

Efeito do pH *in vitro* sobre a resistência de bactérias do rúmen à perda de potássio intracelular e efeito do pH e de ionóforos sobre a produção de amônia e proteína microbiana

[In vitro effect of pH on resistance of ruminal bacteria to intracellular potassium depletion, and effect of pH and ionophores on ammonia and microbial protein production]

W.M. Leopoldino^{1,5}, R.P. Lana^{2,5*}, A.C. Borges^{2,5}, H.C. Mantovani^{2,5}, R.M.A. Teixeira^{3,6}, J.S. Oliveira^{3,6}, A.R. Jaremtchuk⁴, E.C. Eifert^{1,5}, R.G.R. Martins^{1,7}

¹Doutorando – UFV - Viçosa, MG

²Universidade Federal de Viçosa

Av. P.H. Rolfs, s/n

36571-000 – Viçosa, MG

³Estudante de Graduação – UFV – Viçosa, MG

⁴Pontifícia Universidade Católica – Curitiba, PR

⁵Bolsista do CNPq

⁶Bolsista de Iniciação Científica - FAPEMIG

⁷Bolsista da CAPES

RESUMO

Em dois estudos, o líquido ruminal de bovinos mantidos sob pastagem foi usado para incubação *in vitro* em diferentes meios artificiais com valores de pH 5,5 e 7,0, para avaliar a ação de níveis crescentes de monensina na resistência à perda de potássio de bactérias do rúmen e verificar o efeito de monensina e lasalocida na produção de amônia e de proteína microbiana em pH 5,5 e 7,0. O meio utilizado para determinar a perda de potássio interferiu nos valores absolutos de potássio. A concentração de monensina necessária para causar a metade da perda máxima de potássio foi de 2,77µM em pH 5,5 e 0,056µM em pH 7,0, evidenciando que as bactérias incubadas em meios com pH 5,5 foram mais resistentes à monensina que aquelas incubadas em meios com pH 7,0. Os ionóforos e a acidez do meio reduziram a produção de amônia, e não se observou interação entre eles. Os ionóforos, independente do pH, inibiram a produção de amônia em 56%. A acidez inibiu a produção de amônia em 50,5%, independente do ionóforo. Os efeitos dos ionóforos e da acidez foram aditivos quando a inibição máxima ocorreu pelo uso de ionóforos com pH baixo (75,2%). A produção de proteína microbiana foi menor quando a lasalocida estava presente no meio de cultura com baixo valor de pH.

Palavras-chave: bactérias, lasalocida, monensina, pH, rúmen

ABSTRACT

Ruminal fluid from steers fed on pasture was incubated with artificial media at pH 5.5 and 7.0 in two experiments. In the first, the effect of monensin level on resistance of ruminal bacteria to potassium depletion was evaluated; in the second, effects of the ionophores monensin and lasalocid on ammonia and protein production were quantified. In experiment 1, culture media affected potassium level. The monensin concentration needed to cause half maximal potassium depletion was 2.77µM at pH 5.5 but was 0.056µM at pH 7.0, showing that bacteria incubated at pH 5.5 were more tolerant to monensin than

Projeto financiado pela FAPEMIG - CBB 2583/97

Recebido para publicação em 12 de julho de 2004

Recebido para publicação, após modificações, em 14 de janeiro de 2005

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: rlana@ufv.br

those incubated at pH 7.0. Both ionophores as well as increased acidity caused decreased ammonia production. Both ionophores inhibited ammonia production by 56%, independently of pH. In cultures incubated at pH 5.5 compared to pH 7.0, ammonia production was decreased by 50.5%, independently of the ionophores. Therefore, effects of ionophores and acidity were additive, and the maximum inhibition occurred in the presence of an ionophore at low pH (75.2%). Microbial protein production was lowest when lasalocid was present in a low pH culture medium, causing inhibition of microbial growth.

Keywords: bacteria, lasalocid, monensin, pH, rumen

INTRODUÇÃO

Monensina e lasalocida são antibióticos (ionóforos) usados para aumentar a eficiência alimentar de ruminantes (Goodrich et al., 1984). A eficiência alimentar é considerada o melhor parâmetro para se avaliar o efeito de ionóforos no desempenho animal, mas experimentos com grande número de animais são caros e demorados. Há, portanto, a necessidade de se aperfeiçoar uma técnica *in vitro* que seja eficiente e de baixo custo.

Os ionóforos inibem principalmente as bactérias Gram-positivas, uma vez que a resistência aos ionóforos está relacionada à presença de uma membrana externa, de natureza lipopolissacarídica, existente em bactérias Gram-negativas (Russell e Strobel, 1988). A monensina é um antiporte que catalisa não apenas trocas de sódio (alta afinidade) e prótons na membrana plasmática, como também permite trocas de prótons e potássio. A lasalocida transporta muitos cátions mono e bivalentes (incluindo prótons) e tem maior afinidade por K^+ (Pressman, 1973, 1976). Lana e Russell (1996) apresentaram uma técnica para avaliação da resistência da população microbiana ruminal *in vivo*, com base na avaliação da diminuição do nível de potássio intracelular quando as bactérias são submetidas a níveis crescentes de ionóforos *in vitro*.

A manipulação da fermentação ruminal pode ser realizada por meio de alterações de pH, fornecimento de ionóforos (antibióticos naturais), entre outros, com intuito de diminuir perdas de energia e proteína por fermentações indesejáveis e impactos ambientais provenientes da emissão de metano na atmosfera.

O efeito dos ionóforos é mais drástico com dietas

à base de forragem, pois, sob essas condições, a taxa de degradação de proteína é muito maior que a taxa de fermentação de carboidratos, tornando os níveis de amônia ruminal mais elevados (Russell, 1996).

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito do pH na resistência da população de bactérias do rúmen à perda de potássio intracelular e o seu efeito associado aos ionóforos monensina e lasalocida sobre a produção de proteína microbiana e de amônia, utilizando-se técnica de incubação *in vitro* em diferentes meios.

MATERIAL E MÉTODOS

Realizaram-se dois experimentos. No primeiro, foram coletados 500ml do líquido ruminal de bovino duas horas após a alimentação com capim-coast-cross (*Cynodon dactylon*). O líquido, filtrado em quatro camadas de gaze, transportado sob anaerobiose para o laboratório, colocado em erlenmeyer e mantido a 39°C por 30 minutos para coleta da fase intermediária, foi centrifugado a $500 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante, centrifugado a $1200 \times g$ por 10 minutos para obtenção do sedimento de populações de bactérias do rúmen, foi suspenso em metade do volume inicial com solução salina (0,9%) e usado como inóculo nos diferentes meios de cultura.

Os meios utilizados foram preparados a partir do sobrenadante do líquido ruminal centrifugado a $500 \times g$ por 15 minutos, autoclavado durante 20 minutos e diluído (1:5) com tampão McDougall (9,8g de $NaHCO_3$, 0,57g de KCl, 0,47g de NaCl, 0,05g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 7g de $NaHPO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,12g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; Silva e Queiroz, 2002), enriquecido por litro com 10ml de solução padrão de vitaminas (10mg de piradoxamina

Efeito do pH in vitro...

2HCl, 20mg de riboflavina, 20mg de tiamina HCl, 20mg de nicotinamida, 20mg de Ca – pantotenato, 10mg de ácido lipóico, 1mg de ácido p-aminobenzóico, 0,5mg de ácido fólico, 0,5mg de biotina, 0,5mg de cianocobalamina, 10mg de piridoxal HCl e 10mg de piridoxina HCl por 100ml de 0,1M K₂HPO₄ ou 0,1M KH₂PO₄ em pH 6,0, 5ml de minerais (500mg de Na₄EDTA, 200mg de FeSO₄ · 7H₂O, 10mg de ZnSO₄ · 7H₂O, 200mg de MnCl₂ · 4H₂O, 20mg de H₃BO₃, 20mg de CoCl₂ · 6H₂O, 1mg de CuCl₂ · 2H₂O, 2mg de NiCl₂ · 6H₂O, 3mg de NaMoO₄ · 2H₂O por litro de H₂O destilada), e meio Chen (292mg de K₂HPO₄ · 3H₂O, 240mg de KH₂PO₄, 480mg de (NH₄)₂SO₄, 480mg de NaCl, 100mg MgSO₄ · 7H₂O, 64mg de CaCl₂ · 2H₂O, 4000mg de Na₂CO₃ e 600mg de cisteína por litro de H₂O destilada; Lana e Russell, 1996), todos novamente autoclavados por 12 minutos.

Incubaram-se 7,6ml de cada um dos três meios em pH 5,5 e 7,0, em duplicata, acrescentando-se 1ml do inóculo, 1ml de caseína hidrolisada (tripticase) a 15%, 0,2ml de etanol a 99% e 0,2ml de glicose a 1,5%. A incubação foi feita a 39°C sob anaerobiose durante três dias, realizando-se transferência a cada 24 horas de 1ml da cultura inicial para novos tubos nas mesmas condições acima. No terceiro dia, foi feito o teste de resistência bacteriana, transferindo-se 1,4ml do meio incubado para cinco novos tubos, adicionando-se 0,1ml de solução de etanol (99%) com níveis crescentes de monensina (0; 0,16; 0,31; 1,25 e 5µM como concentração final), seguindo-se incubação de 10 minutos a 39°C em anaerobiose. De acordo com Lana e Russell (1996), coletou-se 1ml de amostras em tubos de 1,5ml e centrifugou-se a 10.000 × g por cinco minutos, por meio de uma camada de 0,3ml de óleo silicone (mistura 50:50 dos óleos Hysol 550 e 560)¹. Os tubos foram congelados a -20°C, os sedimentos celulares removidos pelo corte de sua parte inferior, e as células digeridas com HNO₃3N em igual volume final do meio. O resíduo não digerido foi removido por centrifugação 10.000 × g por cinco minutos, e o potássio determinado em espectrofotômetro de chama. A perda do potássio celular foi estimada em relação às amostras incubadas sem monensina.

¹ Hysol Co., Olean, NY

Utilizou-se delineamento inteiramente ao acaso, em fatorial 3×2×5 (três meios, dois valores de pH e cinco níveis de monensina), com duas repetições, sendo realizadas análises de variância, incluindo os efeitos principais e de interação (User's... 1999). Fez-se análise de regressão da recíproca da perda de potássio intracelular em função da recíproca da concentração de monensina para determinar a perda máxima de potássio (K_{max}) e a concentração de monensina necessária para causar a metade da perda máxima de potássio (K_d), segundo Lana e Russell (1996).

No segundo experimento, um bovino fistulado no rúmen, alimentado uma vez ao dia com dieta exclusiva de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) picado, foi utilizado como doador de líquido do rúmen. Após a incubação *in vitro* do líquido, coletado duas horas após alimentação, adicionou-se suspensão de amido (10g/l) a 39°C em anaerobiose por 19 horas, até atingir pH de 5,5. O meio foi resfriado a 5°C e centrifugado a 500 × g por 15 minutos. O sobrenadante foi autoclavado por 20 minutos e armazenado em geladeira. Para obter o líquido de rúmen com valor de pH 7,0, o mesmo foi coletado antes da alimentação, resfriado a 5°C e centrifugado a 500 × g por 15 minutos. O sobrenadante foi autoclavado por 20 minutos e armazenado em geladeira.

O inóculo, obtido de líquido ruminal coletado duas horas após a alimentação e mantido em banho-maria a 39°C sob anaerobiose, ficou em repouso por 30 minutos para a obtenção do líquido da fase intermediária com a população de bactérias do rúmen.

Incubaram-se a 39°C, em anaerobiose, 7,8ml dos meios (pH 5,5 ou 7,0), em duplicata, acrescentando-se 1ml de inóculo, 1ml de caseína hidrolisada (tripticase 15%) e 0,2ml de etanol a 99%, na ausência (controle) ou presença dos ionóforos monensina e lasalocida, durante oito dias. Os ionóforos foram adicionados para atingir 5µM. A solução alcoólica usada foi obtida adicionando-se 0,03465g de monensina ou 0,03065g de lasalocida por 20ml de etanol (99%), seguida de diluição de 1:9 com etanol.

A cada 24 horas de incubação foram retiradas da cultura duas alíquotas de 1,0ml para a

determinação de amônia (Channey e Marbach, 1962) e para análise de proteína microbiana (Lowry et al., 1951). Em seguida, as alíquotas foram centrifugadas em tubos de 1,5ml a $10.000 \times g$ por 10 minutos; o sobrenadante ou o sedimento celular foi coletado e congelado para posteriores análises. Na obtenção do sedimento celular, acrescentou-se 1ml de solução salina (0,9% de NaCl) na amostra acima, centrifugando-se a $10.000 \times g$ por 10 minutos e retirando-se o sobrenadante. Adicionou-se novamente 1ml de solução salina, centrifugou-se, retirou-se o sobrenadante e dissolveu-se o sedimento celular em água destilada ao volume inicial de 1ml.

Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso para avaliar os efeitos de ionóforos, em dois valores de pH, em duplicata, durante oito dias. Foram realizadas análises de variância, avaliando-se os efeitos dos aditivos, pH e suas interações (User's... 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração inicial de potássio intracelular foi maior em meio onde as bactérias foram submetidas ao pH 7,0, e ocorreu decréscimo com abaixamento de pH e aumento do nível de monensina ($P < 0,001$; Tab. 1). O meio contendo líquido ruminal (LR) apresentou valor mais alto de potássio, provavelmente em razão do alto teor de potássio, quando comparado com os meios McDougall enriquecido e Chen. O meio para determinar a perda de potássio interferiu nos valores absolutos de potássio, porém sem alterar a ação de níveis crescentes de monensina. À medida que se aumentou a concentração de monensina, houve redução da concentração de potássio intracelular da população bacteriana do rúmen. O meio pode causar contaminações de sódio e de potássio (Russell, 1996), interferindo na ação do ionóforo, que depende do gradiente de concentração do íon na membrana.

Tabela 1. Concentração de potássio intracelular (mmol/L) em populações de bactérias do rúmen incubadas em diferentes meios de cultura e pH e tratadas com cinco níveis de monensina a 39°C por 10 minutos¹

Concentração de monensina (μM)	Líquido ruminal + McDougall		McDougall enriquecido		Chen	
	pH 5,5	pH 7,0	pH 5,5	pH 7,0	pH 5,5	pH 7,0
0,00	12,8	35,8	5,7	17,9	6,4	11,5
0,16	12,8	23,0	5,1	10,2	5,1	7,7
0,31	11,5	24,3	5,1	10,2	3,8	8,9
1,25	10,2	20,5	5,1	18,9	3,8	7,7
5,00	8,9	16,6	5,1	7,7	2,5	6,4

¹ Houve efeito de meio de cultura, pH e monensina ($P < 0,001$).

A partir das equações de regressão linear da recíproca da concentração de monensina *versus* a recíproca da perda de potássio intracelular para os valores de pH de 5,5 e 7,0 nos diferentes meios, obtiveram-se as constantes de resistência à monensina, em que a perda máxima de potássio (K_{max}) pode ser obtida pelo inverso do intercepto da ordenada ($1/a$) e a concentração de monensina necessária para causar a metade da perda máxima (K_d) pela divisão da inclinação da reta, pelo intercepto da ordenada (b/a ; Fig. 1).

Houve perda do potássio intracelular pela ação da monensina *in vitro* em diferentes meios e em dois valores de pH. As curvas foram obtidas pelas médias das repetições (Fig. 2).

O K_{max} obtido foi de 58,8% para o pH 5,5 e de 46,5% para o pH 7,0. O efeito de pH foi mais expressivo no K_d , de $2,77\mu\text{M}$ no pH 5,5 e $0,056\mu\text{M}$ de monensina no pH 7,0. Esse efeito mostra que as bactérias incubadas em meio com pH 5,5 são mais resistentes à monensina que aquelas incubadas em meios com pH 7,0 (Fig. 1).

Efeito do pH in vitro...

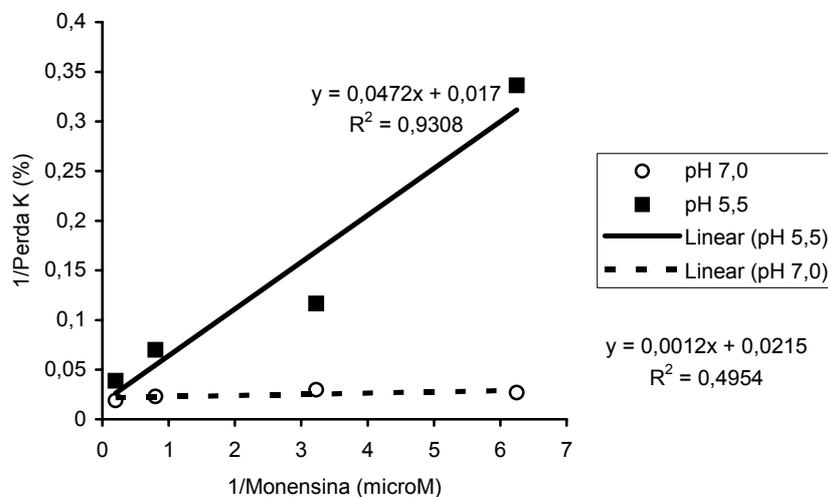


Figura 1. Relação entre a recíproca da concentração de monensina e a recíproca da perda de potássio intracelular na população de bactérias do rúmen em meios com pH 5,5 e 7,0.

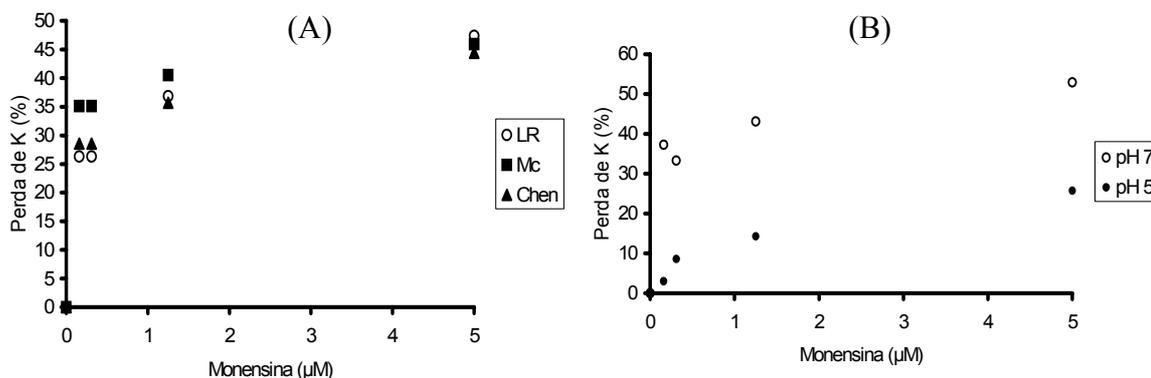


Figura 2. (A) Efeito da monensina na perda de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen incubadas a 39°C por 10 minutos em diferentes meios (LR – líquido de rúmen; Mc – McDougall). (B) Efeito da monensina na perda de potássio intracelular de populações de bactérias do rúmen incubadas a 39°C por 10 minutos em dois valores de pH.

Em trabalhos anteriores, constatou-se maior tolerância à perda do potássio intracelular pela ação da monensina *in vitro* em bactérias provenientes de animais que receberam dietas contendo lipídios ou os ionóforos monensina e lasalocida (Lana e Russell, 1996), ou nível elevado de concentrado em relação a volumoso (Lana e Russell, 2001). Esses efeitos foram

consistentes com a possível mudança da população de bactérias do rúmen de Gram-positiva para Gram-negativa e a conseqüente mudança nos parâmetros de fermentação ruminal, como a diminuição da relação acetato:propionato no líquido ruminal e da produção de metano.

O pH do meio também pode alterar a população de bactérias do rúmen quanto à perda de potássio intracelular (Fig. 1 e 2). O pH baixo reduz o pH intracelular com conseqüente redução na atividade enzimática, assim, diminui ou inibe o crescimento celular de algumas bactérias, enquanto outras, mais adaptadas ao pH baixo, como o *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* sp., proliferam.

No segundo estudo, os ionóforos e a acidez do

meio reduziram a produção de amônia ($P < 0,05$), e não se observou interação entre eles (Fig. 3). Não houve diferença entre os ionóforos, pois, independente do pH do meio, eles inibiram a produção de amônia em 56% ($P < 0,05$). A acidez, por sua vez, inibiu a produção de amônia em 50,5% ($P < 0,05$), independente dos ionóforos. Portanto, o efeito dos ionóforos e a acidez foram aditivos, quando a inibição máxima ocorreu pelo uso de ionóforos em pH baixo (75,2%; $P < 0,05$).

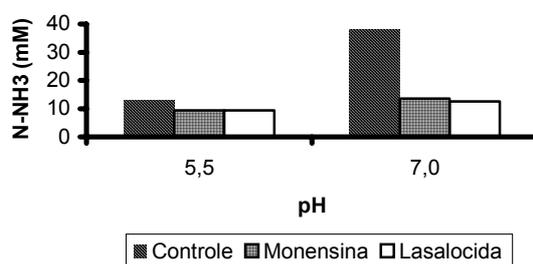


Figura 3. Produção média de amônia (mM) após 24 horas de incubação *in vitro* da população de bactérias do rúmen sob dois valores de pH e ionóforos (monensina e lasalocida).

O efeito de ionóforos em reduzir a produção de amônia foi verificado anteriormente, tanto *in vitro* (Van Nevel e Demeyer, 1977) como *in vivo* (Dinius et al., 1976). A menor produção de amônia (10,6 mM) no pH 5,5 é semelhante à já observada por Lana et al. (1998). O decréscimo da produção de amônia atribuído à ação dos ionóforos é conseqüência da redução da degradação da proteína. Esse fato é de grande importância para o desempenho animal, pois caracteriza o efeito chamado *protein-sparing*. Isso significa aumento da quantidade da proteína da dieta que escapa da degradação ruminal e fica disponível para a digestão no abomaso e no intestino delgado e posterior absorção dos aminoácidos pelo intestino delgado (Van Nevel e Demeyer, 1977; Russell, 1996). Esses mesmos efeitos podem ser observados quando ocorre acidificação do meio atribuído ao fornecimento de carboidratos não fibrosos (Lana et al., 1998).

De modo geral, não houve efeito dos ionóforos e acidez sobre a produção de proteína microbiana (990,8mg/l), exceto quando a lasalocida estava presente no meio de cultura com baixo valor de pH. Nesse caso, ocorreu inibição ($P < 0,05$) do crescimento microbiano (Fig. 4). Estudos anteriores com culturas de população de bactérias do rúmen indicaram que a monensina provocou decréscimo na quantidade de proteína microbiana, quando a tripticase foi usada como substrato da fermentação (Van Nevel e Demeyer, 1977; Russell e Martin, 1984). Lana e Russell (1996), ao usarem uma nova técnica de determinação da resistência microbiana à perda do potássio intracelular, observaram que a lasalocida foi mais potente inibidor *in vitro* dos microrganismos ruminais do que a monensina, aspecto confirmado pelo resultado do segundo estudo.

Efeito do pH in vitro...

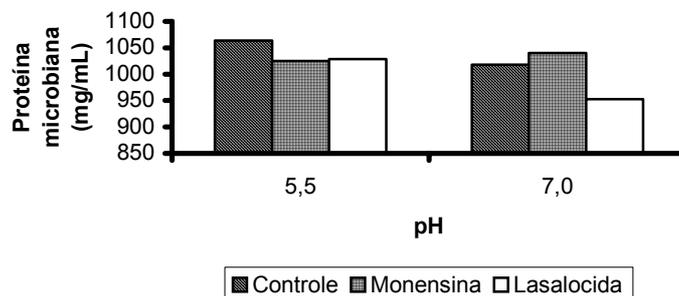


Figura 4. Proteína microbiana (mg/l) média após 24 horas de incubação *in vitro* da população de bactérias do rúmen sob dois valores de pH com ou sem ionóforos (monensina e lasalocida).

CONCLUSÕES

O aumento da acidez torna a população microbiana do rúmen mais resistente à perda de potássio intracelular quando testado com monensina. Os ionóforos e a acidez têm efeito sinérgico na redução da produção de amônia, e a lasalocida inibe o crescimento da população de bactérias do rúmen em meio de cultura com baixo pH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.*, v.8, p.130-132, 1962.

DINIUS, D.A.; SIMPSON, M.E.; MARSH, P.B. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. *J. Anim. Sci.*, v.42, p.229-234, 1976.

GOODRICH, R.D.; GARRETT, J.E.; GAST, D.R. et al. Influence of monensin on the performance of cattle. *J. Anim. Sci.*, v.58, p.484-498, 1984.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumoso ou concentrado. *Rev. Bras. Zootec.*, v.30, p.254-260, 2001.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, p.4499-4503, 1996.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; VAN AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating ruminal methane

and ammonia production. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.2190-2196, 1998.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.

PRESSMAN, B.C. Biological applications of ionophores. *Ann. Rev. Biochem.*, v.45, p.501-530, 1976.

PRESSMAN, B.C. Properties of ionophores with broad range cation selectivity. *Fed. Proc.*, v.32, p.1698-1703, 1973.

RUSSELL, J.B. Bacteria: mechanisms of ionophore action in ruminal bacteria. In: SYMPOSIUM SCIENTIFIC UPDATE ON RUMENSIN/TYLAN FOR THE PROFESSIONAL FEEDLOT CONSULTANT, 1996, Amarillo, TX. *Proceedings...* Indianapolis, 1996. p.E1-E19.

RUSSELL, J.B.; MARTIN, S.A. Effects of various methane inhibitors on the fermentation of amino acids by mixed rumen microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, v.59, p.1329-1338, 1984.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Effects of additives on *in vitro* ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another Gram-positive antibiotic. *J. Anim. Sci.*, v.66, p.552-558, 1988.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3.ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 235p.

USER'S guide: statistics. Release 6.13. Cary, NC: SAS Institute, 1999.

VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.34, p.251-257, 1977.