



Teste de eficiência de Penicilina, Sulfato de Estreptomicina e Cloranfenicol para cultivo de fungos ruminais provenientes de vacas Holandês x Zebu sob condição de pastejo em *Brachiaria* spp.

Juliana Alves Resende¹, Sara Barbosa de Paiva¹, Fernando César Ferraz Lopes², Marlice Teixeira Ribeiro², Jailton da Costa Carneiro², Pedro Braga Arcuri²

¹Graduanda do curso de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF. Estagiária da Embrapa Gado de Leite. e-mails: juresende2003@yahoo.com.br; sarabp_farmufjf@yahoo.com.br

²Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, MG. e-mails: fernando@cnpgl.embrapa.br; marlice@cnpgl.embrapa.br; jailton@cnpgl.embrapa.br; pbal@cnpgl.embrapa.br

Resumo: Os fungos anaeróbios ruminais produzem enzimas e geralmente degradam os mais resistentes polímeros da parede celular de plantas. Estes microrganismos têm sido cultivados em meios simulando o rúmen, sob condições ótimas para sua germinação e reprodução, como pH 6,7, temperatura, anaerobiose, além de diferentes antibióticos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes concentrações dos antibióticos Penicilina + Estreptomicina e Cloranfenicol, em solução ou adicionados diretamente ao meio de cultura, visando inibir o crescimento de bactérias ruminais. O crescimento de fungos foi confirmado pela observação macroscópica de estruturas filamentosas aderidas ao material fibroso e, microscopicamente, pela visualização de hifas e esporângios coradas com azul de lactofenol-algodão. A associação dos antibióticos Penicilina + Estreptomicina e Cloranfenicol originou resultados mais satisfatórios, pois houve crescimento de fungos e inibição completa de bactérias, possibilitando cultivo isolado de fungos ruminais.

Palavras-chave: antibiótico, cultivo, fungo anaeróbio, inibição bacteriana

Test of efficiency of Penicillin, Streptomycin Sulfate and Cloranfenicol for culture of ruminal fungi proceeding from cows Holstein x Zebu under grazing in *Brachiaria* spp

Abstract: The ruminal anaerobic fungi produces enzymes and generally degrade most resistant polymers of the plant cell walls. These microorganisms have been cultivated in medium simulating rumen, that includes excellent conditions for its germination and reproduction, as pH 6.7, temperature, anaerobes, beyond different antibiotics. The present work aimed to test the efficiency of different concentrations of antibiotics Penicillin + Streptomycin sulfate or Cloranfenicol, in solution or added directly to the medium, to inhibit the growth of the ruminal bacteria. The growth of fungi was confirmed by the microscopic observation of filament structures adhered to the fibres material and microscopically by the visualization of systems of rhizoids and sporangia colored by blue of lactofenol-cotton. The association of antibiotics Penicillin + Streptomycin Sulfate and Cloranfenicol originated better results, because the fungi grew and there was a complete inhibition of bacteria, making possible the isolated culture of ruminal fungi.

Keywords: antibiotic, culture, anaerobic fungi, bacterial inhibition

Introdução

O rúmen é um ecossistema complexo, onde se encontram bactérias, protozoários e fungos que vivem em constante interação com os alimentos e entre si (Lee et al., 2000). Os fungos anaeróbios produzem grande variedade de enzimas e geralmente degradam espectro maior de substratos quando comparados com as bactérias do rúmen, sendo capazes de degradar os mais resistentes polímeros da parede celular de plantas (Orpin & Joblin, 1997).

Estes microrganismos têm sido cultivados em meios simulando o rúmen, sob condições ótimas para sua germinação e reprodução, como pH 6,7, temperatura e anaerobiose. A temperatura ideal para que zoósporos se desenvolvam é 39°C, e os esporângios podem ser observados em microscópio óptico, aderidos em partículas fibrosas, após coloração com tintura apropriada, tal como azul de lactofenol-algodão (Orpin & Joblin, 1997). Joblin (1981) utilizou fluido de rúmen, para obter culturas enriquecidas, que continham também antibióticos como Penicilina e Sulfato de Estreptomicina. Bactérias metanogênicas, que não haviam sido eliminadas pelo primeiro tratamento com os antibióticos utilizados, foram então removidas por meio do Cloranfenicol (Orpin & Joblin, 1997).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes concentrações dos antibióticos Penicilina + Estreptomicina e Cloranfenicol, em solução ou adicionados diretamente ao meio de cultura, visando inibir o crescimento de bactérias ruminais.

Material e Métodos

O conteúdo ruminal foi obtido de uma vaca Holandês x Zebu, não-gestante, canulada no rúmen e mantida em pastagem de *Brachiaria* spp., no Campo Experimental de Coronel Pacheco (Coronel Pacheco, MG) de propriedade da Embrapa Gado de Leite.

A amostra foi coletada manualmente no saco ventral do rúmen, visando ser representativa do conteúdo ruminal total. Posteriormente, esta foi transferida para um recipiente (garrafa térmica), devidamente identificado, sanitizado e pré-aquecido a 39°C. Após a coleta, a garrafa térmica foi armazenada em caixa de isopor e imediatamente encaminhada ao Laboratório de Microbiologia do Rúmen da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG) para análises microbiológicas.

Em liquidificador, recebendo fluxo constante de CO₂, foram adicionados 180 mL de solução de diluição anaeróbica ADS, constituída por 3,75 mL de Solução Mineral 1 (K₂HPO₄ 6% p/v em água destilada), 3,75 mL de Solução Mineral 2 (KHPO₄ 0,6%; (NH₄)₂SO₄ 1,2%; NaCl 1,2%; MgSO₄ · 7H₂O 0,25%; CaCl₂·2H₂O 0,16% p/v em água destilada) e 91,5 mL de água destilada. Uma alíquota de 20 g de amostra do conteúdo ruminal foi transferida para o liquidificador e homogeneizada em velocidade máxima por três minutos. Em seguida a amostra foi inoculada (0,5 mL) no meio de cultivo GSM (*Growth Study Medium*), preparado segundo Odenyo et al. (1991), acrescido de antibióticos. Logo após a inoculação, os tubos foram incubados a 39°C. O meio de cultura foi acondicionado em tubos de *Hungate* (Bellco Glass, Inc, Vineland, NJ, EUA), que continham 8 mL de GSM, vedados com rolhas de borracha butil, impermeáveis a gases e selados com lacres alumínio. A Penicilina G e Sulfato de Estreptomicina foram acrescidas ao meio de cultura em solução e o Cloranfenicol, em solução (no momento em que o meio de cultura foi distribuído nos tubos) ou diretamente durante o preparo do meio de cultura. A solução de Penicilina G e Sulfato de Estreptomicina foi preparada nas concentrações de 12,1 e 2 mg/mL, respectivamente, e a de Cloranfenicol, nas concentrações de 0,050; 0,100; 0,150; 0,200 e 0,300 mg/mL.

Para a esterilização das soluções foi utilizado o processo de filtração, utilizando filtro de membrana (Millipore, 0,45 µm de poro).

As soluções foram preparadas sob condições anaeróbias, sendo, posteriormente, armazenadas em vidros previamente autoclavados, vedados conforme os tubos que continham o meio de cultura, e estocados a 4°C.

O procedimento foi repetido em triplicata, duas vezes em semanas distintas. A verificação do crescimento foi feita visualmente, pela observação no microscópio óptico, de hifas e esporângios, a partir de 48 h até sete dias, corando-se as lâminas com azul de lactofenol-algodão. O crescimento bacteriano foi verificado através da turvação do meio de cultura, comprovado pela visualização de bactérias em lâminas e coloração de Gram.

Resultados e Discussão

Conforme apresentado na Tabela 1, nenhuma das soluções testadas conseguiu inibir efetivamente o crescimento bacteriano. Ressalte-se que a concentração utilizada de Penicilina + Sulfato de Estreptomicina foi aquela recomendada por Joblin (1981) e confirmada por Tripathi et al. (2007). Ao mesmo tempo, foram realizados testes com o dobro da concentração dessa solução. A concentração de 0,050 mg/mL da solução de Cloranfenicol foi a mesma utilizada por McGranaghan et al. (1991). Também foram testadas outras concentrações de Cloranfenicol (Tabela 1). Foi visualizado crescimento de fungos somente nas duas concentrações testadas de Penicilina + Sulfato de Estreptomicina e de 0,300 mg/mL de Cloranfenicol.

Diferentemente do relatado por McGranaghan et al. (1991), não houve crescimento de fungos ruminais na concentração indicada, possivelmente pela resistência das bactérias ruminais a esta concentração de antibiótico. Como as bactérias apresentam desenvolvimento mais rápido, estas consomem todo o substrato, inibindo o crescimento dos fungos. Já na concentração mais elevada (0,300 mg/mL) foi possível o desenvolvimento dos fungos pelo menor crescimento de bactérias.

Foi testada também a adição do Cloranfenicol durante o preparo do meio de cultura, nas concentrações de 0,050; 0,100 e 0,300 mg/mL (Tabela 2). Os resultados encontrados foram semelhantes aos apresentados acima.

Por meio dos resultados apresentados anteriormente, a associação dos antibióticos (Tabela 3) originou resultados mais satisfatórios, pois houve crescimento de fungos e inibição completa de bactérias. O Cloranfenicol foi adicionado durante o preparo do meio de cultura e a solução de Penicilina + Sulfato de Estreptomicina, após autoclavagem. Lee et al. (2000), estudando a interação dos microrganismos

ruminais utilizaram também a associação dos antibióticos Penicilina G, Sulfato de Estreptomicina e Cloranfenicol, porém o Cloranfenicol foi utilizado na concentração de 0,100 mg/mL, concentração esta que não foi eficaz, neste trabalho, na inibição das bactérias (Tabela 2).

Tabela 1 Relação das concentrações de antibióticos utilizados, em solução, e o respectivo crescimento

Antibiótico	Concentração (mg/mL)	Crescimento de fungos	Crescimento de bactérias
Penicilina + Sulfato de Estreptomicina	12,1 e 2	++	+
Penicilina + Sulfato de Estreptomicina	24,2 e 4	++	+
Cloranfenicol	0,050	-	+++
Cloranfenicol	0,100	-	+++
Cloranfenicol	0,150	-	+++
Cloranfenicol	0,200	-	+++
Cloranfenicol	0,250	-	++
Cloranfenicol	0,300	++	+

+ = pequeno crescimento, ++ = médio crescimento, +++ = grande crescimento, - = nenhum crescimento

Tabela 2 Relação das concentrações de Cloranfenicol utilizadas e o respectivo crescimento.

Antibiótico	Concentração (mg/mL)	Crescimento de fungos	Crescimento de bactérias
Cloranfenicol	0,050	-	+++
Cloranfenicol	0,100	-	+++
Cloranfenicol	0,300	++	+

+ = pequeno crescimento, ++ = médio crescimento, +++ = grande crescimento, - = nenhum crescimento

Tabela 3 Associação de antibióticos utilizados que resultou na completa inibição das bactérias ruminais.

Antibiótico em solução	Antibiótico	Concentração (mg/mL)	Crescimento de fungos	Crescimento de bactérias
Penicilina + Sulfato de Estreptomicina	-	12,1 e 2	+++	-
-	Cloranfenicol	0,300		

+ = pequeno crescimento, ++ = médio crescimento, +++ = grande crescimento, - = nenhum crescimento

Conclusões

A associação dos antibióticos Penicilina + Estreptomicina e Cloranfenicol apresentou eficiência na inibição do crescimento de bactérias e permitiu o crescimento de fungos. Portanto, este estudo possibilitou o cultivo isolado de fungos ruminais e através deste, futuros trabalhos poderão ser desenvolvidos a fim de avaliar a atividade fúngica isoladamente.

Literatura citada

- 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.
- 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.
- MCGRANAGHAN, P.; DAVIES, J.C; GRIFFITH, G.W. et al. The survival of anaerobic fungi in cattle faeces. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p. 293-300, 1999.
- ODENYO, A.A.; MACKIE, R.I.; FAHER, G.Jr. et al. Degradation of wheat straw and alkaline hydrogen peroxide – treated wheat straw by *Ruminococcus albus* 8 and *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. **Journal of Animal Science**, v.69, p.819-826, 1991.
- ORPIN, C.G.; JOBLIN, K.N. The rumen anaerobic fungi. In: HOBSON P.N.; STEWART, C.S. (Ed.). **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2. ed. London: Blackie Academic, 1997. p.140-195.
- TRIPATHI, V.K.; SEHGAL, J.P.; PUNIYA, A.K. et al. Hydrolytic activities of anaerobic fungi from wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*). **Anaerobe**, v.13, p.36-39, 2007.