



Caracterização expedita bioquímica de bactérias ruminais isoladas tolerantes a própolis¹
Odimári Pricila Pires do Prado², Lúcia Maria Zeoula³, Sara Barbosa de Paiva⁴, Juliana Alves Resende⁴,
Thaís Barros Rísoli⁴, Pedro Braga Arcuri⁴ e Lucimar Pontara Peres de Moura³

¹Parte da tese de doutorado da primeira autora, financiada pela CNPq ²Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UEM/Maringá. Bolsista do CNPq. e-mail: odimari@hotmail.com ³Departamento de Zootecnia – UEM- Maringá. Profa. Dra. Bolsista do CNPq. e-mail: lmzeoula@uem.br ⁴ Estagiárias da EMBRAPA Gado de Leite – Juiz de Fora/MG ⁵ Pesquisador EMBRAPA Gado de Leite - Juiz de Fora/MG

Resumo: Objetivou-se estudar cepas bacterianas tolerantes aos produtos à base de própolis (LLOS) pelas técnicas de isolamento, caracterização bioquímica, em dietas com razão volumoso:concentrado de 100:0 e 50:50. Para dietas volumosas foram avaliados os produtos LLOSC1 e LLOSB3, e para dietas 50:50% os produtos LLOSC1, LLOSD1, LLOSA2 e LLOSC3, os quais diferiam no teor alcoólico e na concentração de própolis. O líquido ruminal foi incubado anaerobiamente a 39°C durante 6 dias em meio contendo LLOS. Após o isolamento, foi avaliado o crescimento das cepas na presença dos substratos: arabinose, celulose, glicose, celobiose, xilose, frutose e lactose. Em dietas volumosas verificou-se que as cepas tolerantes a LLOSC1 foram superiores em fermentar celobiose e celulose do que cepas resistentes ao LLOSB3. Para dieta 50:50 de volumoso:concentrado, destacaram-se os produtos LLOSC3 e LLOSA2, que selecionaram maior número de cepas capazes de degradar todos os carboidratos testados.

Palavras-chave: aditivo alimentar, ecologia microbiana, nutrição de ruminantes, própolis

Expediently characterization biochemistry on isolated rumen bacteria tolerant to propolis

Abstract: The objective was to study bacterial strains tolerant to products containing propolis (LLOS) by isolation techniques, morphology and biochemistry characterization in diets 100:0 and 50:50 roughage:concentrate. For roughage diets were evaluated products LLOSC1 and LLOSB3, and diets to 50:50% LLOSC1 products, LLOSD1, LLOSA2 and LLOSC3, differing in alcoholic teor and propolis concentration. The liquid ruminal was incubated at 39°C during 6 days in anaerobic medium containing propolis. After isolation, there were evaluated growths of strains in the presence of substrates: arabinose, cellulose, glucose, celobiose, xylose, fructose and lactose. In diets with roughage was found that the strains were more tolerant to LLOSC1 ability to fermenter cellulobiose and cellulose than strains resistant to LLOSB3. To diet 50:50 roughage:concentrate highlighted products LLOSC3 and LLOSA2 by selecting larger number of strains capable of degrading all carbohydrates tested.

Keywords: feed additive, microbial ecology, ruminant nutrition, propolis

Introdução

As bactérias ruminais são responsáveis pelos processos fermentativos que fornecem ao animal hospedeiro, principalmente ácidos graxos voláteis (AGV) e proteína microbiana. A ação antimicrobiana da própolis foi verificada por Antunes et al. (1996) em ensaios de antibiose com adição de própolis, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbias e constataram que a atividade antibacteriana da própolis foi mais efetiva sobre as Gram-positivas. O mecanismo de atividade antimicrobiana da própolis é complexo e segundo Takaisi-Kikuni & Schilcher (1994) é provável que esteja envolvido na inibição da RNA-polimerase bacteriana. O uso da própolis como aditivo em ruminantes tem sido objeto de estudos, produtos à base de própolis em pó, (em diferentes extrações alcoólicas: 1, 2 e 3 e concentrações de própolis: A, B, C e D), denominados de LLOS (PI = nº 0605768-3), foram avaliados sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de dietas com razão volumoso:concentrado 100:0 e 50:50 (Prado, 2005). Segundo esse autor, em dietas com 100% de feno de Tifton, a DIVMS foi superior (P<0,05) para a adição de LLOSB3 (49,1%) e de LLOSC1 (45,6%) em relação ao controle (sem aditivo) e a adição de monensina, com média de 39,3%; e em dietas com 50% de concentrado o maior valor de DIVMS foi para LLOSC1 (57,4%) e menores valores para a dieta monensina (54,0%) seguido do controle (53,0%). Assim, objetivou-se estudar exploratoriamente o perfil bioquímico de cepas bacterianas isoladas tolerantes aos produtos à base de própolis LLOS. Assim, os produtos LLOS testados foram LLOSC1, LLOSB3 para dietas com 100% de volumoso e os produtos LLOSC1, LLOSD1, LLOSA2, LLOSC3, para dietas com 50:50% de volumoso:concentrado.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG. Os produtos à base de extratos de própolis em pó LLOS e se diferenciaram em três extrações alcoólicas em (1, 2 e 3) e por

quatro concentrações de própolis (A, B, C e D), sendo estes preparados de acordo com metodologia desenvolvida por Franco & Bueno (1999). Os produtos avaliados foram LLOSC1, LLOSB3 em dietas com 100% de volumoso e os produtos LLOSC1, LLOSD1, LLOSA2, LLOSC3 em dietas com 50:50% de volumoso:concentrado, que se destacaram no ensaio DIVMS em relação à dieta controle e monensina sódica (Prado, 2005). Os meios de cultura anaeróbios para os procedimentos de isolamento de bactérias ruminais foram preparados previamente. O meio de cultivo utilizado para o cultivo e isolamento de bactérias era denominado GSM (Growth Study Médium) e feito conforme descrição de Odenyo et al. 1998. Sempre que necessário, utilizou-se uma solução de diluição anaeróbia (ADS). Para o isolamento, utilizou-se meio sólido, roll-tube, (Hungate, 1969). As amostras de conteúdo ruminal, foram retiradas de quatro vacas Holandês X Zebu canuladas no rúmen e alimentadas com dietas contendo 50:50 e 100:0 de volumoso:concentrado. A amostragem do conteúdo ruminal, em torno de 1 litro, era realizada antes da alimentação. O conteúdo ruminal era filtrado e imediatamente acondicionado em garrafa térmica e levado imediatamente ao laboratório de microbiologia do rúmen. Retirava-se uma alíquota de 5 mL de líquido ruminal, que era injetada através de seringa e agulha estéreis em frasco estéril com capacidade para 100 mL, contendo 75 mL de meio de cultura anaeróbico GSM, 2,0 mL de cisteína HCl (1,25%), 1,0 mL de complexo vitamínico B, e 3,0 mL da solução contendo o produto LLOS a ser testado. Os frascos inoculados eram incubados a 39°C durante até 6 dias. Após a incubação, 1 mL da suspensão era transferido para tubos de ensaio tipo Hungate (tubo de cultura anaeróbico, 18 X 150 mm; Bellco®) contendo: 8 mL do meio GSM, 0,1 mL de complexo de vitamina B, 0,2 mL de cisteína HCl e mais 0,3 mL do produto LLOS teste. Após até dois dias de cultivo, 1 mL da suspensão era retirado de cada tubo de Hungate e diluído em solução anaeróbica (ADS), até as diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} . Procedia-se ao isolamento de cepas conforme Hungate, (1969). Os tubos eram então incubados a 39°C. Dois dias após a inoculação nos roll-tubes, as colônias bacterianas isoladas crescidas eram repicadas, sob anaerobiose, em novos tubos contendo: 8 mL do meio GSM acrescido de 0,1 mL de complexo de vitamina B e 0,2 mL de cisteína HCl. Para a confirmação de pureza das cepas foi feita observação morfológica em microscópio ótico. As cepas isoladas que demonstraram capacidade de tolerarem os produtos LLOS testados foram classificadas através de características bioquímicas. Para isto, utilizou-se o mesmo meio GSM, porém substituindo-se a glicose por um dos açúcares: arabinose, celulose, celobiose, xilose, frutose e lactose. Os dados observados foram agrupados de acordo com a frequência de ocorrência de cada cepa isolada, expressa em percentagens.

Resultados e Discussão

Foram isoladas 66 cepas bacterianas tolerantes ao produto LLOS em inóculo proveniente de vacas alimentadas com 50% de silagem de milho e 50% de concentrado, e foram obtidas 49 cepas bacterianas, de vacas recebendo dietas com 100% de silagem de milho. Em dietas com 100% de silagem de milho, as cepas tolerantes a LLOSC1 foram mais capazes de fermentar celobiose (92,4% vs 78,3%) e celulose (57,7% vs 34,8%) do que cepas resistentes ao LLOSB3 (Tabela 1). A maior quantidade de cepas celulolíticas para LLOSC1 mostrou que este extrato foi mais tolerado por bactérias que degradam celulose, como também apresentou maior capacidade hemicelulolítica e pectinolítica, pela maior fermentação da arabinose e xilose. Desta forma, observou-se que o produto LLOSC1 foi tolerado por maior número de cepas, que degradaram todos os diferentes carboidratos testados. As cepas tolerantes a LLOSB3 foram mais específicas; das 23 cepas isoladas (Tabela 1) somente seis cepas foram capazes de degradar todos os carboidratos testados. Esses dados sugerem que LLOSB3 têm compostos que atuam de forma diferente sobre bactérias predominantes em dietas de 100% de silagem de milho, em comparação a LLOSC1. Entre os quatro produtos LLOS testados em dietas contendo 50:50% de silagem de milho:concentrado a maior capacidade de fermentação de celobiose foi apresentada pelas cepas tolerantes ao produto LLOSC3 (94,1%), seguida pelas cepas tolerantes ao produto LLOSA2 (87,5 %), LLOSC1 (77,3 %) e a menor foi pelas cepas tolerantes ao produto LLOSD1 (52,6 %). Por outro lado, destacou-se entre eles, que a menor capacidade de fermentação da celulose foi apresentada pelas cepas tolerantes ao LLOSC1 (31,8 %). Ainda, quanto à capacidade celulolítica da microbiota ruminal resistente ao produto LLOS registrou-se que cepas tolerantes ao LLOSD1 apresentaram capacidade semelhante de fermentar celulose e celobiose (Tabela 1). A arabinose e xilose foram fermentadas pela maioria das cepas tolerantes ao LLOSC3, seguida pelo LLOSA2. Os mesmos açúcares foram fermentados em proporções menores por cepas tolerantes aos demais produtos LLOS. Observando o padrão de fermentação de cada cepa tolerante aos diferentes produtos LLOS de inóculo proveniente de animais alimentados com dietas com 50: 50% de volumoso:concentrado, verificou-se que os produtos LLOSA2 (0,001 mg de flavonóides totais em crisina/g de LLOS) e LLOSC3 (0,030 mg de flavonóides totais em crisina/g de LLOS) selecionaram na sua maioria cepas capazes de fermentar todos os carboidratos testados. Assim, o trabalho demonstrou que existem princípios ativos distintos e ainda não quantificados em cada tipo de LLOS e que estes devem atuar em populações diferentes de bactérias ruminais.

Tabela 1. Capacidade de fermentação de diferentes carboidratos expressa em porcentagem de cepas de bactérias tolerantes aos diferentes produtos à base de própolis LLOS¹, obtidas de animais alimentados com diferentes dietas (100% de silagem de milho e 50% silagem de milho:50% concentrado)

Capacidade de Fermentação	Celulolíticos		Hemicelulolíticos + Pectinolíticos		Fermentadores de açúcares solúveis		
	Celulose	Celobiose	Arabinose	Xilose	Frutose	Glicose	Lactose
100% de Silagem de milho							
LLOSC1							
Efetiva (+)	57,7	92,4	61,6	65,4	88,4	100,0	100,0
Nenhuma (-)	42,6	7,6	38,4	34,6	11,5	0,0	0,0
LLOSB3							
Efetiva (+)	34,8	78,3	47,8	47,8	73,9	100,0,0	82,6
Nenhuma (-)	65,2	21,7	52,2	52,2	26,1	0,0	17,4
50% Silagem de milho e 50% Concentrado							
LLOSD1							
Efetiva (+)	52,7	52,6	63,2	57,9	57,9	100,0	94,8
Nenhuma (-)	47,3	47,4	36,8	42,1	42,1	0,0	5,2
LLOSC3							
Efetiva (+)	64,8	94,1	76,5	70,6	94,1	100,0	100,0
Nenhuma (-)	35,2	5,9	23,5	29,4	5,9	0,0	0,0
LLOSC1							
Efetiva (+)	31,8	77,3	45,4	63,6	86,4	100,0	77,3
Nenhuma (-)	68,2	22,7	54,6	36,4	13,6	0,0	22,7
LLOSA2							
Efetiva (+)	75,0	87,5	75,0	62,5	100,0	100,0	87,5
Nenhuma (-)	25,0	12,5	37,5	37,5	0,0	0,0	12,5

(+): Crescimento visual (meio turvo) em 48hs; (-): Não houve crescimento até 48hs de incubação; ¹ LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1, 2 e 3) e diferentes concentrações de própolis (A, B, C e D)

Conclusões

O aditivo contendo LLOSC1 foi mais promissor para animais recebendo dieta volumosa, uma vez que o mesmo foi tolerado por uma proporção significativa de bactérias celulolíticas. Os aditivos LLOSC3 e LLOSA2 foram os mais promissores em animais recebendo dietas com relação volumoso:concentrado 50:50, uma vez que os mesmos foram tolerados por populações de maior diversidade metabólica, como observado pelo crescimento em diferentes açúcares.

Literatura citada

- ANTUNES, R.M.P.; CATAO, R.M.R.; CEVALLOS, B.S.O. Antimicrobial activity of propolis. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.77, p.15-18, 1996.
- FRANCO, S. L. & BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, v.11, n.11/12, p. 48-51, 1999.
- HUNGATE, R. E., A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. In: **Methods of Microbiology**. V.3B Edited by J. R. Norris and D. W. Ribbons. Academic Press, New York, p.117, 1969.
- ODENYO, A. A. & OSUJI, P. O. Tannin-tolerant ruminal bacteria from east African ruminants. **Canadian Journal of Microbiology**. V.44, n.9, p.905-909, 1998.
- PRADO, O. P. P. **Produto à base de própolis na nutrição de ruminantes (LLOS)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, 2005, 78p.
- TAKAISI-KIKUNI N.B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medicine**, v.60, n.2, p.222-227, 1994.