WALTER GUIMARÃES OTERO

Avaliação da diversidade microbiana e degradabilidade *in situ* em animais tratados com preparado de anticorpos policlonais contra bactérias produtoras de lactato e bactérias proteolíticas

Pirassununga
2008

WALTER GUIMARÃES OTERO

Avaliação da diversidade microbiana e degradabilidade *in situ* em animais tratados com preparado de anticorpos policlonais contra bactérias produtoras de lactato e bactérias proteolíticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza
Rodrigues

Pirassununga

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2065
FMVZ

Otero, Walter Guimarães

Avaliação da diversidade microbiana e degradabilidade *in situ* em animais tratados com preparado de anticorpos policlonais contra bactérias produtoras de lactato e bactérias proteolíticas / Walter Guimarães Otero. – Pirassununga : W. G. Otero, 2008. 85 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues.

1. Degradabilidade *in situ*. 2. Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação. 3. Ionóforos. 4. Preparado de anticorpos policlonais. I. Título.

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Carta cartalográfica			85f.	84 f.
9	1	11	85f.	84 f.
11	1	7	85f.	84 f.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de um aditivo alimentar alternativo para dietas de ruminantes", protocolado sob o nº1254/2007, utilizando 09 (nove) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião da referida Comissão do dia 12 de dezembro de 2007.

We certify that the Research "Evaluation of an alternative feed additive for ruminants diets", protocol number 1254/2007, utilizing 09 (nine) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/12/2007.

São Paulo, 18 de dezembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OTERO, Walter Guimarães

Título: Avaliação da diversidade microbiana e degradabilidade *in situ* em animais tratados com preparado de anticorpos policlonais contra bactérias produtoras de lactato e bactérias proteolíticas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Francisco e Ana Carmen, que além de acreditar em mim sempre, jamais mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

E ao meu irmão, Paulo, por ser um grande amigo, pela coragem e força de vontade.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal por disponibilizar suporte teórico e prático mais que necessário para realizar o mestrado.

Ao Professor Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, primeiramente por acreditar em mim, depois pela amizade, paciência (e muita) e orientação durante o curso de pós-graduação e pela grande dedicação à pesquisa, que sempre me contagiou, e espero que continue contagiando.

Ao Prof. Dr. Mario de Beni Arigoni por também possibilitar o projeto e por me mandar uma colega tão especial como a Carol. E também a todo o pessoal de Botucatu, João, Rodrigo, Danilo e Professora Cintia.

À Professora Vivian Helena Pellizari, pela disponibilidade do laboratório, ensinamentos e a todo pessoal do laboratório 148 do ICB, pela ajuda, ensinamento, alegria e paciência.

A todo o corpo docente do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), Prof. Gobesso, Profa. Maria de Fátima, Prof. Messias, Prof. Augusto, Prof. Aníbal, Prof. Romualdo, Prof. Marcos Veiga, Prof. Luis Felipe e Prof. Francisco Rennó, por sempre estarem disponível para ajudar em dúvidas.

Ao Ari, Gilson, Simi, Isabel e Everson J. Lázaro, técnicos do Laboratório de Bromatologia (VNP/FMVZ–USP) pela paciência, bom-humor e, principalmente, grande conhecimento técnico, os quais foram fundamentais para realização das análises bromatológicas deste projeto.

Ao funcionário responsável pelo setor de fistulados do VNP (FMVZ–USP), Gilmar E. Botteon, não só pela total disposição em ensinar e ajudar, mas por tornar momentos de stress em paz total.

À CAMAS Inc[®]. pelo fornecimento do produto testado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro ao projeto.

À amiga Dra. Carolina Tobias Marino, pela co-orientação, paciência gigantesca comigo, auxílio em todo o projeto, amizade sincera e diversão.

Ao amigo e pesquisador Dr. Ricardo Lopes Dias da Costa, por sempre ter acreditado em mim e por ter me permitido sentir sua paixão pela pesquisa. Isso me inspirou muito.

Ao meu menino, Samuel dos Santos Stabile, que ajudou sempre que precisei nesse projeto e em estudos madrugada adentro. E por ter me agüentado durante todo o período de mestrado, se tornando um grande irmão.

Ao Dr. Marcos Barbosa Ferreira (Forrest Gump), pelas histórias, ensinamentos e amizade. Sem ele esse período de aprendizagem seria menos didático. Ao pessoal do CEPTOX pelos cafezinhos e conversas futebolísticas

Ao Rafael Bueno (Sr. Calabresa) pela amizade, ajuda nos estudos e caronas, vez ou outra.

À Cris, Alessandra e Zequinha, secretários do VNP, pela pronta disposição dispendida.

Aos amigos Fernanda (Xeila) e Flávio pela ajuda no projeto e pelos momentos de diversão.

Aos amigos de Pós-Graduação do VNP, Carolina Fernanda, Daniel (Emú), Diego, Estelinha, Rafael, Felipão, Vinícius, Willian, Rodrigo, Andréia, Ariana, Pascoal, Zé Ésler, Milton, Jefferson, Érika, Paula, Dani, Juliana, Juliane, Julianne, Camila, Cris, Bruna, Waleska, Alessandra, Renata, Lucas, Artur, Brunão, Andrezza, Monalisa e Laura pela alegre convivência que tivemos.

Resumo

Otero, W. G. **Avaliação da diversidade microbiana e degradabilidade *in situ* em animais tratados com preparado de anticorpos policlonais contra bactérias produtoras de lactato e bactérias proteolíticas.** [Evaluation of microbial diversity and *in situ* degradability in animals treated with polyclonal antibody preparation against lactate-producer and proteolytic bacteria]. 2008. **85 f.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

A imunidade passiva surge como uma alternativa para a manipulação da fermentação ruminal e anticorpos de origem aviária contra bactérias específicas começam a ser pesquisados. Objetivou-se com este trabalho avaliar um preparado de anticorpos policlonais contra *Streptococcus bovis*, *Fusobacterium necrophorum* e algumas cepas de bactérias proteolíticas (*Peptostreptococcus anacrobis*, *Clostridium aminophilum* e *Clostridium sticklandii*) sobre a diversidade microbiana ruminal e degradabilidade *in situ* de alguns alimentos. Foram utilizadas nove vacas mestiças portadoras de cânula ruminal. O delineamento experimental foi o quadrado latino 3 x 3 replicado 3 vezes, com arranjo fatorial de tratamentos 3 x 3 referente a 2 modificadores ruminais representados pela monensina (MON) e pelo preparado de anticorpos policlonais (PAP) mais o grupo controle e 3 fontes energéticas suplementadas na dieta, representadas pelo milho seco moído (MSM), silagem de grão úmido de milho (SGUM) e polpa cítrica (PC). Cada subperíodo experimental foi composto de 21 dias, sendo 16 dias para adaptação aos tratamentos e 5 para coleta de dados. A degradabilidade *in situ* dos alimentos testados foi mensurada através da técnica de saco de náilon. A coleta de amostras para a análise quantitativa de protozoários ocorreu no 21º dia de cada período, às 0 e 4 horas pós-alimentação, sendo estas coletadas por varredura do assoalho ruminal. O conteúdo ruminal foi coletado no 21º dia de cada período, às 4 h pós-alimentação, para análise da diversidade microbiana através de técnica de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação. Observou-se que dietas contendo PC apresentaram aumento de 80,6%; 75,4% e 66,8% da degradabilidade efetiva da FDN da cana-de-açúcar para

as taxas de passagem de 2, 5, 8%/h, respectivamente, em relação ao grupo tratado com SGUM, mas não em relação ao grupo com MSM. O tratamento com PAP demonstrou efeito sobre a fração solúvel ("a") do amido do MSM, diminuindo esta em 45,26% e 45,37% em relação ao grupo CON e grupo MON, respectivamente. Observou-se que o tratamento com MON diminuiu em 16,14% o valor da fração potencialmente degradável ("b") da MS da SGUM em relação ao grupo CON, mas não em relação ao grupo tratado com PAP. Já sobre a taxa de degradação ("c"), a MON aumentou o valor desta em 63,18% e 60,65% em relação ao grupo CON e PAP, respectivamente. Também a MON diminuiu a degradabilidade potencial (Dp) da MS da SGUM em 3,40% em relação ao grupo CON, mas não em relação ao grupo tratado com PAP. Observou-se que o PAP aumentou em 93,65% a contagem relativa de *Isotricha* em relação ao grupo CON, mas não em relação ao grupo MON. Já a PC aumentou em 334,42% (0h) e 399,75% (4h) a contagem relativa de protozoários do gênero *Isotricha* em relação às dietas de MSM e SGUM. Observou-se que o tratamento com PC aumentou em 52% a contagem do número de bandas em DGGE para a comunidade *Archaea*, em relação ao grupo MSM, sem diferir do grupo SGUM. Em linhas gerais, no presente experimento, não foi possível atribuir um padrão na estrutura de amplificação das comunidades *Bacteria* ou *Archaea* do conteúdo ruminal de animais tratados com dois diferentes modificadores ruminais ou 3 fontes energéticas distintas.

Palavras-chave: Degradabilidade *in situ*. Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação. Ionóforos. Preparado de anticorpos policlonais.

ABSTRACT

Otero, W. G. **Evaluation of microbial diversity and *in situ* degradability in animals treated with polyclonal antibody preparation against lactate-producer and proteolytic bacteria.** [Avaliação da diversidade microbiana e degradabilidade *in situ* em animais tratados com preparado de anticorpos policlonais contra bactérias produtoras de lactato e bactérias proteolíticas]. 2008. **85 f.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

Passive immunity arises as an alternative for ruminal fermentation manipulation and aviary antibodies against specific bacteria starts to be studied. The objective of the present study was to evaluate a polyclonal antibody preparation (PAP) against *Streptococcus bovis*, *Fusobacterium necrophorum* and some proteolytic bacteria (*Peptostreptococcus anacrobis*, *Clostridium aminophilum* and *Clostridium sticklandii*) on ruminal microbial community diversity and *in situ* degradability of some feedstuffs. Nine ruminally fistulated cows were used in a latin square 3 x 3 replicated 3 times with factorial arrangement of treatments 3 x 3 regarding to two rumen modifiers [monensin (MON) and (PAP) plus a control group (CON)] and three energetic sources supplemented in the diet represented by the dry-grounded corn grain (CG), high moisture corn silage (HMCS) and citrus pulp (CiPu). Each trial lasted 21 days where 16 days were for treatments adaptation and 5 for data collection. *In situ* degradability of the experimental diets was measured by nylon bag *in situ* technique. The collection of samples for quantitative protozoa analysis occurred on day 21 of each trial at 0 and 4 h after feeding by scanning the ruminal floor. The ruminal content was collected in the day 21 of each trial at 0 and 4 h after feeding for the analysis of microbial ruminal diversity by the denaturing gradient gel electrophoresis. Diets with CiPu presented an increase of 80.6%; 75.4% and 66.8% in effective degradability of NDF of sugar cane for outflow rates of 0.02, 0.05, 0.08/h, respectively, in relation to group treated with HMCS but not to the group CG. The group treated with PAP showed effect on soluble fraction ("a") of starch of CG decreasing it in 45.26% and 45.37% in relation to CON and MON group respectively. It was observed that the treatment with MON decreased in 16.14% the value of potentially soluble fraction ("b") of DM from HMCS in relation to CON group but not in relation to PAP. For the degradation rate ("c") the MON increased it values in 63.18%

and 60.65% in relation to CON and PAP group respectively. Also, MON treatment decreased potential degradability (Pd) of DM of HMCS in 3.40% in relation to CON group but not to PAP. It was observed that PAP treatment increased in 93.65% the relative counting of *Isotricha* in relation to CON group but not in relation to MON group. It was observed that CiPu diet increased in 334.42% (0h) and 399.75% (4h) the relative counting of *Isotricha* in relation to CG and HMCS. It was observed that CiPu increased in 52% the counting of the numbers of bands in DGGE for *Archaea* community in relation to CG without difference to HMCS group. In general lines, in the present experiment, it was not possible to assign that there was a pattern in the structures of amplification by *Bacteria* and *Archaea* communities of the ruminal content of animals treated with two different rumen modifiers or three distinct energetic sources.

Key words: Denaturing Gradient Gel by Electrophoresis. *In situ* degradability. Ionophores. Polyclonal antibody preparation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfis de amplificação em eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) para *Bacteria* produzido a partir de amostras de conteúdo ruminal de animais alimentados com (A) MSM: milho seco moído; (B) SGUM: silagem de grão úmido de milho ou (C) PC: polpa cítrica. Nas legendas, à direita dos perfis estão o número da vaca, período (P), modificador ruminal (CON = controle; MON = monensina; PAP = preparado de anticorpos policlonais) e dieta. Os coeficientes de similaridade, determinados pelo software Bionumerics, utilizando-se o método de agrupamento different bands, estão demonstrados do lado esquerdo de cada painel.....64

Figura 2. Perfis de amplificação em eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) para *Archaea* produzido a partir de amostras de conteúdo ruminal de animais alimentados com (A) MSM: milho seco moído; (B) SGUM: silagem de grão úmido de milho ou (C) PC: polpa cítrica. Nas legendas, à direita dos perfis estão o número da vaca, período (P), modificador ruminal (CON = controle; MON = monensina; PAP = preparado de anticorpos policlonais) e dieta. Os coeficientes de similaridade, determinados pelo software Bionumerics, utilizando-se o método de agrupamento different bands, estão demonstrados do lado esquerdo de cada painel.....66

Figura 3. Perfis de amplificação em eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) para *Bacteria* produzido a partir de amostras de conteúdo ruminal de animais tratados com (A) CON: controle; (B) MON: monensina ou (C) PAP: preparado de anticorpos policlonais. Nas legendas, à direita dos perfis estão o número do animal, período (P), modificador ruminal e fonte energética (MSM = milho seco moído; SGUM = silagem de grão úmido de milho ou PC = polpa cítrica). Os coeficientes de similaridade, determinados pelo software Bionumerics, utilizando-se o método de agrupamento different bands, estão demonstrados do lado esquerdo de cada painel.....67

Figura 4. Perfis de amplificação em eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) para *Archaea* produzido a partir de amostras de conteúdo ruminal de animais tratados com (A) CON: controle; (B) MON: monensina ou (C) PAP: preparado de anticorpos policlonais.. Nas legendas, à direita dos perfis estão o número do animal, período (P), modificador ruminal e fonte energética (MSM = milho seco moído; SGUM = silagem de grão úmido de milho ou PC = polpa cítrica). Os coeficientes de similaridade, determinados pelo software Bionumerics, utilizando-se o método de agrupamento different bands, estão demonstrados do lado esquerdo de cada painel.....69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Esquema do delineamento experimental em quadrado latino 3 X 3 triplicado com arranjo fatorial de tratamentos 3 X 3.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais, com base na matéria seca.....	39
Tabela 2 - Esquema da análise de variância para delineamento em quadrado latino triplo com arranjo fatorial de tratamentos.....	46
Tabela 3 - Degradabilidade in situ da Matéria Seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN) da cana-de-açúcar sob influência de dois modificadores ruminais e três fontes energéticas	49
Tabela 4 - Degradabilidade in situ da Matéria Seca (MS) e da Proteína Bruta (PB) do farelo de soja sob influência de dois modificadores ruminais e três fontes energéticas.....	53
Tabela 5 - Efeito dos modificadores ruminais sobre a degradabilidade in situ da Matéria Seca e do Amido do Milho Seco Moído.....	54
Tabela 6 - Efeito dos modificadores ruminais sobre a degradabilidade in situ da Matéria Seca e do Amido da Silagem de Grão Úmido de Milho.....	55
Tabela 7 - Efeito dos modificadores ruminais sobre a degradabilidade in situ da Matéria Seca e da Pectina da Polpa Cítrica.....	57
Tabela 8 - Contagem absoluta de protozoários ($\times 10^3/\text{mL}$) obtida com os tratamentos compostos por diferentes modificadores ruminais e fontes energéticas.....	59
Tabela 9 - Contagem relativa de protozoários (%) obtida com os tratamentos compostos por diferentes modificadores ruminais e fontes energéticas.....	61
Tabela 10 - Número de bandas amplificadas por eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) para comunidade <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> e soma de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> obtida com os tratamentos compostos por diferentes modificadores ruminais e fontes energéticas.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

EC	European Community
MS	Matéria seca
FDN	Fibra em detergente neutro
PB	Proteína bruta
PC	Polpa cítrica
CH ₄	Metano
CO ₂	Gás carbônico
MON	Monensina
PAP	Preparado de anticorpos policlonais
CON	Controle
MSM	Milho seco moído
SGUM	Silagem de grão úmido de milho
CNF	Carboidrato não fibroso
EE	Extrato etéreo
NDT	Nutrientes digestíveis totais
CNCPS	Cornell Net Carbohydrate and Protein System
EB	Energia Bruta
FDA	Fibra em detergente ácido
PEC	Pectina
AMI	Amido
De	Degradabilidade ruminal efetiva
Dp	Degradabilidade ruminal potencial
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Princípios da fermentação ruminal.....	19
2.1.1 Ecossistema microbiano	20
2.1.1.1. Bactérias Celulolíticas	20
2.1.1.2. Bactérias Amilolíticas	21
2.1.1.3. Bactérias Proteolíticas.....	21
2.1.1.4. Bactérias Metanogênicas	23
2.1.1.5. Bactérias utilizadoras de ácido láctico	23
2.1.1.6. Protozoários	24
2.1.2 Ambiente ruminal	25
2.1.3 Substratos da fermentação ruminal.....	25
2.2 Métodos de manipulação da fermentação ruminal.....	26
2.2.1. Aditivos microbianos ou probióticos	27
2.2.2. Extrato de própolis	28
2.2.3. Anticorpos específicos contra bactérias ruminais	29
2.3 Etiopatogenia da acidose ruminal	30
2.4 Métodos de controle da acidose	32
2.4.1. Manejo alimentar.....	33
2.4.2. Estimulação da produção de tamponantes	34
2.5 Uso de antibióticos para o controle da acidose	34
3 OBJETIVOS.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Animais e instalação	38
4.2 Tratamentos	38
4.3 Período experimental	42
4.4 Degradabilidade <i>in situ</i>	42
4.5 Contagem total e diferencial de protozoários ruminais.....	43
4.6 Análise de comunidade bacteriana ruminal.....	44
4.6.1 Extração do DNA das amostras de líquido ruminal	44
4.6.2 PCR para amplificação de DNA da comunidade <i>Bactéria</i> e <i>Archaea</i>	45
4.6.3 Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE)	46
4.7 Análise Estatística	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Com o crescimento da produção brasileira de carne nos últimos anos, os setores responsáveis por otimizar a cadeia produtiva têm criado meios de chegar a uma maior produção deste alimento em um menor espaço de tempo.

O manejo alimentar dos animais é uma parte dessa cadeia que requer cuidado, principalmente quando se trata de criações intensivas, como é o caso dos confinamentos, onde são empregadas dietas ricas em carboidratos fermentescíveis, o que diminui o pH a níveis preocupantes (SLYTER, 1976). Uma ferramenta de grande utilidade nos confinamentos é a utilização do ionóforo monensina, o qual vem sendo empregado com sucesso. Dentre outras funções, a monensina é um ionóforo capaz de diminuir a produção de ácido láctico, contribuindo para a elevação do pH ruminal (NAGARAJA et al., 1982). Como é classificada como um antibiótico, devido a sua ação contra as bactérias, fungos e protozoários (CAMPOS NETO et al., 1995), sua presença na dieta animal tem levantado questões relacionadas à saúde humana.

Através do Regulamento (EC) Nº 1831/2003 (EUROPA 2003), a Comunidade Européia determinou a proibição da utilização de coccidiostáticos e antibióticos como aditivos alimentares para bovinos. Tal proibição é justificada, sem comprovação científica, por uma possível relação entre o aumento da resistência de microorganismos a antibióticos, observados na medicina humana, e a utilização de antibióticos e substâncias similares nas dietas animais. Como o Brasil é um grande exportador de carne, novas alternativas ao uso de ionóforos vêm sendo pesquisadas a fim de manter este mercado, tão importante como é o caso do mercado europeu.

O conceito de imunidade passiva vem sendo testado por alguns autores (BERGHMAN e WAGHELA, 2004; HARDY, 2002), como alternativa a antibióticos, na manipulação da fermentação ruminal. Já existem trabalhos demonstrando que o uso de um preparado de anticorpos policlonais de origem aviária contra bactérias como *Streptococcus bovis* e *Fusobacterium necrophorum* aumentou a eficiência alimentar em dietas com alto concentrado para bovinos, sem alteração das características de carcaça (DiLORENZO et al., 2006).

Portanto, objetivou-se com o presente estudo, avaliar os efeitos de um preparado de anticorpos policlonais de origem aviária contra *Streptococcus bovis*, *Fusobacterium necrophorum* e algumas cepas de bactérias proteolíticas (*Peptostreptococcus anacrobis*, *Clostridium aminophilum* e *Clostridium sticklandii*) sobre a degradabilidade ruminal *in situ* dos alimentos, bem como sobre a contagem e diversidade microbiana em fêmeas bovinas suplementadas com três diferentes fontes energéticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Visando otimizar a produção de carne bovina em um menor espaço de tempo, sistemas intensivos de criação, como o confinamento, têm ganhado espaço na pecuária brasileira. Em 2007, segundo o ANUALPEC (2007), o sistema de engorda intensiva registrou um total de 5,858 milhões de cabeças, dos quais 2,375 milhões foram relacionados a confinamentos. Nesse sistema, a otimização do manejo nutricional se faz necessária, principalmente pela alta presença de carboidratos prontamente fermentescíveis nas dietas, o que altera a fermentação ruminal, podendo ocasionar distúrbios digestivos, como a acidose láctica (NOCEK, 1997).

Ionóforos, como a monensina, têm sido amplamente utilizados na produção animal devido à seu efeito positivo no metabolismo energético e protéico no rúmen, além da diminuição da incidência de distúrbios digestivos (RODRIGUES et al., 2001). McGUFFEY et al. (2001), em revisão da literatura, reportaram menor perda de condição corporal, melhora no status energético durante o pico da produção de leite, traduzido como melhora na eficiência mesmo com a baixa ingestão de matéria seca, e diminuição da incidência de cetose e de deslocamento de abomaso com a utilização da monensina. Devido a esta eficiência, esses fármacos vêm sendo largamente utilizados nos sistemas intensivos de produção.

O atual desafio é encontrar alternativas que sejam tão eficazes quanto os ionóforos, já que este começa a sofrer resistência pelos grandes importadores de carne bovina do Brasil.

2.1 Princípios da fermentação ruminal

A fermentação ruminal é um processo resultante de atividades físicas e microbiológicas que transformam os substratos da dieta em produtos que são úteis (ácidos graxos de cadeia curta, proteína microbiana, vitaminas do complexo B), inúteis [metano (CH_4), gás carbônico (CO_2)] e também nocivos (amônia), quando em excesso, para o animal hospedeiro. A população microbiana é mantida no rúmen através da ingestão contínua de alimentos, da adição de tampões produzidos pelo

animal hospedeiro, da eliminação dos ácidos produzidos e dos resíduos alimentícios não digestíveis, bem como da manutenção das condições ambientais deste órgão (pH, temperatura e umidade) apropriadas para o crescimento microbiano (OWENS e GOETSCH, 1993).

2.1.1 Ecossistema microbiano

A fermentação ruminal é resultado do equilíbrio de interações entre as diferentes espécies de microorganismos existentes no rúmen (YOKOYAMA e JOHNSON, 1993).

A microbiota ruminal é composta por bactérias, protozoários e fungos, sendo a maioria destes de natureza anaeróbia estrita. Essa diversidade pode variar por inúmeros fatores, como, por exemplo, devido ao tempo entre ingestão de alimentos, tipo de dieta e outros. Há interação entre diferentes espécies de bactérias, onde uma espécie pode utilizar o produto final de outra para seu crescimento, e também interação entre diferentes espécies dentro do ecossistema, como é o caso dos protozoários, que ingerem e digerem bactérias, controlando, assim, a taxa de colonização das partículas de alimento (LONDOÑO et al., 1997).

Dentre os tipos de microrganismos, as bactérias possuem a população mais diversa no rúmen e esse fato pode ser explicado por sua elevada atividade metabólica, diversidade da dieta ingerida pelo hospedeiro e facilidade na adaptação ao ambiente ruminal (fator reservado às espécies predominantes). A classificação destas bactérias é feita levando-se em conta o tipo de substrato utilizado e os produtos oriundos de sua fermentação, sendo classificadas em bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais (celulolíticas), fermentadoras de carboidratos não-estruturais (amilolíticas e pectinolíticas), lipolíticas, proteolíticas, metanogênicas e as láticas (ARCURI et al., 2006).

2.1.1.1. Bactérias Celulolíticas

Boa parte da energia disponível na alimentação dos ruminantes está na forma estrutural junto à parede celular das plantas (celulose, hemicelulose e pectina) e, no rúmen, existem microrganismos de suma importância capazes de degradar esses

polímeros para posterior fermentação dos açúcares resultantes. As espécies de maior importância para degradação de celulose são *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *R. flavefaciens*.

Portanto, este grupo particular de bactérias pode ser considerado o mais decisivo para a evolução dos ruminantes, quanto animais de produção, já que conferem a estes animais a característica de degradação de fibra, o que não ocorre em espécies monogástricas (ØRSKOV, 1988). Resulta, portanto, exata a afirmação de HUNGATE (1966), que os ruminantes vivem mais às expensas da atividade dos microorganismos e de seus produtos de fermentação, do que dos próprios alimentos ingeridos.

A amônia é o substrato de escolha das bactérias celulolíticas para sua síntese protéica, assim como para as bactérias amilolíticas e metanogênicas (VAN SOEST, 1994).

2.1.1.2. Bactérias Amilolíticas

O amido é um dos componentes mais importantes na fermentação de carboidratos não-estruturais, principalmente quando se trata de dietas à base de grãos. As principais bactérias amilolíticas são *Bacteroides amilophilus* e *Streptococcus bovis* que, em conjunto com bactérias utilizadoras de açúcares solúveis, ocupam nicho comum. Esses microorganismos se encontram em constante competição devido a sua fonte de substrato, porém as bactérias amilolíticas, devido ao seu rápido crescimento ou grande afinidade de substrato, predominam (HOBSON, 1971; LIN et al., 1985).

2.1.1.3. Bactérias Proteolíticas

A atividade proteolítica no rúmen é essencialmente uma função microbiana, já que enzimas com atividade proteolítica, provenientes do hospedeiro, não são secretadas neste compartimento gástrico.

As proteínas são degradadas por ação de enzimas de microorganismos, como *Bacteroides*, *Selenomonas* e *Butyrivibrio*, formando peptídeos e aminoácidos

que serão utilizados na síntese microbiana ou sofrerão deaminação oxidativa, formando amônia e esqueletos de carbono. A amônia será utilizada para síntese protéica, principalmente pelas bactérias celulolíticas, ou será absorvida no rúmen, sendo reciclada pelo fígado e voltará ao rúmen através da saliva como uréia, formando assim o ciclo da uréia. Já o esqueleto de carbono será utilizado na síntese de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e na formação de ácidos graxos de cadeia ramificada (isobutirato, isovalerato e 2-metilbutirato), que estão associados à disponibilidade de aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina) e são fundamentais para a síntese de algumas espécies de bactérias (VAN SOEST, 1994).

A proteína sintetizada no rúmen segue o trânsito alimentar e, no abomaso e intestino, é metabolizada pelas enzimas do animal e resulta em aminoácidos que são absorvidos pelas vilosidades intestinais e veia porta, seguindo para o fígado e depois para os tecidos. A uréia exógena ou endógena, ao chegar ao rúmen, é imediatamente hidrolisada em amônia e gás carbônico pela enzima bacteriana urease. As principais bactérias ureolíticas são *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Selenomonas sp*, *Bacteróides ruminicola*, *Ruminococcus bromii*, *Butirivibrio sp* e *Treponema sp*. A urease é extremamente ativa, sendo que sua taxa de hidrólise (em amônia) é quatro vezes maior que a capacidade dos microorganismos em utilizar a amônia para a formação da proteína microbiana (ALLISON et al., 1996).

A uréia apresenta um coeficiente de absorção muito elevado e é transformada pelas bactérias ureolíticas em amônia (NH_3). Esta é imediatamente absorvida através do epitélio ruminal, caso não seja aproveitada pelas bactérias para síntese protéica. Por outro lado, se o fígado for incapaz de metabolizá-la, devido à alta concentração, poderá ocorrer intoxicação urêmica. Quando a produção de amônia é muito maior do que sua utilização e a concentração no rúmen se torna elevada (maior do que 80 mg/100mL) se instala uma alcalose ruminal (pH 7,0-8,5), o que favorece ainda mais a absorção da amônia livre (NH_3) e a ação da urease (pH ótimo 7,7-8,0). Se a quantidade absorvida ultrapassar a capacidade de "detoxificação" do fígado, observa-se um quadro clínico de intoxicação aguda (EMERICK, 1993).

2.1.1.4. Bactérias Metanogênicas

As bactérias metanogênicas são anaeróbias estritas e podem sofrer inibição de desenvolvimento e crescimento por fatores que afetem a presença de hidrogênio no rúmen, já que este é um dos co-fatores utilizados por estes microrganismos para seu desenvolvimento.

No processo de fermentação, alguns produtos da degradação e outras substâncias orgânicas são convertidas em CH_4 e CO_2 (EVANS, 1977). As bactérias metanogênicas, como *Methanobrevibacter ruminantium* e *Methanosacina barkeri*, utilizam H_2 , CO_2 , formiato e acetato para seu desenvolvimento e, como produto final, produzem metano. O envolvimento dessas bactérias na transferência de hidrogênio interespecíes é uma importante interação que altera o balanço fermentativo (WOLIN, 1974).

Segundo LANA et al. (1998), a produção de metano corresponde a uma perda energética de até 13% em relação à energia do alimento ingerido.

2.1.1.5. Bactérias utilizadoras de ácido láctico

A produção de ácido láctico é uma característica de dietas de alto concentrado (elevada presença de grãos) e, nessas condições, tem-se o crescimento da população de bactérias utilizadoras de ácido láctico. Portanto, são bactérias que utilizam produtos da degradação das bactérias primárias e, como exemplo, se pode citar a *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*. Como consequência da ação destas bactérias, tem-se a conversão de ácido láctico em propionato (VAN SOEST, 1994).

2.1.1.6. Protozoários

Os protozoários são organismos anaeróbios, unicelulares, não patogênicos que podem medir de 20-200 μm (DEHORITY, 1993).

Sua população é influenciada pelo tipo de substrato e varia de concentração entre 10^4 – 10^6 protozoários/mL de conteúdo ruminal. Em decorrência de seu tamanho, pode representar 40-60% da biomassa do conteúdo ruminal (ARCURI et al., 2006).

Os protozoários têm, como característica, a ingestão de amido e açúcares solúveis, tornando-os particularmente benéficos para animais que recebem dietas com alto concentrado, pois reduzem a disponibilidade de substrato altamente fermentescível às bactérias (DEHORITY e TIRABASSO, 2000), auxiliando no controle do pH ruminal. Ainda, possuem grande capacidade para degradar e fermentar os componentes fibrosos dos vegetais, como celulose, hemicelulose e pectina. Além dos substratos descritos acima, os protozoários também utilizam as próprias bactérias ruminais como fonte de substrato, o que contribui no controle do ecossistema ruminal (ØRSKOV, 1988). As bactérias são a maior fonte de componentes nitrogenados para o crescimento dos protozoários, porém a proteína vegetal e os aminoácidos livres também são utilizados por algumas espécies (WILLIAMS e COLEMAN, 1988).

Segundo VIERA (1986), todo efeito direto ou indireto, causado pelos protozoários na nutrição de seus hospedeiros, deriva de suas funções no rúmen, ou seja, a presença ou ausência destes microrganismos pode influenciar fatores, como pH, concentração amoniacal, volume ruminal e taxa de diluição, além de número e diversidade das espécies bacterianas encontradas no rúmen, os quais podem afetar diretamente a taxa e extensão da digestão.

2.1.2 Ambiente ruminal

Para que a fermentação ocorra de uma forma normal, tanto para hospedeiro quanto para os microorganismos, são necessárias condições ruminais ideais que envolvem pH (5,5-7,0), temperatura (38-42°C), osmolaridade (260-340 mOsm) e umidade relativa estável (85-90%), que é mantida parte pela saliva e parte pela água presente nos alimentos ingeridos, além da anaerobiose. A saliva também é responsável por fornecer tamponante, o qual mantém o pH em níveis estáveis (ANDRIGUETO, 2002).

Quando o ambiente ruminal apresenta condições de bem-estar para a população microbiana, o alimento sofrerá alterações físicas e metabólicas até ser finalmente absorvido pelo hospedeiro. Ou seja, através de uma dinâmica interativa com o alimento e as condições orgânicas mantidas pelo hospedeiro, os microorganismos ruminais mantêm seu crescimento e permitem o aporte de nutrientes necessários para suprir as exigências do ruminante (COELHO, 2002).

As condições anaeróbias são mantidas pelos gases gerados nos processos fermentativos, como o dióxido de carbono, metano e hidrogênio. O oxigênio aprisionado na dieta consumida é utilizado por algumas bactérias anaeróbias facultativas, mantendo assim o ambiente anaeróbio. O ambiente singular do rúmen, com baixo potencial redox (-350 mV), alta capacidade de tamponamento, pressão osmótica, além da capacidade de alguns microorganismos ruminais de produzirem fatores antimicrobianos, são fatores limitantes ao desenvolvimento de outros microorganismos oportunistas (KAMRA, 2005).

2.1.3 Substratos da fermentação ruminal

As forragens constituem a grande base de nutrientes na dieta dos ruminantes. Na composição destes alimentos há energia, proteína e fibra. Graças a presença desta última há promoção da mastigação, ruminação e salivação. Os alimentos

concentrados são utilizados para complementar as contribuições das forragens e, em alguns casos, aumentar a disponibilidade de energia para os microrganismos ruminais (TEIXEIRA e ANDRADE, 2001).

Segundo VAN SOEST (1994), os carboidratos compõem de 50-80% da MS das forrageiras e cereais e suas características são dependentes dos açúcares que o compõe e de suas interligações estabelecidas, além de fatores de natureza físico-química. Podem ser classificados em estruturais e não estruturais, de acordo com sua degradabilidade. Os carboidratos não estruturais estão no componente celular e são a glicose, frutose, amido (degradação de 40-90%, dependendo da fonte e do tipo de processamento), sacarose e frutanas (reserva energética da planta). Já os carboidratos estruturais fazem parte da parede celular da planta e são representados pela celulose, hemicelulose e pectina, esta última não ligada às porções lignificadas.

Como já proposto, os carboidratos, estruturais ou não estruturais, e as proteínas, presentes na dieta, são as maiores fontes de substrato para fermentação microbiana, sendo os carboidratos a fonte primordial e as proteínas surgindo como fonte suplementar (MENG et al., 1999).

HUNGATE (1975) escreveu que, no rúmen, o carboidrato é o substrato utilizado para o crescimento microbiano e formação de resíduos, principalmente ácidos graxos de cadeia curta, como o acético, propiônico e butírico, além de CO₂ e CH₄. Tais resíduos são de grande valia para o ruminante, sendo, por exemplo, o ácido propiônico transformado, após sua absorção, em glicose pelo hospedeiro e utilizado como fonte de energia. Também são formados outros resíduos, como o ácido láctico, succinato, formato, etanol e H₂, que, na verdade, são resíduos intermediários, utilizados na formação dos outros ácidos graxos em sua falta.

2.2 Métodos de manipulação da fermentação ruminal

Como já descrito, o ruminante fornece nutrientes e proporciona um meio adequado para o desenvolvimento dos microrganismos ruminais e, por sua vez, tais microrganismos possibilitam o uso da fibra vegetal como fonte de energia e proteínas. Esta relação de simbiose é eficiente, porém há espaço para melhora

dessa eficiência quando se leva em conta a perda de energia (CH_4) e de proteína (N-NH_3) (VAN NEVEL e DEMEYER, 1988).

Deve-se controlar o equilíbrio do ecossistema ruminal, principalmente em modelos de criação intensiva, que visam maior eficiência na conversão de alimento em energia e conseqüentemente produção, evitando perdas energéticas. A manipulação da fermentação ruminal pode auxiliar o alcance de tais objetivos.

Além da correta formulação de dietas e adequado manejo nutricional, existem métodos adicionais de modulação da fermentação ruminal, como o manejo do metabolismo energético do rúmen, aumento da degradação de fibra e amido e, conseqüentemente, aumento da produção de AGCCs e, principalmente, estímulo do aumento da proporção molar de propionato, inibição da produção de metano, controle da produção de lactato e do pH ruminal (CASALMIGLIA et al., 2002). Além disso, pode-se melhorar o metabolismo protéico no rúmen, uma vez que o alto desdobramento protéico em nitrogênio no rúmen, para a síntese protéica dos microrganismos, resulta em excessiva perda do N-NH_3 na forma de uréia (pela urina) e amônia (pelas fezes), o que implica em perda econômica e contaminação do solo. Estratégias como tratamento químico ou por calor no farelo de soja, por exemplo, têm aumentado a resistência a enzimas proteolíticas (BRODERICK et al., 1991).

Aditivos como a monensina têm atuado na inibição de bactérias deaminadoras, como o *Peptostreptococcus* e o *Clostridium spp.*, as quais possuem capacidade 20 vezes maior de deaminação em relação a outras bactérias com tal função, prevenindo assim o excesso de nitrogênio livre no rúmen. Porém, é importante lembrar que a fermentação de aminoácidos é essencial para a manutenção da população microbiana ruminal, devido ao fato que a degradação de aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina, isoleucina) produz ácidos graxos com esse tipo de cadeia (isobutirato, isovalerato e 2-metil butirato), os quais são utilizados pelas bactérias celulolíticas (WEIMER, 1998).

2.2.1. Aditivos microbianos ou probióticos

O termo probiótico foi definido como um suplemento alimentar microbiano vivo, que afeta benéficamente o hospedeiro, melhorando o balanço microbiano intestinal (FULLER, 1989). São descritos como culturas microbianas, culturas de extratos

microbianos, preparados enzimáticos ou uma combinação destes. O Food and Drug Administration (U.S. FDA) nomeou estes tipos de probióticos como direct-fed microbial (DFM), sendo que os mais importantes para nutrição de ruminantes são os provindos de culturas fúngicas e bacterianas (KREHBIEL et al., 2003).

Os aditivos microbianos ou probióticos podem ser apresentados na forma de leveduras vivas, como, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. Esta parece ser responsável pelo aumento de bactérias celulolíticas (*F. succinogenes* e *R. albus*), além de estimular a utilização de lactato pela *M. elsdenii* (CASALMIGLIA et al., 2002), o que resulta no aumento da produção de propionato.

WARE et al. (1988) reportaram que a adição de *Lactobacillus acidophilus* BT1386 aumentou o ganho de peso diário e melhorou a eficiência alimentar de novilhos alimentados com dieta de alto concentrado, quando comparado ao grupo controle. Este achado também foi relatado por GALYEAN et al. (2000), que administraram diariamente DFM com bactérias produtoras e utilizadoras de lactato e observaram aumento na eficiência alimentar e ganho de peso diário em gado em confinamento.

2.2.2. Extrato de própolis

A própolis é um produto natural, proveniente de substâncias (resinas) coletadas das plantas, pelas abelhas e misturadas às secreções hipofaríngeas destas. Tal mistura promove uma modificação na composição da resina, pela presença, principalmente, de β -glicosidases. Dessa forma, os flavonóides heterosídeos, que conferem a ação antibacteriana à própolis, são hidrolisados para a forma de agliconas livres, aumentando a ação farmacológica destes compostos (BONHEVI et al. 1994).

MIRZOEVA et al. (1997) relataram que a própolis possui ação sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática das bactérias aos íons, levando a dissipação de potencial de membrana, semelhante aos ionóforos.

Em experimento, STRADIOTTI Jr et al. (2004) observaram que a própolis foi eficiente em inibir a atividade de deaminação *in vitro* e *in vivo* das bactérias ruminais, além de aumentar a concentração de AGCCs totais, sem alterar a proporção entre estes. OLIVEIRA et al. (2004), em experimento *in vitro*, observaram que tanto a própolis quanto a monensina foram eficientes em inibir a produção de amônia a partir de diferentes fontes de nitrogênio no líquido ruminal de animais que recebiam dieta à base de forragem.

2.2.3. Anticorpos específicos contra bactérias ruminais

Segundo HAU e COENRAAD (2005), os princípios da resposta imune específica ao antígeno são a) ativação das células B, responsáveis pela produção de anticorpos; b) ativação das células T, responsáveis pela resposta citotóxica ao antígeno; c) ativação das células T_h (T helper), responsáveis pela estimulação das células B e T. A manutenção da resposta antígeno-anticorpo é realizada através de comunicação intercelular, pelo contato célula-célula (mediado pelas citosinas).

No processo de imunização passiva em aves, as galinhas transferem ao ovo, ainda no ovário, suas imunoglobulinas séricas Y (IgY), ficando estas presentes na gema e, ao percorrer o oviduto, o ovo recebe as IgM e IgA na albumina (SCHADE et al., 2001).

A imunização passiva contra coronavírus bovino foi avaliada em bezerros utilizando-se gema de ovo ou colostro, obtidos respectivamente de galinhas e vacas vacinadas com vírus inativado de coronavírus bovino. Foram administrados antígenos entre 24 e 36 horas pós-nascimento e a administração dos tratamentos ocorreu 6 horas após o desafio. No grupo controle, os animais apresentaram diarreia e óbito após 6 dias à exposição aos vírus. Os animais submetidos aos tratamentos sobreviveram ao desafio e ganharam peso. Foi atribuída maior eficácia na prevenção à diarreia ao tratamento com gema em pó já que, segundo o autor, foi necessária maior quantidade de colostro que gema de ovo para prevenir a doença. A titulação de anticorpos foi de 1:2560 e 1:10240 para a gema de ovo e pó de colostro, respectivamente (IKEMORI et al., 1997).

LEE et al. (2002) testaram anticorpos contra *Salmonella enteritidis* e *Salmonella thyphimurium in vitro* e observaram inibição de crescimento dos microrganismos em meio líquido e também a existência de uma reação cruzada entre os anticorpos das duas espécies testadas. Em análise microscópica foi demonstrado que a IgY específica para *Salmonella* se liga ao antígeno expressado na superfície da bactéria, levando à alterações estruturais que diminuem o crescimento destas.

DiLORENZO (2004) testou um preparado de anticorpos contra *Streptococcus bovis* (PAPSb) e *Fusobacterium necrophorum* (PAPFn) em novilhos recebendo alta proporção de concentrados na dieta. Observou redução na população das bactérias aos quais o produto é destinado, o que indica especificidade de ação do produto, já que outras populações não sofreram alterações. Ambos preparados foram eficientes em manter o pH ruminal. Quando administrados sozinhos ou em conjunto, os anticorpos policlonais melhoraram a eficiência alimentar, porém, quando em conjunto, não demonstraram efeito no desempenho animal. No mesmo trabalho o autor constatou que o PAPSb aumentou o peso de carcaça, espessura de gordura subcutânea e classificação de carcaça devido ao efeito sobre o ganho de peso diário.

MILLEN et al. (2007) testaram um preparado de anticorpos policlonais (PAP) contra *Streptococcus bovis*, *Fusobacterium necrophorum* e algumas cepas de bactérias proteolíticas em bovinos jovens em confinamento recebendo dieta com alta proporção de concentrado. Relataram que os animais tratados com PAP obtiveram ganho de peso médio diário, ingestão de matéria seca e eficiência alimentar semelhante ao grupo de animais tratados com monensina sódica. Já em porcentagem do peso vivo, a ingestão de matéria seca nos animais tratados com PAP foi mais elevada quando comparada aos animais tratados com monensina.

MARINO et al. (2007) relataram que a suplementação com anticorpos policlonais foi tão efetiva em controlar o pH ruminal em dietas de alto concentrado quanto a monensina sódica (5,95 vs. 5,99), sendo estes valores maiores que os apresentados pelo grupo controle (5,65).

2.3 Etiopatogenia da acidose ruminal

O rúmen possui um ecossistema basicamente anaeróbio que converte substratos fermentescíveis da dieta ingerida em ácidos orgânicos, que posteriormente são removidos através de absorção. Portanto, se a produção desses ácidos for estável, sua absorção também o será e conseqüentemente a manutenção do pH em níveis aceitáveis para a microbiota (5,8–6,5). Os fatores que influenciam na flutuação do pH são a quantidade de carboidratos rapidamente fermentescíveis que o animal ingere, a capacidade animal de produção de tampão (saliva) e a taxa

de utilização e absorção dos ácidos produzidos. Quando algum destes fatores é alterado, ocorrerá acúmulo dos ácidos no rúmen, levando a queda do pH (abaixo de 5,5), estimulando assim bactérias produtoras de lactato e inibindo as bactérias fermentadoras deste mesmo ácido (NAGARAJA e TITGEMEYER, 2007).

OWENS et al. (1998) descreveram alguns itens que ilustram bem as origens da acidose, como 1) concentração de amido e sua conversão à glicose: a apresentação do amido na dieta e sua quantidade nesta influi na velocidade de sua fermentação, já o açúcar livre no rúmen pode aumentar a osmolaridade do conteúdo ruminal, aumentando assim o acúmulo de AGCCs no rúmen e inibindo sua absorção; 2) fornecimento de amido e açúcar: a quantidade de carboidrato altamente fermentescível na dieta influi diretamente no surgimento da acidose; 3) produção de AGCC e produção e utilização lactato: a disponibilidade de substrato pode alterar o balanço entre bactérias produtoras e as utilizadoras de lactato, sensíveis à quedas pronunciadas de pH; 4) depressão do pH ruminal: o pH ruminal é mantido por elementos ácidos, básicos e tamponantes, um desbalanceamento destes leva a flutuação do pH ruminal; 5) osmolaridade ruminal: AGCC, lactato, minerais e glicose são solutos presentes no conteúdo ruminal e, com excesso de um destes, a osmolaridade se elevar gerando um aumento da passagem de água para dentro do rúmen que inibe a absorção dos ácidos.

Os sintomas clínicos da maior disponibilidade de carboidratos altamente fermentescíveis variam de acordo com o tipo e quantidade destes carboidratos consumidos, assim como a cascata de efeitos relacionados à acidose. A fermentação destes carboidratos leva a produção de ácidos fora do limite fisiologicamente suportável e o pH é reduzido. O limiar do pH não está somente relacionado com a taxa de crescimento microbiano e mudanças em suas populações, mas também com o estado metabólico sistêmico do animal e sua habilidade de catabolizar ou excretar certos metabólitos (NOCEK, 1997).

O bicarbonato é um dos tamponantes responsáveis pela manutenção do pH no rúmen. Metade deste bicarbonato chega ao rúmen, via saliva, durante o processo de mastigação e ruminação. A outra metade chega via corrente sanguínea, através de trocas por ácidos graxos ionizados, durante o processo de absorção destes. Na acidose ruminal, há comprometimento do fornecimento deste tamponante via saliva e o animal deve manter o pH ruminal neutro com o bicarbonato provindo da corrente

sanguínea. Porém, se o ruminante não conseguir manter a homeostase corporal, ocorrerá acidose metabólica (OWENS et al., 1998).

HUBER (1976), em revisão sobre acidose em gado confinado, afirmou que a ingesta ruminal se torna hipertônica pela alta presença de ácido láctico, que durante todo o processo acidótico eleva sua concentração molar de 0,08 para 89,2 mM, elevando, assim, a osmolaridade ruminal de 255 para 401 mM, causando uma perda de água do plasma para o rúmen, o que leva a desidratação do animal. NOCEK (1997) descreveu que alterações na osmolaridade sanguínea podem levar à laminite. Durante a acidose ruminal, a presença de alta concentração de lactato no rúmen leva a lesões no epitélio ruminal que possibilitam a instalação de agentes bacterianos, como *Fusobacterium necrophorum* e *Actinomyces pyogenes*, que, além de colonizar e lesionar o epitélio deste órgão, o que resulta em redução da superfície de absorção deste, também podem chegar ao fígado, levando ao surgimento de abscessos hepáticos (NAGARAJA e CHEGAPPA, 1998).

Ainda pode ocorrer a acidose ruminal sub-aguda, definida por KRAUSE e OETZEL (2006) como um período de depressão moderada do pH ruminal (5,5-5,0), que pode estar associada à laminite ou outro problema de saúde, levando a queda da produção. GOAD et al. (1998) utilizaram animais adaptados a dieta à base de forragens para induzir uma acidose sub-aguda mudando subitamente para dieta exclusiva de grãos. Estes autores observaram diminuição de pH (5,0-5,5), concentração normal de ácido láctico (5 mM), além de mudanças normais na população bacteriana relacionadas a animais em adaptação à dietas com maior proporção de grãos, como maior presença de bactérias amilolíticas, aumento da população de *Lactobacillus spp* e presença de bactérias utilizadoras de lactato. Porém, o que chamou a atenção foi a diminuição da população total de protozoários ciliados após 48 horas de desafio, o que, segundo os autores, pode ser um bom indicador de um potencial ambiente acidótico dentro do rúmen.

2.4 Métodos de controle da acidose

O balanço entre a produção fermentativa dos ácidos e sua remoção ou neutralização está diretamente ligada à um ótimo ambiente ruminal.

Pode-se dizer que a prevenção da acidose está relacionada com dois princípios: o primeiro seria proporcionar uma adaptação correta da mucosa e microbiota ruminal para absorção e metabolização dos altos níveis de AGCC e a segunda estaria relacionada com métodos de manutenção do pH ruminal quando o animal tem acesso a dietas com altos níveis de energia. Desta forma, procura-se atuar na prevenção das desordens da fermentação, principalmente no manejo dos animais e da alimentação destes, ou na regulação dos processos fermentativos, com regulação do conteúdo de fibra ou com uso de aditivos na dieta (KLEEN et al., 2003).

2.4.1. Manejo alimentar

Segundo KRAUSE e OETZEL (2006), existem dificuldades na percepção do aparecimento da acidose relacionadas à dieta, já que quantidades excessivas de carboidratos fermentáveis produzem efeitos, como diminuição na ingestão da MS e na produção de leite, similares à inclusão excessiva de fibra na dieta. Porém, uma quantidade mais elevada de carboidrato fermentescível causa problemas de saúde a longo tempo, enquanto uma reduzida quantidade de carboidrato fermentescível pode reduzir a produção de leite, mas sem aparecimento de problemas de saúde. Portanto, a avaliação das características nutricionais dos carboidratos presentes na dieta é um ótimo começo para a prevenção da acidose, permitindo melhor formulação das dietas fornecidas aos ruminantes. Além disso, o correto manejo alimentar das dietas formuladas é indispensável para a prevenção da acidose.

NORDLUND (2003) relatou que animais que têm acesso a dieta predominantemente composta por forragem devem receber um período de adaptação à dietas com alta disponibilidade de energia, de aproximadamente seis semanas, a fim de melhor adaptação dos microrganismos e da mucosa ruminal.

2.4.2. Estimulação da produção de tamponantes

GALYEAN e RIVERA (2003), em revisão, descreveram a importância da presença de forragem na dieta dos animais por sua capacidade em estimular a mastigação e salivação, devido à presença de fibra nestas, aumentando assim o tamponamento ruminal. ALLEN (1997), em revisão, comentou que o balanço entre a fermentação ácida e a secreção de tamponantes é determinante para a regulação do pH ruminal e acrescentou que variações no pH ruminal podem ser minimizadas através de um correto manejo alimentar. O autor descreve ainda que a fração de matéria orgânica que é fermentada no rúmen possui alta variação entre as dietas que afeta a quantidade de ácidos fermentados produzidos e, por conseguinte, afeta a quantidade de fibra fisicamente efetiva que é necessária para manter um pH ruminal adequado, tendo em vista a influência desta na estimulação da mastigação e salivação.

NORDLUND (2003) relatou que forragens leguminosas têm maior capacidade de tamponamento que grãos ou forragens de capim. Em animais que recebem duas rações com as mesmas especificações nutricionais, porém uma à base de silagem de capim e outra à base de silagem de alfafa, a capacidade de tamponamento das vacas alimentadas com a dieta com silagem de alfafa será maior.

2.5 Uso de antibióticos para o controle da acidose

Os antibióticos podem ser usados na produção animal, através de várias maneiras, na prevenção de doenças ou aumento da eficiência produtiva. A diversidade dos animais usados na produção animal é uma complicação ao uso desses medicamentos. Por exemplo, animais de grande porte, como vacas leiteiras ou cavalos, são tratados individualmente, já frangos ou peixes são tratados por galpão ou tanques. Quando utilizados no aumento da produção, estes produtos podem promover melhor eficiência alimentar e/ou modificar alguns parâmetros produtivos (GUSTAFSON e BOWEN, 1997).

O ionóforo monensina foi usado pela primeira vez em frangos para prevenção de coccidiose em 1971 e, em 1975, recebeu aval de uso pelo FOOD AND DRUG

ADMINISTRATION (U.S. FDA) para gado confinado, sendo administrado para melhorar a eficiência alimentar nestes animais (FEED ADDITIVE COMPENDIUM, 2000).

Os ionóforos foram desenvolvidos para prevenção de doenças, como descrito acima, e posteriormente foi descoberta sua ação na fermentação ruminal. Segundo BERGEN e BATES (1984), quando animais tratados com monensina têm acesso a dieta rica em carboidratos fermentescíveis a ingestão alimentar diminui. Porém, não diminui o ganho de peso diário e sua conversão alimentar é melhorada, já que proporcionam aumento do metabolismo energético e protéico, bem como diminuição de incidência de disfunções ruminais, como a acidose láctica.

SCHELLING (1984) descreveu o modo de ação dos ionóforos como básico, por atuar na membrana celular dos microrganismos ruminais, ou sistêmico, por alterar o metabolismo das bactérias ruminais e, assim, atuar na resposta do ruminante. O modo de ação básico dos ionóforos foi descrito por BERGEN e BATES (1984). Estes agem no fluxo normal de íons na membrana citoplasmática dos microrganismos, através de alteração no gradiente da cadeia de transporte de elétrons, que são responsáveis pelo transporte de aminoácidos, açúcares e outros íons para o interior da célula. As bactérias gram-negativas possuem o sistema enzimático fumarato-redutase, o qual permite o transporte de elétrons acoplado a extrusão de prótons na membrana citoplasmática (CHEN e WOLIN, 1979), conferindo, a estes microrganismos, resistência aos ionóforos. Diferentemente, as bactérias gram-positivas necessitam de gasto de ATP para promover o transporte ativo pela membrana, o que restringe sua capacidade de extrusão de prótons. Os ionóforos agem se ligando à membrana celular dos microrganismos, causando a troca de um cátion por um próton. Tal reação culmina em uma diminuição de concentração intracelular de K^+ e maior concentração de Na^+ , levando essa bactéria a ativar o transporte celular para dissipação de H^+ e Na^+ pelas bombas de Na^+/K^+ ATPase, com conseqüente gasto de energia. Com a baixa concentração intracelular de K^+ ocorre queda na síntese protéica, diminuindo a capacidade de divisão celular. Além disso, a maior concentração intracelular de cátions leva ao aumento da pressão osmótica dentro da célula até o ponto de rompimento celular (MORAIS et al., 2006).

HUNGATE (1966) relatou que, no rúmen de animais alimentados com alta proporção de volumoso na dieta, a concentração de bactérias gram-negativas é

maior. Já no rúmen de animais suplementados com dietas com maior proporção de concentrado há maioria de microrganismos gram-positivos, o que demonstra que a eficiência dos ionóforos pode ser maior em dietas com alta proporção de concentrado.

SCHELLING (1984) classificou o modo de ação sistêmico dos ionóforos em sete categorias, 1) alteração na proporção molar de ácidos graxos de cadeia curta: com diminuição na relação acetato:propionato; 2) alteração na ingestão alimentar: diminuição de até 10,7% no consumo alimentar quando alimentados com dieta concentrada; 3) mudanças na produção de gás: diminuição da produção de metano, através de atuação sobre microrganismos ruminais produtores de CH₄; 4) alteração da digestibilidade e degradabilidade ruminal: podem ocorrer melhoras, porém estas estão sujeitas às condições experimentais, já que consumo alimentar, enchimento ruminal, taxa de passagem e outros podem influenciar tais medidas; 5) mudanças na utilização da proteína; 6) alteração no volume ruminal e taxa de passagem; 7) outros. Neste último item, por exemplo, o triptofano pode causar edema e enfisema pulmonar em bovinos, após sofrer deaminação no rúmen e ser transformado em 3-metilindole. A monensina diminui a ação das bactérias deaminadoras de aminoácidos, diminuindo, assim, a produção deste.

A acidose ruminal se desenvolve pela presença de bactérias, como o *Streptococcus bovis*, que fermentam o carboidrato altamente fermentescível dos grãos em ácido láctico, como. O ácido láctico diminui o pH ruminal, propiciando o crescimento de *Lactobacillus spp.* Um plano de controle da acidose envolve a inibição do desenvolvimento do *S. bovis* com aditivos/ionóforos seletivos, como a monensina, que inibe tanto *S. bovis* como *Lactobacillus spp* (NAGARAJA et al., 1981).

Em experimento de indução de acidose ruminal por glicose ou milho moído administrado intraruminalmente, NAGARAJA et al. (1981) observaram que os animais tratados com monensina ou lasalocida apresentaram pH ruminal mais elevado em relação ao grupo controle. A monensina e a lasalocida têm a vantagem sobre outros antibióticos por inibir não só *S. bovis*, mas também outras bactérias produtoras de lactato, como *Butyrivibrio* e *Lactibacillus*.

A população de *S. bovis*, quando os animais são alimentados com dietas ricas em amido, têm seu crescimento aumentado, com conseqüente produção de lactato, o que está relacionado diretamente com o aparecimento da acidose láctica. Esse

microrganismo é sensível à monensina, enquanto outras bactérias utilizadoras de lactato, como *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*, são resistentes à este ionóforo (RUSSEL e STROBEL 1989).

RODRIGUES (2000), em estudo sobre níveis de monensina e proporções de volumoso:concentrado sobre os parâmetros ruminais, observou que a monensina melhorou o pH ruminal, porém esta resposta pode variar devido ao nível de fibra da dieta e dose do produto. RUSSEL e STROBEL (1989) também afirmaram que a composição da alimentação pode afetar a concentração e relação de cátions (Na/K) no líquido ruminal, tornando a ação dos ionóforos nas bactérias dependente da dieta.

3 OBJETIVOS

Objetivou-se neste trabalho verificar a influência de um preparado de anticorpos policlonais produzido contra bactérias específicas sobre a degradabilidade *in situ* de alguns alimentos em animais recebendo dietas de alto concentrado. Também objetivou-se neste trabalho relatar o efeito dos modificadores ruminais e fontes energéticas sobre a contagem e diversidade do ecossistema ruminal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e instalação

Este trabalho foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga, São Paulo.

Foram utilizadas 9 fêmeas bovinas mestiças holandês X zebu, não gestantes e não lactantes, com peso vivo médio de 690 ± 44 kg e portadoras de cânula ruminal com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Os animais foram mantidos em galpão coberto, em baias individuais com cochos de cimento e bebedouros automáticos comuns a cada dois animais. O estábulo possuía ventiladores suspensos no teto que eram ligados nas horas mais quentes, para amenizar os efeitos da temperatura ambiente.

4.2 Tratamentos

O delineamento experimental foi o quadrado latino 3 X 3 replicado 3 vezes com arranjo fatorial de tratamentos 3 X 3 referente a 2 modificadores ruminais representados pela monensina sódica (MON) ou preparado de anticorpos policlonais (PAP) mais o grupo controle (CON) e 3 fontes energéticas suplementadas na dieta, representadas pelo milho seco e moído (MSM), silagem de grão úmido de milho (SGUM) e polpa cítrica (PC), conforme **quadro 1**.

ANIMAL	FONTES DE ENERGIA								
	MILHO SECO			MILHO ÚMIDO			POLPA CÍTRICA		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PERÍODO I	C	M	P	C	M	P	C	M	P
PERÍODO II	M	P	C	M	P	C	M	P	C
PERÍODO III	P	C	M	P	C	M	P	C	M

Quadro 1. Esquema do delineamento experimental em quadrado latino 3 X 3 triplicado, com arranjo fatorial de tratamentos 3 X 3
Modificadores: C: controle; M: monensina; P: PAP.

Os alimentos foram oferecidos duas vezes ao dia, às 8 e 16 h, na forma de ração completa, *ad libitum*. As dietas possuíam relação volumoso:concentrado de 30:70, onde a fonte de volumoso utilizada foi a cana-de-açúcar fresca e picada com tamanho teórico de partícula de 1,8 cm, sendo este determinado pela Penn State Particle Size Separator, conforme metodologia proposta por LAMMERS et al. (1996).

As proporções dos diversos ingredientes utilizados nas dietas e a composição bromatológica das mesmas estão descritas na **Tabela 1**. O teor de carboidratos não-fibrosos foi estimado pela fórmula $CNF\% = 100\% - (PB\% + FDN\% + EE\% + cinzas\%)$, segundo HALL (2001). O teor de proteína degradável e não-degradável no rúmen (%PB), fibra em detergente neutro efetiva (%FDN), nutrientes digestíveis totais (NDT), energia metabolizável, energia líquida de manutenção e lactação (Mcal/kg MS) foram estimados pelo programa Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS), versão 5.0.40 e nível 2 (simulação ruminal, FOX et al., 1992). As dietas foram formuladas para serem isonitrogenadas, segundo o NRC (1996).

As análises bromatológicas de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), energia bruta (EB), cálcio e fósforo foram realizadas segundo AOAC (1990) e as de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e pectina (PEC), conforme VAN SOEST et al. (1991). Para a análise de FDN foi omitido o sulfito de sódio, mas adicionada a α -amilase e uréia. A concentração de amido (AMI) foi avaliada segundo PEREIRA e ROSSI Jr. (1995), fazendo prévia extração dos carboidratos solúveis segundo HENDRIX (1993).

Tabela 1. Proporções de ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais, com base na matéria seca

Ingredientes (%)	Dietas experimentais		
	MSM	SGUM	PC
Cana-de-açúcar fresca picada	30,4	30,2	30,4
Milho seco moído	64,2	15,7	11,2
Silagem de grão úmido milho	-	48,1	-
Polpa cítrica	-	-	50,0
Farelo de soja	3,10	3,73	6,73
Uréia	0,74	0,65	0,65
Suplemento mineral e vitamínico ¹	0,74	0,75	0,56
Calcário calcítico	0,83	0,84	-
Fosfato bicálcico	-	-	0,47
Composição química			
Matéria seca (%)	59,0	53,5	61,1
Matéria mineral (% MS)	2,77	2,91	5,39
Proteína bruta (% MS)	11,7	10,8	10,8
Proteína degradável no rúmen (% PB) ²	73,0	73,0	71,0
Proteína não-degradável no rúmen (% PB) ²	27,0	27,0	29,0
Extrato etéreo (% MS)	2,84	3,00	2,09
Fibra em detergente neutro (% MS)	24,9	23,2	21,3
Fibra em detergente neutro efetiva (% FDN) ²	12,0	13,0	14,0
Fibra em detergente ácido (% MS)	16,3	14,3	21,3
Carboidratos não estruturais (% MS)	57,6	60,1	50,3
Amido (% MS)	49,8	46,7	12,2
Pectina (% MS)	0,33	0,34	11,2
NDT (% MS) ²	78,0	79,0	73,0
Energia bruta (Mcal/Kg MS)	4,30	4,23	4,03
Energia metabolizável (Mcal/Kg MS) ²	2,84	2,85	2,64
EL _{manutenção} (Mcal/Kg MS) ²	1,90	1,91	1,72
EL _{lactação} (Mcal/Kg MS) ²	1,83	1,84	1,70
Cálcio (% MS)	0,49	0,57	1,41
Fósforo (% MS)	0,30	0,26	0,25

¹ Mistura mineral e vitamínica (em cada Kg): 230 g de cálcio, 90 g de fósforo, 15 g de enxofre, 20 g de magnésio, 48 g de sódio, 100 mg de cobalto, 700 mg de cobre, 2.000 mg de ferro, 80 mg de iodo, 1.250 mg de manganês, 20 mg de selênio, 2.700 mg de zinco e 900 mg de flúor (máximo), 200.000 UI de vitamina A, 60.000 UI de vitamina D3, 60 UI de vitamina E.

² Valores estimados pelo programa CNCPS, versão 5.0.40.

A silagem de grão úmido de milho foi confeccionada no Setor de Bovinos Superprecoces da FMVZ – UNESP/Botucatu (Campus Lageado). O milho foi colhido na fase de maturação fisiológica, caracterizada pela ocorrência da camada preta na base do grão, com teor de umidade médio de 30%. Os grãos foram triturados e armazenados em silos do tipo trincheira por 90 dias. Após a abertura dos silos, a silagem foi novamente ensilada em tambores plásticos de 200 L e transportada até a FMVZ – USP (Campus Pirassununga). A polpa cítrica utilizada possuía pellets de 1,5

cm de comprimento em média e 1 cm de diâmetro. O tamanho da partícula médio dos alimentos utilizados no experimento foi 0,70 mm para o milho seco e moído, 2,26 mm para a silagem de grão úmido de milho, 0,74 mm para a ração concentrada da dieta milho seco e moído, 0,72 mm para a ração concentrada da dieta milho de grão úmido de milho e 0,83 mm para a dieta polpa cítrica. O tamanho da partícula médio foi determinado pela granulometria por vibração (Marconi[®]), com peneiras de diâmetro de furo variando de 0,25 mm a 2,36 mm (Bertel[®]). Após a vibração das amostras por 15 minutos, as peneiras foram pesadas e o tamanho de partícula médio determinado.

A adição dos modificadores foi realizada duas vezes ao dia através da fístula ruminal, antes de cada refeição. A monensina foi administrada em papelotes de material absorvível na dose de 300 mg/animal/dia, o que corresponde a 3,0 g/animal/dia do produto comercial Rumensin – Elanco[®]. Já o preparado de anticorpos policlonais (CAMAS Inc[®]) foi administrado através de seringa descartável na dose de 10 mL/animal/dia.

O PAP de origem aviária utilizado foi preparado para agir contra bactérias ruminais específicas, tais como *Streptococcus bovis*, *Fusobacterium necrophorum* e cepas das bactérias proteolíticas *Clostridium aminophilum*, *Peptostreptococcus anacrobis* e *Clostridium sticklandii*.

Como este produto é fabricado sob patente e direitos particulares de produção, somente algumas fases de sua confecção serão descritas a seguir. Imunógenos foram extraídos de culturas bacterianas modelo cultivadas sob condições especiais para expressar os antígenos de superfície que o organismo utiliza para se aderir às células. Além dos organismos modelos, foram utilizadas bactérias específicas coletadas diretamente do rúmen de animais saudáveis. Os antígenos foram, então, purificados da cultura e imunógenos isolados foram produzidos para administração em galinhas poedeiras sem adjuvante. Mais de 600 galinhas foram imunizadas para cada imunógeno. Seus ovos foram analisados semanalmente por teste de ELISA específico para monitorar a ligação dos anticorpos. Aproximadamente 200 galinhas imunizadas foram selecionadas aleatoriamente para a coleta de ovos. Os ovos foram coletados por três dias e, a partir deste material coletado, o PAP foi produzido. No produto, aproximadamente 26% dos anticorpos agiam contra *S. bovis*, 12% contra *F. necrophorum* e 48% contra as bactérias proteolíticas *Clostridium aminophilum*, *Peptostreptococcus anacrobis* e

Clostridium sticklandii. O restante dos anticorpos (14%) agiam contra *E. coli* O157:H7, *Eimeria* e *Salmonella*.

Em cada dose diária recomendada, os títulos por ELISA variavam de 1:50.000 a 1:1.000.000. Os preparados continham imunoglobulina Y, imunoglobulina M e imunoglobulina A. O PAP continha ainda em sua formulação uma mistura de proteína de ovo pasteurizada, melaço, óleo de soja e solução tampão salina fosfato (PBS) com pH 7,4. Devido ao fato de que os ovos normalmente consumidos possuem anticorpos contra diversas bactérias, ovos comercialmente a venda foram testados para anticorpos contra microrganismos específicos utilizando os mesmos protocolos para avaliação do PAPs. Embora houvesse pequenas quantidades de anticorpos nestes ovos contra bactérias específicas como *Streptococcus spp* ou *Escherichia coli*, eles não se ligaram aos microrganismos específicos. Ainda, os títulos de ELISA não indicaram ligação aos fatores de adesão específicos. O produto era apresentado na forma líquida, sendo mantido durante todo o período de utilização sob refrigeração (4,4-10,0 °C).

4.3 Período experimental

Cada subperíodo experimental foi composto de 21 dias, sendo 16 dias para adaptação aos tratamentos e 5 dias para a coleta de dados.

4.4 Degradabilidade *in situ*

A degradabilidade *in situ* da fibra em detergente neutro da cana-de-açúcar, da proteína bruta do farelo de soja, do amido do milho seco e da silagem de grão úmido de milho ou da pectina da polpa cítrica foram avaliadas pela técnica descrita por MEHREZ e ØRSKOV (1977). Um dia antes da preparação das amostras, os sacos de náilon medindo 10,0 X 19,0 cm, com porosidade de 50 µm, foram colocados em estufa a 55 °C, a fim de retirar umidade. Os sacos foram pesados em balança analítica de precisão. Aproximadamente 7 g de amostra foram colocadas em cada saco de náilon, que foi novamente pesado. As amostras dos alimentos foram previamente secas em estufa a 55 °C por 72 horas e moídas em peneira com furos

de 2 mm. Os sacos foram presos à cânula ruminal através de fio de náilon com comprimento mínimo de 50 cm e incubados durante 0; 1,5; 3; 6; 12; 24 e 48 h para a fonte protéica (farelo de soja), 0; 6; 12; 24; 48; 72 e 96 h para a fonte de fibra (cana-de-açúcar) e 0; 3; 6; 12; 24; 48 e 72 h para a fonte de energia (MSM, SGUM e PC). Imediatamente após a retirada do rúmen, os sacos foram colocados em balde com água gelada para cessar a fermentação. Foram então lavados a mão, em água corrente, até que o líquido da lavagem fluísse incolor e, então, foram colocados em estufa a 55 °C por 72 horas. Posteriormente, foram pesados e submetidos à análises bromatológicas. A degradabilidade em tempo zero foi tomada mergulhando os sacos em recipiente contendo água a temperatura de 39 °C durante 15 minutos (CUMMINS et al., 1983).

Para estimativa dos parâmetros de degradação foi utilizado o modelo proposto por ØRSKOV e McDONALD (1979): $p = a + b(1 - e^{-ct})$, em que “p” é a degradação obtida em cada tempo; “a” é a fração solúvel; “b” é a fração potencialmente degradável da fração insolúvel que seria degradada a uma taxa “c”; “c” é a taxa de degradação da fração “b” e “t” é o tempo de incubação em horas.

Os parâmetros “a”, “b” e “c” da equação exponencial foram utilizadas para calcular a degradabilidade potencial ($D_p = a + b$), representada pela quantidade de alimento que pode se solubilizar ou degradar dentro do rúmen se o tempo não for um fator limitante. A degradabilidade ruminal efetiva (D_e), que representa a quantidade de alimento realmente degradado, é definida pelo tempo na qual o alimento está realmente no rúmen. Foi calculada segundo o modelo matemático proposto por ØRSKOV e McDONALD (1979): $DE = a + [(b \times c) / (c + k)]$, em que k é a taxa de passagem de sólidos pelo rúmen. No presente estudo, utilizou-se taxa de passagem de MS de 2,0; 5,0 e 8,0 %/h. Recomenda-se o valor de 2%/h para animais recebendo ração completamente moída e/ou em baixo nível alimentar (uma vez a manutenção), 5%/h para vacas leiteiras de baixa produção (menos que 15 kg de leite /dia) ou gado de corte recebendo alto nível de dietas mistas (menos que 2 vezes a manutenção) e 8%/h para vacas leiteiras de alta produção (mais que 15 kg de leite/dia) recebendo dietas mistas (mais que 2 vezes a manutenção) (AFRC, 1993).

4.5 Contagem total e diferencial de protozoários ruminais

As coletas para contagem total e diferencial de protozoários foram realizadas no dia 19 de cada período experimental, às 0 e 4 h após a alimentação matinal. O conteúdo ruminal foi coletado manualmente por varredura do assoalho ruminal e 10 mL deste material foi armazenado em frasco contendo 20 mL de formaldeído 50% (v/v). Para a realização da contagem diferencial dos protozoários foi utilizado 1 mL da amostra diluída com formol e nesta, adicionada 2 gotas de verde brilhante a 2 %, deixando repousar por 4 h. Em seguida, foram adicionados 9 mL de glicerol a 30% e homogeneizada a mistura, tornando a alíquota do líquido ruminal diluída 30 vezes.

Para as contagens diferenciais dos protozoários utilizou-se câmara de contagem “Sedgwick-Rafter” composta por retículo de 0,5 mm X 0,5 mm de área, com subdivisões de 25 quadrículos. Esta câmara foi acoplada à ocular de um microscópio da marca Olympus modelo CH2, conforme técnica descrita por DEHORITY (1993).

Com a câmara acoplada ao microscópio, foram contados 100 campos óticos através do retículo, com aumento de 100 X. Do total de protozoários, foram diferenciados cinco gêneros, *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Epidinium* e *Diplodinium* (incluem *Eudiplodinium*, *Ostracodinium* e *Polysplatron*).

4.6 Análise de comunidade bacteriana ruminal

As amostras de conteúdo ruminal para realização de análise de comunidade bacteriana ruminal, através da técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), foram coletadas via fístula às 4 h após a refeição matinal do 21º dia. Foram coletadas aproximadamente 50 mL de conteúdo ruminal, em pontos diferentes do rúmen e homogeneizadas. Imediatamente após a coleta, as amostras eram embaladas em frasco de vidro hermético, rotuladas e armazenadas em freezer à -20 °C para posterior processamento do DNA.

4.6.1 Extração do DNA das amostras de líquido ruminal

Para a extração de DNA foi seguida a técnica de GRIFFITHS modificado (2000), sendo o conteúdo das amostras descongelado e 0,5 g transferidos para

microtubos (2 mL) contendo 0,5 mg de glass beads (micropérolas de vidro com 0,1 mm, Biospec Products), 0,5 mL de solução tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 8,0), 0,25 mL de fenol saturado (Ultra PureTM Buffer-Saturated Phenol, Invitrogen Life Technologies) e 0,25 mL de clorofórmio. Cada amostra foi passada pelo vórtex (TE 162, TECNAL) em velocidade máxima, por 60 s para lise celular, e, então, foram centrifugadas a 6000 rpm por 12 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e foi adicionado 0,5 mL de clorofórmio. Nova centrifugação foi realizada a 6000 rpm por 12 min a 4°C, sendo a fase aquosa transferida para novo tubo adicionando-se 0,5 mL de clorofórmio. Última centrifugação a 6000 rpm por 12 min a 4°C e a fase aquosa foi transferida para novo tubo e os ácidos nucleicos foram precipitados adicionando-se 2 volumes de etanol absoluto (Synth) por 2 h em gelo e novamente as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm, por 10 min a 4°C. Descartou-se o etanol cuidadosamente e o precipitado foi lavado com etanol 70% e sofreram nova centrifugação a 6000 rpm por 10 min a 4°C. Descartou-se o etanol e foi aguardada a secagem das amostras. O precipitado foi então re-suspenso em 50-100 µL de TE (tris-EDTA). As amostras foram congeladas para serem usadas como “template” (substrato) para as reações de PCR.

A qualidade da extração, pureza e quantidade de DNA na solução final obtida foram avaliadas através da razão entre a absorbância A260 e A280 em espectrofotômetro Nanodrop ND-100.

4.6.2 PCR para amplificação de DNA da comunidade *Bactéria e Archaea*

Alíquotas de 1,0 µL de “template” foram utilizadas para a amplificação de seqüências de 16S rRNA em PCR com volume total de reação de 25 µL, contendo concentrações finais de 0,8 mM de dNTPs, 0,2µM cada de par dos “primers” (Invitrogen Life Technologies), solução tampão (1X), 1,5 mM de solução de MgCl₂, 1 U/50µL de Taq DNA polimerase e 19,95 µL de água tratada (DEPC Treated Water, free DNase and RNase, Invitrogen Life Technologies).

Os “primers” para *Bacteria* utilizados foram 968GCF (5' CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC 3') e 1401R (CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG). Já para a comunidade

Archaea foram utilizados os “primers” 1100GCF (5’ CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CCG TCG ACA GTC AGG YAA CGA GCG AG 3’) e 1400R (CGG CGA ATT CGT GCA AGG AGC AGG GAC). As condições de amplificação para *Bactéria* foram 1 ciclo inicial de desnaturação de 3 minutos a 97°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, com um ciclo de extensão final de 3 minutos a 72°C. Já para *Archaea* as condições de amplificação foram 1 ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 55°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C, com um ciclo de extensão final de 7 minutos a 72°C.

A presença de produtos da reação foi observada através de eletroforese em gel de agarose (1,5%) em 90 V por 60 min sob solução tampão de TAE 1X (40 mM de tris-acetato e 1 mM de EDTA). O gel foi corado com brometo de etídio ($10 \mu\text{L}^{-1}$) utilizando o DNA de fago Lambda (Promega) e λ Hind III (Promega) como marcador de peso molecular, sendo visualizado sob luz U.V. (ultravioleta) em transiluminador.

4.6.3 Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE)

O método de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (“denaturing gradient gel electrophoresis” – DGGE) tem por princípio básico a desnaturação das pontes de hidrogênio existentes entre as duas fitas de DNA através das bases de purina, adenina (A) e guanina (G), e das bases de pirimidinas, tiamina (T) e citosina (C). A adenina se liga à tiamina por duas ligações de pontes de hidrogênio, enquanto que, entre a citosina e guanina, ocorrem três ligações. Portanto, as regiões de DNA ricas em C e G se tornam mais resistentes à desnaturação. O gradiente de desnaturação de um gel de DGGE aumenta de cima para baixo, ou seja, o maior gradiente de desnaturação ocorre no final do gel. Desta forma, os organismos que contém menor quantidade de regiões C e G sofrem desnaturam rapidamente e se concentram no início do gel, enquanto que os organismos ricos em C e G só são paralisados no final do gel. A formação de bandas nos diferentes gradientes no gel ocorre pela presença dos grampos GC, que são responsáveis pelo retardamento dos fragmentos durante a corrida no gel, sem estes o fragmento sofreria desnaturação completa e não haveria a formação das bandas. Através disto, é possível realizar a

separação de populações de organismos amplificados com os mesmos “primers” presentes em uma única banda de reação de PCR (FISHER e LERMANN, 1979).

O DGGE foi realizado no sistema Dcode “Universal Mutation Detection System” (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando gel de acrilamidabisacrilamida, 0,1% [m/v] de persulfato de amônio (Bio-Rad), 0,1% [v/v] de TEMED [N,N,N',N' tetrametil-etilenotiamina] em solução tampão 1X TAE [tris-acetato EDTA]. O gel de acrilamidabisacrilamida de concentração 8% para comunidade *Bacteria* e 6% para comunidade *Archaea* continha gradientes desnaturantes de 45 a 60%. O gradiente de desnaturação foi preparado utilizando-se duas soluções: solução 100% de desnaturação (40% de formamida e 7 M de uréia) e solução 0% de desnaturação (sem formamida ou uréia). Os produtos do PCR foram aplicados no DGGE contendo agente tamponante e corante (bromofenol azul), na proporção de 5:1 do produto de PCR e fixador. Como a concentração de fragmentos de DNA dos produtos de PCR variou, a concentração de DNA nas amostras foi corrigida antes da aplicação no DGGE. O procedimento para a amplificação ocorreu em solução TAE a 60°C e voltagem constante de 60V por 16 h. As bandas de DNA foram reveladas através de coloração de prata como descrito por MEYER et al. (1991). Os géis foram fotografados (Cânon Powershot A580) e as imagens analisadas, utilizando-se o software Bionumerics (Biosystematica, Devon, UK). Os resultados das análises das imagens obtidas após o DGGE foram utilizados para a determinação da contagem de bandas para as comunidades *Bacteria* e *Archaea*. Os Clusters (grupos) foram determinados por seqüenciamento comparando os padrões de amplificação, sendo a construção da árvore de relações (dendograma) reflexo da similaridade relativa entre os perfis. A quantidade de similaridade é refletida através da proximidade ou agrupamento e o coeficiente de similaridade é expresso em porcentagem, valor esse locado acima de cada dendograma.

4.7 Análise Estatística

Os resultados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1989), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). Os dados (variável dependente) que não atenderam a esta premissa foram submetidos à transformação logarítmica [$\log(X+1)$] ou pela raiz quadrada [$\sqrt{X+1/2}$]. Os

dados originais ou transformados, quando este último procedimento foi necessário, foram submetidos à análise de variância, através do procedimento General Linear Model (PROC GLM do SAS), que separou como causas de variação efeito de modificador, efeito de fonte energética e efeito de interação entre modificador e fonte energética, bem como efeito de período e efeito de animal dentro de quadrado (**Tabela 2**). Os efeitos dos fatores principais (efeito de modificador e efeito de fonte energética) foram separados através do teste de Duncan. Adotou-se o nível de significância de 5%.

Tabela 2. Esquema da análise de variância para delineamento em quadrado latino triplo com arranjo fatorial de tratamentos

Causas de variação	Graus de Liberdade
Tratamentos	8
Modificador (M)	[2]
Fonte de energia (E)	[2]
Interação M X E	[4]
Período	2
Animal dentro de quadrado	6
Resíduo	10
Total	26

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes aos resultados encontrados para a degradabilidade *in situ* da MS e da FDN da cana-de-açúcar se encontram na **Tabela 3**.

Tabela 3. Degradabilidade *in situ* da Matéria Seca e da Fibra em Detergente Neutro da cana-de-açúcar sob influência de dois modificadores ruminais e três fontes energéticas

	Modificador ¹			Fonte ²					Probabilidade ⁴		
Variável	CON	MON	PAP	MSM	SGUM	PC	Média	EPM ³	M	F	M*F
MS											
Fração a	41,90	41,64	41,92	42,14	41,14	42,18	41,82	0,2055	0,8024	0,0784	0,5607
Fração b	19,54	17,50	26,34	16,67	23,00	23,71	21,13	2,3146	0,2354	0,3476	0,0959
Taxa c	0,0182	0,0180	0,0167	0,0245	0,0137	0,0148	0,0176	0,0023	0,9717	0,2404	0,6520
De 2%	49,74	49,20	49,96	49,57	47,44	51,88	49,63	0,6816	0,8813	0,0503	0,7520
De 5%	46,31	45,96	46,31	46,60 ^{AB}	44,46 ^B	47,51 ^A	46,19	0,4374	0,9094	0,0220	0,7318
De 8%	44,98	44,67	44,97	45,35 ^A	43,41 ^B	45,87 ^A	44,88	0,3426	0,8800	0,0129	0,6955
Dp	61,44	59,15	68,26	58,82	64,13	65,89	62,95	2,3134	0,2110	0,3689	0,0987
FDN											
Fração a	1,98	1,74	2,63	2,14	2,20	2,02	2,12	0,1876	0,2992	0,9397	0,9176
Fração b	41,59	33,45	48,73	37,45	40,30	45,56	41,25	2,9895	0,0289	0,5348	0,0169
Taxa c	0,0140	0,0163	0,0119	0,0170	0,0106	0,0149	0,0141	0,0018	0,2468	0,4169	0,0575
De 2%	16,80	14,63	16,00	15,40 ^{AB}	11,36 ^B	20,52 ^A	15,78	1,0955	0,7887	0,0063	0,5258
De 5%	10,05	8,96	9,52	9,52 ^{AB}	6,88 ^B	12,07 ^A	9,49	0,6606	0,8898	0,0045	0,2782
De 8%	7,56	6,77	7,30	7,30 ^{AB}	5,36 ^B	8,94 ^A	7,20	0,4703	0,7546	0,0029	0,1411
Dp	43,57 ^a	35,19 ^b	51,36 ^a	39,59	42,50	47,59	43,37	3,0524	0,0244	0,5589	0,0174

^{abc}Letras minúsculas nos modificadores diferem estatisticamente.^{ABC}Letras maiúsculas nas fontes diferem estatisticamente.¹Modificador: CON: controle, MON: monensina, PAP: preparado de anticorpos policlonais. ²Fonte: MSM: milho seco moído, SGUM: silagem de grão úmido de milho, PC: polpa cítrica. ³EPM: erro padrão da média. ⁴Probabilidades estatísticas para efeito de modificador (M), efeito de fonte energética (F), interação entre modificador ruminal e fonte energética (M*F).

Observou-se que os dados da De da MS da cana-de-açúcar, independentemente dos tratamentos, apresentaram valores médios compatíveis com os apresentados por PINTO et al. (2003) que reportaram De a 2,6%/h da MS da cana-de-açúcar de 50,2.

Em linhas gerais, os dados obtidos para a degradabilidade efetiva da FDN da cana-de-açúcar, independentemente dos tratamentos utilizados, se mostraram baixos. O valor observado neste experimento para degradabilidade efetiva de FDN da cana-de-açúcar a 0,02/h foi igual a 15,8%, o que contraria o demonstrado por FRANZOLIN e FRANZOLIN (2000a) que observaram para a mesma variável o valor de 42,4% em bovinos alimentados com dietas de alto volumoso. Isto possivelmente ocorreu devido às diferenças na proporção volumoso:concentrado entre os dois experimentos, ao estágio de maturação e/ou variedade de cana-de-açúcar utilizada. Isto é compreensivo, já que o ambiente ruminal de animais com maior quantidade de carboidrato prontamente fermentescível, como é o caso do atual experimento, terá um pH mais ácido que um ambiente com maior presença de fibras, diminuindo a população de bactérias celulolíticas e, por conseguinte, diminuindo a degradabilidade da fibra.

O valor para a Dp da FDN da cana-de-açúcar, independentemente dos tratamentos analisados, mostrou-se relativamente baixo. Em experimento avaliando a Dp da cana-de-açúcar, MOGENTALE (2005) demonstrou valor para tal variável, independentemente de tratamento, de 54,70.

Foi observado efeito de fonte energética sobre a degradabilidade efetiva da MS da cana-de-açúcar a 0,05 e 0,08/h, com maior degradação do grupo suplementado com PC em relação ao grupo que recebeu SGUM e sem diferença para o grupo alimentado com MSM, ou seja, na presença da SGUM há maior disponibilidade de carboidratos prontamente fermentescíveis, neste caso amido, para utilização dos microrganismos, conseqüentemente há acidificação do meio o que leva a diminuição da população celulolítica, diminuindo a De da cana-de-açúcar. Já com a PC, a energia disponível está presente na forma de pectina, que permite maior proliferação de bactérias celulolíticas, elevando a degradabilidade da cana-de-açúcar neste grupo. Esse achado pode ser justificado pelo encontrado no trabalho de Marino (2008), onde no grupo suplementado com PC os valores médios de pH se mantiveram na faixa de 6,0 - 6,5 (ideal para atividade das bactérias celulolíticas)

durante todos os tempos de coleta, fato não ocorrido com o pH das outras fontes, em que o mesmo encontrava-se abaixo de 6,0 entre 2 e 6 h após a alimentação.

Uma outra hipótese possível seria o efeito inibitório que os carboidratos prontamente fermentescíveis possam causar sobre as bactérias ruminais celulolíticas e conseqüentemente, sobre a digestão da fibra. Esse efeito é provavelmente relacionado com uma preferência de espécies bacterianas como *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes* e *Prevotella ruminicola* pela utilização dos carboidratos disponíveis, ao invés de investir energia para a produção de fatores de adesão e celulasas para a digestão da fibra (MIRON et al., 1996).

Interação entre modificador ruminal e fonte energética foi observada sobre a fração “b” da degradabilidade da FDN da cana-de-açúcar ($P = 0,0169$), onde no grupo tratado com monensina os animais suplementados com PC apresentaram valores maiores que os animais suplementados com SGUM. Os animais que receberam MSM não mostraram diferença entre os dois outros grupos (dados não demonstrados).

Efeito de modificador foi observado sobre a fração “b” da degradabilidade da FDN da cana-de-açúcar ($P = 0,0289$), porém o teste de médias utilizado (Duncan) não foi capaz de detectar diferença entre modificadores.

Observou-se efeito de fonte energética sobre a De da FDN da cana-de-açúcar a 0,02; 0,05 e 0,08/h. De forma geral, a adição da PC à dieta aumentou a De da MS em 5,7 à 6,9% e da FDN em 66,79 à 80,63%, em relação à dieta contendo SGUM.

Para a degradabilidade potencial (Dp) da FDN da cana-de-açúcar foi observada interação entre modificador ruminal e fonte energética ($P = 0,0174$), sendo que no grupo tratado com monensina os grupos suplementados com MSM e PC tiveram valores maiores que o grupo suplementado com SGUM. No grupo tratado com PAP, os animais alimentados com SGUM tiveram valor maior que os animais que receberam MSM. Já os animais alimentados com PC não diferiram dos outros dois grupos (dados não demonstrados).

Também foi observado efeito de modificador ruminal sobre a Dp da FDN da cana-de-açúcar ($P = 0,0244$), sendo que o tratamento com MON diminuiu em 8,38 e 16,17 unidades percentuais (19,23% e 31,5%) a Dp da FDN em relação aos grupos CON e PAP, respectivamente.

Em experimento que avaliou o efeito de ionóforos sobre a fermentação e digestão ruminal em bovinos, MOGENTALE (2005) observou que a monensina diminuiu em 6,99% a Dp da FDN da cana-de-açúcar em relação ao grupo controle. No atual experimento, a MON propiciou uma diminuição apenas ligeiramente maior da Dp da FDN da cana-de-açúcar.

Os dados referentes à degradabilidade *in situ* da MS e da PB do farelo de soja se encontram na **Tabela 4**

Em linhas gerais, os dados da degradabilidade da MS e PB do farelo de soja se apresentaram mais baixos que o citado, por exemplo, por RODRIGUES (2000), que observou valores para degradabilidade da PB do farelo de soja de 8,92; 93,34; 0,1136; 86,65; 71,51; 61,52 e 102,26 para fração “a”, “b”, taxa de degradação “c”, De à 2, 5, 8%/h e Dp, respectivamente.

Não foi observada interação entre modificador ruminal e fonte energética, nem efeito de modificador ruminal ou de fonte energética para quaisquer dos parâmetros de degradabilidade *in situ* da MS ou PB do farelo de soja.

Esperava-se observar efeito do PAP sobre os parâmetros de degradabilidade, uma vez que tal produto possui anticorpos contra bactérias proteolíticas (*Peptostreptococcus anacrobis*, *Clostridium aminophilum* e *Clostridium sticklandii*). Uma das razões para a não observação do efeito pode ser atribuída à proteólise ruminal do PAP. Ainda, o produto pode ter exercido seu efeito sobre as citadas espécies bacterianas, mas outras espécies com funções proteolíticas podem ter ocupado este nicho e exercido tal função.

Tabela 4. Degradabilidade *in situ* da Matéria Seca e da Proteína Bruta do farelo de soja sob influência de dois modificadores ruminais e três fontes energéticas

	Modificador ¹			Fonte ²					Probabilidade ⁴		
Variável	CON	MON	PAP	MSM	SGUM	PC	Média	EPM ³	M	F	M*F
MS											
Fração a	25,29	24,73	24,79	25,27	25,48	24,06	24,94	0,3423	0,7743	0,2379	0,9521
Fração b	77,85	78,78	79,89	79,31	76,63	80,58	78,84	1,3490	0,8581	0,5614	0,9322
Taxa c	0,0505	0,0429	0,0394	0,0419	0,0466	0,0443	0,0443	0,0035	0,5627	0,9040	0,9798
De 2%	78,57	77,21	76,13	75,92	77,60	78,38	77,30	0,9681	0,5595	0,5423	0,9224
De 5%	62,24	60,00	58,73	58,95	61,15	60,87	60,32	1,1039	0,4699	0,6989	0,9493
De 8%	53,78	51,37	50,25	50,71	52,70	51,98	51,80	1,0436	0,4361	0,7590	0,9465
Dp	103,14	103,51	104,68	104,59	102,10	104,64	103,78	1,4036	0,9231	0,7733	0,9513
PB											
Fração a	3,60	1,46	1,88	1,96	3,24	1,74	2,31	0,4641	0,1652	0,3674	0,8779
Fração b	100,70	100,02	99,73	101,56	98,84	100,04	100,15	0,9596	0,9492	0,6858	0,8105
Taxa c	0,0534	0,0492	0,0472	0,0481	0,0526	0,0492	0,0500	0,0034	0,8207	0,8970	0,9905
De 2%	73,93	71,99	70,51	70,55	73,92	71,96	72,14	1,3259	0,6763	0,6842	0,9503
De 5%	52,97	50,57	49,21	49,04	53,10	50,60	50,92	1,5732	0,6948	0,6589	0,9738
De 8%	41,89	39,19	38,13	38,07	41,85	39,28	39,74	1,4995	0,6596	0,6615	0,9777
Dp	104,30	101,48	101,61	103,52	102,08	101,78	102,46	0,8505	0,4991	0,7806	0,6726

¹Modificador: CON: controle, MON: monensina, PAP: preparado de anticorpos policlonais, ²Fonte: MSM: milho seco moído, SGUM: silagem de grão úmido de milho, PC: polpa cítrica. ³EPM: erro padrão da média. ⁴Probabilidades estatísticas para efeito de modificador (M), efeito de fonte energética (F), interação entre modificador ruminal e fonte energética (M*F).

Os dados referentes à degradabilidade *in situ* da MS e do amido do MSM se encontram na **Tabela 5**.

Tabela 5. Efeito dos modificadores ruminais sobre a degradabilidade *in situ* da Matéria Seca e do Amido do Milho Seco Moído

Variável	Modificador ¹			Média	EPM ²	Prob. ³
	CON	MON	PAP			
MS (MSM)						
Fração a	12,84	13,39	12,64	12,96	0,620	0,8531
Fração b	85,56	84,33	86,95	85,61	1,362	0,8541
Taxa c	0,0501	0,0433	0,0483	0,047	0,004	0,8608
De 2%	73,33	70,86	72,27	72,15	1,246	0,8842
De 5%	55,15	52,33	53,68	53,72	1,603	0,8899
De 8%	45,43	42,84	44,07	44,12	1,560	0,8986
Dp	98,40	97,72	99,59	98,57	1,316	0,8699
Amido (MSM)						
Fração a	4,64 ^a	4,65 ^a	2,54 ^b	3,95	0,596	0,0374
Fração b	97,25	97,66	100,71	98,54	0,694	0,1699
Taxa c	0,0592	0,0505	0,0564	0,055	0,006	0,8573
De 2%	76,65	74,38	74,53	75,18	1,576	0,8210
De 5%	56,75	53,55	53,69	54,66	2,128	0,8246
De 8%	45,55	42,32	42,44	43,44	2,084	0,8272
Dp	101,89	102,31	103,25	102,49	0,381	0,4833

^{abc} Letras minúsculas nos modificadores diferem estatisticamente.

¹Modificador: CON: controle, MON: monensina, PAP: preparado de anticorpos policlonais ²EPM: erro padrão da média. ³Prob: Probabilidades estatísticas para efeito de modificador (M).

Observou-se que os dados para degradabilidade do MSM, independentemente do tratamento utilizado, demonstraram semelhança com os valores discutidos por MOGENTALE (2005) e PASSINI et al. (2004), porém, discordou do descrito por ZEOULA et al. (2004) que apresentaram valores de 35,87; 58,90; 6,58; 80,88; 69,17; 62,30 e 94,76 para fração “a”, “b”, taxa de degradação “c”, De à 2, 5, 8%/h e Dp, respectivamente.

Houve efeito de modificador ruminal (P = 0,0374) sobre a fração “a” da degradabilidade do amido do MSM, sendo que o tratamento com PAP apresentou diminuição de 2,1 unidades percentuais (45,26%) sobre a degradação desta variável

tanto em relação ao grupo CON como em relação ao grupo tratado com MON, que por sua vez não diferiu do controle.

Os dados referentes à degradabilidade *in situ* da MS e do amido da SGUM se encontram na **Tabela 6**.

Tabela 6. Efeito dos modificadores ruminais sobre a degradabilidade *in situ* da Matéria Seca e do Amido da Silagem de Grão Úmido de Milho

	Modificador ¹					
Variável	CON	MON	PAP	Média	EPM ²	Prob. ³
MS (SGUM)						
Fração a	58,66	61,14	59,36	59,72	0,480	0,3248
Fração b	35,13 ^a	29,46 ^b	32,78 ^{ab}	32,45	1,028	0,0383
Taxa c	0,1350 ^b	0,2203 ^a	0,1371 ^b	0,164	0,020	0,0169
De 2%	88,85	88,01	87,90	88,25	0,508	0,7728
De 5%	83,69	84,92	83,27	83,96	0,632	0,6979
De 8%	80,08	82,49	79,95	80,84	0,782	0,5032
Dp	93,79 ^a	90,60 ^b	92,14 ^{ab}	92,18	0,714	0,0810
Amido (SGUM)						
Fração a	75,36	75,77	74,52	75,21	0,502	0,7730
Fração b	23,99	23,31	25,23	24,17	0,629	0,6715
Taxa c	0,2633	0,5073	0,1995	0,323	0,504	0,1579
De 2%	97,49	98,18	97,11	97,60	0,244	0,3947
De 5%	95,21	96,97	94,12	95,43	0,583	0,3583
De 8%	93,38	95,87	91,87	93,71	0,805	0,3485
Dp	99,35	99,08	99,74	99,39	0,165	0,4619

^{abc}Letras minúsculas nos modificadores diferem estatisticamente.

¹Modificador: CON: controle, MON: monensina, PAP: preparado de anticorpos policlonais ²EPM: erro padrão da média. ³Prob: Probabilidades estatísticas para efeito de modificador (M).

Em linhas gerais, independentemente dos tratamentos utilizados, a degradabilidade da SGUM apresentou valores maiores que os descritos por JOBIM et al. (1999) que relataram que silagens de grãos úmidos de milho tem maior fração solúvel (a) em relação à silagens de espiga (grãos + sabugo) ou de plantas inteiras, o que é atribuído à menor fração de parede celular nas silagens de grãos. Uma elevada fração “a”, associada a uma alta taxa de degradação da fração

potencialmente degradável do alimento “b” conferem rápido desaparecimento no rúmen das silagens de grãos.

Os dados para a Dp da MS da SGUM, independentemente dos tratamentos, se apresentaram mais baixos que os descritos por JOBIM et al. (1999), que demonstraram Dp da silagem de grãos de milho de 97,53%. Segundo os autores, esta maior degradabilidade, atribuída às silagens de grãos de milho, pode estar associada à fragilização da matriz protéica durante a ensilagem.

Efeito de modificador ruminal ($P = 0,0383$) foi observado sobre a fração “b” da degradabilidade da MS da SGUM, sendo que o grupo tratado com MON apresentou diminuição de 5,67 unidades percentuais (16,14%) desta variável, em relação ao grupo CON. O grupo tratado com PAP não mostrou diferença significativa entre os dois grupos. Também foi demonstrado efeito de modificador ruminal ($P = 0,0169$) sobre a taxa de degradação “c” da MS da SGUM, sendo que a MON aumentou em 0,0853 e 0,0833 unidade percentual (63,2% e 60,7%) esta variável em relação ao grupo CON e o grupo tratado com PAP, respectivamente, que por sua vez não diferiram entre si.

O efeito de modificador ruminal observado no atual experimento, com maior taxa de degradação (c) para o grupo tratado com MON, pode estar relacionado com o efeito deste ionóforo sobre a população de bactérias gram-positivas, permitindo a seleção de outras com maior afinidade pela degradação do amido.

Observou-se efeito de modificador ruminal sobre a Dp da MS da SGUM, sendo que os animais tratados com MON apresentaram diminuição de 3,19 unidades percentuais (3,40%) em relação ao grupo CON. Os animais tratados com PAP não apresentaram diferença significativa para os dois outros grupos.

Os dados referentes à degradabilidade *in situ* da MS e da pectina da PC se encontram na **tabela 7**.

Tabela 7. Efeito dos modificadores ruminiais sobre a degradabilidade *in situ* da Matéria Seca e da Pectina da Polpa Cítrica

	Modificador ¹					
Variável	CON	MON	PAP	Média	EPM ²	Prob. ³
MS (PC)						
Fração a	14,26	15,54	16,62	15,47	0,601	0,2118
Fração b	85,09	85,46	87,10	85,88	0,950	0,7207
Taxa c	0,0386	0,0411	0,0287	0,036	0,005	0,3223
De 2%	67,74	72,54	67,88	69,39	2,181	0,3023
De 5%	49,54	53,75	48,35	50,55	2,209	0,2883
De 8%	40,79	44,31	39,70	41,57	1,917	0,2925
Dp	99,34	101,00	103,72	101,35	0,952	0,2703
Pectina (PC)						
Fração a	14,88	14,20	16,30	15,13	1,450	0,9026
Fração b	84,93	88,23	79,55	84,24	2,870	0,3610
Taxa c	0,0462	0,0452	0,0596	0,050	0,007	0,6048
De 2%	72,45	74,56	72,94	73,32	2,138	0,8787
De 5%	54,46	55,44	56,56	55,49	2,561	0,9305
De 8%	45,20	45,60	47,75	46,18	2,522	0,8884
Dp	99,81	102,43	95,85	99,36	1,708	0,1313

^{abc} Letras minúsculas nos modificadores diferem estatisticamente.

¹Modificador: CON: controle, MON: monensina, PAP: preparado de anticorpos policlonais ²EPM: erro padrão da média. ³Prob: Probabilidades estatísticas para efeito de modificador (M).

Não foi observado efeito de modificador ruminal para quaisquer dos parâmetros de degradabilidade *in situ* da MS ou da pectina da polpa cítrica.

MÜLLER e PRADO (2004), em revisão, destacam que a PC é rica em pectina, um carboidrato altamente fermentescível, porém sem as características de degradação do amido, que é a produção de ácido láctico. Portanto, suas características promovem um padrão de fermentação ruminal mais estável, semelhante aos volumosos, diminuindo a ocorrência de distúrbios ruminiais e metabólicos.

Os dados referentes à contagem absoluta de protozoários ($\times 10^3/\text{mL}$) se encontram na **Tabela 8**.

Os dados observados para a contagem geral de *Isotricha*, independentemente dos tratamentos utilizados, foram superiores aos descritos na literatura, por exemplo, por MENDOZA et al. (1993), que observaram valores de 1,28 ($\times 10^3/\text{mL}$).

O gênero *Isotricha* sofreu efeito de modificador ruminal ($P = 0,0264$) às 4 h, sendo que o grupo tratado com PAP apresentou maior contagem total deste gênero de protozoários em relação ao grupo CON e ao grupo tratado com MON, que não diferiram entre si. Também foi observado efeito de fonte energética sobre a população de *Isotricha* às 0 h ($P = 0,0012$) e 4 h ($P = 0,0011$) após a alimentação, sendo a contagem total deste gênero mais elevada no grupo alimentado com PC e menor nos grupos que receberam SGUM ou MSM, sem diferença entre esses dois grupos. Os animais alimentados com PC tiveram maiores valores, o que pode ser justificado pela presença da pectina na dieta destes, uma vez que, segundo VAN SOEST (1994), o gênero *Isotricha* tem características pectinolíticas. Isso também foi citado por WILLIAMS e COLEMAN (1988), que relatam que as holotricas (*Isotricha* e *Dasytricha*) estão mais envolvidas na utilização de polissacarídeos não estruturais e açúcares solúveis, demonstrando, assim, atividade pectinolítica.

Tabela 8. Contagem absoluta de protozoários ($\times 10^3/\text{mL}$) obtida com os tratamentos compostos por diferentes modificadores ruminais e fontes energéticas

Variável		Modificador ¹			Fonte ²			Média	EPM ³	Probabilidade ⁴		
		CON	MON	PAP	MSM	SGUM	PC			M	F	M*F
Cont. Geral	0h	227,07	145,73	244,27	166,80	240,13	210,13	205,69	35,74	0,5624	0,7478	0,4861
	4h	140,53	143,47	268,67	190,13	226,27	136,27	184,22	37,70	0,2367	0,5474	0,3115
<i>Dasytricha</i>	0h	2,27	0,93	1,20	1,07	1,07	2,27	1,47	0,30	0,2230	0,2336	0,5452
	4h	1,07	2,00	1,33	0,93	1,20	2,27	1,47	0,40	0,6889	0,4627	0,8534
<i>Diplodinium</i>	0h	4,13	4,80	4,40	4,80	3,87	4,67	4,44	1,20	0,9760	0,9468	0,4339
	4h	4,93	8,40	6,27	6,80	8,00	4,80	6,53	1,89	0,7529	0,7838	0,3079
<i>Entodinium</i>	0h	203,07	123,60	201,60	156,67	232,00	139,60	176,09	34,49	0,6272	0,5819	0,4903
	4h	123,47	123,07	239,20	175,20	209,60	100,93	161,91	36,47	0,2894	0,4124	0,3537
<i>Epidinium</i>	0h	0,93	0,80	0,13	0,40	0,27	1,20	0,62	0,23	0,4146	0,3062	0,7079
	4h	1,20	1,07	0,13	0,40	0,80	1,20	0,80	0,27	0,2053	0,4437	0,7107
<i>Isotricha</i>	0h	16,67	15,60	36,93	3,87 ^B	2,93 ^B	62,40 ^A	23,07	7,32	0,2185	0,0012	0,2839
	4h	9,87 ^b	8,93 ^b	21,73 ^a	6,80 ^B	6,67 ^B	27,07 ^A	13,51	3,06	0,0264	0,0011	0,4061

^{abc} Letras minúsculas nos modificadores diferem estatisticamente.

^{ABC} Letras maiúsculas nas fontes diferem estatisticamente.

¹Modificador: CON: controle, MON: monensina, PAP: preparado de anticorpos policlonais. ²Fonte: MSM: milho seco moído, SGUM: silagem de grão úmido de milho, PC: polpa cítrica. ³EPM: erro padrão da média. ⁴Probabilidades estatísticas para efeito de modificador (M), efeito de fonte energética (F) e interação entre modificador ruminal e fonte energética(M*F).

Os dados referentes à contagem relativa de protozoários (%) se encontram na **Tabela 9.**

Em linhas gerais, independentemente dos tratamentos, os dados para a contagem relativa de protozoários se mostrou semelhante ao apresentado em literatura. FRANZOLIN et al. (2000b), em experimento para avaliar diferentes níveis de cana-de-açúcar na alimentação de ovinos sobre a população de protozoários ciliados, demonstraram valores para relação de protozoários de 87,5-93,8% para o gênero *Entodinium*. No atual experimento, foi demonstrado valor próximo para o mesmo gênero de protozoários nos animais alimentados com MSM (86,7-89,2) e SGUM (89,4-94,6), o que pode ser explicado pela grande presença de substrato prontamente fermentescível nessas dietas. VALDEZ et al. (1977) e LENG e PRESTON (1976) relataram que, em dietas à base de cana-de-açúcar, pode ocorrer um aumento da população de holotricas (*Isotricha* e *Dasytricha*), com aumento de *Isotricha* em relação a *Dasytricha*, fato que foi observado no atual experimento.

Não foi observada interação entre modificador ruminal e fonte energética sobre a contagem relativa (%) de protozoários.

Para a contagem relativa, o gênero *Entodinium* foi influenciado pelo tipo de fonte energética a 0 h ($P = 0,0091$) e 4 h ($P = 0,0026$), sendo que os animais que receberam SGUM e MSM não diferiram entre si e apresentaram maior relação de protozoários quando comparados aos animais que receberam PC. Quanto aos resultados obtidos para a contagem relativa de protozoários, VAN SOEST (1994) descreveu que os protozoários que se desenvolvem melhor em dietas com alta quantidade de grãos tendem a ser do gênero *Entodinia*, por serem estes mais tolerantes a meios ácidos e por possuírem taxa de crescimento mais acelerada (6-15 h) quando comparados a outros gêneros de protozoários.

Tabela 9. Contagem relativa de protozoários (%) obtida com os tratamentos compostos por diferentes modificadores ruminais e fontes energéticas

Variável		Modificador ¹			Fonte ²			Média	EPM ³	Probabilidade ⁴		
		CON	MON	PAP	MSM	SGUM	PC			M	F	M*F
<i>Dasytricha</i>	0h	1,08	3,85	0,39	2,82	1,07	1,42	1,77	0,85	0,2477	0,6725	0,4793
	4h	1,12	2,12	0,51	0,76	1,16	1,83	1,25	0,35	0,2781	0,5490	0,9920
<i>Diplodinium</i>	0h	1,52	3,66	1,47	3,47	1,23	1,96	2,22	0,64	0,2518	0,3057	0,1848
	4h	4,04	6,19	3,22	5,63	4,18	3,64	4,48	0,99	0,3372	0,5942	0,0990
<i>Entodinium</i>	0h	89,46	76,50	83,43	86,78 ^A	94,67 ^A	67,95 ^B	83,13	3,92	0,2252	0,0091	0,2096
	4h	87,15	81,49	83,73	89,25 ^A	89,42 ^A	73,70 ^B	84,12	2,50	0,3573	0,0026	0,1135
<i>Epidinium</i>	0h	0,87	1,22	0,06	0,50	0,87	0,78	0,72	0,34	0,3689	0,8942	0,4095
	4h	1,22	1,51	0,03	0,38	1,39	0,99	0,92	0,32	0,1245	0,3715	0,7593
<i>Isotricha</i>	0h	7,06	14,76	14,64	6,42 ^B	2,16 ^B	27,89 ^A	12,15	3,14	0,2471	0,0008	0,1787
	4h	6,46 ^b	8,68 ^{ab}	12,51 ^a	3,97 ^B	3,84 ^B	19,84 ^A	9,22	1,97	0,1008	0,0001	0,1665

^{abc} Letras minúsculas nos modificadores diferem estatisticamente.

^{ABC} Letras maiúsculas nas fontes diferem estatisticamente.

¹Modificador: CON: controle, MON: monensina, PAP: preparado de anticorpos policlonais. ²Fonte: MSM: milho seco moído, SGUM: silagem de grão úmido de milho, PC: polpa cítrica. ³EPM: erro padrão da média. ⁴Probabilidades estatísticas para efeito de modificador (M), efeito de fonte energética (F) e interação entre modificador ruminal e fonte energética (M*F).

O gênero *Isotricha* sofreu efeito de modificador ruminal ($P = 0,1008$) às 4 h, sendo que o grupo tratado com PAP apresentou maior contagem relativa deste gênero de protozoários em relação ao grupo CON. O grupo tratado com MON não diferiu entre os dois outros grupos. Quando se observa a contagem total ($\times 10^3$ / mL) ou relativa (%) de protozoários, o efeito do modificador PAP está relacionado com maiores valores de protozoários do gênero *Isotricha*, o que pode ser explicado pelo fato de o modificador ruminal ter produzido seu efeito, diminuindo o número de bactérias responsáveis pela acidificação do ambiente, e tornando este favorável à proliferação de bactérias bem como destes próprios protozoários que possuem taxa de crescimento mais elevada (24-48 h).

No gênero *Isotricha*, houve efeito de fonte energética às 0 h ($P = 0,0008$) e 4 h ($P = 0,0001$) e os animais que receberam PC apresentaram contagem relativa deste gênero de protozoário mais elevada que os animais que receberam SGUM ou MSM, que por sua vez não diferiram entre si.

Os dados referentes à contagem de bandas amplificadas por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) para comunidades de *Bacteria* e *Archaea* se encontram na **Tabela 10**.

Foi observado efeito de interação entre modificador ruminal e fonte energética ($P = 0,0264$) sobre a contagem do número de bandas da comunidade *Archaea*. Porém, o teste de médias utilizado (Duncan) não detectou diferenças entre os efeitos estudados.

Tabela 10. Número de bandas amplificadas por eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) para comunidade *Bacteria*, *Archaea* e soma de *Bacteria* e *Archaea* obtida com os tratamentos compostos por diferentes modificadores ruminais e fontes energéticas

Variável	Modificador ¹			Fonte ²			Média	EPM ³	Probabilidade ⁴		
	CON	MON	PAP	MSM	SGUM	PC			M	F	M*F
<i>Bacteria</i>	6,61	7,39	7,00	5,94	9,11	5,94	7,00	0,6400	0,8837	0,1106	0,5216
<i>Archaea</i>	4,00	3,56	3,56	3,00 ^B	3,56 ^{AB}	4,56 ^A	3,70	0,3809	0,6518	0,0470	0,0264
Soma	10,61	10,94	10,56	8,94 ^B	12,67 ^A	10,50 ^{AB}	10,70	0,7123	0,9579	0,0741	0,0736

^{ABC} Letras maiúsculas nas fontes diferem estatisticamente.

¹Modificador: CON: controle, MON: monensina, PAP: preparado de anticorpos policlonais. ²Fonte: MSM: milho seco moído, SGUM: silagem de grão úmido de milho, PC: polpa cítrica. ³EPM: erro padrão da média. ⁴Probabilidades estatísticas para efeito de modificador (M), efeito de fonte energética (F) e interação entre modificador ruminal e fonte energética (M*F).

Houve efeito de fonte energética ($P = 0,0470$) sobre a contagem do número de bandas em DGGE da população de *Archaea*, sendo que os animais que receberam PC demonstraram um aumento de 1,56 banda (52%) em relação ao grupo que recebeu MSM. O grupo alimentado com SGUM não demonstrou diferença entre os dois outros grupos.

Segundo ANTUNES e RODRIGUEZ (2006), a fermentação da polpa cítrica aumenta a produção de acetato, o que conseqüentemente leva à produção de CO_2 . Com o aumento da disponibilidade deste co-fator, ocorre o aumento da presença das bactérias metanogênicas, o que explica, assim, o aumento das bandas amplificadas para esta comunidade.

Para a soma total do número de bandas amplificadas em DGGE houve efeito de fonte energética. Os animais alimentados com SGUM tiveram maior soma total de bandas amplificadas em relação aos animais alimentados com MSM, enquanto que os animais que receberam PC não diferiram dos outros dois grupos.

Os DGGEs oriundos dos produtos de PCR para análise da diversidade microbiana das comunidades *Bacteria* e *Archaea*, sob influência de dois tipos de modificadores ruminais se encontram nas figuras 1 e 2 e sob a influência de diferentes fontes energéticas se encontram nas figuras 3 e 4.

(A)

Figura 1. Perfis de amplificação em eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) para *Bacteria* produzido a partir de amostras de conteúdo ruminal de animais alimentados com (A) MSM: milho seco moído; (B) SGUM: silagem de grão úmido de milho ou (C) PC: polpa cítrica. Nas legendas à direita dos perfis estão o número do animal, período (P), modificador ruminal (CON = controle; MON = monensina; PAP = preparado de anticorpos policlonais) e fonte energética. Os coeficientes de similaridade, determinados pelo software Bionumerics, utilizando-se o método de agrupamento different bands, estão demonstrados do lado esquerdo de cada painel

(A)

(B)

(C)

Figura 2. Perfis de amplificação em eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) para *Archaea* produzido a partir de amostras de conteúdo ruminal de animais alimentados com (A) MSM: milho seco moído; (B) SGUM: silagem de grão úmido de milho ou (C) PC: polpa cítrica. Nas legendas, à direita dos perfis estão o número do animal, período (P), modificador ruminal (CON = controle; MON = monensina; PAP = preparado de anticorpos policlonais) e fonte energética. Os coeficientes de similaridade, determinados pelo software Bionumerics, utilizando-se o método de agrupamento different bands, estão demonstrados do lado esquerdo de cada painel

(A)

(B) **(C)**

Figura 3. Perfis de amplificação em eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) para *Bacteria* produzido a partir de amostras de conteúdo ruminal de animais tratados com (A) CON: controle; (B) MON: monensina ou (C) PAP: preparado de anticorpos policlonais. Nas legendas, à direita dos perfis estão o número do animal, período (P), modificador ruminal e fonte energética (MSM = milho seco moído; SGUM = silagem de grão úmido de milho ou PC = polpa cítrica). Os coeficientes de similaridade, determinados pelo software Bionumerics, utilizando-se o método de agrupamento different bands, estão demonstrados do lado esquerdo de cada painel

(A)

(B)

(C)

Figura 4. Perfis de amplificação em eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) para *Archaea* produzido a partir de amostras de conteúdo ruminal de animais tratados com (A) CON: controle; (B) MON: monensina ou (C) PAP: preparado de anticorpos policlonais. Nas legendas, à direita dos perfis estão o número do animal, período (P), modificador ruminal e fonte energética (MSM = milho seco moído; SGUM = silagem de grão úmido de milho ou PC = polpa cítrica). Os coeficientes de similaridade, determinados pelo software Bionumerics, utilizando-se o método de agrupamento different bands, estão demonstrados do lado esquerdo de cada painel

Não foi observada similaridade de perfis dentro dos tratamentos.

Em linhas gerais, não foi possível atribuir um padrão na estrutura de amplificação das comunidades *Bacteria* ou *Archaea* do conteúdo ruminal de animais tratados com dois diferentes modificadores ruminais ou 3 fontes energéticas distintas.

As amplificações das bandas, no atual experimento, demonstraram padrão parecido com o relatado por TAJIMA et al. (2001) e EDWARDS et al. (2004), sendo a maior concentração destas amplificações observadas para a comunidade *Bacteria* concentrada na região de baixo gradiente, ou seja, onde as bandas dos DNA com menor quantidade de ligações C-G se estabelecem. O DNA de algumas bactérias, como o *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium*, *Anaerovibrio lipolytica* e *Prevotella SP*, tem um baixo limiar de amplificação e, por isso, provavelmente são mais facilmente amplificados que seqüências de DNA de bactérias como a *Fibrobacter succinogenes* (TAJIMA et al., 2001; EDWARDS et al., 2004).

A microbiota ruminal é altamente responsiva a mudanças na dieta, idade, aditivos alimentares e saúde do animal hospedeiro (MIN et al., 2006). Ainda,

segundo o autor citado anteriormente, animais alimentados com dietas à base de milho demonstraram maior diversidade sobre a população bacteriana que animais alimentados com dietas à base de forragens.

A grande variação na similaridade dos perfis de DGGE da população bacteriana ruminal obtida neste experimento, quando analisado os efeitos de fonte energética ou modificador ruminal, demonstra a grande diferença na população bacteriana entre animais. Tal observação pode ser sustentada pelo demonstrado por KOCHERGINSKAYA et al. (2001) e MIN et al. (2006), que relataram a mesma variação na similaridade dos perfis de amplificação dos géis.

Os perfis dos géis de DGGE das amostras analisadas demonstraram diferenças acentuadas na amplificação das bandas, quando se observa um tratamento com um modificador ruminal ou uma fonte energética. Fato esse que é sustentado por KARNATI et al. (2007), que observaram comportamento semelhante na análise com DGGE de amostras de fluido ruminal, sugerindo que essas diferenças podem estar relacionadas ao tipo de amostra utilizada. No mesmo experimento, os autores utilizaram conteúdo ruminal e omasal como amostras para análise com DGGE e demonstraram um padrão mais semelhante de amplificação entre tratamentos para as amostras de conteúdo omasal, o que foi justificado pelo fato de o omaso possuir uma comunidade bacteriana menor e bem associada ao seu conteúdo sólido, diferentemente do que ocorre no rúmen, onde o conteúdo ruminal é constituído por porção líquida e sólida, propiciando uma maior diversidade microbiana.

7 CONCLUSÃO

O PAP não foi eficiente em elevar os parâmetros da degradabilidade dos alimentos estudados. Porém, resultou em aumento da contagem total e relativa de *Isotricha*, indicando afetar a população microbiana ruminal.

A adição de polpa cítrica aumentou a contagem total e relativa de *Isotricha*, resultando em diminuição relativa da contagem de *Entodinium*. Este alimento também se mostrou eficiente em melhorar a degradabilidade da fibra da cana-de-açúcar.

A análise, por DGGE, do DNA das amostras de conteúdo ruminal demonstrou que a dieta, especialmente aquela adicionada de polpa cítrica, pode alterar a população de *Archaea*. Entretanto, não pôde ser observada nenhuma similaridade de perfil populacional entre animais que receberam os mesmos tratamentos.

REFERÊNCIAS

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL (AFRC). **Energy and protein requirement of ruminants**. Wallingford: CAB International, 1993.

ALLEN, M. S. Relation between fermentation acid production in the rumen and the requirement of physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1447-1462, 1997.

ALLISON, M. J. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**, 11. Ed., Ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1996, 856 p.

ANDRIGUETTO, J. M.; LUIMAR, P.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J.S.; SOUZA, G.A.; FILHO, A. B. **Nutrição Animal**, v. 1, São Paulo: Nobel, 2002. 395p.

ANTUNES, R. C.; RODRIGUEZ, N. M. Metabolismo dos carboidratos não estruturais. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 1 ed., Jaboticabal, Ed. Funep, p. 229-255, 2006.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15.ed. Washington, 1990. 1050p.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 1 ed., Jaboticabal, Ed. Funep, p. 111-151, 2006.

BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1465-1483, 1984.

BERGHMAN, L. R.; GHANEM, D. A.; WAGHELA, S. D.; RICKE, S. C. Antibodies: an alternative for antibiotics? **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 660-666, 2004.

BONHEVI, J. S.; COLL, F. V.; JORDÁ, R. E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 71, n. 5, p. 529-532, 1994.

BRODERICK, G. A.; WALLACE, R. J.; ØRSKOV, E. R. Control of rate and extent of protein degradation. In: TSUDA, T.; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. (Ed.), **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. Proceedings of seventh international symposium on ruminant physiology, p. 541-592. Academic Press. New York, 1991.

CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; DEVANT, M. Effect of pH and pH fluctuation on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 3, p. 574-579, 2002.

CAMPOS NETO, O.; RAMOS, A. A.; ESCOBAR, M. J.; DALANESE, J. A.; DE BEM, C. H. W. Avaliação da monensina sódica. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 2, p. 268-273, 1995.

CHEN, M.; WOLIN, M. J. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 72-77, 1979.

COELHO, R. M. Efeitos da concentração de matéria seca e do uso de inoculante bacteriano-enzimático na silagem de Tifton 85 (*Cynodon spp.*), sobre a digestão de nutrientes, parâmetros ruminais e comportamento ingestivo em novilhos de corte em crescimento. 122f, **Tese** (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros", Piracicaba, SP, 2002.

CUMMINS, K. A.; NOCEK, J. E.; POLAN, C. E.; HERBEIN, J. H. Nitrogen degradability and microbial protein synthesis in calves fed diets of varying degradability by the bag technique. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 11, p. 2356 – 2364. 1983.

DEHORITY, B. A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa**. Florida: CRC Press Inc. 96p. 1993.

DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P. A. Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2921-2927, 2000.

DiLORENZO, N. Effects of polyclonal antibody preparation against *Streptococcus bovis* or *Fusobacterium necrophorum* on performance and carcass characteristics of feedlot steers. **Thesis** (Master of Science), University of Minnesota, MN, 2004.

DILorenzo, N.; Diez-Gonzalez, F.; Di Constanzo, A. Effects of feeding polyclonal antibodies preparations on ruminal bacterial populations and ruminal pH of steers fed high-grain diets. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 8, p. 2178-2185, 2006.

EDWARDS, J. E.; McEWAN, N. R.; TRAVIS, A. J.; WALLACE, R. J. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 86, n. 3, p. 263-281, 2004.

EMERICK, R. J. Nitrate and Urea Toxities. In: CHURCH, C.D. **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. New Jersey: Waveland Press, 1993, 564p.

EUROPA. Regulation EC N° 1831/2003 of the European Parliament and Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Disponível em: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2003/l_268/l_26820031018en00290043.pdf. Acesso em 05 de fev. 2006.

EVANS. W.C.; Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. **Nature**, v. 270, p. 17-22, 1977.

Feed Additive Compendium, Miller Publishing Co., Minnetonka, MN, 2000.

FISHER, S. G.; LERMANN, L. S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. **Cell**, Cambridge, v.16, n. 1, p. 191-200, 1979.

FRANZOLIN, R.; FRANZOLIN, M. H. T. População de protozoários ciliados e degradabilidade ruminal em búfalos e bovinos zebuínos sob dieta à base de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1853-1861. 2000 a.

FRANZOLIN, M. H. T.; SILVEIRA, A. C.; FRANZOLIN, R. Efeito de rações com níveis crescentes de cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho sobre a população de protozoários ciliados no rúmen de ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1452-1457. 2000b.

FOX, D. G.; SNIFFEN, C. G.; O'CONNOR, J. D.; RUSSELL, J. B. and VAN SOEST, P.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diets adequacy. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3578 – 3596. 1992.

FULLER, R. A review: Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Microbiology**, v.66, Issue 5, p. 365-378, 1989.

GALYEAN, M. L.; NUNNERY, G.A.; DEFOOR, P.J.; SALYER, G.B.; PARSON, C.H. Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (Strains 45 and 51) and

Propionibacterium freudenreichii PF-24 on performance and carcass characteristics of finishing beef steers, 2000. <http://www.asft.ttu.edu/burnettcenter/progressreports/bc8.pdf>. Acesso em 07 de Jun. 2007.

GALYEAN, M. L.; RIVERA, J. D. Nutritionally related disorders affecting feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 13-20, 2003.

GOAD, D. W.; GOAD, C. L.; NAGARAJA, T. G. Ruminant microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 234-241, 1998.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G. O.; BAILEY, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and RNA-based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5488-5491, 2000.

GUSTAFSON, R. H.; BOWEN, R. E. Antibiotic use in animal agriculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 5, p. 531-541, 1997.

HALL, M. B. Recent advances in non-NDF carbohydrates for the nutrition of lactating cows. In: **Simpósio Internacional de bovinos de leite**, Lavras, Brasil, p. 139-148, 2001.

HARDY, B. The issue of antibiotic use in livestock industry. What have we learned? **Animal Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 129-147, 2002.

HAU, J.; COENRAAD, F. M. H. Refinement of polyclonal antibody production by combining oral immunization of chickens with harvest of antibodies from the egg yolk. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 294-299, 2005.

HENDRIX, D. L. Rapid extraction and analyses of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Science**, v. 33, n. 6, p. 1306-1311, 1993.

HOBSON, P. N. Rumen Microorganisms. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 9, p. 42-77, 1971.

HRISTOV, A. N.; GRANDEEN, K. L.; ROPP, J. K.; GREER, D. Effect of *Yucca schidigera*-based surfactant on ammonia utilization in vitro and in situ degradability of corn grain. **Animal and Feed Science Technology**, v. 115, n. 3, p. 341-355, 2004.

HRISTOV, A. N.; ZAMAN, S.; VanDERPOL, M.; SZASZ, P.; HUBER, K.; GREER, D. Effect of a saponin-based surfactant and aging time on ruminal degradability of flaked corn grain dry matter and starch. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 6, p. 1459-1466, 2007.

HUBER, T. L. Physiological effects of acidosis on feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 902-909, 1976.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. Academic Press, New York, 533 p., 1966.

HUNGATE, R.E. The rumen microbial ecosystem. **Annual Reviews in Ecology Systematic**, v. 6, n. 1, p. 39-66, 1975.

IKEMORI, Y.; OHITA, M.; UMEDA, K.; ICATLO JR., F.C.; KUROKI, M.; YOKOYAMA, H.; KODAMA, Y. Passive preparation of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. **Veterinary Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 105-110, 1997.

JOBIM, C. C.; REIS, R. A.; MARTINS, E. N.; ALCALDE, C. R.; ROSA, B. Degradabilidade *in situ* da matéria seca e da proteína bruta de silagens de planta de milho, dos grãos úmidos e das espigas sem brácteas. **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 3, p. 665-670, 1999.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, n. 1, p. 124-135, 2005.

KARNATI, S. K. R.; SYLVESTER, J. T.; NOFTSGER, S. M.; YU, Z.; St-PIERRE, N. R.; FIRKINS, J. L. Assessment of ruminal bacterial populations and protozoal generation time in cows fed different methionine sources. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 798-809, 2007.

KLEEN, J. L.; HOOIJER, G. A.; REHAGE, J.; NOORDHUIZEN, P. T. M. Subacute ruminal acidosis (SARA): A review. **Journal of Veterinarian Medicine**, v. 50, n. 8, p. 406-414, 2003.

KOCHERGINSKAYA, S. A.; AMINOV, R. I.; WHITE, B. A. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. **Anaerobe**, v. 7, n. 3, p. 119-134, 2001.

KRAUSE, K. M.; OETZEL, G. R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A Review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n.3, p. 215-236, 2006.

KREHBIEL, C. R.; RUST, S. R.; ZHANG, G.; GILLILAND, S. E. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 14, Eletronic Suppl. 2, p. E120-E132, 2003.

LAMMERS, B. P.; BUCKMASTER, D. R.; HEINRICHS, A. J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**. v. 79, n. 5, p. 922 – 928. 1996.

LANA, L. P.; RUSSEL, J. B.; VAN AMBURGH, M. E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 8, p. 2190-2196, 1998.

LEE, E. N.; SUNWOO, H. H.; MENNINEN, K.; SIM, J. S. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**, v. 81, n. 5, p. 632-641, 2002.

LENG, R. A.; PRESTON, T. R. Sugar cane for cattle production: present constraints, perspectives and research priorities. **Tropical Animal Production**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 1976.

LIN, K. W.; PATERSON, J. A.; LADISCH, M. R. Anaerobic fermentation: Microbes from ruminants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 3, p. 98-107, 1985.

LONDOÑO, A. A. S.; VELÁSQUEZ, L. F. U.; PAREDES, G. C. G.; BORJA, R. L. H.; APONTE, A. L. O. Estudo da microflora intestinal utilizando *Dichanthium aristatum* e

dois suplementos. In: XXXIV REUNIÃO DA SBZ, 1997, Juiz de Fora (MG). [**Anais...**], p. 137, 1997.

McGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for dairy cattle: Current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, Eletronic Suppl. E194-E203, 2001.

MARINO, C. T.; OTERO, W. G.; RODRIGUES, P. H. M.; CASTRO, A. L.; MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; MARTINS, C. L.; ARRIGONI, M. B. Avaliação do preparado de anticorpos policlonais (PAP) nos parâmetros de fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas de alto concentrado. In: Reunion Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA), 20., 2007, Cusco – Peru. **Anais...** Cusco, 2007, CDROM.

MARINO, C. T. Efeito do preparado de anticorpos policlonais sobre o consumo alimentar, fermentação ruminal e digestibilidade *in vivo* de bovinos suplementados com três fontes energéticas. 107f, **Tese** (Doutorado em Nutrição e Produção Animal). Universidade Estadual Paulista, FMVZ, Botucatu, SP, 2008.

MEHREZ, A. Z.; ORSKOV, E. R. A study of the fiber bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **Journal of Agriculture Science**, v. 88, p. 645-650, 1977.

MENDOZA, G. D.; BRITTON, R. A.; STOCK, R. A. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 6, p. 1572-1578, 1993.

MENG, Q.; KERLEY, M. S.; LUDDEN, P. A.; BELYEA, R. L. Fermentation substrate and dilution rate interact to affect microbial growth and efficiency. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 1, p. 206-214, 1999.

MEYER, C. G.; TANNICH, E.; HARDERS, J.; HENCO, K.; HORTSMANN, R. D. Direct sequencing of variable *HLA* gene segments after *in vitro* amplification and allele separation by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 142, n. 2, p. 251-256, 1991.

MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; ARRIGONI, M. D. B.; PARRILI, M.; MATSUHARA, S. A.; FOSSA, M. V.; SARTI, L. M. N.; MARTINS, C. L.; BASTOS, J. P. S. T.; MARIANI, T. M. Feedlot performance and rumen parakeratosis incidence in *Bos indicus* type bullocks fed high-grain diets and monensin or polyclonal antibodies preparations against rumen bacteria. In: 2007 Joint Annual Meeting, San Antonio,

Texas. ABSTRACT - **Journal of Animal Science**, San Antonio: ASAS – American Society of Animal Science, v. 85, p. 552, 2007.

MIN, B. R.; PINCHAK, W. E.; ANDERSON, R. C.; HUME, M. E. In vitro bacterial growth and in vivo ruminal Microbiota populations associated with bloat in steers grazing wheat forage. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 10, p. 2873-2882, 2006.

MIRON, J.; SOLOMON, R.; BRUCKENTAL, I.; BEN-GHEDALIA, D. Effect of changing the proportion, wheat:sorghum in dairy cows rations on Carbohydrate digestibility and NAN flor to intestine. **Animal Feed Science and Technology**, v. 57, p. 75-86, 1996.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial activity of propolis and some of its components: The effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.

MOGENTALE, S. M. Efeito da flavomicina e da monensina sobre a fermentação e digestão ruminal e total em bovinos. 105f, **Tese** (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2005.

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 1 ed., Jaboticabal, Ed. Funep, p. 539-561, 2006.

MÜLLER, M.; PRADO, I. N. Metabolismo da pectina em animais ruminantes. Uma revisão. **Revista Varia Scientia**, v. 4, n. 8, p. 45-56, 2004.

NAGARAJA, T. G.; AVERY, T. B.; BARTLEY, E. E.; GALITZER, S. J.; DAYTON, A. D. Prevention of lactic acidosis in cattle by lasalocid or monensin. **Journal of Animal Science**, v. 53, n.1, p. 206-216, 1981.

NAGARAJA, T. G.; AVERY, T. B.; BARTLEY, T. E.; ROOF, S. K.; DAYTON, A.D. Effect of lasalocid, monensin, or thiopeptin on lactic acidosis in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 54, n. 3, p. 649-658, 1982.

NAGARAJA, T. G.; CHENGAPPA, M. M. Liver abscess in feedlot cattle: A review. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 287-298, 1998.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 13, Eletronic Suppl. E17-E38, 2007.

NOCEK, J. E. Bovine acidosis: implications on laminitis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 1005-1028, 1997.

NORDLUND, K. Factors that contribute to subacute ruminal acidosis. Preconvention Seminar 7: Dairy Herd Problem Investigation Strategies. AMERICAN ASSOCIATION OF BOVINE PRACTITIONERS. *In: 36th Annual Conference*, Sep/ 2003, p. 15-17, Columbus, OH.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7. ed. Washington, USA: National Academy Press, 1996. 242 p.

OLIVEIRA, J. S.; LANA, R. P.; BORGES, A. C.; QUEIROZ, A. C.; ALMEIDA, I. C. C. Efeito da monensina e extrato de própolis sobre a produção de amônia e degradabilidade *in vitro* da proteína bruta de diferentes fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 2, p. 504-510, 2004.

ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agriculture Science**, v. 92, p. 499-503, 1979.

ØRSKOV, E.R. Rumen Microorganisms and their Nutrition. *In: Protein Nutrition in ruminants*. Academic Press LTDA, Second Edition, 1988, 175p.

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; WILL, W. J.; GILL, D. R. Acidosis in cattle: A review. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 275-286, 1998.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. *In: CHURCH, C.D. The ruminant animal: digestive physiology and nutrition*. New Jersey: Waveland Press, 1993, 564p.

PASSINI, R.; BORGATTI, L. M. O.; FERREIRA, F. A.; RODRIGUES, P. H. M. Degradabilidade no rúmen bovino de grãos de milho processados de diferentes formas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 3, p. 271-276, 2004.

PEREIRA, J. R. A.; ROSSI Jr., P. **Manual prático de avaliação nutricional de alimentos**. 1.ed. FEALQ, Piracicaba, SP. 1995.

PINTO, A. P.; PEREIRA, E. S.; MIZUBUTI, I. Y. Características nutricionais e formas de utilização da cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 73-84, 2003.

RODRIGUES, P. H. M. Efeito dos níveis de monensina e proporções volumoso/concentrado na ração sobre a utilização dos alimentos e parâmetros da fermentação ruminal em animais ruminantes. 169f, **Tese** (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiros", Piracicaba, SP, 2000.

RODRIGUES, P. H. M.; MATTOS, W. R. S.; MELOTTI, L.; RODRIGUES, R. R. Monensina e digestibilidade aparente em ovinos alimentados com proporções de volumoso/concentrado. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 3, p. 449-455, 2001.

RUSSEL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1-6, 1989.

SAS. STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. **SAS/STAT User's guide**. 5. ed. Cary: SAS, 1989.

SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. (Eds). **Chicken egg yolk antibodies, production and applications**. Chapter 1. Springers. Germany, 2001.

SCHELLING, G. T. Monensin: mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1518-1527, 1984.

SLYTER, L. L. Influence of acidosis on rumen functions. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 910-929, 1976.

STRADIOTTI Jr., D.; QUEIROZ, A. C.; LANA, R. P.; PACHECO, C. G.; EIFERT, E. C.; NUNES, P. M. M. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 1086-1092, 2004.

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2766-2774, 2001.

TEIXEIRA, J.C., ANDRADE, G. A. Carboidratos na alimentação de ruminantes. *In*: II Simpósio de Forragicultura e Pastagens. Lavras (MG), **Palestras...**Lavras, Editora UFLA, 2001, v. 1, p. 165-210.

VALDEZ, R. E.; ALVAREZ, F. J.; FERREIRO, H. M.; GUERRA, F.; LÓPEZ, J.; PRIEGO, A.; BLACKBURN, T. H.; LENG, R. A.; PRESTON, T. R. Rumen function in cattle given sugar cane. **Tropical Animal Production**, v. 2, n. 3, p. 260-272, 1977.

VAN NEVEL, C.J., DEMEYER, D.I. *In*: **The rumen microbial ecosystem**. Hobson, P.N., Ed. Elsevier Applied Science. London, p. 387-443, 1988.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Carbohydrate methodology. Metabolism, and nutrition implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 11, p. 3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Comstock Publ. Assoc. Ithaca, 1994, 476 p.

VIERA, D. M. The role of ciliate protozoa in nutrition of ruminant. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 5, p. 1547-1560, 1986.

WARE, D. R.; READ, P. L.; MANFREDI, E. T. Pooled summary of eight feedlot trials evaluating performance and carcass characteristics of steers fed *Lactobacillus acidophilus* strain BT138. **Journal of Animal Science**, v. 66, suppl. 1, p. 436, 1988.

WEIMER, P.J. Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 12, p. 3114-3122. 1998.

WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. The rumen protozoa. *In*: HOBSON, P. N. **The rumen microbial ecosystem**. Elsevier Applied Science. England, 1988, 528p.

WOLIN, M. J. Metabolic interactions among intestinal microorganisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 27, n. 11, p. 1320-1328, 1974.

YOKOYAMA, M. T.; JOHNSON, K.A. In: CHURCH, C.D. **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. New Jersey: Waveland Press, 1993, 564p.

ZEOULA, L. M.; NETO, A. C.E.M.; KAZAMA, R.; OLIVEIRA, F. C. L.; SILVA, D. C.; PRADO, O. P . P. Degradabilidade *in situ* da matéria seca e proteína bruta de concentrados com diferentes fontes energética. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 2, p. 281-287, 2004.