

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM IMUNOLOGIA / GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

RENATA DA COSTA BARROS SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS XILANOLÍTIICAS E
CELULOLÍTIICAS A PARTIR DE CONTEÚDO RUMINAL DE
BOVINOS LEITEIROS**

Juiz de fora

2012

RENATA DA COSTA BARROS SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS XILANOLÍTIICAS E
CELULOLÍTIICAS A PARTIR DE CONTEÚDO RUMINAL DE
BOVINOS LEITEIROS**

**Dissertação de Mestrado do Curso
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências
Biológicas na área ou Genética e
Biotecnologia.**

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

Co-orientador: Dr. Marcelo Henrique Otenio

Co-orientadora: Vânia Lúcia da Silva

Juiz de Fora

2012

SILVA, R. C. B. BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS XILANOLÍTICAS E CELULOLÍTICAS A PARTIR DO CONTEÚDO RUMINAL DE BOVINOS LEITEIROS, 2012. 90 f. Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências

DEDICO ESSE TRABALHO:

A minha mãe, exemplo de força e dedicação, base da minha educação,
que semeou e cuidou com atenção e carinho meu crescimento pessoal e
profissional.

Ao meu avô, fã incondicional e amigo eterno.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, pelo amor, compreensão e companhia nos momentos fáceis e difíceis. Por estarem sempre presentes, mesmo quando ausentes.

Ao Professor Dr. Cláudio Galuppo Diniz pela orientação em todos os anos que fiz parte do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Obrigada pela oportunidade e por conduzir seus alunos com motivação, força e muito conhecimento.

Ao Dr. Marcelo Henrique Otenio pela orientação, apoio e incentivo. Agradeço pelo exemplo e por todo o ensinamento adquirido.

A Professora Dra. Vânia Lúcia da Silva orientação, ensinamentos, apoio e incentivo durante o desenvolvimento desse trabalho.

A Dra. Alessandra Ferreira Machado pelo exemplo e auxílio imprescindível para a realização desse trabalho.

Ao Dr. Jackson Silva e Oliveira pelas amostras cedidas a esse trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Microbiologia do Rúmем da Embrapa Gado de Leite pela amizade e auxílio no decorrer desse estudo.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Juiz de Fora pela amizade, carinho, ensinamentos e auxílio durante todos os anos em que trabalhamos juntos.

Ao corpo docente do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelos ensinamentos, incentivo e auxílio.

A professora Regina Martoni por ter me inspirado a fazer Ciências Biológicas.

As amigas Ana Luiza Moura, Camila Branda, e Lorena Fernandes por toda ajuda, companheirismo e risadas quando tudo parecia dar errado.

As amigas Mariana Lopes e Daniele Knupp pelos aconselhamentos, incentivo e amizade.

A todos os demais amigos pela compreensão, conselhos e companheirismo durante esses dois anos.

Ao meu namorado por todo o apoio, amizade, auxílio e paciência, em especial nos últimos meses de desenvolvimento do trabalho.

A Universidade Federal de Juiz de Fora, por acolher grandes mestres e pela oportunidade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

RESUMO

Os ruminantes são animais capazes de utilizar a fibra contida nos vegetais como alimento devido a atuação de microrganismos contidos em seu trato digestivo. A prospecção por organismos da microbiota ruminal com potencial capacidade de degradação de celulose e xilana tem grande importância em atividades antrópicas e processos industriais. Foram realizadas coletas semanais de conteúdo ruminal de bovinos fistulados para posterior isolamento de bactérias com o auxílio da metodologia desenvolvida por Hungate (1966) com modificações e outros meios de cultura específicos para microrganismos do rúmem. Os isolados foram avaliados quanto as suas características morfo-tintoriais com o auxílio da coloração de Gram e quanto a motilidade mediante inoculação em meio SIM suplementado. Também foi avaliado o metabolismo energético dos isolados por meio de teste respiratório, assim como o seu perfil enzimático com a utilização de zimogramas. Uma vez caracterizados, os isolados foram acondicionados em freezer -20°C para caracterização molecular e posterior inclusão na coleção de microrganismos da Embrapa. No total foram obtidos 67 isolados, sendo destes 52 cocos Gram positivos, 10 bacilos Gram negativos e 5 bacilos Gram positivos. O teste de motilidade revelou que apenas 12 dos 67 isolados eram móveis e no teste respiratório observou-se que 14 eram anaeróbios estritos. Os zimogramas demonstraram que 14 isolados são celulolíticos e 53 são xilanolíticos. Pelos kits comerciais de identificação microbiana, das 67 linhagens bacterianas isoladas, 49,3% foram identificadas no nível de espécie com identidade aceitável (15,15%) ou boa identificação (34,15%), enquanto que 50,7% linhagens não foram identificadas pela técnica utilizada. Os isolados foram agrupados em biogrupos, de acordo com as semelhanças em seus perfis bioquímicos, e uma ribotipagem foi realizada com até três integrantes de cada biogrupo. A reação só foi possível com os bacilos Gram positivos e negativos. Um integrante de cada ribotipo e até três de cada biogrupo foram selecionados para amplificação a região do DNA codificadora do rRNA 16S e posterior sequenciamento. Após análise das sequências de DNA resultantes, as

espécies *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus* sp., *Pseudobutyrvibrio* sp. e *Lactobacillus vitulinus* foram identificadas entre os isolados. Um dos isolados não obteve identificação satisfatória. Foi possível avaliar que não houve alterações significativas no perfil da comunidade bacteriana frente as diferentes dietas. A comparação entre os resultados dos dois métodos de identificação indicou que os kits bioquímicos utilizados no trabalho não são aconselhados para a identificação de bactérias ruminais. O sequenciamento da região do DNA codificadora do rRNA 16S ainda é a forma de identificação mais segura. A identificação de isolados potencialmente celulolíticos e xilanolíticos como *Selenomonas ruminantium* e *Lactobacillus vitulinus* constitui novas evidências da presença de atividade fibrolítica em indivíduos dessas espécie. Mais estudos devem ser realizados de forma a comprovar a expressão de fitases por essas bactérias. Os resultados obtidos nesse estudo são importantes para a melhor compreensão do ecossistema ruminal e futuramente podem contribuir para o melhoramento da hidrólise de material lignocelulósico na indústria.

ABSTRACT

Ruminants are animals capable of utilizing the fiber contained in vegetables as feed due to the microorganisms present in their digestive tract. The prospection of organisms with potential ability to degrade cellulose and xylan in the rumen microbiota is of great importance in anthropogenic activities and industrial processes. Samples of ruminal content were collected weekly from fistulated bovines for later bacteria isolation by making use of the technique described by Hungate (1966) with modifications by Bryant and Burke (1951). The isolates were evaluated regarding their morphotintorial characteristics by using Gram stain and regarding their motility by inoculation in supplemented SIM media. The isolates energetic metabolism was also evaluated by respiratory test, as well as their enzymatic profile by zymmograms. Once characterized, the isolates were stored in -20°C freezer for molecular identification and later inclusion in the EMBRAPA microorganism collection. A total of 67 isolated were obtained, of which 52 were Gram positive cocci, 10 were Gram negative rods and 5 were Gram positive rods. The motility test revealed that only 12 out of the 67 isolates were motile and in the respiratory test it was possible to observe that 14 bacteria were obligate anaerobes. The zymmograms showed that 14 isolates were potentially cellulolytic and 53 were potentially xylanolytic. The commercial biochemical identification kits revealed that out of the 67 bacteria, 49,3% obtained species identification with acceptable (15,15%) or good identification (34,15%), while 50,7% were not identified by this technique. The isolates were grouped in biogroups, according to the similarities in their biochemical profiles, and up to three integrals were chosen for ribotyping. The reaction was only possible with the rods. One member of each ribotype and up to three members of each biogroup were selected for amplification of the DNA region that encodes the 16S rRNA and later sequencing. After analysis of the resulting sequences, the species *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus* sp., *Pseudobutyrvibrio* sp. e *Lactobacillus vitulinus* were identified among the isolates. One of the isolates did not present satisfactory identification. It was possible to evaluate that the two different diets did not cause significant changes in the bacterial community profile. The comparison between both identification methods showed that the biochemical kits utilized during this research should not be used for the identification of ruminal bacteria. The sequencing of the the DNA region that encodes the 16S rRNA is still the safest form of identification. The identification of potentially cellulolytic and xylanolytic isolates as *Selenomonas ruminantium* and *Lactobacillus vitulinus* presents new evidence of the fibrolytic activity in individuals from those species. More studies are needed so as to verify the phytase expression by those bacteria. The results in this study are important for better comprehension of the rumen ecosystem and, in the future, could

contribute to improvements in the industrial hydrolysis of lignocellulosic material.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos microrganismos ruminais recuperados que apresentaram atividade celulolítica ou xilanolítica, de acordo com a dieta do animal hospedeiro.	36
Figura 2. Zimogramas com resultados positivos para celulase na amostra 44.	37
Figura 3. Distribuição dos microrganismos ruminais recuperados que apresentaram atividade celulolítica ou xilanolítica, de acordo com suas características morfotintoriais e a dieta do animal hospedeiro.	38
Figura 4: Distribuição dos microrganismos ruminais recuperados que apresentaram atividade celulolítica ou xilanolítica, de acordo com seu tipo de metabolismo energético considerando-se a presença de oxigênio no ambiente e a dieta do animal hospedeiro.	39
Figura 5: Biogrupos formados a partir de agrupamento dos resultados obtidos no kit comercial BBL Crystal GP ID.	41
Figura 5 (continuação): Biogrupos formados a partir de agrupamento dos resultados obtidos no kit comercial BBL Crystal GP ID.	42
Figura 6: Biogrupos formados a partir de agrupamento dos resultados obtidos no kit comercial API 20A (bioMérieux).	43
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação da região do DNA bacteriano codificadora do rRNA 16S.	45
Figura 8: Comparação da distribuição entre as espécies bacterianas celulolíticas e xilanolíticas isoladas do conteúdo ruminal dos bovinos mantidos sob diferentes regimes dietéticos.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das bactérias predominantes no rúmem.	23
Tabela 2. Identificação bioquímica pela utilização de kits semi-automatizados comerciais dos microrganismos ruminais recuperados de animais que receberam silagem de milho acrescida de glicerina bruta que apresentaram atividade celulolítica ou xilanolítica.	40
Tabela 3. Identificação bioquímica pela utilização de kits semi-automatizados comerciais dos microrganismos ruminais recuperados de animais que receberam uma dieta rica em fibras que apresentaram atividade celulolítica ou xilanolítica.	40
Tabela 4: Biogrupos encontrados após a ribotipagem dos bacilos isolados de ambas as dietas.	44
Tabela 5: Resultado do sequenciamento das 39 amostras selecionadas dentre os biogrupos formados.	46
Tabela 6: Comparação entre a identificação bioquímica e a identificação molecular dos isolados de animais que receberam dieta rica em fibras.	47
Tabela 7: Comparação entre a identificação bioquímica e identificação molecular dos isolados de animais que receberam dieta composta por silagem de milho acrescida de glicerina bruta.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV – Ácidos Graxos Voláteis

BEC – “Bacterial Wpimural Community” ou Comunidade Epimural Bacteriana.

BHI – “Brain Heart Infusion” ou Infusão de Coração e Cérebro

BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool” ou Ferramenta de Procura de Alinhamento Local Básico

BTL – “Biomass-to-Liquids” ou Biomassa-para-Líquidos.

CMC – Carboximetilcelulose

DNA – “Desoxyribonucleic Acid” ou Ácido Desoxirribonucleico

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

LAB – “Liquid-Associated Bacteria” ou Bactérias Associadas ao Líquido

M - Molar

MG – Minas Gerais

°C – Grau Centígrado

PCR – “Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase

rRNA – “Ribosomal Ribonucleic Acid” ou Ácido Ribonucleico Ribossômico

SAB – “Solid-Adherent Bacteria” ou Bactérias Aderidas a Fase Sólida

SIM – “Sulfide Indole Motility” ou Sulfeto Indol Motilidade

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Diversidade bacteriana e metabolismo de fibras vegetais	16
2.1.1 Microrganismos associados ao rúmem	18
2.1.1.1 Caracterização das bactérias ruminais	21
2.2 Lignocelulose	23
2.3 Aproveitamento biotecnológico do metabolismo bacteriano celulolítico e xilanolítico	24
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Animais experimentais	29
4.2 Isolamento e cultivo dos microrganismos	29
4.3 Avaliação da atividade celulolítica e xilanolítica	30
4.4 Caracterização bioquímico-fisiológica	31
4.5 Identificação microbiana pela utilização de kits comerciais	32
4.6 Identificação molecular das espécies isoladas	32
5 RESULTADOS	34
5.1 Caracterização morfo-tintorial dos microrganismos isolados celulolíticos ou xilanolíticos	35
5.2 Caracterização do perfil energético microbiano	38
5.3 Caracterização fisiológica e identificação microbiana	37
6 DISCUSSÃO	47
6.1 Caracterização fisiológica dos isolados	47
6.2 Identificação bioquímica	49
6.3 Identificação molecular	51
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
8 CONCLUSÕES	57
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO A	68
ANEXO B	72

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A lignocelulose, composta principalmente por celulose, hemicelulose (xilanas) e lignina, é o maior componente da biomassa vegetal, e constitui em torno de metade da matéria produzida pela fotossíntese. Essa substância representa, de acordo com a literatura, o recurso orgânico renovável mais abundante no solo. Neste contexto, a biomassa lignocelulósica descartada derivada da agricultura, silvicultura e fontes municipais torna-se uma matéria prima com grande potencial de reciclagem, podendo ser utilizada, por exemplo, como substrato na síntese de bioprodutos de grande valor econômico. O fator limitante do seu uso, no entanto, é a realização de uma hidrólise apropriada, especialmente em seus estágios iniciais, além do alto custo de produção das enzimas que participam do processo.

Atualmente são conhecidas diversas espécies de microrganismos fibrolíticos como *Clostridium thermocellum*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptomyces aureofaciens* e *Fibrobacter succinogenes*, porém a maior parte da produção industrial de celulasas e xilanas é realizada com a utilização de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Apesar de tamanha diversidade, as enzimas disponíveis no mercado ainda não apresentam grande eficiência e os custos associados ao processo ainda são altos, o que justifica a necessidade da continuidade de estudos que tenham como objetivo a prospecção de novas espécies de microrganismos capazes de hidrolisar a fibra vegetal ou, ainda, o melhoramento de tecnologias associadas aos processos biológicos já descritos.

O rúmen abriga uma grande diversidade de microrganismos que executam vias metabólicas associadas à degradação da fibra vegetal. As bactérias e fungos produzem várias enzimas fibrolíticas altamente ativas, enquanto que os protozoários possuem um papel menor no processo. Apesar de os fungos do rúmen apresentarem uma capacidade superior de penetração na parede celular vegetal e solubilização da lignina, sua atividade fibrolítica não é tão expressiva quanto a das bactérias devido a menor biomassa e

metabolismo mais lento. Desta forma, as bactérias ruminais são responsáveis pela maior parte da degradação de matéria vegetal no rúmen. Este ainda é um ecossistema pouco explorado e compreendido, o que torna os animais herbívoros potenciais detentores de novas espécies de microrganismos capazes de degradação da parede celular lignocelulósica.

A bioprospecção é a procura sistemática por novas fontes de compostos, genes, proteínas, microrganismos e outros produtos que possuem potencial econômico e podem ser encontrados na biodiversidade. Dentre os diferentes isolados obtidos, populações bacterianas específicas podem ser selecionadas com base em uma característica de interesse específica. Estima-se que menos de 1% dos microrganismos existentes foram cultivados e caracterizados até hoje, e portanto novas espécies obtidas de ambientes pouco estudados podem trazer outras perspectivas de genes e enzimas

Assim, considerando-se o rúmen como ecossistema ainda não totalmente explorado principalmente em relação à diversidade de microrganismos residentes com capacidade de degradação de fibras vegetais, o objetivo deste trabalho foi a prospecção de bactérias com potencial celulolítico e xilanolítico oriundas do rúmen de bovinos alimentados com dietas ricas em fibra vegetal e com silagem de milho acrescida de glicerina bruta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIVERSIDADE BACTERIANA E METABOLISMO DE FIBRAS VEGETAIS

Os microrganismos, em especial as bactérias, estão presentes em quase todos os *habitats* explorados pelo homem, cumprindo um importante papel na manutenção do equilíbrio ecológico. Constituem a base da cadeia alimentar e auxiliam nos ciclos biogeoquímicos, isto é, na decomposição de matéria orgânica e reciclagem de elementos químicos como o carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo, os convertendo em formas utilizáveis por animais e plantas (RECHE & FIUZA, 2005; FAGUNDES et al., 2012).

A diversidade metabólica bacteriana possibilita a utilização de vários substratos, sendo esta uma das principais razões do sucesso adaptativo do grupo. Todo composto orgânico natural está sujeito a degradação por uma ou mais espécies, e a velocidade com que esse processo ocorre está diretamente ligada a complexidade do composto (HURST et al., 2007). Devido a essa característica, diversas espécies de bactérias têm sido utilizadas na indústria para fins variados, como por exemplo, no tratamento de esgoto, onde a matéria orgânica é convertida em dióxido de carbono, nitratos, fosfatos, sulfatos, amônia, metano e sulfeto de hidrogênio (WU et al., 2012). Os procaríotos também são muito utilizados biotecnologicamente em processos de biolixiviação e controle de algumas pragas agrícolas, uma vez que, quando comparadas as soluções tecnológicas disponíveis tradicionalmente, constituem alternativas baratas, eficazes e não prejudiciais ao meio ambiente (AGUIRRE et al., 2007; SILVA et al., 2012).

Dentre os substratos utilizados pelas bactérias, a lignocelulose destaca-se por sua abundância e dificuldade de degradação. Ela é o maior componente da biomassa vegetal, sendo constituída por celulose, hemicelulose e lignina (PÉREZ et al., 2002). Os produtos da sua hidrólise tem grande importância na indústria de papel e celulose, de alimentos, energética e têxtil, porém ainda há barreiras tecnológicas que dificultam a sua utilização (MELO., 2010).

Microrganismos têm sido empregados na produção de enzimas hidrolíticas com a finalidade de aumentar o aproveitamento dessa matéria prima, porém uma das maiores barreiras tecnológicas de sua utilização em processos industriais é o alto custo das enzimas utilizadas para a hidrólise e sua baixa eficiência (GREER, 2005; WINTERS, 2007; WYMAN, 2007). Sendo assim, há necessidade de descoberta de novas espécies de microrganismos capazes de hidrolisar a fibra vegetal ou o melhoramento das enzimas já existentes (MARQUÉZ et al., 2010). Para que a lignocelulose seja utilizada, são necessários tratamentos que liberam seus açúcares monoméricos, para que então passem por fermentação biológica. Os principais passos da produção são:

1. Pré tratamento (por processos físicos ou químicos) que libera as hexoses e pentoses da hemicelulose.
2. Tratamento enzimático (ou hidrólise química) que libera a glicose da celulose (ZALDIVAR et al, 2001).

No entanto, a dificuldade em se superar a resistência natural das plantas a quebra de seus açúcares por fontes biológicas tem tornado o processo muito caro para que seja economicamente viável (WYMAN, 2007). A presença de lignina dificulta ainda mais o processo, uma vez que ela forma uma barreira em torno das fibras de celulose e ainda possui afinidade por uma boa porção das celulasas, se ligando a elas e impedindo a sua ação (JORGENSEN et al., 2007).

Os ruminantes são alguns dos poucos animais capazes de digerir a fibra vegetal e utilizá-la como fonte energética devido a sua relação simbiótica com os microrganismos presentes no rúmen (WANG et al., 2012). Acredita-se que o curto período de tempo disponível para a execução dos diversos processos fermentativos e hidrolíticos impostos pelo trânsito contínuo de biomassa pelo trato digestivo, o ambiente anaeróbio e as baixas quantidades de enzimas hidrolíticas produzidas criaram uma pressão seletiva que transformou os microrganismos ruminais nos biorreatores consumidores de material

lignocelulósico mais eficientes e naturais existentes (KOIKE & KOBAYASHI, 2009). Nesse contexto, se insere a bioprospecção, que consiste na análise direcionada de material biológico que tem como objetivo encontrar novos produtos, e atualmente envolve a aplicação de tecnologias avançadas para desenvolver cosméticos, fragrâncias, compostos farmacêuticos, agroquímicos e enzimas industriais (ARTUSO, 2002). Eventualmente, esses produtos podem ser utilizados em processos industriais ou no desenvolvimento de novos fármacos, constituindo ganho tecnológico e econômico.

2.1.1 MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO RÚMEM

Apesar da disponibilidade de dados sobre a taxonomia, ecologia e fisiologia dos microrganismos ruminais, em especial as bactérias, a microbiota do rúmen, por ser um ambiente complexo, ainda necessita de muitos estudos para que seu ecossistema possa ser melhor compreendido (KOBAYASHI, 2006).

Os microrganismos do rúmen são, em grande parte, termófilos com temperatura ótima entre 39° e 40° C, adaptados para sobrevivência em ambiente de anaerobiose, com uma variação de pH entre 5.5 e 7.0, na presença de concentrações moderadas de produtos de fermentação. Esses microrganismos obtêm nutrientes a partir do alimento ingerido pelo ruminante. Condições físico-químicas relativamente estáveis são proporcionadas pelo fluxo contínuo de alimento e remoção de produtos de fermentação e resíduos de alimentos no processo de alimentação dos animais, o que resulta no desenvolvimento de uma densidade populacional de até 10^{10} /mL (HUNGATE, 1966).

A microbiota ruminal é responsável por parte importante da digestão do alimento ingerido pelos ruminantes. Processos como a degradação da celulose, do amido, de proteínas e outros ácidos orgânicos, assim como a fermentação de açúcares, ocorrem devido a atividade microbiana. Os produtos

dessa atividade são ácidos graxos voláteis (AGV), dióxido de carbono, metano, amônia e proteínas bacterianas (WEIMER, 1996; JAMI & MIZRAHI, 2012).

Ainda, pouco se sabe sobre a ecologia e dinâmica de distribuição das bactérias ruminais em seu ambiente. É bem estabelecido que o rúmen abriga populações microbianas moduladas tanto pelo conteúdo quanto pela anatomia na parede do rúmen (KONG et al., 2011). De acordo com Czerkawski (1986), é possível considerar que os procariotos presentes no conteúdo ruminal formam um sistema heterogêneo dividido em três grandes compartimentos:

- Compartimento I, onde estão situadas as LAB (*liquid-associated bacteria* ou Bactérias associadas ao líquido), que flutuam livremente na fase líquida do conteúdo ruminal.
- Compartimento II, correspondente a uma mistura entre as LAB associadas à fase sólida e as SAB (*solid-adherent bacteria* ou bactérias aderidas a fase sólida) que estão fracamente ligadas a matéria sólida do rúmen e podem ser facilmente retiradas por lavagem do material.
- Compartimento III, onde podem ser encontradas as SAB que não podem ser retiradas por lavagem do material.

Em comparação com os outros compartimentos, a população integrante do compartimento III é a mais abundante e diversa, estando relacionada a digestão da matéria vegetal no rúmen (LEGAY-CARMIER e BAUCHART, 1989).

A população bacteriana ligada ao epitélio ruminal, também conhecida como BEC (*bacterial epimural community* ou comunidade epimural bacteriana), representa menos de 1% da biomassa microbiana total do rúmen (CZERKAWSKI, 1969), é a menos estudada e sua contribuição para o processo fermentativo do órgão é mínima (SADET et al., 2007). Apesar disso, ela pode ser considerada responsável pela hidrólise da uréia sistêmica, e conseqüentemente participa do metabolismo de nitrogênio do hospedeiro (MCCOWAN et al., 1979). Também são atribuídas a BEC a reciclagem do

tecido do rúmem e a retirada do oxigênio que difunde pela parede do órgão (CHENG et al., 1979).

A grande diversidade microbiana presente no rúmem resultou na presença de microrganismos mais especializados, capazes de utilizar poucos nutrientes, e microrganismos menos exigentes, que conseguem energia a partir de uma gama mais ampla de substratos. A microbiota ruminal é composta por fungos, bactérias, archaea e protozoários, porém as bactérias são as mais abundantes e diversas, compondo cerca de 95% da população total (HUNGATE, 1966; KOBAYASHI, 2006; BRULC et al., 2009).

Já em 1966 Robert Hungate identificou espécies bacterianas ruminais amilolíticas como *Streptococcus bovis*, *Bacteroides amylophilus* e *Bacteroides ruminicola*, e também celulolíticas como *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*. Dentre as degradadoras de hemicelulose também foram identificadas algumas linhagens de *Eubacterium*, *Bacteroides amylogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, entre outras, assim como espécies que somente fermentam açúcares, como é o caso de *Borrelia* e *Lactobacillus*. Vários estudos foram realizados ao longo dos anos visando a caracterização e melhor compreensão dessas e de outras espécies, porém há a necessidade de estudos objetivando a identificação e caracterização de novas espécies bacterianas no rúmen (BRULC et al., 2009; MAIA et al., 2010; KIRBY et al., 1997; RAKOTOARIVONINA et al., 2002; SUEN et al., 2011; WETZSTEIN e GOTTSCHALK; 1985).

Em ruminantes, as bactérias têm acesso a uma nutrição relativamente sem modificações e podem, portanto, exibir maior grau de dependência da dieta (HUNGATE, 1966). Apesar de essa dependência ser bem conhecida, a associação de microrganismos específicos com a dieta e produção do animal ainda não foi totalmente esclarecida devido a dificuldades na enumeração de espécies microbianas individuais (WEIMER et al., 1996). Estudos indicam que o fornecimento de dietas ricas em fibras vegetais de fácil digestão (ex: feno, palha de cevada tratada com amônia, grama seca e casca de soja) a ruminantes, pode estimular o crescimento e atividade das populações bacterianas fibrolíticas, potencialmente melhorando a digestão de forragens de menor qualidade (SILVA e ØRSKOV 1988; NGWE et al., 2012; MASUDA et al.,

1998). Além disso, em 2000, Tajima e colaboradores constataram que a abundância relativa das populações bacterianas foi muito alterada quando a dieta mudou de feno para grãos, havendo um decréscimo significativo das populações de *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*. Uma dieta rica em grãos induz a proliferação de bactérias como *Streptococcus bovis*, que facilmente fermenta o amido e produz lactato, um dos maiores causadores de acidose láctica no rúmem (TAJIMA et al., 2000). Além da dieta, diversos estudos apontam que há diferenças substanciais entre a microbiota ruminal de animais da mesma idade que receberam a mesma dieta durante um determinado período (LI et al., 2012; WELKIE et al., 2009; MIN et al., 2006).

2.1.1.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS RUMINAIS

A identificação de bactérias ruminais de forma rápida ainda é um desafio atualmente. Em 1960, Robert Hungate relatou que há bactérias identificáveis no conteúdo ruminal por sua morfologia em microscopia: *Sarcina bakeri* apresenta formação de tétrades com células entre 3 e 4 μm ; *Borrelia* possui morfologia espiroqueta característica; *Selenomonas*, células grandes e crescentes com um tufo de flagelos em um dos lados; *Peptostreptococcus elsdenii*, longas cadeias de cocos grandes; e *Oscillospira guilliermondii*, tricomas grandes e móveis muito similares ao *Caryophanon*. Apesar disso, a morfologia por si só não é um parâmetro conclusivo, uma vez que muitos microrganismos ruminais possuem características morfológicas similares e o pleomorfismo é muito comum (HOBSON e MANN, 1957).

A ausência de produtos metabólicos específicos também torna difícil a identificação bioquímica das bactérias ruminais, sendo esse um dos motivos da ausência de kits de identificação bioquímica automatizados no mercado (Tabela 1) (RUSSELL e RYCHLIK, 2001). O desenvolvimento de técnicas que permitam uma identificação rápida e precisa proporcionariam grande estímulo aos estudos ecológicos. Métodos que utilizam anticorpos e sondas fluorescentes e que envolvem a análise da composição de ácidos graxos da

célula (HOBSON e MANN, 1957; IFKOVITS e RAGHEB, 1968; SCHOFIELD et al., 1996) foram testados, porém o mais utilizado atualmente é o sequenciamento da região codificadora do rRNA 16S no genoma bacteriano. As diferenças nas sequências de nucleotídeos serve não somente para relacionar as bactérias, mas também constitui uma forma confiável de se determinar a espécie de microrganismos provenientes de amostras ambientais (STAHL et al., 1988). Técnicas moleculares baseadas no RNA ribossômico 16S são frequentemente utilizadas tanto em estudos quantitativos (TAJIMA et al., 2000; FERNANDO et al., 2010) quanto qualitativos (KOCHERGINSKAYA et al., 2001; REGENSBOGENOVA et al., 2004; TAJIMA et al., 1999).

Tabela 1. Características das bactérias predominantes no rúmem.

Espécie	Substratos preferenciais	Produto de fermentação
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	CL	S, F, A
<i>Ruminococcus albus</i>	CL, HC	A, F, E, H ₂
<i>Ruminococcus bavefaciens</i>	CL, HC	S, F, A, H ₂
<i>Eubacterium ruminantium</i>	HC, DX, AÇ	A, F, B, L
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	AM	S, F, A, E
<i>Streptococcus bovis</i>	AM, AÇ	L, A, F, E
<i>Succinomonas amylolytica</i>	AM	S, A, P
<i>Prevotella ruminicola, albensis, brevis, e bryantii</i>	AM, XI, AÇ, PC	S, A, F, P
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	AM, CL, HC, PC, AÇ	B, F, A, H ₂
<i>Selenomonas ruminantium</i>	AM, DX, AÇ, L, S	L, A, P, B, F, H ₂
<i>Megasphaera elsdenii</i>	L, AÇ	P, A, B, AVG, H ₂
<i>Lachnospira multiparus</i>	PC, AÇ	L, A, F, H ₂
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	PC, DX, AÇ	S, A, F, L
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	GL, AÇ	A, S, P
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	AA	AVG, A
<i>Clostridium aminophilum</i>	AA	A, B
<i>Clostridium sticklandii</i>	AA	A, AVG, B, P
<i>Wolinella succinogenes</i>	AO, H ₂ , F	S
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	H ₂ , CO ₂ , F	CH ₄

CL, celulose; HC, hemicelulose; DX, dextrinas; AM, amido; PC, pectina; XI, xilanas; L, lactato; S, succinato; GL, glicerol; AA, aminoácidos; AO, ácidos orgânicos; H₂, hidrogênio; F, formato; CO₂, dióxido de carbono; A, acetato; E, etanol; B, butirato; P, propionato; AVG, ácidos graxos voláteis de cadeias ramificadas; e CH₄, metano. Adaptado de RUSSELL e RYCHLIK, 2001.

2.2 LIGNOCELULOSE

A lignocelulose é derivada da madeira, grama, resíduos da agricultura e silvicultura e lixo municipal. É o maior componente da biomassa, constituindo cerca de metade da matéria produzida pela fotossíntese (também denominada fotomassa) e representando o recurso orgânico renovável mais abundante no solo (SÀNCHEZ., 2009). Ela consiste de três tipos de polímeros – celulose (15 – 40%), hemicelulose, em especial as xilanas (30 – 40%) e lignina (20%) – que estão fortemente entrelaçados e quimicamente ligados por forças não covalentes e por ligações covalentes cruzadas (PÉREZ et al., 2002).

A celulose ($C_6H_{10}O_5$), componente mais abundante da biomassa das plantas, é encontrada na natureza quase exclusivamente nas paredes celulares vegetais, em uma hetero-matriz composta por xilana, outras hemiceluloses e lignina, apesar de ser produzida por alguns animais (tunicados, por exemplo) e bactérias (LYND et al., 2005; CARERE et al., 2008). É rara a ocorrência em sua forma pura, como nos fios de semente de algodão, uma vez que está quase sempre associada com outros componentes que constituem a complexa matriz da parede celular vegetal (SANDGREN et al., 2005). Sendo assim o substrato que os microrganismos celulolíticos irão de fato encontrar apresenta uma grande variação em sua composição e complexidade, abrangendo desde materiais de paredes celulares primárias facilmente degradados a madeira densamente lignificada (SANDGREN et al., 2005). A complexidade estrutural variada e a dificuldade de se trabalhar com um substrato insolúvel levou a uma ampla utilização de um éter de celulose altamente solúvel, a carboximetilcelulose (CMC), como um substrato para estudos de produção de celulasas (LYND et al., 2005).

A hemicelulose é um polímero de carboidrato complexo que constitui de 25 a 30% do peso total da madeira seca. A principal diferença entre a celulose e a hemicelulose é a presença de ramos com cadeias laterais curtas na hemicelulose consistindo de diferentes açúcares enquanto que a celulose é

composta por oligômeros facilmente hidrolisáveis (SÁNCHEZ, 2009). As hemiceluloses mais relevantes são as xilanas e as gliconamans, sendo as xilanas as mais abundantes (GÍRIO et al., 2010). A estrutura e composição das xilanas varia de acordo com a fonte da biomassa (GÍRIO et al., 2010; MARAIS, 2008).

A lignina está ligada a hemicelulose e a celulose, formando uma barreira física impenetrável na parede celular vegetal. Ela confere suporte estrutural, impermeabilidade, e resistência contra ataques por microrganismos (SANCHEZ, 2009).

2.3 APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DO METABOLISMO BACTERIANO CELULOLÍTICO E XILANOLÍTICO

Atualmente as celulasas e xilanasas, juntamente com as pectinases, são responsáveis por cerca de 20% do mercado de enzimas. Sua utilização permite que a degradação do material lignocelulósico, importante em diversos processos industriais, seja uma atividade de baixo risco ambiental e de alta especificidade hidrolítica (ALMEIDA et al., 2011). Elas possuem diversas aplicações na biotecnologia de alimentos, produção de biocombustíveis de segunda geração, indústria têxtil e de detergentes, produção de rações animais e reciclagem de papel (BHAT, 2000; POLIZELI et al., 2005).

Os biocombustíveis têm sido indicados como uma alternativa atraente a matriz energética atual, diminuindo as emissões de gases do efeito estufa e proporcionando um desenvolvimento mais sustentável (GIAROLA et al., 2012). Parte do entusiasmo vem do fato de que, a primeira vista, eles parecem ser carbono neutros, renováveis e as plantas utilizadas como matéria prima podem ser cultivadas em diferentes ambientes (THE ROYAL SOCIETY, 2008).

O foco primário de apoio de muitos governos tem sido os biocombustíveis de segunda geração derivados de lignocelulose, também conhecidos como biocombustíveis BTL (*Biomass-to-Liquids* ou Biomassa-para-

Líquidos) uma vez que ela é o polímero mais abundante no planeta e não pode ser digerida por humanos, não competindo diretamente com a oferta de alimento (STEPHEN et al., 2012). Os principais passos da produção são (i) um pré tratamento (por processos físicos ou químicos) que libera as hexoses e pentoses da hemicelulose e (ii) um tratamento enzimático (ou hidrólise química) que libera a glicose da celulose (ZALDIVAR et al., 2001). No entanto, devido a dificuldade em se superar a resistência natural das plantas a quebra de seus açúcares por fontes biológicas tem tornado o processo muito caro para que seja economicamente viável (WYMAN, 2007). Uma das maiores barreiras tecnológicas para a produção de etanol de segunda geração é o alto custo das enzimas utilizadas para a hidrólise da lignocelulose em glicose e sua baixa eficiência (GREER, 2005; WINTERS, 2007; WYMAN, 2007).

Além disso, o uso de celulasas e xilanases na reciclagem de papel tem facilitado o processo e diminuído seu impacto ambiental. A presença de tinta nos papéis utilizados para a reciclagem requer o uso de surfactantes para a sua remoção, seguido de altas temperaturas para agregamento e dispersão vigorosa para a diminuição de tamanho, constituindo processos são dispendiosos e que consomem grande quantidade de energia. A utilização de enzimas libera as partículas de tinta e portanto, facilita os passos seguintes (PÉREZ et al., 2002).

As indústrias de papel e polpa de celulose utilizam grandes quantidades de compostos de cloro para tornar a polpa mais branca, resultando na produção de dioxinas tóxicas nos efluentes. O pré-clareamento da polpa com xilanases pode reduzir o consumo de cloro entre 20 – 30% sem que a cor final da polpa seja afetada. Xilanases livres de celulasas e ativas em altas temperaturas e ambientes alcalinos são preferidas nesse processo (NAGAR et al., 2012).

Na tecnologia de alimentos e rações animais, o uso de xilanases é datado da década de 70, na panificação. Juntamente com a α -amylase, glicose oxidase e proteases, as xilanases promovem a quebra da hemicelulose presente na farinha de trigo, auxiliando na redistribuição de água na massa, aumentando seu volume e tornando-a mais macia e susceptível a sova (POLIZELI et al., 2005; GRUPPEN et al., 1993).

A utilização destas enzimas também é possível na extração de azeite de oliva. A mistura comercial de enzimas Olivex, uma preparação de pectinase com baixos níveis de celulases e hemicelulases, foi a primeira a ser utilizada para o melhoramento do processo. A utilização de misturas de enzimas permite um aumento nos anti oxidantes presentes no produto e redução na indução de rancidez. Além disso, ela proporciona um aumento na extração (até 2 quilos de óleo a cada 100 quilos de azeitonas) sob condições de processamento a frio, baixo conteúdo de óleo na água resultante do processo e melhoramento geral da eficiência da planta (BHAT, 2000). Da mesma forma, essas enzimas poderiam desempenhar um papel importante na extração de óleos de outras plantas.

Na indústria de rações animais, celulases, xilanases e outras enzimas são empregadas na fabricação devido a presença da arabinoxilana da parede celular dos grãos utilizados. Ela aumenta a viscosidade da ração, interferindo na mobilidade e diminuindo a absorção de nutrientes (POLIZELI et al., 2005). A adição de enzimas diminui a viscosidade e aumenta a digestibilidade do produto nas partes iniciais do trato digestivo, resultando em melhor absorção de energia. Além disso, acredita-se que esse tipo de dieta seja responsável pela redução de resíduos indesejáveis de fósforo, nitrogênio, cobre e zinco nas excretas, o que poderia diminuir os impactos ambientais causados pela criação de animais (POLIZELI et al., 2005).

Entre outros processos biotecnológicos, as celulases são utilizadas, ainda, no processamento de tecidos como agentes de modificação da superfície das fibras. As enzimas possuem diversos efeitos em tecidos com base em celulose, como a viscose, o acetato de celulose e o liocel. Na viscose e no liocel são utilizadas celulases para alterar a maleabilidade e drapeabilidade, além de removerem a penugem da superfície. Elas ainda, elas diminuem a tendência da viscose de soltar fios e reduzem a fibrilação do liocel e do acetato de celulose (DURÁN e DURÁN, 2000). Há relatos (SREENATH et al., 1996) de que uma mistura de pectinases e xilanases livres de celulases é igualmente eficiente na remoção de fibras superficiais protuberantes.

A indústria têxtil também utiliza as celulases como alternativa ao processo de lavagem de jeans com pedras. O processo tradicional envolve a

remoção da cobertura de amido com amilases e posterior tratamento do produto com pedras pomes em grandes máquinas de lavas. A biolavagem utiliza celulasas para a quebra de pequenas fibras na superfície, diminuindo a aderência da tinta ao jeans e facilitando sua remoção mecânica no ciclo de lavagem. A vantagem da substituição das pedras é um produto final de maior qualidade com menos danos às fibras, maior maciez e absorção de água, além de um aumento de produtividade das máquinas (KUHAD et al., 2011).

Misturas de celulasas capazes de modificar a estrutura das fibrilas de celulose são adicionadas a detergentes com o objetivo de tornar as cores mais vivas, tornar o toque dos tecidos mais macios e remover a sujeira de tecidos com algodão em sua composição. A maior parte desses tecidos, após lavagens sucessivas perde suas características originais e a ação das celulasas pode restaurar suas propriedades tornando-o mais macio, além de remover partículas de sujeira presas na malha de microfibrilas (BHAT, 2000).

Do exposto, considerando-se: (i) a importância das enzimas microbianas na biotecnologia; (ii) a prospecção de espécies bacterianas celulolíticas e xilanolíticas ruminais; (iii) a parceria e a integração entre o Laboratório de Microbiologia do Rúmen da EMBRAPA Gado de Leite de Juiz de Fora e o Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/UFJF; é proposto este estudo prospectivo para descrição de espécies bacterianas capazes de degradar da parede celular lignocelulósica associadas ao rúmen de bovinos mantidos em fazenda experimental, sob diferentes regimes dietéticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização, por estudo prospectivo bactérias potencialmente celulolíticas e xilanolíticas a partir de amostras do conteúdo ruminal de bovinos leiteiros mantidos com diferentes dietas na fazenda experimental da EMBRAPA Gado de Leite em Juiz de Fora, MG.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar em meio seletivo quimicamente definido, bactérias ruminais com capacidade de crescimento utilizando-se fibra vegetal como única fonte de carbono em cultivo primário;
- Avaliar a capacidade de degradação de celulose e xilana das bactérias isoladas no cultivo primário;
- Caracterizar as bactérias celulolíticas e xilanolíticas quanto à morfologia e metabolismo após coloração de Gram, motilidade e atmosfera ótima de crescimento;
- Identificar por métodos bioquímicos, as bactérias isoladas pelo uso de kits de identificação microbiana comerciais;
- Identificar, as bactérias isoladas pelo sequenciamento do DNA correspondente à região codificadora do rRNA 16S e pesquisa de similaridade das sequências em bancos de dados disponíveis;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados no estudo dois grupos de bovinos leiteiros fistulados da raça Holandês x Zebu mantidos nas instalações do Campo Experimental José Henrique Bruschi (Coronel Pacheco – MG) da Embrapa Gado de Leite. Os animais foram mantidos e manuseados de acordo com os preceitos éticos da experimentação animal e os procedimentos encontram-se aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite, pelo parecer nº 10/2011. Um dos grupos recebeu dieta rica em fibras vegetais (silagem de cana de açúcar, pastagem e capim elefante) e outro com silagem de milho acrescida de glicerina bruta.

As coletas foram realizadas semanalmente, entre o período de junho a novembro de 2011, onde era retirado em torno de 1 litro de conteúdo ruminal de forma manual para posterior acondicionamento em garrafas térmicas vazias previamente aquecidas a 39°C e transporte até o Laboratório de Microbiologia do Rúmem da Embrapa Gado de Leite. Todos os animais foram mantidos com suas respectivas dietas por pelo menos uma semana antes das coletas.

4.2 ISOLAMENTO E CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

O isolamento dos microrganismos foi feito de acordo com a metodologia de Hungate (1966) modificada por Bryant e Burkey (1952). Em 34 coletas, garrafas térmicas foram abertas sob fluxo de CO₂ em capela de fluxo laminar e

1mL de líquido foi retirado para diluição até 10^{-4} com auxílio do meio de diluição (Anexo A) descrito por Bryant e Burkey (1952). Uma alíquota de 0,3mL foi inoculada no meio simulador do *habitat* total (Anexo A) descrito por Hungate (1966), após diluição seriada do líquido ruminal até 10^{-10} , e o sistema incubado a 39°C por 24 horas. As amostras derivadas de animais que receberam silagem de milho acrescida de glicerina foram inoculadas em *roll tubes* (Anexo A) contendo meio simulador do habitat total sólido nas concentrações 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10} e incubadas a 39°C por 24 horas. As amostras provenientes de animais com dieta rica em fibras receberam o mesmo tratamento, porém foram inoculadas em *roll tubes* contendo o meio seletivo para bactérias celulolíticas (Anexo A) descrito por Hungate (1950), com modificações. Colônias isoladas dos *roll tubes* contendo meio simulador do habitat total foram selecionadas para inoculação em placas de Petri com o mesmo meio para obtenção de cultura pura. O mesmo procedimento foi realizado para colônias isoladas dos *roll tubes* contendo meio seletivo para bactérias celulolíticas. Após incubação e crescimento a 39°C por 24 horas, os isolados foram analisados quanto a pureza e morfologia após coloração pelo método de Gram.

As culturas puras foram transferidas para o meio simulador de habitat total para posterior congelamento em *freezer* a -20°C e inclusão no banco de microrganismos da Embrapa Gado de Leite.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA E XILANOLÍTICA

A capacidade bacteriana de degradação das fibras vegetais do tipo celulolítica e xilanolítica foi verificada com o auxílio de zimogramas (TEATHER & WOOD, 1981). Meios sólidos NaPi 50mM, pH 7 + carboximetil celulose (CMC) 0,5% ou xilana 1% (Anexo A) perfurados com uma pipeta de pasteur estéril foram utilizados para os testes. Colônias de 24 horas foram centrifugadas por 10 minutos a 14 000 x g e 100µL do pellet e do sobrenadante foram inoculados nas cavidades de ambos os meios e incubados por 24 horas

a 39°C. Após esse período as placas foram lavadas com água destilada, coradas com solução de vermelho de congo 0,1% por 10 minutos e lavadas novamente com solução de NaCl 1M. Para visualização e aferição dos possíveis halos foram realizadas fotos sob iluminação com ultra-violeta, com o equipamento Eagle Eye (Stratagene). Como controle positivo e negativo foram utilizados, respectivamente, 100µL do *pellet* de uma colônia de 24 horas da bactéria com número de referência C0048 S1.1 pertencente ao banco de microrganismos da Embrapa Gado de Leite e 100 µL de NaPi 50mM, pH 7.

4.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICA

O perfil oxidativo em atmosfera ótima de crescimento foi avaliado pela realização de teste respiratório em placas de BHI Ágar suplementado (Anexo A). Os microrganismos foram inoculados em duplicata dentro de câmara anaeróbia e incubados por 24 horas a 39°C (uma em aerobiose e a outra em anaerobiose). Foram consideradas anaeróbias estritas as bactérias que cresceram somente em ambiente anaeróbio, enquanto que aeróbios anaeróbios facultativos, as bactérias que cresceram em aerobiose e anaerobiose.

A motilidade bacteriana foi avaliada a partir da inoculação dos isolados em meio SIM suplementado (Anexo A), e posterior incubação em atmosfera ideal de crescimento microbiano, como determinado pelo teste respiratório, a 39°C por 24 horas.

4.5 IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA PELA UTILIZAÇÃO DE KITS COMERCIAIS

Kits comerciais semi-automatizados de identificação bioquímica de microrganismos de interesse clínico foram utilizados para a identificação dos isolados. O sistema API 20A (BioMérieux Corporate) foi empregado na identificação das bactérias anaeróbias estritas e o sistema BBL Crystal GP (Becton, Dickinson and Company) foi utilizado na identificação dos cocos Gram positivos anaeróbios facultativos. Todos os kits foram inoculados de acordo com as instruções do fabricante, a partir de culturas dos microrganismos teste de 24h, em meio Columbia Sangue para o sistema BBL Crystal e Ágar Sangue para o sistema API 20A.

4.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES ISOLADAS

O DNA total de todos os 67 isolados foi extraído com o auxílio do kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) a partir do pellet de 1 mL de colônias de 24 horas. A integridade do produto final foi avaliada mediante a eletroforese em gel de agarose 0.8% e o gel foi posteriormente corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV. A concentração e qualidade do DNA foram determinadas com a utilização de um espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000, Thermo Scientific).

Reações de PCR contendo os primers IX (5' - GGTGAAGTCGTAACAAG) e II (5' - TGCCAAGGCATCCACC) descritos por Saruta e colaboradores (1997) foram realizadas com o intuito de se determinar os ribotipos presentes no grupo amostral. As amostras foram desnaturadas por 2 minutos a 94°C, seguido por 22 ciclos de desnaturação por 1 segundo a 94°C, anelamento por 2 segundos a 55°C e extensão por 10 segundos a 72°C

e por fim, um período final de extensão de 4 minutos a 72°C. A visualização desses ribotipos foi realizada a partir de eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, coloração do gel com brometo de etídio e visualização em transiluminador UV. Os isolados foram divididos em grupos (biogrupos) com a maior probabilidade de representarem a mesma espécie de acordo com as semelhanças na ribotipagem e nos perfis bioquímicos obtidos durante a realização dos kits comerciais de identificação.

Em cada um dos grupos formados, 3 amostras foram selecionadas aleatoriamente, totalizando 39 amostras, para realização de PCR com os primers universais EUB338 (5' - ACTCCTACGGGAGGCAGC) e 926R (5' - CCCGTCAATTCMTTGGAGTTT) (AMANN et al., 1990; WATANABE et al., 2001), objetivando a amplificação da região do DNA codificadora do rRNA 16S. As amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento por 1 minuto a 60°C e extensão por 72°C, terminando com uma extensão final por 10 minutos a 72°C. A qualidade dos produtos foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1.2%, coloração do gel com brometo de etídio e visualização em transiluminador UV.

Os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento por eletroforese capilar no aparelho ABI3130 (Applied Biosystems), utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1 na empresa Valid Biotecnologia (Belo Horizonte – MG). As sequências resultantes foram identificadas por similaridade após comparação no banco de dados GenBank (National Institute of Biotechnology Information), com o uso da ferramenta BLAST.

5 RESULTADOS

De 34 coletas (17 de animais com dieta rica em fibras e 16 de animais com dieta de silagem de milho acrescida de glicerina bruta) foram isolados no total, 67 colônias bacterianas nos meios de cultura primários. Destas, 42 colônias vieram dos animais com dieta rica em fibras e 25 vieram dos animais com dieta de silagem de milho acrescida de glicerina.

Dos animais com dieta rica em fibras, apenas 26,19% foram confirmados como potenciais metabolizadores de celulose, enquanto que 73,81% foram confirmados como potenciais metabolizadores de xilana. Dos animais com dieta de silagem de milho acrescida de glicerina, apenas 12% foram confirmados como potenciais metabolizadores de celulose, enquanto que 88% foram confirmados como potenciais metabolizadores de xilana (Figura 1 e 2).

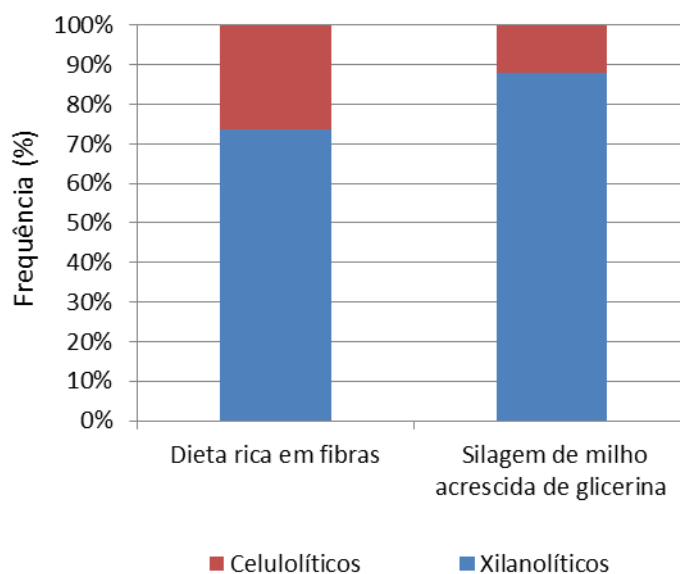


Figura 1. Distribuição dos microrganismos ruminais recuperados que apresentaram atividade celulolítica ou xilanolítica, de acordo com a dieta do animal hospedeiro.

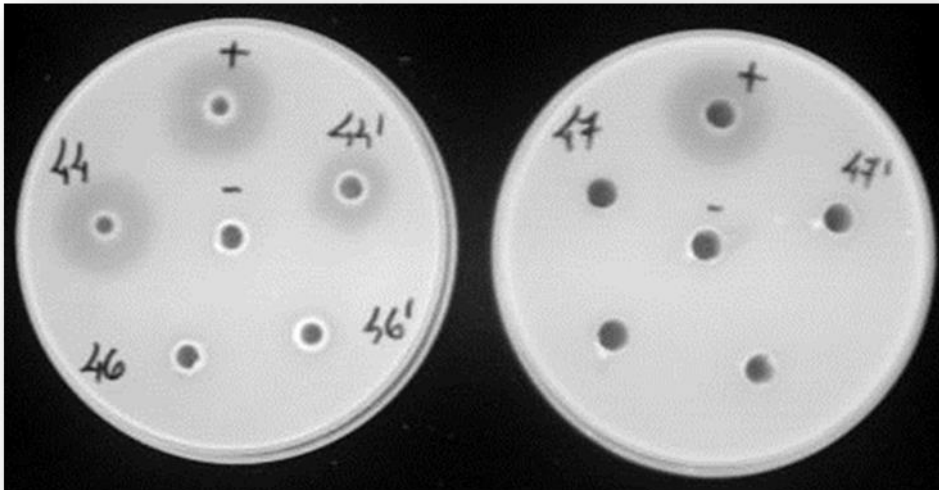


Figura 2. Zimogramas com resultados positivos para celulase na amostra 44. No orifício 44 foi inoculado o pellet da cultura de 24 horas e no orifício 44' foi inoculado o sobrenadante da cultura centrifugada.

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFO-TINTORIAL DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS CELULOLÍTICOS E/OU XILANOLÍTICOS

A coloração de Gram revelou que o perfil morfotintorial dos microrganismos isolados de ambas as comunidades microbianas foi semelhante (Figura 3). Dentre as bactérias isoladas do rúmen de animais que receberam dietas ricas em fibra, 31 eram cocos Gram positivos, 8 eram bacilos Gram negativos e 3 eram bacilos Gram positivos, enquanto que dentre os isolados do rúmen de animais alimentados com silagem acrescida de glicerina, 21 eram cocos Gram positivos, 2 eram bacilos Gram negativos e 2 eram bacilos Gram positivos.

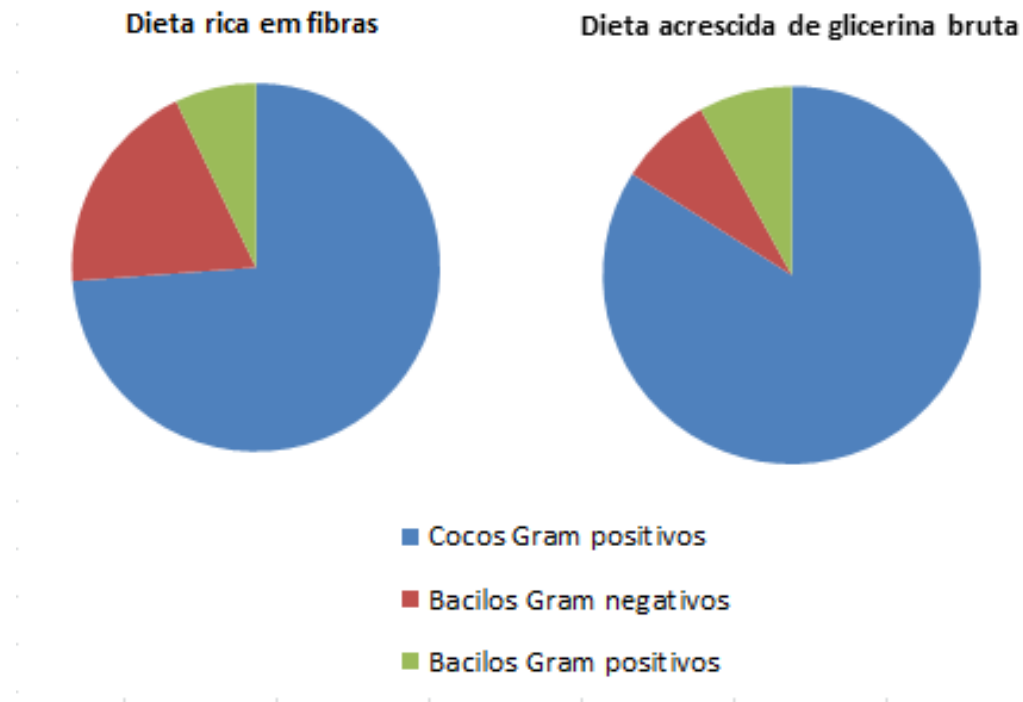


Figura 3. Distribuição dos microrganismos ruminais recuperados que apresentaram atividade celulolítica ou xilanolítica, de acordo com suas características morfotintoriais e a dieta do animal hospedeiro.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ENERGÉTICO MICROBIANO

Dos microrganismos isolados, 14 foram identificados como anaeróbios obrigatórios e 53 como anaeróbios facultativos (Figura 4). Não foram observadas bactérias aeróbias estritas. Um número maior de anaeróbios estritos foi encontrado no rúmem de animais que receberam uma dieta rica em fibras vegetais.

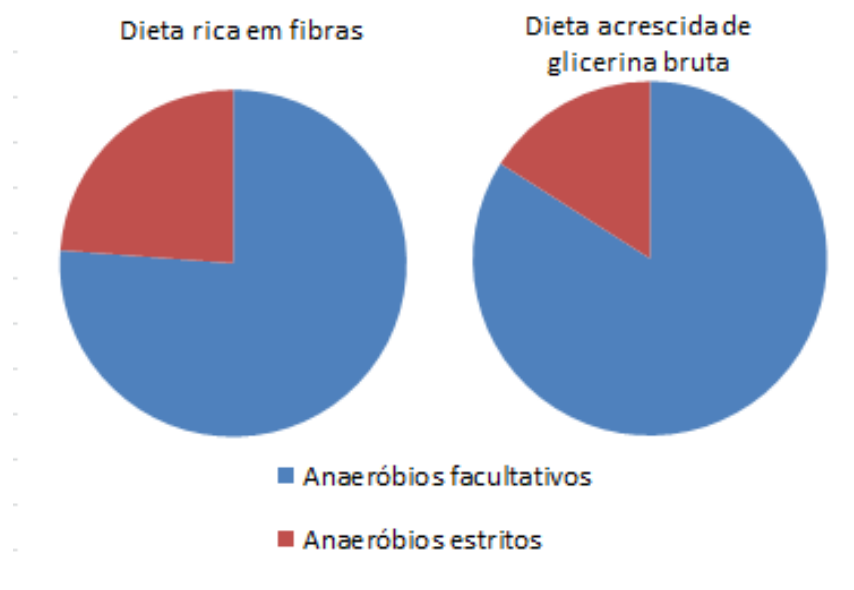


Figura 4: Distribuição dos microrganismos ruminais recuperados que apresentaram atividade celulolítica ou xilanolítica, de acordo com seu tipo de metabolismo energético considerando-se a presença de oxigênio no ambiente e a dieta do animal hospedeiro.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

No teste de motilidade com o meio SIM observou-se que 12 bactérias eram móveis, sendo destas 9 isoladas de animais que receberam dietas ricas em fibra vegetal e 3 de animais que receberam silagem de milho acrescida de glicerina bruta.

Pelos kits comerciais de identificação microbiana, das 67 linhagens bacterianas isoladas, 49,3% foram identificadas ao nível de espécie com identidade aceitável (15,15%) ou boa identificação (34,15%), enquanto que 50,7% linhagens não foram identificadas pela técnica utilizada (tabela 2 e 3). Um total de 7 espécies distintas foi identificado, sendo que *Streptococcus mutans* estava presente somente entre os isolados provenientes de animais com dieta com suplementação de glicerina e *Pediococcus pentosaceus* estava presente somente entre os isolados provenientes de animais com dieta rica em fibras.

O bacilo Gram negativo C14A6 foi identificado como um fermentador forte, porém o teste do nitrato foi negativo, sugerindo que essa bactéria não seria integrante da família *Enterobacteriaceae*. Sendo assim, não foi proposta sua identificação bioquímica pelo uso de kits comerciais.

Tabela 2. Identificação bioquímica pela utilização de kits semi-automatizados comerciais dos microrganismos ruminais recuperados de animais que receberam silagem de milho acrescida de glicerina bruta que apresentaram atividade celulolítica ou xilanolítica.

Amostra	Identificação	Amostra	Identificação	Amostra	Identificação
P119	Sem identificação ^a	P1113	<i>Bifidobacterium</i> spp2 ^b	P2116.3	Sem identificação ^b
P2116.1	Sem identificação ^b	P214	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a	P2117	Sem identificação ^a
P114	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	P2114	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	P2117.2	<i>Streptococcus mutans</i> ^a
P116	Sem identificação ^a	P1116	<i>Lactococcus lactis</i> ^a	P2117.3	Sem identificação ^a
P117	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a	P1117	<i>Streptococcus salivarius</i> ^a	P315	Sem identificação ^a
P411	Sem identificação ^a	P4114	<i>Streptococcus salivarius</i> ^a	P112	Sem identificação ^a
P413	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	P4115	Sem identificação ^a	P4117	<i>Streptococcus salivarius</i> ^a
P4111	Sem identificação ^a	P2113.2	Sem identificação ^a		
P4113	Sem identificação ^b	P2115.2	Sem identificação ^a		

^a Sistema BBL Crystal GP ID; ^b Sistema API 20A

Tabela 3. Identificação bioquímica pela utilização de kits semi-automatizados comerciais dos microrganismos ruminais recuperados de animais que receberam uma dieta rica em fibras que apresentaram atividade celulolítica ou xilanolítica.

Amostra	Identificação	Amostra	Identificação	Amostra	Identificação
T1C2	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	C17A5	<i>Bifidobacterium</i> spp2 ^b	T3A2	Sem identificação ^a
T2A1.1	<i>Lactococcus lactis</i> ^a	C115	Sem identificação ^b	C15A3	Sem identificação ^a
T2A2	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	C118	Sem identificação ^b	C15A2	Sem identificação ^a
T2A6	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	T3A2	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a	C15A8	Sem identificação ^b
T3A3	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	C318	Sem identificação ^a	C15A5	Sem identificação ^b
C10A12	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a	C312	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a	C4I9.1	Sem identificação ^b
C10A11	Sem identificação ^a	C313	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a	C5I1	<i>Bifidobacterium</i> spp2 ^b
C11A2	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	C315	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a	C5I2	<i>Bifidobacterium</i> spp2 ^b
C11A6	Sem identificação ^a	C4I2	Sem identificação ^b	C4I10	Sem identificação ^a
C11A3	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	C4I3	Sem identificação ^a	C14A2	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a
C13A9	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	C4I4	Sem identificação ^a	C14A8	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a
C13A1	Sem identificação ^a	C4I5	<i>Lactococcus lactis</i> ^a	C4I11	Sem identificação ^a
C13A3	<i>Streptococcus bovis</i> ^a	C4I6	Sem identificação ^a	C4I8.1	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a
C13A7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ^a	C5I8	Sem identificação ^b	C14A4	Sem identificação ^a

^a Sistema BBL Crystal GP ID; ^b Sistema API 20A

Considerando-se os perfis bioquímicos demonstrados pelos microrganismos isolados nas galerias dos kits utilizados em função das reações propostas pelos fabricantes, foi realizado o agrupamento destes microrganismos em biotipos semelhantes. Esse agrupamento mostrou a ocorrência de 26 biogrupos, e a partir deles foi possível selecionar 30 isolados bacterianos para a identificação molecular, considerando-se quando possível, o sequenciamento de até 3 representantes por grupo (Figura 5 e 6).

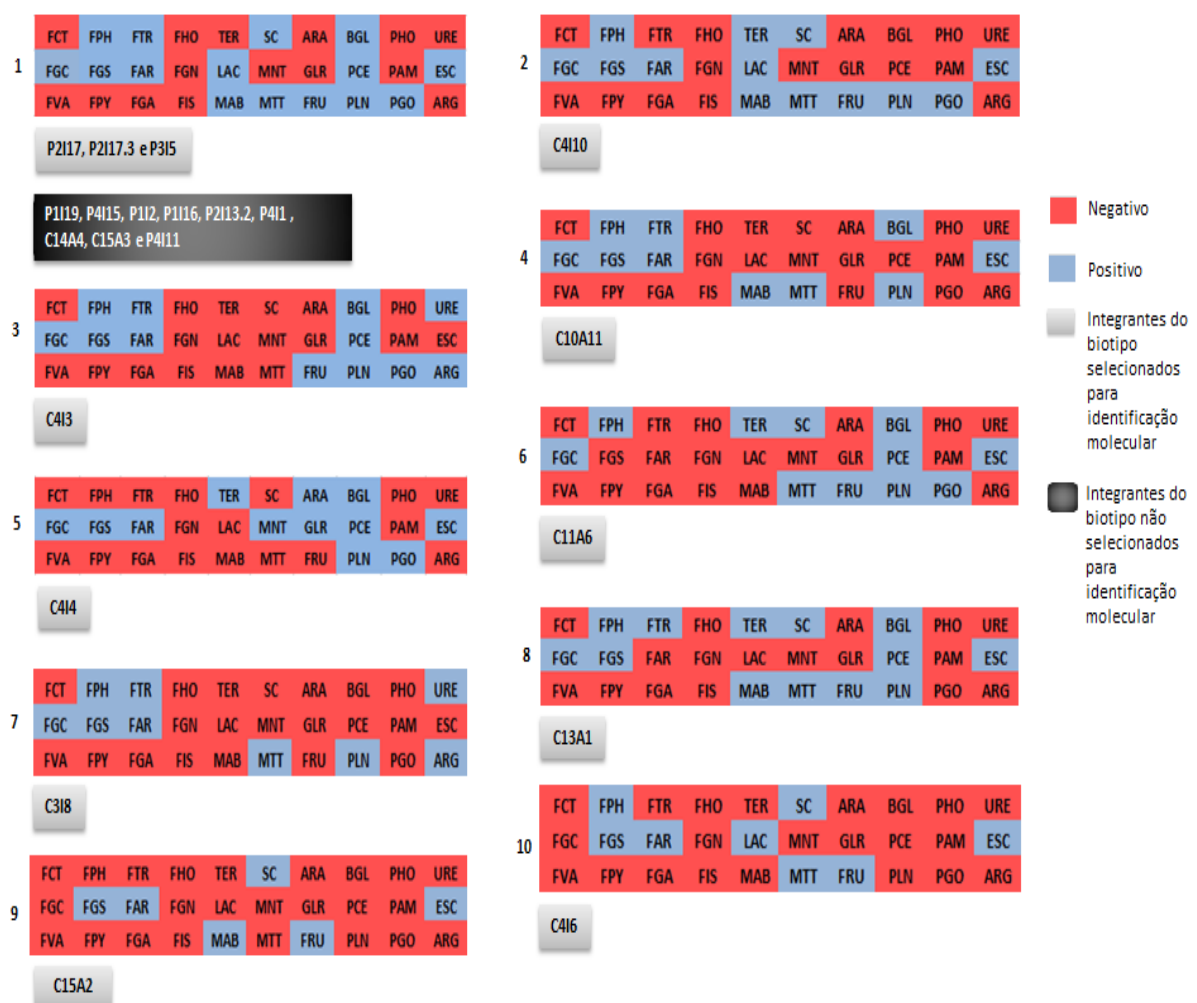


Figura 5: Biogrupos formados a partir de agrupamento dos resultados obtidos no kit comercial BBL Crystal GP ID. As abreviações significam: FCT: controle negativo; FGC: glucósido; FVA: valina; FPH: fenilalanina; FGS: glucósido; FPY: ácido piroglutâmico; FTR: triptofano; FAR: arginina; FGA: glucosaminida; FHO: fosfato; FGN: glucurônico; FIS: isoleucina; TRE: trealose; LAC: lactose; MAB: glucosídeo; SUC: sacarose; MNT: manitol; MTT: maltotriose; ARA: arabinose; GLR: glicerol; FRU: frutose; BGL: glucósido; PCE: celobiosídeo; PLN: prolina e leucina; PHO: fosfato; PAM: maltósido; PGO: galactósido; URE: uréia; ESC: esculina; ARG: arginina.

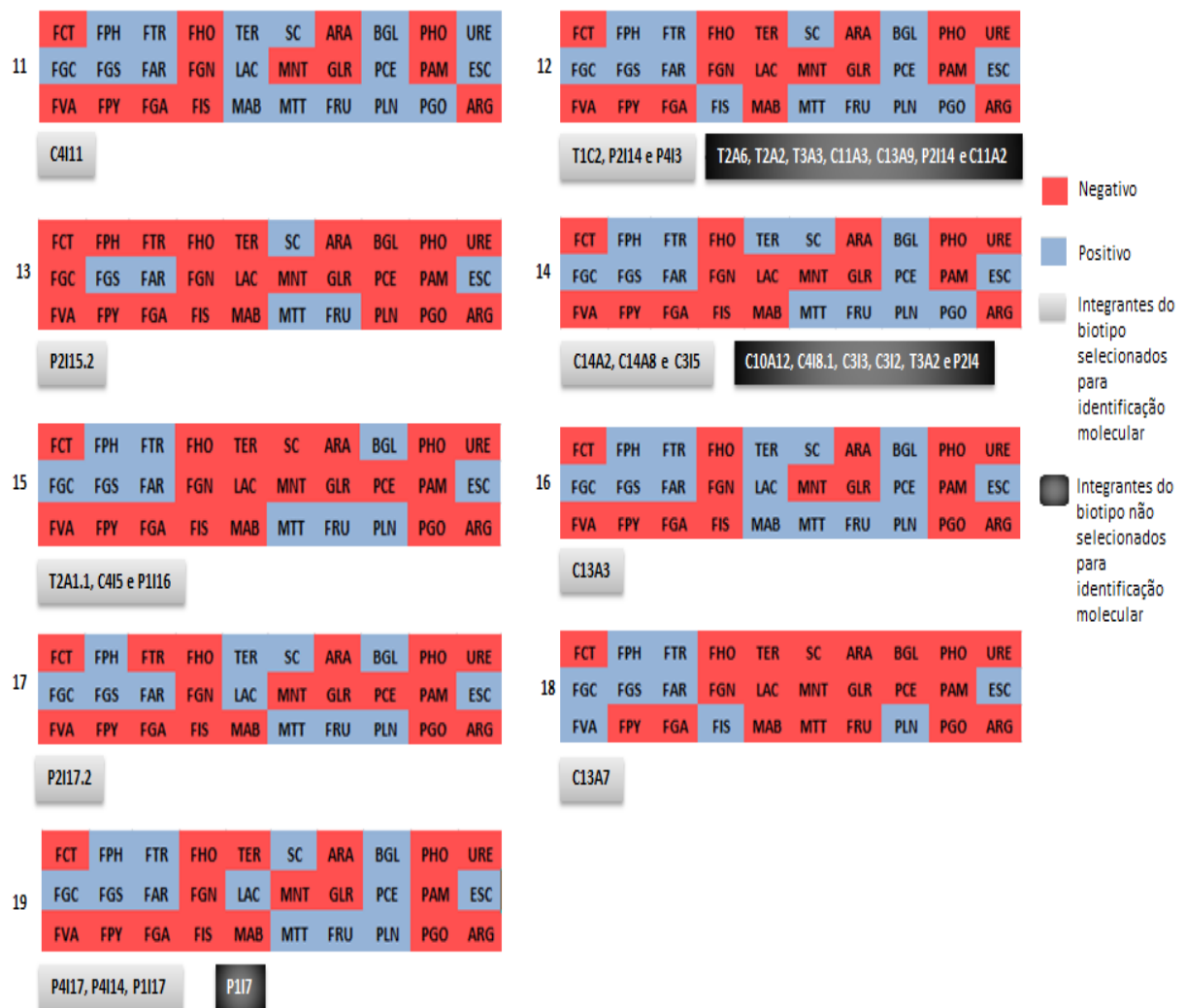


Figura 5 (continuação): Biogrupos formados a partir de agrupamento dos resultados obtidos no kit comercial BBL Crystal GP ID. As abreviações significam: FCT: controle negativo; FGC: glucósido; FVA: valina; FPH: fenilalamina; FGS: glucósido; FPY: ácido piroglutâmico; FTR: triptofano; FAR: arginina; FGA: glucosaminida; FHO: fosfato; FGN: glucurônico; FIS: isoleucina; TRE: trealose; LAC: lactose; MAB: glucosídido; SUC: sacarose; MNT: manitol; MTT: maltotriose; ARA: arabinose; GLR: glicerol; FRU: frutose; BGL: glucósido; PCE: celobiosídido; PLN: prolina e leucina; PHO: fosfato; PAM: maltósido; PGO: galactósido; URE: uréia; ESC: esculina; ARG: arginina.

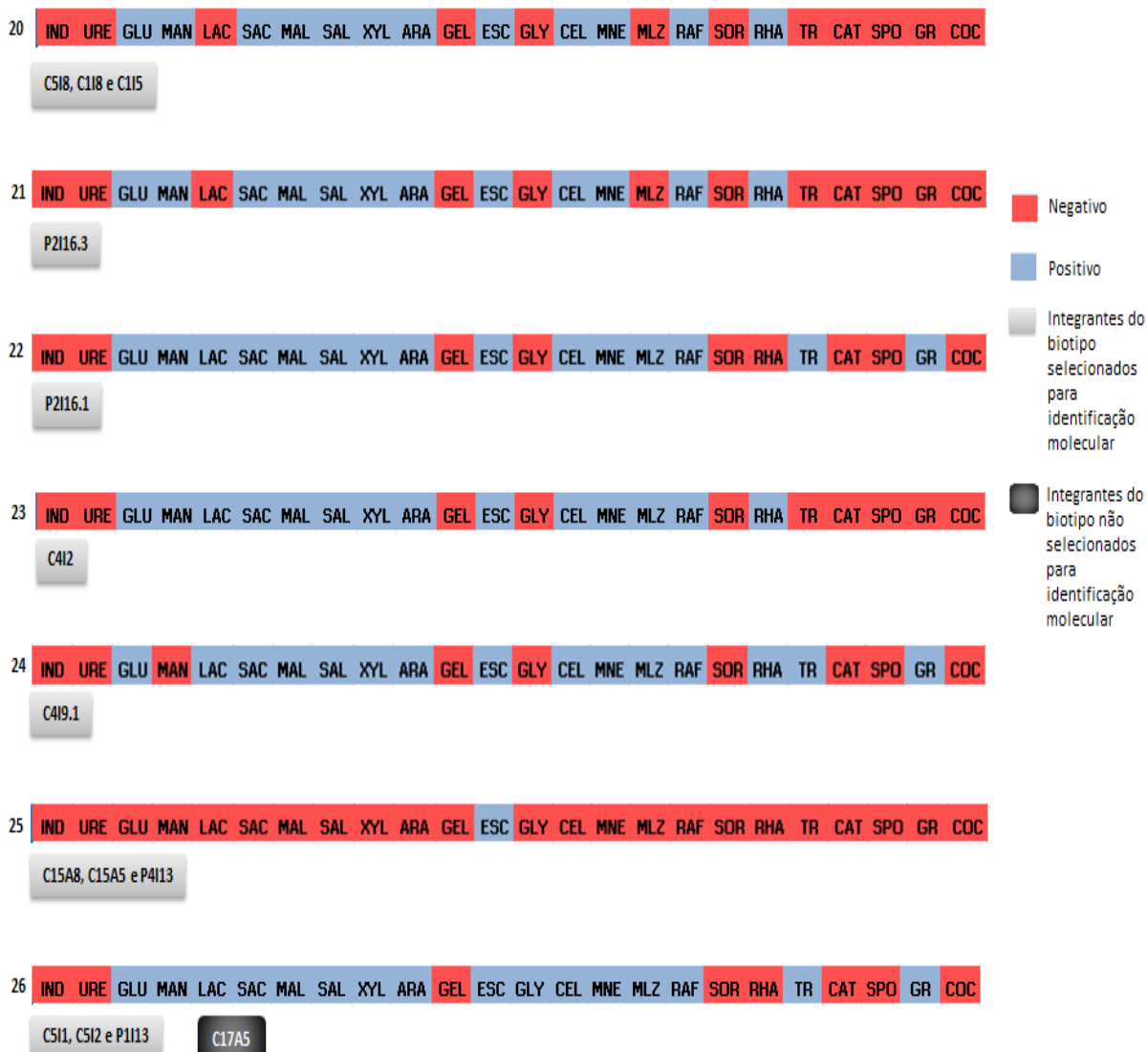


Figura 6: Biogrupos formados a partir de agrupamento dos resultados obtidos no kit comercial API 20A (bioMérieux). As abreviações significam: IND: indol; URE: urease; GLU: glicose; MAN: manitol; LAC: lactose; SAC: sacarose; MAL: maltose; SAL: salicina; XYL: xilose; ARA: arabinose; GEL: gelatina; ESC: esculina; GLY: glicerol; CEL: celobiose; MNE: manose; MLZ: melezitose; RAF: rafinose; SOR: sorbitol; RHA: ramnose; TRE: trealose; CAT: catalase; SPO: esporos; GR: coloração de Gram; COC: morfologia (coco + / bacilo -).

Além da proposição de biogrupos, foi realizada uma tentativa de ribotipagem dos microrganismos a fim de auxiliar no agrupamento dos biogrupos propostos. Os oligonucleotídeos iniciadores II e IX utilizados por outros autores já estabelecidos na literatura para a ribotipagem não possibilitaram a amplificação de segmentos de DNA *Streptococcus*, nem do isolado C14A6. Assim, a ribotipagem foi realizada apenas para os outros microrganismos.

No total, foi possível observar a presença de nove ribotipos distintos, sendo que alguns representantes bacterianos dentro de um mesmo ribotipo foram agrupados, segundo seu perfil bioquímico-fisiológico, em biogrupos diferentes. Representantes de todos os ribotipos, incluindo aqueles em biogrupos diferente também foram selecionados para a identificação molecular (Tabela 4).

Tabela 4: Biogrupos encontrados após a ribotipagem dos bacilos Gram positivos e negativos isolados de ambas as dietas.

Biogrupo	Isolados	Biogrupo	Isolados
A	C118, C115, C518	F	C419.1
B	P4113	G	P2116.3
C	C15A8, C15A5	H	P2116.1
D	P1113	I	C412
E	C511, C512		

A amplificação da região do DNA bacteriano codificadora do rRNA 16S foi realizada com todos os isolados selecionados entre os biogrupos 1 a 19, com um integrante de cada ribotipo identificado entre os bacilos isolados e com a bactéria C14A6, totalizando 39 bactérias. A reação de PCR resultou em um produto de 560 pares de base (Figura 7) que, após o sequenciamento, possibilitou sua comparação ao banco de dados *Genbank* resultando em identificação microbiana por similaridade após alinhamento das sequências obtidas.

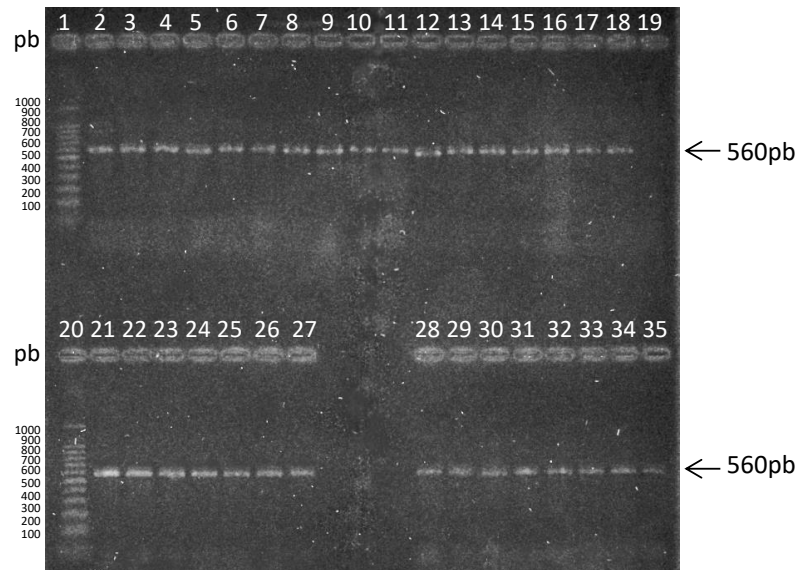


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação da região do DNA bacteriano codificadora do rRNA 16S. Canaletas 1 e 20, padrão de peso molecular 100bp Ladder (Promega); canaletas 2 a 18 e 21 a 35, amplicons representativos de 560 pb submetidos ao sequenciamento. A canaleta 19 foi utilizada como controle negativo da reação.

Em algumas situações foi possível a identificação das espécies bacterianas, enquanto que em outros momentos foi possível identificação apenas no nível de gênero bacteriano. Para um isolado bacteriano, devido à baixa identidade das sequencias após alinhamento (86%) (Tabela 5, Anexo B).

Tabela 5: Resultado do sequenciamento das 39 amostras selecionadas dentre os biogrupos formados.

Amostra	Biogrupo	Identificação molecular
C5I2	E	<i>Selenomonas ruminantium</i>
P1I17	19	<i>Streptococcus</i> sp.
P4I3	12	<i>Streptococcus</i> sp.
C5I8	A	<i>Pseudobutyrvibrio</i> sp.
C4I9.1	F	<i>Selenomonas ruminantium</i> / <i>Mitsuokella jalaludinii</i>
C14A6	-	Sem identificação
P4I13	B	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>
P2I16.3	G	<i>Pseudobutyrvibrio</i> sp.
C4I2	I	<i>Selenomonas ruminantium</i>
P2I16.1	H	<i>Selenomonas ruminantium</i>
C15A8	C	<i>Pseudobutyrvibrio</i> sp.
P1I13	D	<i>Lactobacillus vitulinus</i>
P3I5	1	<i>Streptococcus</i> sp.
P2I17.3	1	<i>Streptococcus</i> sp.
C4I3	3	<i>Streptococcus</i> sp.
C4I4	5	<i>Streptococcus</i> sp.
C4I10	2	<i>Streptococcus</i> sp.
P2I15.2	13	<i>Streptococcus</i> sp.
P2I17	1	<i>Streptococcus</i> sp.
C4I11	11	<i>Streptococcus</i> sp.
C4I6	10	<i>Streptococcus</i> sp.
C3I8	7	<i>Streptococcus</i> sp.
C15A2	9	<i>Streptococcus</i> sp.
C13A1	8	<i>Streptococcus</i> sp.
C11A6	6	<i>Streptococcus</i> sp.
C10A11	4	<i>Streptococcus</i> sp.
C13A3	16	<i>Streptococcus</i> sp.
C13A7	18	<i>Streptococcus</i> sp.
P2I17.2	17	<i>Streptococcus</i> sp.
P4I17	19	<i>Streptococcus</i> sp.
P4I14	19	<i>Streptococcus</i> sp.
P2I14	12	<i>Streptococcus</i> sp.
C3I5	14	<i>Streptococcus</i> sp.
C14A2	14	<i>Streptococcus</i> sp.
C14A8	14	<i>Streptococcus</i> sp.
T2A1.1	15	<i>Streptococcus</i> sp.
C4I5	15	<i>Streptococcus</i> sp.
P1I16	15	<i>Streptococcus</i> sp.
T1C2	12	<i>Streptococcus</i> sp.

(-) Não faz parte de nenhum biogrupo.

É possível observar que houve diferenças significantes entre a identificação bioquímica e a identificação molecular dos isolados (Tabela 6 e 7).

Entre os isolados de animais com dieta rica em fibras, 75% das bactérias eram *Streptococcus sp.*, 8.33% eram *Pseudobutyrvibrio sp.*, 12.5% eram *Selenomonas ruminantium* e 4.16% não foram identificadas. Entre os isolados de animais que receberam silagem de milho acrescida de glicerina 73.3% foram identificados como *Streptococcus sp.*, 13.33% como *Pseudobutyrvibrio sp.*, 6.66% como *Selenomonas ruminantium* e 6.66% como *Lactobacillus vitulinus* (Figura 8)

Tabela 6: Comparação entre a identificação bioquímica e a identificação molecular dos isolados de animais que receberam dieta rica em fibras.

Amostra	Identificação bioquímica	Identificação molecular
T1C2	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
T2A1.1	<i>Lactococcus lactis</i> ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C10A11	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C11A6	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C13A1	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C13A7	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C14A6	-	Sem identificação
C3I8	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C4I5	<i>Lactococcus lactis</i> ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C5I8	Sem identificação ^b	<i>Pseudobutyrvibrio sp.</i>
C3I5	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C4I2	Sem identificação ^b	<i>Selenomonas ruminantium</i>
C15A2	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C15A8	Sem identificação ^b	<i>Pseudobutyrvibrio sp.</i>
C4I9.1	Sem identificação ^b	<i>Selenomonas ruminantium / Mitsukella jalaludinii</i>
C5I2	<i>Bifidobacterium spp2</i> ^b	<i>Selenomonas ruminantium</i>
C4I10	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C14A2	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C14A8	<i>Streptococcus vestibularis</i> ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C4I11	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C4I3	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C4I4	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C13A3	<i>Streptococcus bovis</i> ^a	<i>Streptococcus sp.</i>
C4I6	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus sp.</i>

^a Sistema BBL Crystal GP; ^b Sistema API A; (-) não submetido à identificação bioquímica

Tabela 7: Comparação entre a identificação bioquímica e identificação molecular dos isolados de animais que receberam dieta composta por silagem de milho acrescida de glicerina bruta.

Amostra	Identificação bioquímica	Identificação molecular
P4I14	<i>Streptococcus salivarius</i> ^a	<i>Streptococcus</i> sp.
P2I16.1	Sem identificação ^b	<i>Selenomonas ruminantium</i>
P4I3	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	<i>Streptococcus</i> sp.
P4I13	Sem identificação ^b	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>
P1I13	<i>Bifidobacterium spp2</i> ^b	<i>Lactobacillus vitulinus</i>
P2I14	<i>Streptococcus equinus</i> ^a	<i>Streptococcus</i> sp.
P1I16	<i>Lactococcus lactis</i> ^a	<i>Streptococcus</i> sp.
P2I16.3	Sem identificação ^b	<i>Pseudobutyrvibrio</i> sp.
P2I17	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus</i> sp.
P2I17.2	<i>Streptococcus mutans</i> ^a	<i>Streptococcus</i> sp.
P4I17	<i>Streptococcus salivarius</i> ^a	<i>Streptococcus</i> sp.
P2I15.2	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus</i> sp.
P1I17	<i>Streptococcus salivarius</i> ^a	<i>Streptococcus</i> sp.
P3I5	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus</i> sp.
P2I17.3	Sem identificação ^a	<i>Streptococcus</i> sp.

^a Sistema BBL Crystal GP; ^b Sistema API A; (-) não submetido à identificação bioquímica

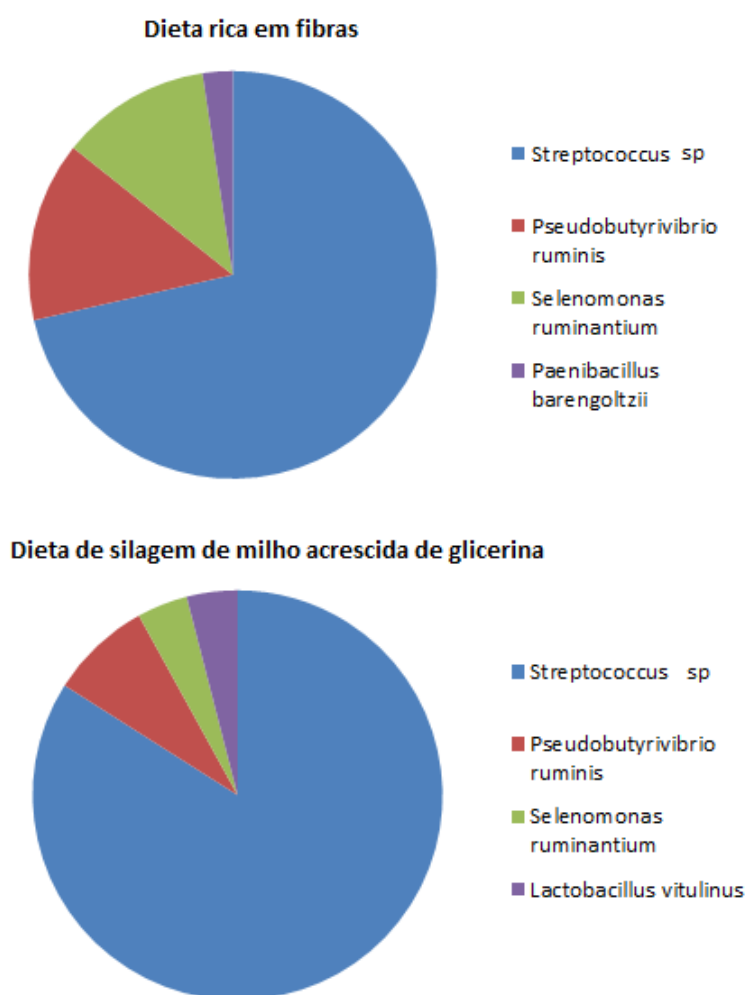


Figura 8: Comparação da distribuição entre as espécies bacterianas celulolíticas e xilanolíticas isoladas do conteúdo ruminal dos bovinos mantidos sob diferentes regimes dietéticos.

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS

Considerando-se que a diversidade bacteriana ruminal não está ainda bem caracterizada, a prospecção de microrganismos celulolíticos e xilanolíticos neste ecossistema permitiu a recuperação de bactérias capazes de utilizar a fibra vegetal como fonte de carbono.

A maioria dos isolados obtidos foi caracterizada quanto ao seu aspecto morfotintorial pela coloração de Gram como cocos Gram positivos. Já em 1966, Hungate relatou que existe um predomínio de cocos Gram positivos na microbiota ruminal, de tamanhos variados, geralmente entre 0,4 – 1,0 μm de diâmetro e 1 – 3 μm de comprimento. Estudos mais recentes (EDWARDS et al., 2004) baseados na análise do sequenciamento da região do DNA bacteriano codificadora do rRNA 16S também confirmam que as bactérias Gram positivas são predominantes no rúmem.

As bactérias fibrolíticas compõem uma importante parte da microbiota ruminal, possuindo papel na degradação biológica da fibra vegetal ingerida pelos ruminantes (KOIKE e KOBAYASHI, 2009). Durante o estudo foi constatado que 26,19% dos isolados provenientes de animais que receberam dieta rica em fibras e 12% dos isolados provenientes de animais que recebem silagem de milho acrescida de glicerina eram celulolíticos. Resultados similares foram encontrados por Dehoroty e colaboradores em 1989 durante um estudo sobre a enumeração de bactérias ruminais, onde animais que receberam uma dieta composta somente de feno de alfafa apresentaram uma porcentagem maior de microrganismos celulolíticos do que animais que receberam uma dieta composta de 60% de milho e 40% de palha de alfafa. Esses resultados corroboram com a idéia de que o fornecimento de uma dieta rica em um determinado substrato aos animais, no caso a lignocelulose, pode causar uma maior proliferação dos microrganismos que degradam esse substrato.

Pode-se observar que a porcentagem de bactérias xilanolíticas obtidas neste estudo foi superior a de bactérias celulolíticas. Esse resultado foi obtido devido ao grande número de microrganismos hemicelulolíticos presentes no rúmen e também pela capacidade de digerir hemiceluloses característica de todas as bactérias celulolíticas (HUNGATE, 1966).

Considerando-se a forma e o tipo de parede celular bacteriana, o que reflete na caracterização microbiana pela coloração de Gram, acredita-se que animais alimentados com feno e forragem apresentam uma quantidade maior de bactérias Gram negativas no rúmen, enquanto que animais que recebem rações baseadas em grãos possuem uma proporção maior de bactérias Gram positivas (Hungate, 1966).

Neste estudo, não foram encontradas diferenças significativas na proporção entre Gram positivos e Gram negativos nos isolados de ambas as dietas, considerando-se sua capacidade de degradação de fibras vegetais com atividade celulolítica ou xilanolítica. O fato de haver diferenças na composição da microbiota entre animais de uma mesma espécie que recebem a mesma dieta (MOHAMMED et al, 2012; KONG et al., 2011) provavelmente não está relacionado com os resultados obtidos, isto é, com atividade metabólica específica, considerando-se a riqueza de nutrientes que são oferecidos aos microrganismos ao se variar os substratos oferecidos aos ruminantes.

A alimentação de ruminantes com dietas ricas em grãos pode causar um aumento expressivo na população de cocos Gram positivos (GUTIERREZ et al., 1959). Em concordância com a literatura, nossos dados mostram um aumento de em torno de 15% no número de cocos Gram positivos anaeróbios facultativos isolados de animais que receberam dieta de silagem de milho acrescida com glicerina em comparação com os isolados de animais que receberam uma dieta rica em fibras vegetais.

O número reduzido de microrganismos que apresentaram motilidade nas avaliações *in vitro*, está relacionado ao fato de que a maior parte dos isolados celulolíticos e xilanolíticos são cocos e a motilidade em neste tipo morfológico de bactéria, considerando-se qualquer que seja sua origem, é rara (LEIFSON et al., 1964).

Nos ruminantes, o trato gastrointestinal não apresenta microrganismos associados no momento do nascimento, tal como esperado para outras espécies de animais. Porém essas superfícies mucosas são rapidamente colonizadas por bactérias nas primeiras 24 horas de vida e os anaeróbios estritos já se tornam predominantes no segundo dia após o nascimento (LI et al., 2012; FONTY et al., 1989). Desta forma, apesar da predominância de bactérias anaeróbias esperada entre os microrganismos ruminais, nesse estudo considerando-se a prospecção de bactérias celulolíticas e xilanolíticas, os anaeróbios não foram os microrganismos predominantemente recuperados.

De acordo com dados da literatura, principalmente devido a limitações nas técnicas de cultivo de bactérias anaeróbias, sobretudo as extremamente sensíveis ao oxigênio, os cocos Gram positivos como bactérias do gênero *Streptococcus*, figuram entre as mais frequentemente isoladas de amostras de líquido ruminal. (Bryant, 1959). No nosso estudo, deve ser considerado ainda, que a distância física, o transporte e a metodologia de isolamento e cultivo de anaeróbios (técnica do *roll tube*) podem ter contribuído para a baixa recuperação de bactérias anaeróbias potencialmente celulolíticas ou xilanolíticas ruminais. Por outro lado, do ponto de vista biotecnológico a utilização de bactérias celulolíticas ou xilanolíticas aeróbias anaeróbias facultativas teria maior valor, pela facilidade técnica de cultura em ambiente não anaeróbico.

6.2 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

A introdução de kits de identificação bioquímica automatizados no mercado forneceu uma alternativa a identificação bioquímica manual, tornando o processo mais rápido e preciso (MCLAUGHLIN et al., 1984). Apesar de serem altamente eficazes e de grande utilidade, esses kits foram desenvolvidos com o objetivo de identificar microrganismos de importância clínica. Atualmente, não há disponibilidade no mercado de kits de identificação

bioquímica de bactérias de origem ambiental, porém há estudos que fazem uso dos kits de identificação de bactérias de interesse clínico para esse fim (HASSEN et al., 1998; DALSGAARD et al., 1996).

Nesse estudo, foi constatado que a identificação de bactérias ruminais a partir do uso dos kits API 20A e BBL Crystal GP ID não é eficaz, uma vez que não foi possível determinar a espécie de mais da metade dos isolados. Apesar da identificação de algumas bactérias como *Streptococcus bovis*, pelo sistema BBL Crystal GP ID, e *Bifidobacterium spp2.*, pelo sistema API 20A, ser possível para amostras provenientes de conteúdo ruminal, a identificação de *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus vestibularis* é duvidosa, uma vez que essas são bactérias de interesse clínico tipicamente encontradas na cavidade oral humana (WHILEY e HARDIE, 1988; BARRETTO et al., 2012).

Essas falhas de identificação podem estar relacionadas a limitações nas bases de dados dos kits, uma vez que eles foram desenvolvidos com o objetivo de identificar microrganismos de interesse clínico e não têm incluídas as principais espécies bacterianas do rúmen. Desta forma, pode-se esperar que a utilização destes kits comerciais possa produzir resultados incertos devido à variabilidade de expressão de características fenotípicas, que são usadas como parâmetro de identificação. Adicionado a isso, nestes sistemas comerciais os resultados das provas são baseadas em mudança visual de cores e/ou fluorescências, o que torna sua interpretação subjetiva (COUTO et al., 2001; ALEXOPOULOU et al., 2006).

Por outro lado, dada a diversidade microbiana associada ao rúmen, e a carência de dados científicos sobre a identificação específica desses microrganismos, pelo estabelecimento de marcadores fisiológicos para diferenciação bacteriana, a diferenciação e identificação dos diferentes grupos de bactérias ruminais por características bioquímicas e fisiológicas, torna-se dificultada (RUSSEL et al., 2001).

Considerando-se a influência da dieta do hospedeiro no comportamento bioquímico e fisiológico bacteriano, durante análise da microbiota ruminal sob o efeito de duas dietas diferentes, Svetlana e colaboradores (2001) observaram um pequeno aumento na diversidade da comunidade bacteriana presente em animais que receberam dietas ricas em amido. Em nosso estudo, mesmo

utilizando-se métodos de cultivo de microrganismos diferentes para as duas dietas, os perfis das comunidades proporcionados pela identificação bioquímica dos isolados provenientes de animais que receberam dieta rica em fibras e de animais que receberam silagem de milho acrescida de glicerina bruta apresentaram poucas diferenças. Esses dados corroboram com nossos resultados uma vez que, neste estudo, a variação de dieta dos animais, de cujos conteúdos ruminais foram isolados as bactérias celulolíticas e xilanolíticas, não interferiu de maneira geral, nos tipos fisiológicos e aparentemente bioquímicos dos microrganismos recuperados.

6.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

A identificação bioquímica de microrganismos ruminais ainda apresenta desafios, uma vez que as semelhanças morfológicas e fisiológicas além da grande diversidade microbiana no rúmen, torna difícil a distinção das espécies (RUSSEL e RYCHLIK, 2001). A necessidade de ferramentas de identificação mais precisas foi sanada pela disponibilidade das técnicas de sequenciamento, como o sequenciamento da região do DNA codificadora do rRNA 16S bacteriano, uma vez que a divergência nas sequências desses segmentos gênicos permite, a princípio, definir o limite entre uma espécie e outra (AMANN et al., 1990).

Entretanto, apesar de sua universalidade e precisão, a utilização do sequenciamento de pequenas subunidades do rRNA para a identificação de microrganismos ainda é relativamente laboriosa e de certo custo, sobretudo considerando-se a disponibilidade de infraestrutura e do consumo rotineiro de reagentes químicos. Assim, apesar do sequenciamento de DNA genômico permanecer como padrão na identificação de espécies de seres vivos, outras metodologias vêm sendo estudadas para serem propostas como ferramentas alternativas para identificação precisa que permitam o processamento rápido de um grande volume de amostras para uma descrição detalhada e precisa da

estrutura, dinâmica populacional e atividade funcional da comunidade microbiana do rúmen (SVETLANA et al., 2001).

No nosso estudo, a partir da análise dos resultados obtidos na identificação bioquímica, ribotipagem e na identificação molecular dos microrganismos isolados, observou-se que ocorreram diferenças na caracterização microbiana pelo uso das técnicas, fisiológicas e moleculares. Mais da metade dos isolados não pode ser identificado com o auxílio dos kits bioquímicos. Durante a análise dos dados obtidos, foi possível observar que alguns bacilos que obtiveram a mesma identificação molecular apresentaram diferentes ribotipos e faziam parte de diferentes biogrupos. Isso pode ser justificado uma vez que a presença de ribotipos diferentes dentro de uma mesma espécie não é de ocorrência rara e pode indicar a presença de grupos evolucionários diferentes (FUJITA et al., 2005). Além disso, a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores II e IX, não se mostrou eficaz para a ribotipagem de cocos Gram positivos ruminais, tal como para a ribotipagem de cocos Gram positivos do gênero *Staphylococcus*, motivo da sua proposição.

Em relação às bactérias isoladas, para as quais os métodos de identificação permitiram a nomeação microbiana, o gênero *Streptococcus* foi relacionado aos cocos Gram positivos por ambas as abordagens metodológicas, porém com grandes divergências em relação à caracterização específica. O gênero *Streptococcus* compreende espécies bacterianas imóveis e abundantes no rúmen, com representantes responsáveis por diversas atividades, como a degradação do amido e outros substratos. É aceito que estes microrganismos sejam as bactérias mais isoladas do ambiente ruminal (HUNGATE, 1966).

O rúmen é um ambiente de população complexa e, por esse motivo, a taxonomia dos microrganismos residentes em seu interior está em constante mudança (ČEPELJNIK et al., 2003; STURT et al., 2010; SCHLEGEL et al., 2003). Esse pode ser considerado um dos motivos de terem sido obtidos perfis tão próximos na identificação dos isolados. Além disso, a interpretação dos dados de sequenciamento do rRNA 16S podem ser complicadas devido ao fato de possível divergência nas sequências de um mesmo organismo ou devido a espécies evolutivamente próximas possuírem sequências de rRNA 16S quase

idênticas (UEDA et al., 1999; FOX et al., 1992). Isso pode ser observado em linhagens do grupo *Streptococcus bovis* (*S. bovis*, *Streptococcus caprinus*, *S. equinus*, *S. gallolyticus*, *S. infantarius* e *S. macedonicus*) onde a porcentagem de identidade varia entre 97 e 98%. Para que essas linhagens possam ser diferenciadas, é necessário utilizar sequências alvo de cópia única no genoma que exibam maior divergência do que a do rRNA 16S. Segundo dados da literatura, o gene *sodA* presente em cocos Gram positivos é uma das possibilidades que pode ser considerada (POYART et al., 2002).

As variações fisiológicas observadas entre os microrganismos isolados, somada a pequena diferença na identidade obtida no sequenciamento (Anexo B) podem indicar, ainda, possibilidade de que os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação da região do genoma bacteriano codificadora da subunidade 16S do rRNA pode não ter sido complementar às regiões de maior polimorfismo, impedindo sua amplificação. Esse fato poderia interferir na distinção entre as espécies, como no caso do isolado C4I9.1, que apresentou identidades variando entre 93 e 95% para três gêneros diferentes. O mesmo ocorreu com todos os cocos isolados nesse estudo (Anexo B), onde em todos os casos foram obtidas identidades muito próximas para as espécies *Streptococcus lutetiensis*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus luteciae*, *Streptococcus pasteurianus* e *Streptococcus alactolyticus*. Apenas o isolado P1113, identificado como *Lactobacillus vitulinus*, obteve identificação final única.

Em relação aos bacilos, assim determinados após avaliação morfológica, não foram observadas correlações em nenhum nível de identificação, considerando-se as metodologias utilizadas.

Alguns dos isolados celulolíticos obtidos no trabalho foram identificados como *Selenomonas ruminantium* ou *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica*. Essa é uma bactéria ruminal, bastonete curvo, Gram negativo, anaeróbia estrita e não formadora de esporos, que pode ser responsável por 22 a 51% da contagem total de bactérias do rúmem (CALDWELL e BRYANT, 1966). Apesar de *S. ruminantium* ser conhecida por fermentar diferentes tipos de carboidratos, porém não os que compõem a parede celular vegetal (HUNGATE, 1966; KINGSLEY e HOERNIGER, 1973), estudos recentes indicam a possibilidade de envolvimento dessa espécie na digestão de fibras

(KOIKE e KOBAYASHI, 2011). Os resultados obtidos no presente estudo fornecem novas evidências da existência de atividade fibrolítica entre membros dessa espécie.

Representantes do gênero *Pseudobutyrvibrio* sp. também foram identificados entre os isolados. Esses microrganismos compreendem, também bacilos celulolíticos curvos Gram negativos, anaeróbios estritos, não formadores de esporos, que se locomovem por meio de um flagelo único polar ou subpolar e foram isolados pela primeira vez de vacas em pastagem por Gylswyk e colaboradores em 1996.

Para uma das bactérias isoladas, a metodologia molecular de identificação direcionou a sua identidade para, possivelmente, a espécie *Mitsuokella jalaludinii*. Esses microrganismos são também bastonetes curvos tipicamente ruminais, Gram negativos, produtores de fitases, não formadores de esporos e anaeróbios estritos que foram isolados pela primeira vez em bovinos (Lan et al., 2002).

Entre os bastonetes Gram positivos, foi identificada a espécie *Lactobacillus vitulinus*. Essas bactérias, bastonetes anaeróbios estritos, segundo dados da literatura foram isolados pela primeira vez do rúmen de bovinos em 1973 (SHARPE et al., 1973). Desde então, números significativos dessa espécie foram encontrados no rúmen de animais que recebiam dietas ricas em fibras (BRYANT et al., 1960). Apesar disso, não foi encontrado na literatura estudos que relatam indícios de atividade celulolítica para essa espécie, tal como observado no nosso estudo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hidrólise de material lignocelulósico resulta em produtos de alto valor comercial que são de grande interesse em diversas áreas da indústria. Essa hidrólise é dificultada devido a barreiras tecnológicas na produção e a baixa eficiência de celulasas e xilanases, o que torna esse processo dispendioso e dificulta a inclusão do produto final no mercado. Nesse sentido, estudos que tenham como objetivo o melhoramento das enzimas já existentes ou a descoberta de microrganismos com capacidade de hidrolisar a fibra vegetal são de grande importância e representam potencial ganho tecnológico que pode ser utilizado para amenizar as dificuldades encontradas na hidrólise do material lignocelulósico.

Após a análise do comportamento dos representantes da comunidade bacteriana ruminal frente a duas dietas diferentes, uma rica em fibras e a outra composta por silagem de milho acrescida de glicerina bruta, foi possível avaliar que não houve alterações significativas em seu perfil, mesmo com métodos de cultivo diferentes. Apesar de a literatura encontrada relatar o contrário, embora não considere o isolamento seletivo de microrganismos, buscando atividade metabólica específica, é importante lembrar que o método de cultivo de bactérias ruminais atual não possibilita a recuperação da maior parte da microbiota, sendo que alterações possam ter ocorrido nas populações bacterianas não cultiváveis.

O rúmem é um ecossistema complexo e que ainda necessita de vários estudos de forma a ser bem compreendido. A identificação de bactérias ruminais por meios bioquímicos continua sendo problemática e portanto não é aconselhada, uma vez que é de baixa confiabilidade. Apesar de semelhanças com a identificação molecular, o uso dos kits de identificação bioquímica comerciais API 20A e BBL Crystal GP ID não é indicado uma vez que são destinados a identificação de microrganismos de interesse clínico e seus bancos de dados não incluem as principais espécies bacterianas do rúmem.

Apesar de terem sido encontrados problemas na distinção das espécies isoladas, a identificação molecular por meio do sequenciamento da região do genoma bacteriano codificadora da subunidade 16S do rRNA continua sendo um método preciso para a identificação de microrganismos ruminais. Cuidados devem ser tomados na escolha dos primers utilizados para a reação, uma vez que um iniciador não adequado pode resultar em baixa distinção entre as espécies. Ainda, deve-se ter em mente que a taxonomia das bactérias ruminais está em constante mudança e que há espécies que somente podem ser distintas com o sequenciamento complementar de outras regiões que não a codificadora do rRNA 16S.

A identificação de um isolado potencialmente celulolítico e xilanolítico como *Lactobacillus vitulinus* constitui novas evidências da presença de atividade fibrolítica em indivíduos dessa espécie. Mais estudos devem ser realizados de forma a comprovar a expressão de fitases por essa bactéria.

Os resultados obtidos nesse estudo são importantes para a melhor compreensão do ecossistema ruminal e futuramente podem contribuir para o melhoramento da hidrólise de material lignocelulósico na indústria.

8 CONCLUSÕES

- O meio seletivo quimicamente definido permitiu o isolamento de bactérias ruminais com capacidade de crescimento utilizando-se fibra vegetal como única fonte de carbono em cultivo primário;
- Composto a diversidade bacteriana ruminal, foram detectadas bactérias Gram positivas e Gram negativas, cocos e bastonetes anaeróbios facultativos e obrigatórios com capacidade de degradação de celulose e xilana, a partir do cultivo primário;
- Os kits de identificação bioquímica API 20A e BBL Crystal GP ID não são adequados para a rápida identificação de isolados da microbiota ruminal, dados os baixos níveis de identificação aceitável observados;
- Embora considerada ferramenta altamente sensível, o sequenciamento da região do DNA bacteriano codificadora para o rRNA 16S com oligoiniciadores universais para o Domínio Bacteria, não foi eficaz na identificação de todos os isolados bacterianos.
- Que é de nosso conhecimento até o momento, a prospecção de microrganismos com potencial atividade celulolítica e xilanolítica de origem ruminal permitiu, de maneira inédita, a atribuição desta característica a uma linhagem de *Lactobacillus vitulinus*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, D. M. Z.; HENAO, D. M. O.; GODOY, M. A. M.; 2007. Caracterización Mineralógica De Los Productos De Oxidación Del Sistema Pirita-Esfalerita Por Bacterias Nativas Oxidantes De Fe Mineralogical Characterization Of Oxidation Productos In A Pyrite-Sphalerite System Using Indigenous Fe Oxidizing Bacteria. **Dyna**, 154: 59-64
- ALEXOPOULOU, K.; FOKA, A.; PETINAKI, E.; JELASTOPULU, E.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. 2006. Comparison of two commercial methods with PCR restriction fragment length polymorphism of the *tuf* gene in the identification of coagulase-negative staphylococci. **Letters in Applied Microbiology**, 43: 450 – 454
- ALMEIDA, M.N.; GUIMARÃES, VM.; BISCHOFF, K.M.; FALKOSKI, D.L.; PEREIRA, O.L.; GONÇALVES, D.S. and DE REZENDE, S.T. 2011. Cellulases and hemicellulases from endophytic *Acremonium* species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 165: 594-610
- AMANN, R. I.; BINDER, B. J.; OLSON, R. J.; CHISHOLM, S. W.; DEVEREUX, R. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, 56: 1919 – 1925
- ARTUSO, A. 2002. Bioprospection, benefit sharing, and biotechnological capacity building. **World Development**, 30: 1355 – 1368
- BARRETO, C.; ALVAREZ-MARTIN, P.; FOATA, F.; RENAULT, P.; BERGER, B. 2012. Genome sequence of the lantibiotic bacteriocin producer streptococcus salivarius strain K12. **Journal of Bacteriology**, 194: 5959 – 5960
- BHAT, M. K.; 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, 18: 355 - 383
- BOOTH, S. L. 2012. Vitamin K: food composition and dietary intakes. **Food & Nutrition Research**, 56: 5505 - DOI: 10.3402/fnr.v56i0.5505

- BRULC, J. M.; ANTONOPOULOS, D. A.; MILLER, M. E. B.; WILSON, M. K.; YANNARELL, A. C.; DINSDALE, E. A.; EDWARDS, R. E.; FRANK, E. D.; EMMERSON, J. B.; WACKLIN, P.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B.; NELSON, K. E.; WHITE, B. A. 2009. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, **106**: 6
- BRYANT, M. P. 1959. Bacterial species of the rumen. ***Bacteriology Reviews***, **23**: 125 – 153
- BRYANT, M. P.; BARRENTINE, B. F.; SYKES, F. F.; ROBINSON, I. M.; SHAWVER, C. V. 1960. Predominant bacteria in the rumen of cattle on bloat-provoking ladino clover pasture. ***Journal of Dairy Science***, **43**: 1435 – 1444
- BRYANT, M. P.; BURKEY, L. A. 1952. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. ***Journal of Dairy Science***, **36**: 205 – 217
- CALDWELL, D.; BRYANT, M. 1966. Medium Without Rumen Fluid for Nonselective Enumeration and Isolation of Rumen Bacteria. ***Applied Microbiology***, **14**: 794 – 801
- CARERE, C. R.; SPARLING, R.; CICEK, N.; LEVIN, D. B. 2008 Third Generation Biofuels via Direct Cellulose Fermentation. ***International Journal of Molecular Science***, **9**: 1342 – 1360
- ČEPELJNIK, T.; ZOREC, M.; KOSTANJSEK, R.; NEKREP, F. V.; MARISINSEK-LOGAR, R. 2003. Is *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Strain Mz5T Suitable as a Probiotic? An *in Vitro* Study. ***Folia Microbiology***, **48**: 339 – 345
- CHENG, K. J.; MCCOWAN, R. P.; COSTESTON, J. W. 1979. Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. ***The American Journal of Clinical Nutrition***, **32**: 139 – 148
- COUTO, G. B. L.; RODRIGUES, M. J.; XIMENES, E. C.; VASCONCELOS, M. V. B. ; SILVA, A. T. O. 2001. Comparações clínico-amnésicas e microbiológicas entre mães e filhos relacionadas com a transmissão da doença cárie. ***Rev Fac Odontol Univ Fed Pernambuco***, **10**: 14-9
- ČUČEK, L.; KLEMES, J.; KRAVANJA, Z. 2012. Carbon and nitrogen trade-offs in biomass energy production. ***Clean Technology Environment Policy***, **14**: 389 - 397
- CZERKAWSKI, J. W. 1986. Degradation of solid feeds in the rumen: spatial distribution of microbial activity and its consequences. In ***Control of Digestion and Metabolism in Ruminants***, pp. 158-172
- CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENR, G. 1969. Fermentation of sugar-beet pulp and sucrose in an artificial rumen and effect of linseed oil fatty acids on fermentation. ***British Journal of Nutrition***, **23**: 51 – 66

DALSGAARD, A.; DALSGAARD, I.; HOI, L.; LARSEN, J. L. 1996. Comparison of a commercial biochemical kit and an oligonucleotide probe for identification of environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. **Letters in Applied Microbiology**, **22**: 184 - 188

DEHORITI, B. A.; TIRABASSO, P. A.; GRIFO, A. P. 1989. Most probable procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. **Applied and Environmental Microbiology**, **55**: 2789 – 2792

DURÁN, N.; DURÁN, M. 2000. Enzyme applications in the textile industry. **Review of Progress in Coloration and Related Topics**, **30**: 41 – 44

EDWARDS, J. E.; MCEWAN, N. R.; TRAVIS, A. J.; WALLACE, R. J. 2004. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, **86**: 263 – 61

FAGUNDES, C. T.; AMARAL, F. A.; TEIXEIRA, A. L.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. 2012. Adapting to environmental stresses: the role of the microbiota in controlling innate immunity and behavioral responses. **Immunological Reviews**, **245**: 250 – 264

FERNANDO, S. C.; PURVIR, H. T.; NAJAR, F. Z.; SUKHARNIKOV, L. O.; KREHBIEL, C. R.; NAGARAJA, T. G.; ROE, B. A.; DESILVAM U. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. **Applied and Environmental Microbiology**, **76**: 7482 – 7490

FONTY, G.; GOUET, O.; NEBOUT, J. M. 1989. Development of the cellulolytic microflora in the rumen of lambs transferred into sterile isolators a few days after birth. **Canadian Journal of Microbiology**, **35**: 416 – 22

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSUK, P. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **42**: 166 – 170

FUJITA, S.; SENDA, Y.; IWAGAMI, T.; HASHIMOTO, T. 2005. Rapid Identification of Staphylococcal Strains from Positive-Testing Blood Culture Bottles by Internal Transcribed Spacer PCR Followed by Microchip Gel Electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 1149 – 1157

GIAROLA, S.; ZAMBONI, A.; BEZZO, F. 2012. Environmentally conscious capacity planning and technology selection for bioethanol supply chains. **Renewable Energy**, **43**: 61 – 72

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresouce Technology**, **101**: 4775 – 4800

GREER, D. 2005. Creating cellulosic ethanol: spinning straw into fuel. **Biocycle Energy**

GRUPPEN, H.; KORMELINK, F. J. M.; VORAGEM, A. G. J. 1993. Enzymic Degradation of Water-unextractable Cell Wall Material and Arabinoxylans from Wheat Flour. **Journal of Cereal Science**, **18**: 129 – 143

GUTIERREZ, J.; DAVIS, R. E.; LINDAHL, I. L.; WARWICK, R. J. 1959. Bacterial Changes in the Rumen During the Onset of Feed-lot Bloat of Cattle and Characteristics of *Peptostreptococcus elsdenii* n. sp. **Applied Microbiology**, **7**: 16 – 22

GYLSWYK, N. O.; HIPPE, H.; RAINEY, F. A. 1996. *Pseudobutyrvibrio ruminis* gen. nov., sp. nov., a Butyrate-Producing Bacterium from the Rumen That Closely Resembles *Butyrvibrio jibrisolvens* in Phenotype. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **46**: 559 – 563

HASSEN, A.; SAIDI, N.; CHERIF, M.; BOUDABOS, A. 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource Technology**, **64**: 7 – 15

HOBSON, P. N.; MANN, S. O. 1957. Some studies on the identification of rumen bacteria with fluorescent antibodies. **Journal of Genetic Microbiology**, **16**: 463 – 471

HUNGATE, R. E. 1960. Symposium: Selected topics in microbial ecology: I. Microbial ecology of the rumen. **24**: 353 – 364

HUNGATE, R. E. 1966. The Rumen and Its Microbes. **Academic Press**

HURST, C. J.; GARLAND, J. L.; MILLS, A. L.; CRAWFORD, R. L.; LIPSON, D. A.; STETZENBACH, L. D. 2007. Manual of Environmental Microbiology. **ASM Press**.

IFKOVITS, R. W.; RAGHEB, H. S. 1968. Cellular fatty acid composition and identification of rumen bacteria. **Applied Microbiology**, **16**: 1406 – 1413

JAMI, E.; MIZRAHI, I. 2012. Composition and Similarity of Bovine Rumen Microbiota across Individual Animals. **PLoS ONE**, **7**: 3

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining** **1**: 119 – 134

KINGSLEY, V. V.; HOENIGER, J. F. 1973. Growth, structure and classification of Selenomonas. **Bacteriology Reviews**, **37**: 479 – 521

KIRBY, J.; MARTIN, J. C.; DANIEL, A. S.; FLINT, H. J. 1997. Dockerin-like Sequences in Cellulases and Xylanases from the Rumen Cellulolytic Bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, **149**: 213 – 219

KOBAYASHI, Y. 2006. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: Need for basic and applied science. **Animal Science Journal**, **77**: 375 – 385

KOCHERGINSKAYA, S. A.; AMINOV, R. I.; WHITE, B. A. 2001. Analysis of the Rumen Bacterial Diversity under two Different Diet Conditions using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Random Sequencing, and Statistical Ecology Approaches. **Environmental Microbiology**, **7**: 119 – 134

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. 2009. Fibrolytic Rumen Bacteria: Their Ecology and Functions. **Journal of Animal Science**, **22**: 131 – 138

KONG, Y.; XIA, Y.; SEVIOUR, R.; HE, M.; MCALLISTER, T.; FORSTER, R. 2011. In situ identification of carboxymethyl cellulose-digesting bacteria in the rumen of cattle fed alfalfa or triticale. **FEMS Microbiology Ecology**, **80**: 159 – 167

KUHAD, R. C.; GPTA, R.; SIGH, A. 2011. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research** Volume 2011, Article ID 280696, 10 pages

LAN, G. Q.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N. 2002. *Mitsuokella jalaludinii* sp. nov., from the rumens of cattle in Malaysia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **52**: 713 – 718

LEGAY-CARMIER, F.; BAUCHART, D. 1989. Distribution of bacteria in the rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil. **British Journal of Nutrition**, **61**: 725 – 740

LEIFSON, E.; COSENZA, B. J.; MURCHELANO, R.; CLEVERDON, R. C. 1964. Motile marine bacteria I.: Techniques, ecology, and general characteristics. **Journal of Bacteriology**, **87**: 652 – 666

LI, R. W.; CONNOR, E. E.; LI, C.; BALDWIN, R. L.; SPARKS, M. E. 2012. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metanogenic tools. **Environmental Microbiology**, **14**: 129 – 139

LI, R. W.; WU, S.; BALDWIN, R. L.; LI, W.; LI, C. 2012. Perturbation dynamics of the rumen microbiota in response to exogenous butyrate. **PLoS One**, **7**: 1 – 11

LYND, L. R.; ZYL, W. H.; MCBRIDE, J. E.; LASER, M. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, **16**: 577 – 583

MAIA, M. R. G.; CHAUDHARY, L. C.; BETSWICK, C. B.; RICHARDSON, A.; MCKAIN, N.; LARSON, T. R.; GRAHAM, I. A.; WALLACE, R. J. 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. **BMC Microbiology**, **10**: 52

MARAIS, S. Enzymatic Hidrolysis With Comercial Enzymes of a Xylan Extracted from Hardwood Pulp. Pretoria: UP. 2008. Pág. 4 – 12. Dissertação (Mestrado em Engenharia), Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, The Built Environment and Information Technology, University of Pretoria, Pretoria, 2008

MÁRQUEZ, A., ZAVALA-PÁRAMO, M.G., LÓPEZ-ROMERO, E. & CAMACHO, H.C. 2011. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology Letters**, **33**: 859-868

MASUDA, Y.; KONDO, S.; SHIMOJO, M.; GOTO, I. 1998. Effect of sugar-beet pulp supplementation on fiber degradation of grass hay in the rumen of goats. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, **12**: 186 – 188

MCCOWAN, R. P.; CHENG, K. J.; COSTERTON, J. W. 1979. Adherent bacterial populations on the bovine rumen wall and distribution patterns of adherent bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, **39**: 233 – 241

MCLAUGHLIN, J. K.; ZUCKERMAN, B. D.; TENENBAUM, S.; WOLF, B. A. 1984. Comparison of the API 20E, flow, and minitek systems for the identification of enteric and nonfermentative bacteria isolated from cosmetic raw materials. **Journal of the Society of Cosmetics Chemists**, **35**: 252 – 263

MELO, G. R. 2010. Produção de Celulases e Xilanases pelo Fungo Termofílico *Humicola grisea var. thermoidea* em Diferentes Substratos Lignocelulósicos. Goiânia – GO: UFG.. Pág. 2 – 16. Dissertação (Mestrado em Biologia), Programa de Pós Graduação em Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Goiás, Goiânia, 2010

MIN, B. R.; PINCHAK, W. E.; ANDERSON, R. C.; HUME, M. E. 2006. In vitro bacterial growth and in vivo ruminal microbiota populations associated with bloat in steers grazing wheat forage. **Journal of Animal Science**, **84**: 2873 – 2882

MOHAMMED, R.; STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J.; PENNER, G. B. BEAUCHEMIN, K. A. 2012. Individual animal variability in ruminal bacterial communities and ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, **95**: 6716 – 6730

NAGAR, S.; MITTAL, A.; KUMAR, D.; KUMAR, L.; GUPTA, V. K. 2012. Immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated aluminum oxide pellets for increasing digestibility of poultry feed. **Process Biochemistry**, **47**: 1402 – 1410

NGWE, T.; NUKUI, Y.; OYAIKU, S.; TAKAMOTO, G.; KOIKE, S.; UEDA, K.; NAKATSUJI, H.; KONDO, S.; KOBAYASHI, Y. 2012. Bean husks as a supplemental fiber for ruminants: Potential use for activation of fibrolytic rumen bacteria to improve main forage digestion. **Animal Science Journal**, **83**: 43 – 49

- PASON, P.; KYU, K. L.; RATANAKHANOKCHAI, K. 2006. *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 Xylanolytic-Cellulolytic Enzyme System That Degrades Insoluble Polysaccharides. **Applied Environmental Microbiology**, **72**: 2483 – 2490
- PÉREZ, J.; MUÑOZ-DOURADO, J.; RIBUA, T.; MARTÍNES, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Internationa Microbiology**, **5**: 53 – 63
- POLIZELI, M. L. T. M.; MONTI, R.; RIZZATTI, A. C. S.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **67**: 577 – 591
- POYART, C.; QUESNE, G.; TRIEU-CUOT, P. 2002. Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype II.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **52**: 1247 – 1255
- RAKOTOARIVONINA, H.; JUBELIN, G.; HEBRAUD, M.; GAILLARD-MARTINIE, B.; FORANO, E.; MOSONI, P. 2002. Adhesion to cellulose of the Gram-positive bacterium *Ruminococcus albus* involves type IV pili. **Microbiology**, **148**: 1871 – 1880
- RECHE, M. H. L. R.; FIUZA, L. M. 2005. Bacterial diversity in rice-field water in Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Microbiology**, **36**: n.3
- REGENSBOGENOVA, M.; MCEWAN, N. R.; JAVORSKY, P.; KISIDAYOVA, S.; MECHALOWSKI, T.; NEWBOLD, C. J.; HACKSTEIN, J. H. P.; PRISTAS, P. 2004. A re-appraisal of the diversity of the methanogens associated with the rumen ciliates. **FESM Microbiology Letters**, **238**: 307 – 313
- RUSSEL, J. B.; RYCHLIK, J. L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, **292**: 1119 – 1122
- RYAN, L.; CONVERY, F.; FERREIRA, S. 2006. Stimulating the use of biofuels in the European Union: Implications for climate change policy. **Energy Policy**, **34**: 3184 – 3194
- SADET, S.; MARTIN, C.; MEUNIER, B.; MORGAVI, D. P. 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. **Animal**, **7**: 939 – 944
- SANCHÉZ, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, **27**: 185–194
- SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. 2005; Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and

ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, **89**: 246–291

SARUTA, K.; MATSUNAGA, T.; KONO, M.; HOSHINA, S.; IKAWA, S.; SAKAI, O.; MACHIDA, K. 1997. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. **FEMS Microbiology Letters**, **146**: 271 – 278

SCHLEGEL L., GRIMONT R., AGERON E., GRIMONT P.A.D., BOUVET A. 2003. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. . **International Journal of Systematic Bacteriology** **53**: 631–645

SCHOFIELD, P.; PELL, A. N.; KRAUSE, D. 1996. Molecular Beacons: Trial of a Fluorescence-Based Solution Hybridization Technique for Ecological Studies with Ruminant Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, **63**: 1143 – 1147

SHARPE, M. E.; LATHAM, M. J.; GARVIE, E. I.; ZIRGIBL, J.; KANDLER, O. 1973. Two New Species of *Lactobacillus* Isolated from the Bovine Rumen, *Lactobacillus ruminis* sp.nov. and *Lactobacillus vitulinus* sp.nov. **Microbiology**, **77**: 37 – 49

SILVA, A.; ORSKOV, E. R. 1988. The effect of five different supplements on the degradation of straw in sheep given untreated barley straw. **Animal Feed Science and Technology**. **19**: 289 – 298

SILVA, H. S. A.; TOZZI, J. P. I.; TERRASAN, C. R. F.; BETTIOL, W. 2012. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. **Biological Control**, **63**: 62 – 67

SREENATH, H. K.; SHAH, A. B.; YANG, V. W.; GHARIA, M. M.; JEFFRIES, T. W. 1996. Enzymatic polishing of jute/cotton blended fabrics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. **81**: 18 – 20

STAHL, D. A; FLESHER, B.; MANSFIELD, H. R.; MONTGOMERY, L. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, **54**: 1079 – 1084

STEPHEN, J. D.; MABEE, W. E.; SADDLER, J. N. 2012. Will second-generation ethanol be able to compete with first generation ethanol? Opportunities for cost reduction. **Biofuels, Bioproducts and Bioresources**, **6**: 159 – 176

STURT, A S.; YANG, L.; SANDHU, K.; PEI, Z.; CASSAI, N.; BLASER, M. J. 2010. *Streptococcus gallolyticus* Subspecies *pasteurianus* (Biotype II/2), a

Newly Reported Cause of Adult Meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**, **48**: 2247 - 2249

SUEN, G.; WEIMER, P. J.; STEVENSON, D. M.; AYLWARD, F. O.; BOYUM, J.; DENEKE, J.; DRINKWATER, C.; IVANOVA, N. N.; MIKHAILOVA, N.; CHERTKOV, O.; GOODWIN, L. A.; CURRIE, C. R.; MEAD, D.; BRUMM, P. J. 2011. The Complete Genome Sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 Reveals a Cellulolytic and Metabolic Specialist. **PLoS ONE**, **6**: 4

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; OGATA, K.; NAKARUMA, M.; MASTSUI, H.; BENNO, Y. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. **FEMS Microbiology Ecology**, **29**: 159 – 169

TAJIMA, K.; ARAI, S.; OGATA, K.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; AMINOV, R. I.; BENNO, Y. 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. **Environmental Microbiology**, **6**: 271 - 284

TAN, K. T.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. 2008. Role of energy policy in renewable energy accomplishment: The case of second-generation bioethanol. **Energy Policy**, **36**: 3360 – 3365

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. 1981. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, **43**: 4

THE ROYAL SOCIETY. 2008. Sustainable biofuels: prospects and challenges. Pág. 9 – 36

UEDA, K.; SEKI, T.; KUDO, T.; YOSHIDA, T.; KATAOKA, M. 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. **Journal of Bacteriology**, **181**: 78 – 82

WANG, Y.; RAMIREZ-BRIBIESCA, J. E.; YANKE, L. J.; TSANG, A.; MCALLISTER, T. A. 2012. Effect of Exogenous Fibrolytic Enzyme Application on the Microbial Attachment and Digestion of Barley Straw In vitro. **Asian – Australian Journal of Animal Science**, **25**: 66 – 74

WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. **Journal of Microbiological Methods**, **44**: 253 – 262

WEIMER, P.; 1996. Ruminant Cellulolytic Bacteria Physiology, Ecology, and Beyond. **US Dairy Forage Research Center**.

Welkie, D. G., D. M. Stevenson, and P. J. Weimer. 2009. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. **Anaerobe**, **16**:94 - 100

WETZSTEIN, H. G.; GOTTSCHALK, G. 1985. A sodium-stimulated membrane-bound fumarate reductase system in *Bacteroides amylophilus*. **Archives of Microbiology**, **143**: 157 – 162

WHILEY, R. A.; HARDIE, J. M. 1988. *Streptococcus vestibularis* sp. nov. from the Human Oral Cavity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **38**: 335 – 339

WINTERS, P. 2007. Industrial Biotechnology Is Revolutionizing the Production of Ethanol Transportation Fuel. **Biotechnology Industry Organization**

WU, P.; ZHANG, G.; LI, J.; LU, H.; ZHAO, W. 2012. Effects of Fe²⁺ concentration on biomass accumulation and energy metabolism in photosynthetic bacteria wastewater treatment. **Bioresource Technology**, **119**: 55 – 59

WYMAN, C. E. 2007. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, **25**: 4

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **56**: 17 – 34

ANEXO A – Meios de cultura utilizados

BHI (Brain Heart Infusion) Ágar Suplementado

BHI Ágar	37g
Extrato de levedura	5g
Hemina 0.1%	1mL
Menadiona 0.1%	1mL
L-cisteína	0.5g
H ₂ O Destilada qsp	1000mL

SIM (Sulfureto, Indol, Mobilidade) Suplementado

Meio SIM	36.23g
Extrato de levedura	8g
Hemina 0.1%	1mL
Menadiona 0.1%	1mL
L- cisteína	1g
H ₂ O destilada	1000mL

Solução Mineral I

K ₂ HPO ₄	6g
H ₂ O destilada	1000 mL

Solução Mineral II

KH ₂ PO ₄	6g
(NH ₄) ₂ SO ₄	12g
NaCl	12g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,2g
CaCl ₂ 2H ₂ O	1,2g

H2O destilada 1000mL

Meio de diluição

Solução Mineral I 75 mL

Solução Mineral II 75 mL

H2O destilada 850 mL

Resazurina 0,1% 1 mL

NaHCO₃ 4g

L-Cisteína 0,5g

Meio simulador de habitat total

H2O destilada 220 mL

Líquido ruminal clarificado 200 mL

Solução Mineral I 37,5 mL

Solução Mineral II 37,5 mL

Triptona 1g

Extrato de levedura 0,25g

Solução de hemina 1% 0,5 mL

Solução de resazurina 0,1 % 0,5 mL

Solução de ácidos graxos voláteis (AGV) 5 mL

Glicose 1g

Celobiose 1g

Maltose 1g

Amido solúvel 0,75g

Na₂CO₃ 2g

L-Cisteína 0,25g

Meio sólido simulador de habitat total

H2O destilada 220 mL

Líquido ruminal clarificado 200 mL

Solução Mineral I	37,5 mL
Solução Mineral II	37,5 mL
Triptona	1g
Extrato de levedura	0,25g
Solução de hemina 1%	0,5 mL
Solução de resarzurina 0,1 %	0,5 mL
Solução de ácidos graxos voláteis (AGV)	5 mL
Glicose	1g
Celobiose	1g
Maltose	1g
Amido solúvel	0,75g
Ágar	20g
Na ₂ CO ₃	2g
L-Cisteína	0,25g

Meio sólido seletivo para bactérias celulolíticas

Líquido ruminal clarificado	400 mL
H ₂ O destilada	300 mL
Solução Mineral I	75 mL
Solução Mineral II	75 mL
Solução de resarzurina 0,1%	1 mL
Solução de celulose D 5%	150 mL
Ágar	20g
NaHCO ₃	5g
L-Cisteína	0,5g

Meio para bactérias celulolíticas

Líquido ruminal clarificado	400 mL
H ₂ O destilada	450 mL
Solução Mineral I	75 mL
Solução Mineral II	75 mL

Solução de resazurina 0,1%	1 mL
Celulose D	5g
NaHCO ₃	5g
L-Cisteína	0,5g

Meio NaPi 50 mM, pH 7 + CMC 0,5%

Ágar	7,5g
NaPi 50mM pH 7	500 mL
MgCl ₂ 1M	250µL
CaCl ₂ 1M	250µL
CMC	2,5g

Meio NaPi 50 mM, pH 7 + xilana 1%

Ágar	7,5g
NaPi 50mM pH 7	500 mL
MgCl ₂ 1M	250µL
CaCl ₂ 1M	250µL
Xilana	5g

ANEXO B – Identificação Molecular dos Isolados

Resultado do sequenciamento das 39 amostras selecionadas dentre os biogrupos formados.

Amostra	Biogrupo	Afiliação da sequência (GenBank ID)	Identidade (%)
C5I2	E	<i>Selenomonas ruminantium</i> (NR_044734.1)	99
		<i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. <i>Lactilytica</i> (NR_036912.1)	99
P1I17	19	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	96
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	96
		<i>Streptococcus luteaciae</i> (NR_042051.1)	96
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	96
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	96
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	96
P4I3	12	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	88
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	88
		<i>Streptococcus luteaciae</i> (NR_042051.1)	88
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	88
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	88
C5I8	A	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i> (NR_026315.1)	99
		<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> (NR_025524.1)	97
C4I9.1	F	<i>Selenomonas ruminantium</i> (NR_044734.1)	95
		<i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. <i>Lactilytica</i> (NR_036912.1)	95
		<i>Mitsuokella jalaludinii</i> (NR_028840.1)	94
		<i>Mitsuokella multacida</i> (NR_027596.1)	94
C14A6	-	<i>Anaerovibrio lipolyticus</i> (NR_040836.1)	93
		<i>Paenibacillus barengoltzii</i> (042756.1)	86
P4I13	B	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i> (NR_026315.1)	99
		<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> (NR_025524.1)	98
P2I16.3	G	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i> (NR_026315.1)	99
		<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> (NR_025524.1)	98
C4I2	I	<i>Selenomonas ruminantium</i> (NR_044734.1)	99
		<i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. <i>Lactilytica</i> (NR_036912.1)	99
P2I16.1	H	<i>Selenomonas ruminantium</i> (NR_044734.1)	99
		<i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. <i>Lactilytica</i> (NR_036912.1)	98
C15A8	C	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i> (NR_026315.1)	99
		<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> (NR_025524.1)	98
P1I13	D	<i>Lactobacillus vitulinus</i> (NR_041305.1)	95
P3I5	1	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus luteaciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	99
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	99
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	99

P2I17.3	1	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	99
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	99
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	99
C4I3	3	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	97
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	97
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	97
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	97
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	97
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	97
C4I4	5	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	99
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	99
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	99
C4I10	2	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	95
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	95
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	95
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	94
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	94
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	94
P2I15.2	13	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	99
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	99
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	99
P2I17	1	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	99
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	99
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	99
C4I11	11	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	95
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	95
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	94
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	95
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	94
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	94
C4I6	10	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	99
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	99
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	99

C3I8	7	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	99
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	99
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	99
C15A2	9	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	99
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	99
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	99
C13A1	8	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	93
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	93
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	93
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	93
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	93
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	92
C11A6	6	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	99
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	99
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	99
C10A11	4	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	99
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	99
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	99
C13A3	16	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	99
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	99
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	99
C13A7	18	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	92
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	92
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	92
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	91
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	91
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	91
P2I17.2	17	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	98
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	98
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	98

P4I17	19	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	88
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	88
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	88
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	88
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	88
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	88
P4I14	19	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	98
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	98
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	98
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	98
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	98
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	98
P2I14	12	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	98
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	98
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	98
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	98
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	98
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	98
C3I5	14	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	92
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	92
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	92
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	92
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	92
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	92
C14A2	14	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	98
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	98
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	98
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	98
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	98
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	98
C14A8	14	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	99
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	99
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	99
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	99
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	99
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	99
T2A1.1	15	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	98
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	98
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	98
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	98
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	98
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	98
C4I5	15	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	98
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	98
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	98
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	98
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	98
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	98

P1116	15	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	98
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	98
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	98
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	98
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	98
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	98
T1C2	12	<i>Streptococcus lutetiensis</i> (NR_037096.1)	93
		<i>Streptococcus luteciae</i> (NR_042051.1)	93
		<i>Streptococcus equinus</i> (NR_042052.1)	93
		<i>Streptococcus pasteurianus</i> (NR_043660.1)	92
		<i>Streptococcus infantarius</i> (NR_028761.1)	92
		<i>Streptococcus alactolyticus</i> (NR_041781.1)	92

(-) Não faz parte de nenhum biogrupo.