



Influência de duas dietas diferentes sob microrganismos celulolíticos e xilanolíticos do rúmem

Renata da Costa Barros Silva¹, Lorena Evangelista Fernandes², Raúl Xavier Lopes³, Marlice Teixeira Ribeiro⁴, Jackson Silva e Oliveira⁴, Cláudio Gallupo Diniz⁵, Marcelo Henrique Otenio⁴

¹Trabalho inicial para elaboração da dissertação de mestrado da primeira autora, financiada pela CAPES

²Graduanda em Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora- CES/JF

³Mestrando em Microbiologia Agrícola da UFLA

⁴Embrapa Gado de Leite

⁵Universidade Federal de Juiz de Fora

Resumo^a: A produção de biocombustíveis tem como subproduto grandes quantidades de glicerina, que poderia ser utilizada como suplemento na alimentação de ruminantes. O objetivo desse trabalho foi analisar as mudanças no perfil dos microrganismos celulolíticos e xilanolíticos presentes no rúmem a partir do isolamento destes de dois grupos de bovinos leiteiros mantidos sob diferentes dietas. Foram utilizados dois grupos de bovinos (A e B), um mantido com silagem de cana e pastagem(A) e o outro com silagem de milho acrescida de glicerina bruta(B). Foram realizadas coletas de líquido ruminal para posterior isolamento dos microrganismos e caracterização quanto a morfologia, motilidade, tolerância a oxigênio e perfil enzimático. No grupo A foram isolados 66 bactérias, destas 34,8% cocos Gram positivos, 39,3% cocobacilos Gram positivos, 12,1% bacilos Gram negativos e 13,6% bacilos Gram positivos. Foi observado que 21,2% desses microrganismos eram móveis, 24,2% eram anaeróbios estritos, 21,1% eram celulolíticos e 98,4% eram xilanolíticos. No grupo B foram isolados 34 bactérias, sendo 55,8% cocos Gram positivos, 26,4% bacilos Gram positivos, 5,8% bacilos Gram negativos e 11,7% cocobacilos Gram positivos. Foi observado que 32,3% eram móveis, 26,4% eram anaeróbios estritos, 8,8% eram celulolíticos e 91,1% eram xilanolíticos. Estes resultados são importantes para o entendimento da dinâmica populacional e sua relação com a adição de glicerina na dieta dos ruminantes.

Palavras-chave: Glicerina, microrganismos celulolíticos, ruminantes, xilana

Influence of two different diets on the cellulolytic and xylanolytic rumen microorganisms

Abstract: The production of biofuels has great amounts of glycerin as a byproduct, which could be used as a ruminant feed supplement. The objective of this paper was to analyze the changes in the profile of the cellulolytic and xylanolytic rumen microorganisms by their isolation from two groups of dairy cattle kept on different diets. Two groups of bovines (A and B) were used, one kept with sugar cane silage and pasture (A) and another kept with crude glycerin added corn silage (B). Ruminal liquid samples were taken for later microorganism isolation and characterization regarding morphology, motility, oxygen tolerance and enzymatic profile. In group A 66 isolates were obtained, being 34,8% Gram positive cocci, 39,3% Gram positive coccobacilli, 12,1% Gram negative rods and 13,6% Gram positive rods. It was observed that 21,2% of these microorganisms were motile, 24,2% were strict anaerobes, 21,1% were cellulolytic and 98,4% were xylanolytic. In group B 34 isolates were obtained, being 55,8% Gram positive cocci, 26,4% Gram positive rods, 5,8% Gram negative rods and 11,7% Gram positive coccobacilli. It was observed that 32,3% were motile, 26,4% were strict anaerobes, 8,8% were cellulolytic and 91,1% were xylanolytic. These results are important for the understanding of the population dynamics and its relation with the addition of glycerin to ruminant diet.

Keywords: Glycerin, cellulolytic microorganisms, ruminants, xylan

Introdução

A complexa microbiota simbiote do rúmem é responsável pela quebra da fibra vegetal, uma habilidade que os hospedeiros animais não possuem. Essa microbiota é altamente responsiva a mudanças na dieta, idade, uso de antibióticos e saúde do hospedeiro animal e varia de acordo com a localização geográfica, estação do ano e regime de alimentação (Tajima et al, 2001).

A produção de biocombustíveis tem como subproduto grandes quantidades de glicerina, que não pode ser utilizada totalmente pela indústria farmacêutica. Uma vez que esse composto é glicogênico, há um grande interesse em sua utilização na alimentação de ruminantes, em especial de novilhos e vacas em lactação devido a grande demanda energética desses animais (Roger et al, 1992). Apesar disso, os efeitos causados pela glicerina bruta, no funcionamento ruminal, e na sua microbiota ainda não foram esclarecidos. A abordagem deste estudo é necessária



para o entendimento da utilização deste subproduto da produção do biodiesel, de forma que seja considerado seguro e adequado, não somente ganho energético, mas a manutenção adequada do funcionamento e microbiota ruminal.

O objetivo desse trabalho foi analisar as mudanças no perfil dos microrganismos celulolíticos e xilanolíticos presentes no rúmem a partir do isolamento destes de dois grupos em bovinos leiteiros mantidos com dietas de silagem de cana e pastagem e silagem de milho acrescida de glicerina bruta.

Material e Métodos

Foram utilizados no estudo dois grupos de bovinos leiteiros (A e B) do Campo Experimental de Coronel Pacheco da Embrapa Gado de Leite, sendo A mantido com dieta rica em material lignocelulósico (silagem de cana e pastagem) e B mantido com dieta de silagem de milho acrescida de glicerina bruta. As coletas eram realizadas de forma manual e armazenadas em garrafas térmicas para o transporte até Laboratório de Microbiologia do Rúmem da Embrapa Gado de Leite.

A metodologia desenvolvida por Hungate (1966) foi utilizada para o cultivo e isolamento dos microrganismos. O líquido ruminal foi diluído até 10^{-4} , inoculado em meio completo e após 24 horas, o meio foi diluído até 10^{-10} e inoculado em *rolltubes* para isolamento. Após o crescimento, foram selecionadas colônias para transferência para o meio completo e avaliação quanto a morfologia e pureza (coloração de Gram), motilidade (meio SIM suplementado) e teste respiratório (tolerância a oxigênio/câmara anaeróbica). O perfil enzimático para produção de celulasas e xinalases foi determinado com auxílio de zimogramas. Para detecção de microrganismos celulolíticos utilizou-se o meio NapI 50 mM, pH 7 + carboximetilcelulose (CMC) 0,5% (CMC, 2,5g; Agar, 7,5g; NaPI 50mM pH 7, 500 mL; $MgCl_2$ 1M, 100 μ L; $CaCl_2$ 1M, 100 μ L) para a detecção da atividade celulolítica. Foram perfurados orifícios no ágar para inoculação de 100 μ L das amostras (pellet e sobrenadante) obtidos da cultura pura e do controle positivo, após centrifugação a 8000rpm/15min. As placas foram incubadas a 39°C por 20 horas e após o crescimento, lavadas com água destilada, coradas com solução de vermelho de congo a 0,1% por 10 minutos e lavadas novamente com solução de NaCl 1M. Foram realizadas fotos sob iluminação UV. A detecção de microrganismos xilanolíticos foi realizada utilizando-se o mesmo meio e procedimento, porém com a substituição da CMC por xilana 1%.

Uma vez caracterizados, os isolados foram acondicionados em freezer -20°C para posterior caracterização molecular e inclusão na coleção de microrganismos da Embrapa.

Resultados e Discussão

Foram obtidos 66 isolados do rumem dos animais do grupo A, sendo destes 34,8% cocos Gram positivos, 39,3% cocobacilos Gram positivos, 12,1% bacilos Gram negativos e 13,6% bacilos Gram positivos.

No grupo B foram isoladas 34 bactérias, sendo 55,8% cocos Gram positivos, 26,4% bacilos Gram positivos, 5,8% bacilos Gram negativos e 11,7% cocobacilos Gram positivos.

Esses resultados, para os dois grupos, eram esperados uma vez que, de acordo com Wilson *et al.* (1955) há uma predominância de cocos e bacilos Gram positivos na microbiota ruminal.

No teste de motilidade com os isolados provenientes do grupo A, 21,2% dos isolados foram identificados como móveis, enquanto que no grupo B esse número subiu para 32,3%. O teste respiratório revelou que no grupo A 24,2% dos isolados eram anaeróbios estritos e no grupo B, 26,4%.

Na realização dos testes enzimáticos (zimogramas) foi possível constatar que no grupo A 21,1% dos isolados eram celulolíticos e 98,4% eram xilanolíticos e no grupo B 8,8% eram celulolíticos e 91,1% eram xilanolíticos.

Estudos com bactérias celulolíticas ruminais demonstraram que concentrações de glicerol no meio de cultivo maiores que 5% tem grandes efeitos sobre seu desenvolvimento, prolongando a fase lag do ciclo celular, diminuindo a aderência à fibra e inibindo a degradação da celulose (Roger *et al.*, 1992). É possível que essa seja a razão pela qual foi isolado um número menor de microrganismos celulolíticos e xilanolíticos do rúmem dos animais do grupo B em comparação com o grupo A.

A glicerina é utilizada pronta e facilmente pelas suas características bioquímicas, um triálcool, e sua presença pode ter favorecido a proliferação de espécies bacterianas que utilizam intermediário da glicólise como fonte de energia, tornando sua presença no rúmem dos animais do grupo B maior.

Conclusões

O trabalho é importante pelo interesse na utilização de glicerina na alimentação de ruminantes, como estudo dos seus efeitos na microbiota ruminal, abordagem ainda restrita na literatura.

A adição de glicerina bruta a dieta de bovinos pode influenciar a degradação da celulose no rúmem, isto pela dificuldade do desenvolvimento de microrganismos celulolíticos, mantidos em uma fase lag estendida.



A próxima etapa do trabalho consiste na caracterização molecular dos isolados, de forma a determinar as espécies mais afetadas pelas duas dietas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, a FAPEMIG e a Embrapa pelo suporte financeiro e apoio à este trabalho.

Literatura citada

HUNGATE, R. E. [1966]. The Rumen and its Microbes. **Académie Press, New York and London.** 523 pp. 1966.

ROGER, V.; FONTY, G.; ANDRE, C.; GOUET, P. [1992]. Effects of Glycerol on the Growth, Adhesion, and Cellulolytic activity of Rumen Cellulolytic bacteria and Anaerobic fungi. **Current Microbiology.** vol. 25, pp. 197 – 201, 1992.

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. [2001]. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Appl Environ Microbiol.** vol 67, p. 2766 - 2774

WILSON, M. K.; BRIGGS, C. A. E. [1955]. The Normal Flora of the Bovine Rumen II: Quantitative Bacteriological Studies. **Journal of Applied Microbiology.** vol 18(2). p. 294-306, 1955.

^a Como citar este trabalho: AUTORES. Título do trabalho. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECCIA, 49., 2012, Brasília. Anais... Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2012. (CD-ROM).