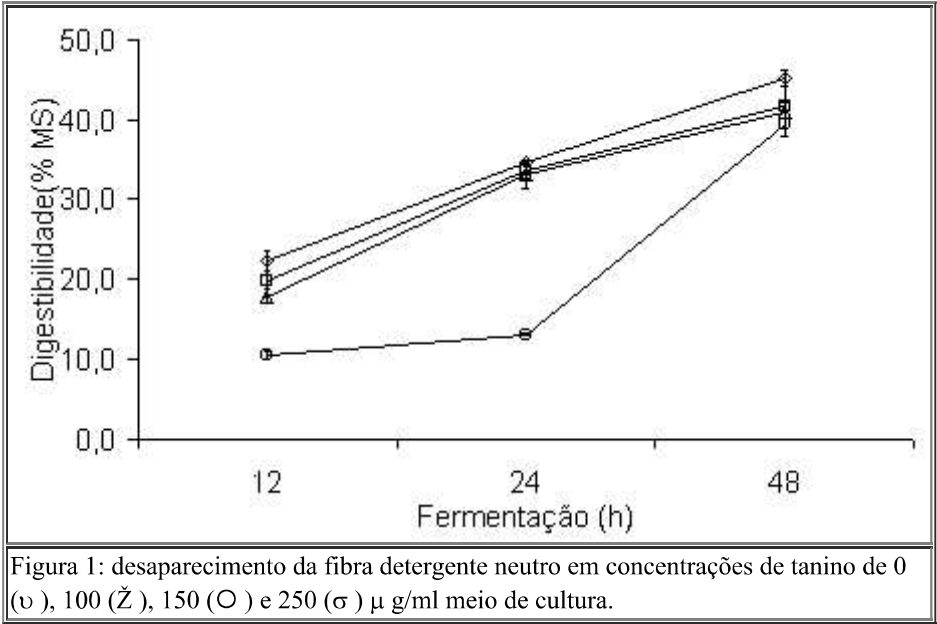
4.Forster, R. J., J. Gong, et al. (1997). Group-specific 16S rRNA hybridization probes for determinative and community structure studies of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the rumen. *Applied and Environmental microbiology* 63(4): 1256-1260

5.R askin, L., W. C. Capman, et al. (1997). Molecular ecology of gastrointestinal ecosystems. in *Gastrointestinal Microbiology; gastrointestinal microbes and host interactions*. R. I. Mackie, B. A. White and R. E. Isaacson. New York, NY, Chapman & Hall, International Thomson Publishing. vol2 p.243-298

6.S chofield, P., A. N. Pell, et al. (1997). Molecular beacons: Development of a fluorescence-based solution hybridization technique for ecological studies with ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1143-1147

7.S hi, Y., C. O. Odt, et al. (1997). Competition for cellulose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 63(2): 743-742

8.S tahl, D. A., B. Flesher, et al. (1988). Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 54(5): 1079 - 1084



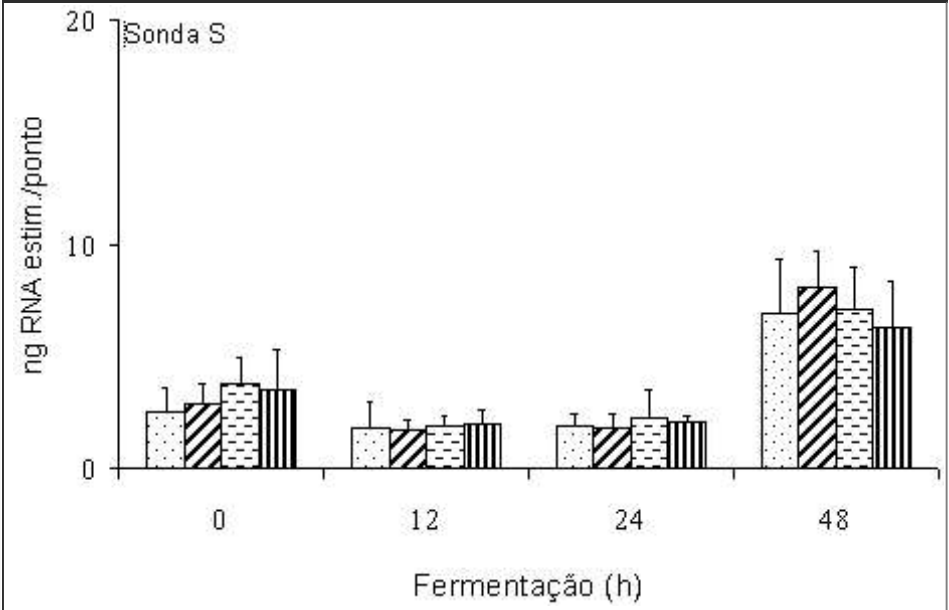


Figura 2: Quantidades estimadas de RNA por ponto (alíquota fixada na membrana de nylon) de amostras hibridizadas com as sondas U, R e S. Da esquerda para a direita, em cada tempo de fermentação, 0, 100, 150 e 250 µ g tanino/ml meio de cultura.