JOHNNY MACIEL DE SOUZA

**Efeitos de diferentes níveis de concentrado, tipos de carboidratos não
fibrosos e digestibilidade da fibra sobre o ecossistema ruminal**

Pirassununga
2015

JOHNNY MACIEL DE SOUZA

Efeitos de diferentes níveis de concentrado, tipos de carboidratos não fibrosos e digestibilidade da fibra sobre o ecossistema ruminal

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 obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga
2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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.3144 FMVZ	<p>Souza, Johnny Maciel de</p> <p>Efeitos de diferentes níveis de concentrado, tipos de carboidratos não fibrosos e digestibilidade da fibra sobre o ecossistema ruminal / Johnny Maciel de Souza. -- 2015.</p> <p>114 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2015.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.</p> <p>Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva.</p> <p>1. Bovinos de corte. 2. Fermentação ruminal. 3. Microrganismos ruminais. 4. qPCR. 5. Cana-de-açúcar. I. Título.</p>
----------------	---

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Efeitos de diferentes níveis de concentrado, tipos de carboidratos não fibrosos e digestibilidade da fibra sobre o ecossistema ruminal”, protocolado sob o nº 7632051113, utilizando 30 (trinta) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, foi aprovado em reunião de 19/2/2014 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research “Effects of different concentrate levels, types of non-fiber carbohydrates and fiber digestibility on the rumen ecosystem” protocol number 7632051113, utilizing 30 (thirty) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, was approved in the meeting of day 2/19/2014 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUZA, Johnny Maciel

Título: **Efeitos de diferentes níveis de concentrado, tipos de carboidratos não fibrosos e digestibilidade da fibra sobre o ecossistema ruminal**

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 obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e a toda minha família, pelo carinho e apoio em todas as etapas de minha vida.

À minha esposa, Janaina Cristina, que de uma forma muito especial e carinhosa me deu força e coragem, apoiando-me em todos os momentos.

Ao meu orientador, prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, pelo excelente trabalho que está sendo desenvolvido em seu grupo de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João Moreira de Souza e Maria das Graças Maciel de Souza, meus maiores exemplos, pelo grande carinho, apoio, compreensão, que, apesar de todas as dificuldades e obstáculos ao longo de suas vidas, me proporcionaram uma educação essencial e imprescindível para me tornar a pessoa que sou hoje.

Agradeço ao meu orientador prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, sempre presente nos momentos de dúvida, pelo apoio, dedicação, amizade e compreensão concedida, pelas orientações e por todos ensinamentos oferecidos ao longo deste trabalho. Agradeço pela oportunidade de trabalhar contigo, exemplo de caráter e excelente profissional, que além de um grande educador eu o considero uma pessoa excepcional e um grande amigo.

À minha esposa, Janaina Cristina da Silva Maciel de Souza, um agradecimento muito especial, por todo apoio e incentivo nos momentos difíceis, todo carinho, amizade e atenção, e por me tornar um homem mais feliz a cada dia que passa.

À todos os integrantes do Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte (LPGC), Dannylo Sousa, Nara Cônsolo, Viviane Ferrari, Cassiele Oliveira, João Penso, Juliana Santos, Rafael Teixeira, Matheus Orlandin, Felipe Bispo, Lígia Garcia Mesquita e Andréa Silva.

Agradecimento mais que especial para Lígia Garcia Mesquita, a especialista do Laboratório de Genômica Funcional do LPGC, por todo o apoio, paciência, amizade, dedicação e por todos os ensinamentos oferecidos ao longo do mestrado.

À todos os meus amigos da Pós Graduação, do Departamento de Nutrição e Produção Animal – FMVZ/USP Pirassununga.

À todos os professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal, em especial, Marcos Veiga dos Santos, Francisco Palma Rennó, Augusto Gameiro e Paulo Mazza pela amizade e pelo conhecimento compartilhado.

À todos os funcionários do VNP. Em especial, ao João Paulo, Alessandra e Fábila. A vocês meu sincero agradecimento.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP) pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Mestrado e confiança depositada.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração deste projeto, muito obrigado.

EPÍGRAFE

*“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice.
Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”*

Leonardo da Vinci

RESUMO

SOUZA, J. M. **Efeitos de diferentes níveis de concentrado, tipos de carboidratos não fibrosos e digestibilidade da fibra sobre o ecossistema ruminal.** [Effects of different concentrate levels, types of non-fiber carbohydrates and fiber digestibility on the rumen ecosystem]. 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Objetivou-se com o presente estudo caracterizar as mudanças na população bacteriana ruminal, ocasionadas pelo aumento de concentrados na dieta, utilização de diferentes fontes de CNF e volumosos com diferentes digestibilidades da fibra. Para tanto, foram coletadas amostras de líquido ruminal, para posterior quantificação relativa de bactérias ruminais, oriundas de quatro projetos de pesquisa conduzidos no Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte, pela FMVZ/USP - Pirassununga-SP. Em todos os experimentos, foram utilizados animais da raça Nelore, castrados e canulados no rúmen, em delineamento experimental de quadrado latino. Foi realizada uma quantificação relativa através da técnica de qPCR de três bactérias celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*), duas amilolíticas (*Streptococcus bovis* e *Ruminobacter amylophilus*), e uma consumidora de lactato (*Megasphaera elsdenii*), para determinação do efeito da dieta sobre a população de microrganismos ruminais. No **Experimento 1**, as dietas experimentais foram formuladas com dois níveis de concentrado (60% ou 80%), sendo que o volumoso utilizado foi silagem de cana-de-açúcar (variedade IACSP 93-3046). Dentro de cada nível de inclusão de concentrado, foram utilizados três fontes de CNF: milho floculado a vapor (MFV), polpa cítrica peletizada (PCP), ou milho moído (MM). MFV e PCP foram incluídas na dieta em substituição parcial de 70% do MM. No **Experimento 2**, as dietas experimentais foram formuladas com 60% de concentrado, sendo que o volumoso utilizado foi a cana-de-açúcar fresca ou ensilada, com alta ou baixa digestibilidade da fibra (DFDN). No **Experimento 3**, as dietas experimentais foram formuladas com dois níveis de concentrado (60% ou 80%), sendo que o volumoso utilizado foi a cana-de-açúcar fresca, com alta ou baixa DFDN. No **Experimento 1**, o aumento de concentrado resultou em queda da população de *F. succinogenes* ($P<0,01$) e *S. bovis* ($P<0,01$), e aumento de *R. flavefaciens* ($P=0,05$). A substituição parcial do MM por PCP resultou em aumento de *S. bovis* ($P=0,01$) e redução de

R. flavefaciens ($P<0,01$). Já a substituição do MM por MFV reduziu *R. albus* ($P<0,01$). Houve uma interação Dieta*CNF apenas para a *M. elsdenii* ($P=0,02$), onde o MFV aumentou *M. elsdenii* apenas na dieta com 80% de concentrado. No **Experimento 2**, o fornecimento de cana fresca resultou em um aumento da população de *S. bovis* ($P<0,01$), e *M. elsdenii* ($P=0,06$). Houve interação entre DFDN e modo de conservação da cana sobre a população de *F. succinogenes* ($P=0,01$), onde a cana de alta DFDN aumentou a população de *F. succinogenes* apenas com o fornecimento de cana fresca. No **Experimento 3**, o aumento de concentrado resultou em queda de *S. bovis* ($P<0,01$) e aumento de *R. amylophilus* ($P=0,07$). Houve interação entre DFDN e nível de concentrado para a *F. succinogenes* ($P=0,06$) e *R. albus* ($P<0,01$), onde a cana de alta DFDN aumentou a população destes microrganismos apenas na dieta com 60% de concentrado. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o desempenho animal pode ser explicado pela modulação da população de microrganismos ruminais por meio da composição da dieta.

Palavras-chave: Bovinos de corte. Fermentação ruminal. Microrganismos ruminais. qPCR. Cana-de-açúcar.

ABSTRACT

SOUZA, J. M. **Effects of different concentrate levels, types of non-fiber carbohydrates and fiber digestibility on the rumen ecosystem.** [Efeitos de diferentes níveis de concentrado, tipos de carboidratos não fibrosos e digestibilidade da fibra sobre o ecossistema ruminal]. 2015. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The aim of this study was to characterize the population change of cellulolytic and amylolytic rumen bacteria, caused by the increase of concentrate, and by the use of different sources of NFC in diets with sugarcane silage. Samples of rumen contents were collected for subsequent analysis of the relative quantification of rumen microorganisms, from four research projects conducted at the Research Laboratory in Beef Cattle at FMVZ / USP - Pirassununga-SP. In all experiments, Nellore beef cattle, castrated, and ruminal cannulated, were used in a Latin square design. Three cellulolytic bacteria (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*), two amylolytic (*Streptococcus bovis* and *Ruminobacter amylophilus*), and a lactate fermenting microorganism (*Megasphaera elsdenii*) were quantified by the technique of qPCR to determine the effect of diet on the population of rumen microorganisms. **Experiment 1**, the experimental diets were formulated with two levels of concentrate (60% or 80%), and the roughage used was sugarcane silage (IACSP 93-3046). Within each level of concentrate inclusion, three different sources of NFC were used: steam flaked corn (SFC), pelleted citrus pulp (PCP), or ground corn (GC). SFC and PCP were included in the diet in partial replacement of 70% of GC. **Experiment 2**, the experimental diets were formulated with 60% of concentrate level, and two sugarcane genotypes divergent for stalk NDFD, with high or low NDFD, either freshly cut or as silage. **Experiment 3**, the experimental diets were formulated with two levels of concentrate (60% or 80%), and the roughage used was fresh sugarcane, with high or low NDFD. In the **Experiment 1**, increasing concentrate in the diet decreased the population of *F. succinogenes* ($P<0.01$) and *S. bovis* ($P<0.01$), and increased *R. flavefaciens* population ($P=0.05$). The partial replacement of GC by PCP increased *S. bovis* population ($P=0.01$) and decreased *R. flavefaciens* population ($P<0.01$). The replacement of GC by SFC decreased the population of *R. albus* ($P<0.01$). There was a significant Diet*NFC interaction only for *M. elsdenii* ($P=0.02$), where SFC

increased the relative population only at the 80% concentrate diet. **Experiment 2**, Diets with fresh sugarcane increased the population of *S. bovis* ($P < 0.01$), and *M. elsdenii* ($P = 0.06$). There was a significant interaction between NDFD and conservation mode of sugarcane for *F. succinogenes* ($P = 0.01$), where sugarcane with high NDFD increased *F. succinogenes* population only when sugarcane was offered as freshly cut. In **Experiment 3**, increasing concentrate in the diet decreased *S. bovis* population ($P < 0.01$), and increased *R. amylophilus* ($P = 0.07$). There was a significant interaction between NDFD and concentrate level for *F. succinogenes* ($P = 0.06$) and *R. albus* ($P < 0.01$), where sugarcane with high NDFD increased the population of these microorganisms only at the 60% concentrate diet. The animal performance can be explained by modulation of the population of the rumen microorganisms through diet composition.

Keywords: Beef cattle. Ruminal fermentation. Rumen microorganisms. qPCR. Sugarcane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Consequências metabólicas da ingestão de alimentos por bovinos de corte sobre pH ruminal e a população microbiana.	26
Figura 2 -	Esquema do procedimento de uma reação de PCR. Após a desnaturação das fitas, ocorre o anelamento dos primers. A enzima Taq, representada em verde, adiciona nucleotídeos complementares às fitas-mãe. Por fim, tem-se duas fitas-mãe pareadas com as suas fitas-filha complementares, sintetizada a partir da adição dos nucleotídeos pela enzima Taq.	35
Figura 3 -	Curva padrão para a bactéria <i>M. elsdenii</i> , realizada com diferentes diluições utilizadas como molde da reação de qPCR.	55
Figura 4 -	Representação gráfica da curva de amplificação para a bactéria <i>M. elsdenii</i> , a partir de uma quantificação relativa pela técnica de qPCR.	56
Figura 5 -	Curva Melt para <i>Eubacter</i> (A) e <i>M. elsdenii</i> (B), demonstrando a especificidade do material amplificado.	57
Figura 6 -	Produtos de qPCR em gel de agarose 2% das bactérias ruminais quantificadas.	58
Figura 7 -	População relativa de <i>M. elsdenii</i> , em função dos tipos de CNF e níveis de concentrado, normalizada para a dieta com 60% de concentrado contendo MM.	60
Figura 8 -	População relativa de <i>F. succinogenes</i> em função do tempo de coleta do conteúdo ruminal.	60
Figura 9 -	População relativa de <i>R. amylophilus</i> , em função dos tipos de CNF e do tempo de coleta, normalizada para a dieta contendo MM no tempo de coleta Pré alimentação.	61
Figura 10 -	População relativa de <i>M. elsdenii</i> , em função dos tipos de CNF e do tempo de coleta, normalizada para a dieta contendo MM no tempo de coleta Pré alimentação.	62
Figura 11 -	População relativa de <i>F. succinogenes</i> , em função da digestibilidade de fibra e da conservação da cana de açúcar, normalizada para cana fresca com baixa DFDN.	82
Figura 12 -	População relativa de <i>M. elsdenii</i> , em função do tempo de coleta de líquido ruminal, normalizada para o tempo de coleta Pré alimentação.	83
Figura 13 -	População relativa de <i>R. amylophilus</i> , em função do tempo de coleta de líquido ruminal, normalizada para o tempo de coleta Pré alimentação.	83
Figura 14 -	População relativa de <i>F. succinogenes</i> , em função da conservação da cana de açúcar e do tempo de coleta de líquido ruminal, normalizada para cana fresca no tempo de coleta Pré alimentação.	84

Figura 15 - População relativa de <i>F. succinogenes</i> , em função da digestibilidade da fibra e níveis de concentrado, normalizada para a cana de baixa DFDN na dieta com 60% de concentrado.....	102
Figura 16 - População relativa de <i>R. albus</i> , em função da digestibilidade da fibra e níveis de concentrado, normalizada para a cana de baixa DFDN na dieta com 60% de concentrado.	102
Figura 17 - População relativa de <i>R. flavefaciens</i> , em função da digestibilidade da fibra e níveis de concentrado, normalizada para a cana de baixa DFDN na dieta com 60% de concentrado.....	103
Figura 18 - População relativa de <i>R. amylophilus</i> , em função do tempo de coleta de líquido ruminal, normalizada para o tempo de coleta Pré alimentação.	104
Figura 19 - População relativa de <i>F. succinogenes</i> , em função da digestibilidade da fibra e do tempo de coleta do conteúdo ruminal, normalizada para a cana de baixa DFDN no tempo de coleta Pré alimentação.	104
Figura 20 - População relativa de <i>M. elsdenii</i> , em função da digestibilidade da fibra e do tempo de coleta do conteúdo ruminal, normalizada para a cana de baixa DFDN no tempo de coleta Pré alimentação.	105
Figura 21 - População relativa de <i>M. elsdenii</i> , em função dos níveis de concentrado e do tempo de coleta do conteúdo ruminal, normalizada para a dieta com 60% de concentrado no tempo de coleta Pré alimentação.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das dietas experimentais (% da MS)	50
Tabela 2 -	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste projeto.....	52
Tabela 3 -	Composição de cada tubo de PCR utilizado na análise de qPCR	54
Tabela 4 -	População relativa de microrganismos ruminais em relação ao controle, em função do nível de concentrado e de diferentes tipos de carboidratos não fibrosos.	59
Tabela 5 -	Composição percentual das dietas experimentais (% da MS).....	77
Tabela 6 -	População relativa de microrganismos ruminais em relação ao controle, em função da digestibilidade da fibra em detergente neutro (alta ou baixa DFND) e do método de conservação (Fresca ou Silagem) da cana-de-açúcar.....	81
Tabela 7 -	Composição percentual das dietas experimentais (% da MS).....	97
Tabela 8 -	População relativa de microrganismos ruminais em relação ao controle, em função dos níveis de concentrado na dieta (60% ou 80%) e da digestibilidade da fibra em detergente neutro (alta ou baixa DFND) da cana-de-açúcar.....	101

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	OS RUMINANTES: CARACTERÍSTICAS DO RÚMEN COMO CÂMARA FERMENTATIVA.....	22
2.2	MICRORGANISMOS RUMINAIS	23
2.3	MANIPULAÇÃO DO AMBIENTE RUMINAL	25
2.4	EFEITO DA DIETA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS RUMINAIS	28
2.5	A TÉCNICA DE qPCR NA QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS RUMINAIS	32
3	OBJETIVO E HIPÓTESE GERAL	39
	REFERÊNCIAS	40
4	EXPERIMENTO 1 – “Avaliação da microbiota ruminal em dietas a base de silagem de cana-de-açúcar com diferentes fontes de carboidratos não fibrosos”	46
4.1	INTRODUÇÃO.....	46
4.2	OBJETIVOS E HIPÓTESES	48
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.3.1	Local e animais	48
4.3.2	Dietas experimentais	49
4.3.3	Coleta de líquido ruminal	50
4.3.4	Processamento das amostras de conteúdo ruminal.....	51
4.3.5	Análises laboratoriais – quantificação relativa de bactérias ruminais.....	51
4.3.6	Extração de DNA	52
4.3.7	Análise quantitativa e qualitativa do produto extraído	53
4.3.8	Preparação dos tubos para qPCR – diluição das amostras.....	53
4.3.9	Quantificação relativa das bactérias de interesse.....	56
4.3.10	Análise estatística	58
4.4	RESULTADOS	59
4.5	DISCUSSÃO.....	62
4.5.1	Efeito do nível de concentrado sobre a população das bactérias ruminais.....	62
4.5.2	Efeito do tipo de carboidrato não fibroso sobre a população das bactérias ruminais.....	65

4.6	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS	70
5	EXPERIMENTO 2 – “Efeito da cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.), fornecida fresca ou ensilada, com alta ou baixa digestibilidade da fibra, sobre a população de bactérias ruminais”	74
5.1	INTRODUÇÃO.....	74
5.2	OBJETIVOS E HIPÓTESES	75
5.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	76
5.3.1	Local e animais	76
5.3.2	Dietas experimentais	76
5.3.3	Coleta de líquido ruminal	78
5.3.4	Processamento das amostras de conteúdo ruminal.....	78
5.3.5	Análises laboratoriais – quantificação relativa de bactérias ruminais.....	79
5.3.6	Análise estatística	80
5.4	RESULTADOS	81
5.5	DISCUSSÃO.....	84
5.6	CONCLUSÕES.....	89
	REFERÊNCIAS	90
6	EXPERIMENTO 3 – “Efeito da digestibilidade da fibra da cana-de-açúcar e do nível de concentrado sobre a população de bactérias ruminais”	94
6.1	INTRODUÇÃO.....	94
6.2	OBJETIVOS E HIPÓTESES	95
6.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	96
6.3.1	Local e animais	96
6.3.2	Dietas experimentais	96
6.3.3	Coleta de líquido ruminal	97
6.3.4	Processamento das amostras de conteúdo ruminal.....	98
6.3.5	Análises laboratoriais – quantificação relativa de bactérias ruminais.....	98
6.3.6	Análise estatística	100
6.4	RESULTADOS	100
6.5	DISCUSSÃO.....	106
6.6	CONCLUSÕES.....	109
	REFERÊNCIAS	110

7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
8	IMPLICAÇÕES	114

1 INTRODUÇÃO

Os ruminantes possuem a capacidade de aproveitar os nutrientes oriundos da fermentação ruminal, resultado da simbiose existente entre estes e microrganismos anaeróbios presentes no rúmen, que por sua vez convertem componentes da dieta em produtos como os Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC) e a Proteína Microbiana (Pmic).

O ambiente ruminal é considerado um complexo ecossistema, apresentando uma microbiota ruminal, composta por uma imensa variedade de bactérias, arqueas, protozoários e fungos, de extrema importância para o aproveitamento do alimento. Dentre estes microrganismos presentes no rúmen, as bactérias são os mais investigados, cujo efeito sobre o desempenho animal é significativo (FERNANDO et al., 2010).

Qualquer estratégia de manipulação da fermentação ruminal deve levar em consideração aspectos relacionados à microbiota presente no rúmen, assim como as características desta câmara fermentativa. Para uma efetiva manipulação da microbiota ruminal, com o intuito de melhorias na produção animal, a compreensão da população de microrganismos ruminais é fundamental para o fornecimento de condições necessárias ao melhor aproveitamento do processo de digestão (McSWEENEY et al., 1994). Tais microrganismos são altamente sensíveis a alterações na dieta, em que quantidades de espécies bacterianas individuais podem alterar em resposta à alimentação (LI et al., 2009; HERNANDEZ-SANABRIA et al., 2012), alterando o modo de aproveitamento do alimento ofertado.

Levando em consideração a diversidade de microrganismos presentes no rúmen, a alimentação dos ruminantes é algo extremamente complexo, sendo que vários fatores podem influenciar o desenvolvimento de tais microrganismos ruminais, como por exemplo tipo de concentrado e volumoso, relação Volumoso:Concentrado da dieta, pH ruminal e uso de aditivos visando melhora da fermentação ruminal.

Dentre as bactérias celulolíticas presentes no rúmen, a *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* são consideradas as principais responsáveis pela degradação da fibra da forragem, e apresentam uma interação positiva entre elas (FOSBERG et al., 1997). A proliferação das bactérias celulolíticas no rúmen está diretamente correlacionada com a quantidade de fibra da dieta, e a substituição desta fibra por carboidratos mais fermentáveis no rúmen influencia o desenvolvimento de tais microrganismos, alterando desta forma a dinâmica no ecossistema ruminal (TAJIMA et al., 2001).

Com o aumento da concentração de carboidratos fermentáveis no rúmen, o crescimento microbiano é estimulado, resultando no aumento da taxa de fermentação ruminal. Por outro lado, o aumento da digestibilidade dos carboidratos resulta na queda do pH ruminal muitas vezes para valores abaixo de 6,0, devido a maior produção de AGCC. Nesta situação, ocorre a redução da atividade das bactérias fibrolíticas, prejudicando desta forma a digestibilidade da fibra e, simultaneamente, ocorre estímulo à atividade das bactérias amilolíticas e utilizadoras de lactato no rúmen (TAJIMA et al., 2001; NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). Além da inibição direta, na situação de pH abaixo de 6,0, a fixação por parte dos microrganismos ao substrato é reduzida, justificada pela falta de compostos que aumentam esta fixação, como o bicarbonato, ou pela presença de inibidores de fixação, como o amido solúvel, resultando na inibição da digestão da celulose (OWENS; GOETSCH, 1993).

Carboidratos não fibrosos (CNF - açúcares, amido e pectina) provêm a maior parte da energia para o crescimento de animais na fase de terminação em confinamento, sendo que o excesso de fermentação ruminal de CNF pode levar a acidose ruminal, redução na digestibilidade da fibra, queda no consumo e, conseqüentemente, redução no ganho de peso dos animais (GONZÁLEZ et al., 2012).

Petri et al. (2012) observaram que em dietas com alto teor de concentrado, em substituição ao volumoso, a população de bactérias fibrolíticas, tais como a *F. succinogenes*, foi menor, quando comparado à dietas com alto concentrado e inclusão de forragem. Esta substituição do volumoso por concentrado, carboidratos de rápida fermentação, promoveu a redução do tamanho da partícula do alimento, queda da fibra em detergente neutro (FDN) fisicamente efetiva reduzindo a motilidade e salivação e, conseqüentemente, o tamponamento do rúmen. Dessa forma, promoveu uma queda do pH, aumentando a duração em que os microrganismos ficaram expostos a pH mais baixo.

Selenomonas ruminantium, *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus spp.* são bactérias ruminais que proliferam no rúmen de bovinos alimentados com alto teor de concentrados e que contribuem para o rápido acúmulo de ácido lático e AGCC (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). Quando a taxa de produção de lactato excede a taxa de absorção ou fermentação, seu acúmulo pode levar à queda do pH ruminal e redução na eficiência de conversão de alimentos à AGCC e proteína microbiana (OUWERKERK et al., 2002). Contudo, em uma situação de queda brusca do pH ruminal, ocorre a lise das bactérias gram-negativas de uma maneira mais acelerada, resultando no aumento da concentração de endotoxinas, componentes bioativos da parede celular destes microrganismos, no ambiente

ruminal, entrando na corrente sanguínea e, conseqüentemente, resultando em uma resposta inflamatória sistêmica (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007).

Uma vez que o lactato é um produto intermediário da fermentação ruminal que pode ser ainda metabolizado à AGCC, é comum a presença de bactérias utilizadoras de lactato no rúmen de animais alimentados com alta inclusão de grãos na dieta, sendo que *Megasphaera elsdenii*, *Propionibacterium acnes* e *Selenomonas ruminantium* spp. *lactilytica* são as espécies mais comuns (RUSSELL; DOMBROWSKI, 1980).

A *M. elsdenii* é um microrganismo ruminal consumidor de lactato, que converte o ácido láctico produzido pela fermentação do amido no rúmen em ácido propiônico. Comparada com a maioria das outras bactérias ruminais, a *M. elsdenii* é relativamente mais resistente ao baixo pH. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a inoculação do rúmen com *M. elsdenii* é capaz de modificar a fermentação ruminal e prevenir o acúmulo de ácido láctico durante mudanças na dieta (GREENING et al., 1991; KUNG; HESSION, 1995; OUWERKERK et al., 2002). Estudos realizados por Petri et al. (2012) demonstraram que, em dietas de alto concentrado, a inclusão de silagem de cevada como fonte volumosa aumentou a população de *Ruminobacter amylophilus*, ao passo que nas dietas sem fonte volumosa a população de *M. elsdenii* foi maior.

Tendo em vista a importância das informações descritas acima, a geração de conhecimentos sobre a biodiversidade de microrganismos ruminais, assim como o comportamento de tais populações microbianas em diferentes situações de manejo alimentar, permitem o aumento da utilização de alimentos de forma efetiva, otimizando a fermentação e conseqüentemente a digestão da dieta. Concomitantemente, o conhecimento detalhado sobre a microbiota ruminal, assim como os diferentes fatores que a afeta diretamente, representa um potencial incremento à produtividade da pecuária de corte.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os ruminantes, ao longo de sua evolução, desenvolveram características anatômicas simbióticas, que lhes permitiram utilizar eficientemente carboidratos estruturais como fonte de energia e compostos nitrogenados não-protéicos como fonte de proteína. O sucesso evolutivo desses animais pode ser atribuído, principalmente, ao desenvolvimento do processo de fermentação pré-gástrica (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

A fermentação em ruminantes é o resultado da atividade física e microbiológica, que converte os componentes dietéticos a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), proteína microbiana (Pmic) e vitaminas do complexo B e vitamina K, metano e dióxido de carbono, amônia, nitrato, dentre outros (OWENS; GOETSCH, 1993). A manutenção de uma população microbiana ativa no ambiente ruminal depende de algumas características ruminais essenciais para o desenvolvimento da mesma que são mantidas pelo animal hospedeiro, tais como a remoção dos produtos da fermentação, tamponantes via saliva por meio da ruminação para contribuir com a manutenção do pH ruminal, temperatura, anaerobiose, dentre outros fatores que proporcionam condições ideais para o crescimento da microbiota.

Neste contexto, destaca-se a importância das pesquisas voltadas para a manipulação da fermentação ruminal, desenvolvendo estudos que possibilitem maior conhecimento acerca da dinâmica da microbiota com base nas condições ruminais, principalmente em relação ao efeito da dieta sobre a população de bactérias celulolíticas e amilolíticas, fungos e protozoários.

Devido ao seu papel na degradação da parede celular das plantas, a dinâmica das populações de bactérias celulolíticas ruminais, em resposta a mudanças dietéticas, têm recebido grande atenção da comunidade científica. No início do desenvolvimento da microbiologia ruminal, estas mudanças foram monitoradas por técnicas baseadas no cultivo de microrganismos. Porém, limitações inerentes da técnica e o desenvolvimento de métodos de detecção moleculares mais sensíveis e acurados têm trazido novos desenvolvimentos na área. Tajima et al. (2001) utilizaram a técnica de quantificação relativa pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), com o intuito de avaliar o efeito da dieta no tamanho da população de *F. succinogenes* e *R. flavefaciens*. O maior conhecimento a respeito da população de bactérias celulolíticas no rúmen permitirá o entendimento sobre as capacidades de digestão de fibra em ruminantes.

A composição da dieta é um fator extremamente importante nas mudanças da população bacteriana do rúmen e a compreensão do impacto da mudança da dieta sobre estes microrganismos pode influenciar diretamente sobre a saúde e produtividade animal. A elucidação dos mecanismos pelos quais o excesso de fermentação ruminal de carboidratos não fibrosos leva a queda da digestibilidade da fibra e a acidose ruminal, bem como das principais populações afetadas, auxiliará no desenvolvimento de técnicas para manutenção da função ruminal, como uso de probióticos, processamento do amido, ionóforos e vacinas contra microrganismos ruminais indesejados.

2.1 OS RUMINANTES: CARACTERÍSTICAS DO RÚMEN COMO CÂMARA FERMENTATIVA

O rúmen é um ecossistema complexo e aberto no qual o alimento consumido pelo ruminante é fermentado, por ação dos microrganismos ruminais, a ácidos graxos voláteis, que servem como fonte de energia para o hospedeiro, além da massa microbiana, ou em outras palavras a proteína microbiana, que por sua vez serve como fonte de proteína ao animal. Espécies de microrganismos têm desenvolvido no rúmen uma série de interações complexas, fazendo do ruminante um dos melhores exemplos de simbiose entre microrganismos na natureza (WEIMER, 1998). Grande parte do conhecimento atual sobre o metabolismo ruminal desses alimentos foi obtida através do estudo *in vitro* de espécies bacterianas, a maioria das quais foram isolados nas primeiras décadas da microbiologia ruminal (HUNGATE, 1996; KRAUSE; RUSSELL, 1996).

Os ruminantes diferem dos outros mamíferos pelo fato de o alimento sofrer fermentação microbiana no rúmen antes de alcançar o estômago verdadeiro e intestino. Tal processo de fermentação ocorre no rúmen, devido à atividade microbiana na degradação de carboidratos como a celulose, que não pode ser utilizada pelo animal sem ação destes microrganismos ruminais. Outros compostos, como proteínas e ácidos orgânicos, também são utilizados pela microbiota, resultando nos principais produtos da fermentação, que são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), além de dióxido de carbono, metano, amônia e proteína microbiana (BRYANT, 1959).

Para a manutenção e o bom desenvolvimento de uma população microbiana ruminal ativa, os animais devem manter o ambiente ruminal com condições adequadas. Nesse contexto, o ambiente ruminal apresenta características favoráveis ao desenvolvimento contínuo de microrganismos, tornando-o um local ideal para fermentação, sendo um ambiente anaeróbio, com temperatura oscilando entre 38 a 42°C (média de 39°C), com pH ruminal variando entre 5,5 a 7,0 (média de 6,8), dentre outros fatores, além da remoção contínua dos produtos de fermentação (KOZLOSKI, 2002; LANA, 2005). Valores de pH ruminal abaixo de 6,0 podem inibir a ação de bactérias celulolíticas e reduzir significativamente a eficiência de síntese de proteína microbiana.

O potencial redox no rúmen está usualmente entre -250 e -450 mV, refletindo ausência de oxigênio e o excesso de potencial redutor (VAN SOEST, 1994). Em virtude dessa característica do ambiente ruminal, as opções metabólicas dos microrganismos se tornam limitadas, sendo que esses são obrigados a trabalhar com esse excesso de equivalentes redutores (NADH), utilizando-os em uma variedade de reações. Para dispor destes compostos, eles reduzem todos os compostos disponíveis, sendo o CO₂ reduzido a metano, sulfatos e nitratos a sulfetos e amônia e ácidos graxos insaturados em saturados. Apesar desse excesso de compostos redutores, o crescimento microbiano permanece limitado pela disponibilidade de ATP (OWENS; GOETSCH, 1993).

2.2 MICRORGANISMOS RUMINAIS

A microbiologia ruminal ampliou o conhecimento acerca da ecologia microbiana e, com base nas características dos diferentes microrganismos ruminais, melhorou a habilidade de alimentar os ruminantes, tornando a alimentação mais eficaz, proporcionando melhor aproveitamento da dieta ofertada e, dessa forma, promovendo melhor desempenho animal (MORGAVI et al., 2013).

Grande número de espécies de microrganismos podem ser encontrados no ambiente ruminal (KRAUSE; RUSSELL, 1996), principalmente de bactérias (10^{10} - 10^{11} células/mL), protozoários (10^4 - 10^6 /mL), fungos anaeróbios (10^3 - 10^5 zoospóro/mL) e bacteriófagos (10^8 - 10^9 /mL) (KAMRA, 2005). Para Belanche et al. (2012) as interações entre esses grupos microbianos, fermentação ruminal e metabolismo do hospedeiro ainda não são totalmente compreendidos, apesar da riqueza de conhecimento que foi adquirida nos últimos anos.

Dentre estes microrganismos, as bactérias representam o grupo microbiano mais importante e diversificado no ambiente ruminal e desempenham um papel importante na degradação biológica de carboidratos. Tais microrganismos são classificados de acordo com sua principal atividade metabólica no ambiente ruminal. *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Ruminococcus flavefaciens* são reconhecidas como as principais bactérias celulolíticas encontradas no rúmen (FORSTER et al., 1997; SHINKAI; KOBAYASHI, 2007; WANAPAT; CHERDTHONG, 2009). Tais microrganismos hidrolisam a celulose, por meio de complexos enzimáticos denominados celulases. As celulases da maioria dos microrganismos celulolíticos estão associadas às células, aderidas firmemente às partículas fibrosas do conteúdo ruminal. Em animais submetidos a dietas a base de grãos, o pH ruminal pode decrescer, inibindo o crescimento das bactérias fibrolíticas. As espécies celulolíticas produzem, principalmente, acetato, propionato, butirato, succinato, formato, CO₂ e H₂. A bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens* fermenta tanto celulose quanto hemicelulose (ARCURI et al., 2011).

Além das fibrolíticas, tem-se as bactérias amilolíticas (por exemplo, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis*), proteolíticas (*Prevotella spp.*), lipolíticas (*Anaerovibrio lipolytica*), produtoras de lactato (por exemplo, *S. bovis* e *S. ruminantium*) e consumidoras de lactato (*Megasphaera elsdenii*) (BELANCHE et al., 2012). Além destes microrganismos, há ainda o importante grupo de organismos *Archaea*, distintos filogeneticamente de bactérias, cujos principais representantes no rúmen são os metanogênicos, responsáveis pela produção de um subproduto da fermentação ruminal, o metano (CH₄) (HINDRICHSEN; KREUZER, 2009). Importante ressaltar que a produção deste gás viabiliza o funcionamento do rúmen, pelo fato de servir como um dreno para hidrogênio, fundamental bioquimicamente para a regeneração de cofatores, como NAD⁺ e NADP⁺, essencial para a manutenção de todo o conjunto de processos fermentativos no rúmen.

Além de uma relação benéfica recíproca, denominada simbiose mutualística, casos de predação, competição, mutualismo e antibiose são exemplos de outras interações entre os microrganismos ruminiais, evoluídas durante 70 milhões de anos. Consequentemente, qualquer estratégia de manipulação da fermentação ruminal deve levar em consideração estes aspectos ecológicos (HOFMANN, 1989; MACKIE, 1997 apud ARCURI et al., 2006, p.111).

As características do rúmen como câmara de fermentação, em consequência das condições alimentares, podem influenciar no desenvolvimento dos microrganismos ruminiais (BRYANT, 1959; HUNGATE, 1996). Dentre estes fatores, o pH ruminal é um dos mais importantes, pelo fato de as bactérias celulolíticas serem muito sensíveis à variação de pH

(MIRON et al., 2001; SUNG et al., 2007). Estudos anteriores com microbiologia ruminal demonstraram que as bactérias fibrolíticas tem predileção de crescimento em uma faixa de pH ruminal em torno de 6,2 (RUSSELL; DOMBROWSKI, 1980; WEIMER, 1993). Quando ruminantes são alimentados com quantidades inadequadas de fibra na dieta, pode resultar em quedas de pH ruminal e, conseqüentemente, a microbiota ruminal é alterada, e os animais se tornam mais suscetíveis a distúrbios metabólicos (RUSSELL; RYCHLIK, 2001). Além disso, o pH ruminal, juntamente com outros fatores, como temperatura, carboidratos e de cátions solúveis, podem influenciar a aderência bacteriana ao substrato (MIRON et al., 2001).

De acordo com Belanche et al. (2012) a degradação da fibra requer um conjunto de microrganismos agindo de forma simbiótica. Os fungos anaeróbios têm sido sugeridos como os colonizadores primários da fração fibrosa, permitindo o subsequente acesso de outros microrganismos fibrolíticos. De modo semelhante, as bactérias celulolíticas estão altamente especializadas na degradação da fibra em pequenos carboidratos, que por sua vez são consumidos por outras espécies bacterianas. Além disso, as bactérias metanogênicas agem como um dissipador de H_2 no rúmen, usando H_2 gerado durante a degradação da fibra para produzir metano.

2.3 MANIPULAÇÃO DO AMBIENTE RUMINAL

A manipulação da fermentação ruminal é uma ferramenta nutricional utilizada com o intuito de melhorar o desempenho produtivo de bovinos de corte, por meio de pequenos ajustes que possibilitam a exploração do potencial produtivo dos ruminantes, acompanhando desta forma a intensificação dos sistemas de produção de bovinos (DILORENZO, 2004). A manipulação da fermentação é resultado de uma extensa pesquisa na área de microbiologia ruminal, com o objetivo de controlar algum processo fermentativo no rúmen, atingindo assim uma utilização mais eficiente dos nutrientes (NAGARAJA, 2003).

Diversos fatores podem interferir no desenvolvimento e estabilidade da microbiota ruminal. A composição da dieta passa a ser o fator mais importante, influenciando o número e a proporção relativa das diferentes espécies de microrganismos ruminais. O impacto da manipulação dos microrganismos do rúmen na moderna produção animal é visto como uma nova linha de produção que vem sendo desenvolvida.

A composição da dieta faz com que os microrganismos presentes alterem o seu balanço de fermentação, sendo seguido pelo ajuste das espécies microbianas às novas situações. No caso de mudanças abruptas para uma dieta de alta qualidade, o desequilíbrio das espécies microbianas pode abrir a porta para organismos facultativos oportunistas que podem dominar a fermentação, por meio da produção de ácidos e redução do pH ruminal, conduzindo a distúrbios metabólicos (VAN SOEST, 1994). Na figura 1, é possível observar as consequências da alimentação sobre o pH ruminal de bovinos de corte, influenciando consequentemente a composição da microbiota ruminal.

Figura 1 - Consequências metabólicas da ingestão de alimentos por bovinos de corte sobre pH ruminal e a população microbiana

Fonte: Schwartzkopf-Genswein et al. (2003)

A quantidade e a composição da dieta são variáveis externas que afetam a taxa de digestão, a taxa de passagem e, consequentemente, o *turnover* do conteúdo ruminal. Nesse contexto, dietas com altos teores de proteína favorecem microrganismos proteolíticos, enquanto que em dietas com alta inclusão de amido, e baixa fibra, estão associadas a uma grande população de bactérias amilolíticas (VAN SOEST, 1994). A disponibilidade de carboidratos não fibrosos, como açúcares e amido, permite que bactérias amilolíticas (por exemplo, *Ruminococcus amylophilus*, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus spp.*) se proliferem, produzindo, consequentemente, quantidades excessivas de AGCC oriundos da fermentação (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003).

Mudanças na relação volumoso:concentrado resultam em uma sucessão de mudanças na população microbiana. Em dietas com alto nível de inclusão de concentrados, bactérias consumidoras de lactato que são sensíveis à acidez, tais como *Selenomonas* e *Veillonella*, são substituídas pelas tolerantes à acidez, tais como *Anaerovibrio* e *Megasphaera*. As bactérias amilolíticas pertencentes ao gênero *Prevotella* são substituídas pelas produtoras de lactato, tais como as dos gêneros *Lactobacillus*, *Eubacterium* e *Streptococcus*. A acidose láctica, que surge nessas condições, parece ser resultado da incapacidade de aumento das bactérias que utilizam este substrato, ocorrendo o seu acúmulo no rúmen e, conseqüentemente, a redução no pH ruminal (OWENS; GOETSCH, 1993). As bactérias celulolíticas, assim como as metanogênicas, são menos tolerantes à queda brusca de pH ruminal.

Outros fatores como processamento dos ingredientes podem interferir no aproveitamento da dieta. Em outras palavras, se o acesso aos componentes do alimento limita a taxa de digestão, a redução do tamanho de partículas, por meio do processamento dos ingredientes, é uma boa alternativa para melhorar seu aproveitamento. O grão de milho *Flint* no Brasil, diferentemente do milho dentado utilizado na alimentação de bovinos na América do Norte, apresenta alta vitreosidade, limitando a digestibilidade do amido principalmente pelo fato da presença de uma densa matriz proteica, que por sua vez atua como barreira à ação de enzimas secretadas por microrganismos ruminais (McALLISTER, 2007). Métodos de processamento de grãos, como por exemplo floculação e moagem, são estratégias eficientes no rompimento desta matriz proteica que envolve o grânulo de amido, proporcionando desta forma maior digestibilidade, pelo fato de expor o amido à ação microbiana.

De acordo com Krause et al. (2013) os diferentes métodos de manipulação da fermentação ruminal e, conseqüentemente, da população microbiana, tais como a utilização de ionóforos, probióticos (leveduras), mudanças na dieta (relação volumoso:concentrado, tipo de carboidrato não fibroso), dentre outros, podem ser avaliados por meio de técnicas da biologia molecular, elucidando seu mecanismo de ação em detalhes com o intuito de compreender o impacto de sua inclusão sobre o ecossistema microbiano e como tais mudanças podem proporcionar maior eficiência e desempenho animal.

O metabolismo no rúmen pode ser manipulado de maneira direta ou indireta, cujo objetivo consiste na melhora da digestibilidade do alimento ofertado. A manipulação indireta está relacionada com as características do alimento, sendo que a composição da dieta pode influenciar na atividade metabólica dos microrganismos. Nesse contexto, o tipo de carboidrato fornecido influencia diretamente no pH do rúmen e na população microbiana, alterando a produção dos AGCC e, conseqüentemente, a relação acetato:propionato (McSWEENEY et

al., 1999). Já a manipulação direta do rúmen relaciona-se com o uso de aditivos zootécnicos, como ionóforos, usados para favorecer a digestibilidade de alimentos fibrosos, modificando a fermentação ao terem efeito sobre a microbiota ruminal.

2.4 EFEITO DA DIETA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS RUMINAIS

A composição da dieta é um dos principais fatores que afetam a composição da microbiota ruminal, sendo que as bactérias fibrolíticas são sensíveis à mudança brusca de dieta, particularmente com relação ao nível de inclusão de concentrados (KOIKE et al., 2003; MOSONI et al., 2007).

A proporção de volumoso na dieta pode influenciar o tamanho da população ou a proporção do número de bactérias celulolíticas no rúmen. Wanapat e Cherdthong (2009) testaram o efeito do fornecimento da palha de arroz tratada com ureia, como fonte volumosa, para búfalos, em diferentes proporções de volumoso:concentrado (V:C) na dieta (100:0, 75:25, 50:50, e 25:75), sobre a população de bactérias celulolíticas ruminais. Para tanto, utilizaram a técnica de qPCR com o intuito de identificar as principais bactérias (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*) presentes em digesta e líquido ruminal de búfalos. Os autores concluem que a *F. succinogenes* foi a população bacteriana dominante (10^9 cópias/mL para digesta e líquido ruminal) dentre as três espécies celulolíticas, seguida por *R. flavefaciens* (10^7 cópias/mL para digesta e líquido ruminal) e *R. albus* (10^6 cópias/mL para digesta e líquido ruminal). A quantificação do DNA bacteriano demonstrou que o aumento do nível de inclusão de concentrados na dieta proporcionou a redução das três bactérias celulolíticas ruminais (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* e *R. albus*).

Tajima et al. (2001) relataram que a prevalência da *F. succinogenes* em animais recebendo feno caiu 20 vezes no terceiro dia da mudança para uma dieta com alto teor de concentrado, seguida por uma nova diminuição, com 28 dias, apresentando redução de 57 vezes no tamanho da população. Já a concentração de DNA para a bactéria *R. flavefaciens* no dia 3 reduziu em aproximadamente 10% do seu valor inicial para os animais recebendo feno e permaneceu nesse nível no dia 28.

Wanapat e Cherdthong (2009) relatam que as bactérias celulolíticas se aderiram principalmente à fração sólida (digesta) no rúmen. A alta distribuição das bactérias

celulolíticas em digesta é razoavelmente explicada pelo fato de que a digesta consiste principalmente de partículas de fibras vegetais que eram susceptíveis de terem sido colonizado por estas bactérias. Da mesma forma, Hungate (1966) informou que as bactérias celulolíticas foram mais abundantes na porção sólidos do que na porção líquida.

Wanapat e Cherdthong (2009) descrevem que, quatro horas após a alimentação, as populações das três bactérias celulolíticas foram maiores do que a encontrada em zero hora após a alimentação. Existem duas explicações possíveis para que as populações tenham aumentado quatro horas após alimentação: a proliferação de células após a alimentação e a fixação adicional das novas bactérias a partir da fase líquida ou de outras partículas.

Em estudo semelhante ao do Wanapat e Cherdthong (2009), Singh et al. (2014) utilizaram a técnica de PCR em tempo real (quantificação absoluta), com o intuito de detectar as principais bactérias amilolíticas e celulolíticas ruminais presentes em búfalos adaptados a diferentes proporções de volumoso:concentrado na dieta (100:0, 75:25, 50:50, e 25:75). Dentre as bactérias celulolíticas, a *R. flavefaciens* foi a mais abundante ($2,22 \times 10^8$ cópias/mL de líquido ruminal), seguida pela *F. succinogenes* ($1,11 \times 10^8$ cópias/mL) e *R. albus* ($1,25 \times 10^7$ cópias/mL). Com relação às amilolíticas, a bactéria mais abundante foi a *S. ruminantium* ($2,62 \times 10^7$ cópias/mL), seguido pela *T. bryantii* ($2,53 \times 10^7$ cópias/mL), *Ruminobacter amylophilus* ($1,31 \times 10^7$ cópias/mL) e *Anaerovibrio lipolytica* ($2,58 \times 10^6$ cópias/mL).

Estudos realizados anteriormente demonstram que a *R. albus* é a menos abundante dentre as principais bactérias fibrolíticas (*R. flavefaciens* e *F. succinogenes*) no rúmen de ovinos (KOIKE; KOBAYASHI, 2001; MICHALET-DOREAU et al., 2002; KOIKE et al., 2003). Entretanto, os dados reportados por Singh et al. (2014) diferem dos presentes no estudo desenvolvido por Koike e Kobayashi (2001), em que a *F. succinogenes* foi a mais dominante (10^{6-7} cópias/mL em digesta ruminal) dentre as três bactérias celulolíticas, seguido por *R. flavefaciens* (10^5 cópias/mL) e *R. albus* (10^4 cópias/mL). Os mesmos autores sugerem que, uma vez que o tamanho total da população bacteriana no rúmen é de cerca de 10^{10} por mL, a *F. succinogenes* está presente em apenas 0,1% do total da população microbiana e as pertencentes ao gênero *Ruminococcus* estão em quantidades muito menores. Da mesma forma, em estudo desenvolvido por Wanapat e Cherdthong (2009), a bactéria celulolítica *F. succinogenes* foi a espécie mais abundante em digesta e líquido ruminal de búfalos.

Singh et al. (2014) observaram que a alteração da porcentagem de volumoso de 75% para 25% promoveu uma redução na população das bactérias celulolíticas, de $2,22 \times 10^8$ para $1,70 \times 10^8$ cópias/mL para *R. flavefaciens*, $1,11 \times 10^8$ para $1,33 \times 10^6$ cópias/mL para *F.*

succinogenes no fluído ruminal, demonstrando que possivelmente as condições dietéticas podem ter proporcionado a redução no número de bactérias celulolíticas.

Singh et al. (2014) confirmaram, com base em seus resultados, a adesão de bactérias amilolíticas à fibra, conforme relatado por Michalet-Doreau et al. (2002), que por sua vez relataram que as bactérias amilolíticas, como *Selenomonas ruminantium* e *Treponema bryantii*, foram detectadas associadas à fibra, de modo que tal associação ocorreu em um nível relativamente mais baixo do que a ligação das bactérias fibrolíticas à fibra. A importância da confirmação da adesão destes microrganismos à fibra reside no fato de que as bactérias amilolíticas utilizam os produtos resultantes da hidrólise da celulose por parte das bactérias fibrolíticas e, concomitantemente, essas bactérias não-fibrolíticas facilitam a degradação da fibra de forma indireta, pelo fato de evitar o acúmulo de metabólitos bacterianos, tais como succinato e celodextrinas (CHENG et al., 1980).

A adaptação a uma dieta de alto grão é utilizada em bovinos de corte confinados com o intuito de garantir melhor desempenho, prevenindo distúrbios metabólicos (acidose) e variações de consumo. Concomitantemente, tal adaptação a uma dieta rica em grãos a partir de uma dieta rica em forragem é conhecida por alterar a estrutura da população microbiana ruminal e ajudar a estabelecer uma população microbiana estável no rúmen, proporcionando uma utilização efetiva de carboidratos prontamente fermentescíveis. Fernando et al. (2010) avaliaram a dinâmica populacional de bactérias ruminais durante a adaptação à uma dieta de alto grão. Para tanto, utilizaram novilhos de corte canulados, que foram adaptados à dieta da alto grão pelo método de adaptação em escadas (*Step-Up*), em diferentes proporções de volumoso:concentrado (80:20, 60:40, 40:60, e 20:80). Os autores observaram que a prevalência das bactérias *Ruminococcus albus* e *Fibrobacter succinogenes* reduziu gradativamente em animais adaptados à dieta de alto concentrado, e seu número foi até 40 vezes menor que em animais recebendo feno. Esta redução da população de bactérias celulolíticas em resposta ao aumento do nível de inclusão de concentrados na dieta são consistentes com dados reportados em estudos anteriores (TAJIMA et al., 2001; SINGH et al., 2014).

Aumentando a inclusão de concentrado na dieta, a porcentagem das bactérias produtoras de lactato, como *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus*, aumenta. Entretanto, a porcentagem das bactérias consumidoras de lactato, como *Selenomonas ruminantium* e *M. elsdenii*, é reduzida. Consequentemente, o lactato se acumula no rúmen, resultando na queda de pH, assim como de bactérias, fungos e protozoários, cujas populações ruminais reduzem rapidamente.

As principais bactérias celulolíticas, como *F. succinogenes*, *R. albus* e *R. flavefaciens*, importantes na degradação da fibra, são sensíveis à baixos valores de pH. Aumentando o nível de inclusão de concentrado, mais açúcares, amido e outros carboidratos não-estruturais são consumidos, que por sua vez contribui para maior produção de AGCC. Essa maior concentração de AGCC no rúmen contribuem para queda de pH e, conseqüentemente, proporciona a redução da quantidade e atividade das bactérias celulolíticas.

Golder et al. (2012) descreve que o fornecimento de uma dieta com grãos resultou em queda de pH ruminal e aumento nas concentrações de amônia e dos AGCC (acetato, propionato, butirato) quando comparado ao tratamento controle sem inclusão de grãos. A bactéria *S. bovis*, fermentadora de carboidratos não estruturais, tem a habilidade de se multiplicar em ambientes de menor pH (RUSSELL; HINO, 1985; RUSSELL; RYCHLIK, 2001), além de apresentar rápido crescimento em animais que sofreram acidose láctica (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007).

O tipo de carboidrato consumido pelo ruminante altera a composição da população microbiana ruminal e, conseqüentemente, modifica o padrão de fermentação ruminal. Belanche et al. (2012) avaliaram o efeito do consumo de duas fontes de carboidrato (dieta rica em FDN x dieta rica em amido), sobre o ecossistema ruminal de vacas leiteiras e relataram que ambos os tratamentos dietéticos modificaram a fermentação e a população ruminal. Em comparação à dieta rica em amido, o consumo da dieta rica em FDN aumentou a concentração de microrganismos celulolíticos, incluindo protozoários (+38%), fungos (+59%) e metanogênicas (+27%), pelo fato de manter o pH elevado, cujo ambiente se torna favorável para o desenvolvimento dos microrganismos em questão, além de proporcionar substratos para os microrganismos celulolíticos (por exemplo, celulose e heteropolissacarídeos). Houve mudanças no padrão de fermentação em consequência da fonte de carboidrato, em que as vacas consumindo a dieta rica em FDN apresentaram maior pH ruminal, concentrações de amônia e maior proporção molar de acetato:propionato. Os autores comentam que, com base nos resultados, a microbiota ruminal está diretamente relacionada com o padrão de fermentação ruminal e com a eficiência de utilização da dieta pelo bovino leiteiro.

Em estudo realizado por Golder et al. (2014), cujo objetivo foi avaliar o efeito da combinação de grãos, frutose e histidina em novilhas de leite não-adaptadas para este desafio sobre a composição da microbiota ruminal, observaram que a *S. bovis* se tornou mais prevalente em novilhas alimentadas com frutose, indicando que esta bactéria responde rapidamente à alterações na dieta, pelo fato da exposição brusca à fontes de carboidratos prontamente fermentescíveis, atuando nas alterações iniciais da microbiota ruminal em

bovinos que não foram adaptados à este desafio. O autor cita que a frutose é mais rapidamente metabolizada quando comparada ao amido. Além destes dados, a abundância relativa das famílias *Streptococcaceae* e *Veillonellaceae* aumentou nas novilhas que receberam frutose. Os autores ainda citam que os bovinos apresentam comunidades bacterianas distintas, que podem influenciar sua capacidade de lidar com as mudanças no tipo e quantidade de substrato.

Como descrito anteriormente, estudos foram realizados para avaliar mudanças na composição bacteriana em bovinos alimentados com diferentes relações de volumoso:concentrado (PETRI et al., 2012), porcentagens crescentes de concentrado na dieta (FERNANDO et al., 2010), fonte de carboidrato (fibroso ou amiláceo; BELANCHE et al., 2012), ou em bovinos com acidose subaguda induzida (KHAFIPOUR et al., 2009). Entretanto, poucos trabalhos avaliam o efeito do tipo de carboidrato não fibroso sobre a população de microrganismos ruminais, assim como o efeito do processamento do grão principalmente em dietas em que a cana-de-açúcar é a fonte volumosa.

2.5 A TÉCNICA DE qPCR NA QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS RUMINAIS

A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), é uma técnica *in vitro* que permite a multiplicação de um trecho específico do DNA utilizando *primer* (ou iniciador) de PCR, DNA polimerase termoestável (enzima *Taq polimerase*), até um ponto em que sua concentração em dada solução seja tão alta que possa ser facilmente detectável por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias (VIEIRA, 2013).

Vale ressaltar que esta técnica já havia sido descrita por Saiki et al. (1985), mas Mullis inovou e a tornou uma técnica muito mais fácil de ser realizada, com a introdução do conceito de *primer* de PCR e utilização da enzima *Taq*. Dessa forma, Kary Mullis, além de conseguir especificidade na cópia de apenas segmentos específicos do DNA, superou sua baixa quantidade na maioria dos tecidos vivos, que representa um grande problema da análise de ácidos nucleicos.

Com relação à técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase, existem dois tipos de análise: PCR tradicional e PCR em Tempo Real. O procedimento por Tempo Real permite a

detecção de amplificação de PCR durante as fases iniciais da reação. O fato de possibilitar a observação da reação durante todo o procedimento proporciona uma vantagem distinta sobre a detecção por PCR tradicional. Os métodos tradicionais usam géis de agarose para a detecção de amplificação de PCR na fase final ou de ponto final da reação de PCR. Além disso, pelo PCR Tempo Real é possível comparar a amplificação entre as amostras, quantificação da expressão de um determinado genótipo, diferente do método tradicional.

Dentro dos tipos de quantificação na PCR, tem-se a Absoluta e a Relativa. A Absoluta baseia-se na comparação da amostra alvo com um padrão, cujo número de moléculas é conhecido. Nesse caso, é determinado o número exato de moléculas da amostra de DNA molde. Já a Quantificação Relativa consiste na análise comparativa da amostra alvo com algum controle interno. Dessa forma, são comparados os ciclos de amplificação entre as amostras alvo e controle.

Recentes avanços nas técnicas de biologia molecular, principalmente no que se diz respeito à técnica de quantificação por PCR em Tempo Real (qPCR), permitiram a análise da quantidade de bactérias ruminais sem a necessidade de cultivo, detectando assim muitas bactérias funcionais como novos alvos para diversas pesquisas (KOBAYASHI, 2006; WANAPAT 2009). O procedimento de qPCR consiste em uma técnica simples e confiável de executar, cuja abordagem permite a monitorização contínua da formação dos produtos de PCR. Tal técnica tem a capacidade de quantificar bactérias alvo com alta sensibilidade e precisão, e tem sido utilizada com sucesso na quantificação de protozoários (SKILLMAN et al., 2006), fungos (DENMAN; MCSWEENEY, 2006; LWIN et al., 2011, BOOTS et al., 2012) e bactérias (TAJIMA et al., 2001; WANAPAT; CHERDTHONG, 2009) ruminais. Estudos recentes demonstraram que determinadas espécies de microrganismos são mais abundantes no rúmen sob determinadas condições de alimentação (TAJIMA et al., 2001; KOBAYASHI, 2006; WANAPAT; CHERDTHONG, 2009; SINGH et al., 2014).

Como descrito anteriormente, a PCR é uma técnica *in vitro* que permite a multiplicação de um trecho específico do DNA, sendo que a multiplicação do material em questão se dá em diferentes etapas, alternando-se a temperatura de ensaio entre elas.

Na primeira etapa, ocorre a elevação da temperatura do material até 95°C. Em seguida, ocorrem as etapas mais importantes de todo o procedimento, momento em que o trecho de DNA de interesse vai ser multiplicado. As etapas em questão compreendem a Desnaturação (95°C), onde a dupla fita de DNA se separa; Anelamento (55°C), em que os *primers* vão se anelar às fitas, com o objetivo de delimitar a sequência a ser amplificada; e Extensão (72°C), momento em que a enzima *Taq* atua, estendendo a fita de DNA, a partir do local onde o

primer se anelou e, no final desta etapa, tem-se duas cópias de DNA. Em seguida, o ciclo se reinicia. Este ciclo em questão se reinicia muitas vezes. Por fim, a última etapa consiste na *Melt Curve*, no caso da qPCR.

A curva *Melt* avalia o comportamento da dupla fita em se tornar fita simples, desnaturando a dupla fita por meio da elevação da temperatura. Este procedimento, realizado pelo aparelho ao final dos ciclos de amplificação da qPCR, determina o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos primers de suas sequências alvo. Este procedimento é essencial para análise do produto final após a amplificação, no intuito de se verificar se houve formação de um único produto ou se produtos inespecíficos também foram formados. Concomitantemente, o aparecimento de um único pico na curva de “melting” sugere a existência de um único produto, demonstrando a especificidade do material amplificado. Caso contrário, se for observado o aparecimento de vários picos na curva, pode-se considerar a hipótese de formação de produtos inespecíficos na reação ou a eventual formação de dímeros de primers (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010). O tempo de análise de PCR dura cerca de 2 horas. Na figura 2, está ilustrado o esquema dos processos realizados em uma reação de PCR.

Figura 2 - Esquema do procedimento de uma reação de PCR. Após a desnaturação das fitas, ocorre o anelamento dos primers. A enzima Taq polimerase, representada em verde, adiciona nucleotídeos complementares às fitas-mãe. Por fim, tem-se duas fitas-mãe pareadas com as suas fitas-filha complementares, sintetizada a partir da adição dos nucleotídeos pela enzima Taq

Fonte: Vieira (2013)

Segundo Koike e Kobayashi (2001), os ensaios de qPCR são aproximadamente 1000 vezes mais sensíveis do que métodos moleculares utilizando sondas e são adequados para mensurar a população de bactérias celulolíticas no rúmen. Entretanto, a obtenção de DNA de boa qualidade e em quantidade adequada para a amplificação é um fator de extrema importância para obter sucesso nas análises por qPCR, com o intuito de se obter alta eficiência e especificidade do produto amplificado.

Neste sentido, para determinar o grau de pureza das amostras de DNA extraídas, realiza-se a leitura em espectrofotômetro, analisando-se a razão de absorbância 260/280, sendo que valores iguais e/ou acima de 1,8 são considerados de boa qualidade. Entretanto,

valores abaixo de 1,8 podem indicar contaminação do material por proteínas, fenol e/ou lipídeos. O “A260” é proporcional à concentração de ácidos nucleicos, enquanto o “A280” é proporcional à concentração de fenol e proteínas. Quanto à razão 260/230, a mesma é utilizada para avaliar contaminação por outros compostos, sendo o valor de referência em torno de 2,0, mas não é consenso. Além disso, o comportamento da curva de absorbância é outro ponto a ser analisado, cujo padrão corresponde a um único pico de absorbância em 260nm para DNA e RNA. Proteínas apresentam um pico de absorbância a 280nm e outros contaminantes (como sais, polissacarídeos, fenol) apresentam pico de absorbância em torno de 230nm.

Resultados de qPCR para avaliação das mudanças no ecossistema ruminal durante fases de acidose demonstram que *S. bovis* e *Escherichia coli* dominaram durante acidose severa, e *M. elsdenii* foi a espécie dominante durante acidose mediana causada por fornecimento de grãos (KHAFIPOUR et al., 2009). A caracterização das mudanças que ocorrem no ecossistema ruminal devido ao fornecimento de fontes e formas de processamento diferentes de carboidratos não fibrosos pode auxiliar na elaboração de dietas mais eficientes e com menor risco de distúrbios metabólicos.

Pelo fato de os carboidratos estruturais contribuírem grandemente para atender requerimentos energéticos dos ruminantes, a otimização da taxa e extensão da digestão da fibra pela microbiota ruminal se torna uma estratégia interessante. Como a celulose é o maior componente da fibra e está prontamente disponível na forma purificada, sua degradação tem recebido muito mais estudo do que outros polissacarídeos de plantas (WEIMER, 1998).

O rúmen fornece um recurso genético único para a descoberta de enzimas secretadas por microrganismos capazes de degradar a parede celular de plantas, para ser utilizado na produção de biocombustíveis, presumivelmente por causa da co-evolução de microrganismos e os tipos de parede celular vegetal (BRULC et al., 2009).

Para Singh et al. (2014), a técnica de qPCR, apesar de ser utilizada para quantificar DNA tanto de células viáveis quanto as não-viáveis, consiste em um procedimento que, além de ser acurado e muito sensível, apresenta a vantagem de quantificar as verdadeiras espécies de bactérias ruminais, através de oligonucleotídeos iniciadores, contendo uma sequência de nucleotídeos específica para cada bactéria de interesse, além de permitir a diferenciação entre os tamanhos de populações bacterianas. Entretanto, apenas a quantificação de bactérias ruminais não reflete a real atividade das mesmas no ambiente ruminal. De fato, os autores relatam que a relação entre a estrutura da microbiota (analisada por qPCR) juntamente com a

atividade e funcionalidade microbiana é o ponto central da ecologia microbiana, mas continua pouco estudado.

Neste contexto, a atividade dos microrganismos ruminais, por exemplo, pode ser avaliada por meio da quantificação das enzimas específicas glicosídeo hidrolases, fornecendo, desta forma, informações adicionais que por sua vez podem refletir a atividade microbiana.

Recentemente, Brulc et al. (2009) realizaram um estudo com o intuito de obter maior compreensão da microbiota ruminal e seu potencial metabólico, utilizando a metagenômica comparativa para examinar dados de pirosequenciamento de três microbiomas que se aderem à fibra, adquiridos de três animais alimentados com a mesma dieta. Os autores relatam que, no microbioma ruminal, a colonização inicial da fibra ocorre por microrganismos que possuem enzimas que atacam as cadeias laterais do complexo polissacarídeo de plantas, evidenciando que as glicosídeo hidrolases são enzimas chave em microrganismos que se aderem à fibra. Além disso, os mesmos autores propõem que a digestão da fibra parece ser um processo dinâmico, com colonização inicial por um subconjunto de microrganismos que, provavelmente, é substituído posteriormente por outro grupo de microrganismos que degradam as principais cadeias de celulose.

De acordo com Weimer (1998), a digestão da celulose no rúmen ocorre através da ação de um número relativamente pequeno de espécies bacterianas que aderem diretamente sobre a superfície da fibra. Para o autor, este modo de ataque apresenta várias vantagens. A localização das enzimas na superfície da célula, ou próximas a ela, permite tanto a hidrólise da celulose quanto o acesso dos microrganismos à celodextrinas. Weimer (1996) descreve que a digestão da celulose envolve a adesão de microrganismos às fibras dietéticas através de uma estrutura glicoproteica, o glicocálice, que por sua vez protege as células da fagocitose pelos protozoários, e também impede que enzimas celulolíticas sofram ação das proteases ruminais, reduzindo sua perda, ao passo que, conseqüentemente, possibilita a retenção temporária de celodextrinas, para serem utilizadas pelas bactérias celulolíticas. Neste contexto, as espécies celulolíticas predominantes no ambiente ruminal (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *R. albus*) digerem celulose mais rápido do que qualquer outro microrganismo celulolítico conhecido no rúmen.

Para Krause et al. (2013) o estudo da microbiologia ruminal através de técnicas da biologia molecular, como a metagenômica, possibilita a formulação, por exemplo, de probióticos específicos ou até mesmo a inclusão de microrganismos, que, ao se estabelecerem no ambiente ruminal, poderiam otimizar a fermentação ruminal, além de auxiliar no desenvolvimento de vacinas para as bactérias metanogênicas, visando a melhoria da eficiência

nutricional em ruminantes. Os mesmos autores citam que recentes avanços na técnica de pirosequenciamento podem elucidar de forma significativa as interações bacterianas com o hospedeiro, e, conseqüentemente, o poder da diversidade microbiana em otimizar a produtividade e saúde animal.

De acordo com Morgavi et al. (2013), o melhor conhecimento acerca da microbiota ruminal e suas funções subjacentes pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias para melhorar a eficiência da fermentação ruminal, como por exemplo proporcionando a redução da produção de metano entérico.

Ding et al. (2014) avaliaram o efeito do fornecimento de levedura (*S. cerevisiae*) sobre a microbiota ruminal e degradação de fibra, em novilhos recebendo dietas com diferentes níveis de concentrado (relação volumoso:concentrado de 70:30, 50:50, 30:70 e 10:90). A quantificação de bactérias por meio da técnica de qPCR detectou que o fornecimento de *S. cerevisiae* proporcionou o aumento total de bactérias, fungos, protozoários e bactérias utilizadoras de lactato, mas reduziu a população de bactérias produtoras de lactato e degradação de amido. Aumentando o nível de inclusão de concentrado, a porcentagem para *Butyrivibrio fibrosolvens*, *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminobacter amylophilus* foi reduzida, enquanto para *Lactobacillus* aumentou. Contudo, a inclusão de levedura resultou em aumento da população de fungos e protozoários ruminais em comparação ao controle, além da redução em porcentagem para *R. amylophilus* e aumento para *S. ruminantium*.

Weimer et al. (2008) relataram que, por meio de uma quantificação relativa (qPCR), a monensina reduziu a abundância relativa de várias espécies bacterianas, incluindo a *B. fibrosolvens* e *Megasphaera elsdenii*.

3 OBJETIVO E HIPÓTESE GERAL

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar as mudanças na população bacteriana ruminal em bovinos de corte, ocasionadas pelo aumento de concentrado na dieta, utilização de diferentes fontes de Carboidrato não Fibroso (CNF) e volumoso com diferente digestibilidade da fibra, determinando a quantidade relativa de bactérias amilolíticas, celulolíticas e fermentadoras de ácido lático, por meio da técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (qPCR).

A hipótese do presente estudo seria que a modulação do desempenho animal pela dieta poderia ser explicada pela modulação da população de microrganismos ruminais.

REFERÊNCIAS

- 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**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 111-150.
- BELANCHE, A.; FUENTE, G.; PINLOCHE, E.; NEWBOLD, C. J.; BALCELLS, J. Effect of diet and absence of protozoa on the rumen microbial community and on the representativeness of bacterial fractions used in the determination of microbial protein synthesis. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 3924-3936, 2012.
- BOOTS, B.; LILLIS, L.; CLIPSON, N.; PETRIE, K.; KENNY, D. A.; BOLAND, T. M.; DOYLE, E. Responses of anaerobic rumen fungal diversity (phylum Neocallimastigomycota) to changes in bovine diet. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 626-635, 2012.
- BRULC, J. M.; ANTONOPOULOS, D. A.; BERG MILLER, M. E.; WILSON, M. K.; YANNARELL, C. A.; DINSDALE, A. E.; EDWARDS, E. R.; FRANK, E. D.; EMERSON, B. J.; WACKLIN, P.; COUTINHO, M. P.; HENRISSAT, B.; NELSON, E. K.; WHITE, A. B. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1948–1953, 2009.
- BRYANT, M. P. Bacterial species of the rumen. **Bacteriological Reviews**, v. 23, p. 125–153, 1959.
- CHENG, K.; FAY, J. P.; HOWARTH, R. E.; COSTERTON, J. W. Sequence events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, p. 613–625, 1980.
- DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 58, p. 572–582, 2006.
- DILorenzo, N. **Effects of feeding polyclonal antibody preparations against rumen starch and lactic-fermenting bacteria on target bacteria populations and steer performance**. 2004. 101 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – University of Minnesota, Saint Paul, Minnesota, 2004.
- DING, G.; CHANG, Y.; ZHAO, L.; ZHOU, Z.; REN, L.; MENG, Q. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on alfalfa nutrient degradation characteristics and rumen microbial populations of steers fed diets with different concentrate-to-forage ratios. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, p. 24, 2014.
- FERNANDO, S. C.; PURVIS II, H. T.; NAJAR, F. Z.; SUKHARNIKOV, L. O.; KREHBIEL, C. R.; NAGARAJA, T. G.; ROE, B. A.; DESILVA, U. Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet. **Applied and Environmental Microbiology**, Oklahoma, v. 76, n. 22, p. 7482-7490, 2010.
- FORSBERG, C. W.; CHENG, K. J.; WHITE, B. A. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In: MACKIE, R. I.; WHITE, B. A. (Ed.). **Gastrointestinal microbiology**. New York: Chapman and Hall, 1997. p. 319–379.

FORSTER, R. J.; GONG, J.; TEATHER, R. M. Group-specific 16S rRNA hybridization probes for determinative and community structure studies of *Butyrivibrio fibrisolvens* in the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 1256–1260, 1997.

GOLDER, H. M.; CELI, P.; RABIEE, A. R.; HEUER, C.; BRAMLEY, E.; MILLER, S. W.; KING, R.; LEAN, I. J.. Effects of grain, fructose and histidine on ruminal pH and fermentation products during an induced subacute acidosis protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1971–1982, 2012.

GOLDER, H. M.; DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C.; CELI, P.; LEAN, I. J. Ruminal bacterial community shifts in grain-, sugar-, and histidine-challenged dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 5131–5150, 2014.

GONZÁLEZ, L. A.; MANTECA, X.; CALSAMIGLIA, S.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; FERRET, A. Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, p. 66-79, 2012.

GREENING, R. C.; SMOLENSKI, W. J.; BELL, R. L.; BARSUHN, K.; JOHNSON, M. M.; ROBINSON J. A. Effects of inoculation of *Megasphaera elsdenii* strain 407A(UC-12497) on ruminal pH and organic acids in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 518, 1991. Supplement, 1.

HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GOONEWARDENE, L. A.; WANG, Z.; DURUNNA, O. N.; MOORE, S. S.; GUAN, L. L. Impact of Feed Efficiency and Diet on Adaptive Variations in the Bacterial Community in the Rumen Fluid of Cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, Canada, v. 78, n. 4, p. 1203-1214, 2012.

HINDRICHSEN, I. K.; KREUZER, M. High methanogenic potential of sucrose compared with starch at high ruminal pH. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, p. 61, 2009.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press, 1966. p. 53.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, n. 1, p. 124-134, 2005.

KHAFIPOUR, E.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1060–1070, 2009.

KHIN OHNMAR LWIN, K. O.; HAYAKAWA, M.; BAN-TOKUDA, T.; MATSUI, H. Real-Time PCR Assays for Monitoring Anaerobic Fungal Biomass and Population Size in the Rumen. **Curr Microbiol**, v. 62, p. 1147–1151, 2011.

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

KOIKE, S.; PAN, J.; KOBAYASHI, Y.; TANAKA, K. Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1429–1435, 2003.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, p. 361–366, 2001.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: UFSM, 2002. 140 p.

KRAUSE, D. O.; NAGARAJA, T. G.; WRIGHT A. D. G.; Callaway T. R. Board-invited review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 331–341, 2013.

KRAUSE, D. O.; RUSSELL, J. B. How many ruminal bacteria are there? **Journal of Dairy Science**, v. 9, p. 1467–1475, 1996.

KUNG JR., L.; HESSION, A. O. Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 250–256, 1995.

LANA, R. P. **Nutrição e alimentação animal**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2005, 343 p.

LI, M.; PENNER, G. B.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; OBA, M.; GUAN, L. L. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. **Journal of Applied Microbiology**, Canada, v. 107, p. 1924–1934, 2009.

MCALLISTER, T. A.; GIBB, D. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; WANG, Y. Starch type, structure and ruminal digestion. In: PIONEER HI-BRED, A DUPONT BUSINEDD CONFERENCE, 2007, Jonston. **Proceedings...** Jonston, 2007. p. 30–41.

MCSWEENEY, C. S.; MACKIE, R. I.; WHITE, B. A. Transport and intracellular metabolism of major feed compounds by ruminal bacteria: the potential for metabolic manipulation. **Australian Journal of Agricultural Research**, n. 45, p. 731–756. 1994.

McSWEENEY, C. S.; DAALRYMPLE, B. P.; GOBIUS, K. S.; KENNEDY, P. M.; KRAUSE, D. O.; MACKIE, R. I.; XUE, G. P. The application of rumen biotechnology to improve the nutritive value of fibrous feedstuffs: pre- and post-ingestion. **Livestock Production Science**, v. 59, n. 3, p. 265–283, 1999.

MICHALET-DOREAU, B.; FERNANDEZ, I.; FONTY, G. A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and the cecum. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 790–796, 2002.

MIRON, J.; BEN-GHEDALIA, D.; MORRISON, M. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1294–1309, 2001.

MORGAVI, D. P.; KELLY, W. J.; JANSSEN, P. H.; ATTWOOD, G. T. Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. **Animal**, v. 7, n. 1, p. 184–201. 2013.

MOSONI, P.; DURAND, F. C.; MAILLET, C. B.; FORANO, E. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with

readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. **Applied Microbiology**, v. 103, p. 2676–2685, 2007.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-50, 1987.

NAGARAJA, T. G. Response of the gut and microbial populations to feedstuffs: the ruminant story. In: MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE, 64., 2003, St. Paul, MN. **Proceedings...** 2002. p. 64-77.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 17–38, 2007. Supplement, 1.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RTPCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 7-19, 2010.

OUWERKERK, D.; KLIEVE, A. V.; FORSTER, R. J. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 753-758, 2002.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Ruminal Fermentation. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. 5. ed. New Jersey: Englewood, Cliffs, 1993. p. 145-171.

PETRI, R. M.; FORSTER, R. J.; YANG, W.; MCKINNON, J. J.; MCALLISTER, T. A. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. **Journal of Applied Microbiology**, Canada, v. 112, p.1152-1162, 2012.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, p. 1119–1122, 2001.

RUSSELL, J. R.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 604-610, 1980.

RUSSELL, J. R.; HINO, T. Regulation of lactate production in streptococcus bovis: a spiraling effect that contributes to rumen acidose. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 7, p. 1712-1721, 1985.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 3.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; GIBB, D. J.; CREWS, D. H.; HICKMAN, D. D.; STREETER, M.; MCALLISTER, T. A. Effect of bunk management

on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 149-158, 2003.

SHINKAI, T.; KOBAYASHI, Y. Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence in situ hybridization and real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1646–1652, 2007.

SINGH, K. M.; PANDYA, P. R.; TRIPATHI A. K.; PATEL, G. R.; PARNERKAR, S.; KOTHARI, R. K.; JOSHI, C. G. Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. **Meta Gene**, v. 2, p. 191–199, 2014.

SKILLMAN, L. C.; TOOVEY, A. F.; WILLIAMS, A. J.; WRIGHT, A. D. Development and validation of a real-time PCR method to quantify rumen protozoa and examination of variability between entodinium populations in sheep offered a hay-based diet. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 200–206, 2006.

SUNG, H. G.; KOBAYASHI, Y.; CHANG, J.; HA, A.; HWANG, H.; HA, J. K. Low ruminal pH reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 20, p. 200–207, 2007.

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, p. 2766–2774, 2001.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 151-182.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminants**. 2. ed. London: Constock Publishing Associates, USA, 1994. 476 p.

VIEIRA, D. P. **Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações**. Disponível em: <<http://www.fea.br/>>. Acesso em: 25 set. 2014.

WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A. Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo. **Current Microbiology**, v. 58, p. 294–299, 2009.

WEIMER, P. J. Effects of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose fed continuous culture. **Archives of Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 288-294, 1993.

WEIMER, P. J. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1496-1502, 1996.

WEIMER, P. J. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3114–3122, 1998.

WEIMER, P. J.; STEVENSON D. M.; MERTENS D. R.; THOMAS E. E. Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 135–145, 2008.

YU, Z.; MORRISON, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. **BioTechniques**, v. 36, p. 808-812, 2004.

4 EXPERIMENTO 1 – “Avaliação da microbiota ruminal em dietas a base de silagem de cana-de-açúcar com diferentes fontes de carboidratos não fibrosos”

4.1 INTRODUÇÃO

A fase de terminação de bovinos de corte em confinamento é parte importante do processo de intensificação de pecuária de corte brasileira, uma vez que permite maior lotação das pastagens no período de verão. Durante a terminação, os gastos com alimentação representam de 70 a 80% do custo total (PACHECO et al., 2006) e, portanto, o confinador busca a maior eficiência do uso de alimentos que leve ao menor custo de ganho de peso.

Dietas modernas de terminação contém entre 2,7 a 3,45 Mcal de energia metabolizável (EM)/kg de MS (KREHBIEL et al., 2006), sendo o milho e sorgo as principais fontes de energia utilizadas no Brasil (MILLEN et al., 2009). O aumento da proporção de alimentos concentrados na dieta, com consequente aumento do teor de EM, resulta em maior consumo de matéria seca (CMS) e maior eficiência alimentar (EA), até certo ponto, a partir do qual o CMS é reduzido mantendo-se o mesmo consumo de energia (OWENS et al., 1995; KREHBIEL et al., 2006). A relação entre aumento da energia da dieta e EA também não é linear, mostrando que com o aumento da EM da dieta, a EA aumenta de forma quadrática (KREHBIEL et al., 2006).

Dietas com excesso de fermentação ruminal e/ou baixos teores de fibra efetiva podem levar a distúrbios metabólicos prejudiciais, tais como acidose ruminal, ruminites, abscessos hepáticos e broncopneumonias (KRAUSE; OETZEL, 2006). Os abscessos hepáticos reduzem em até 11% o ganho de peso diário e em até 9,7% a EA (NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007). Em levantamento retrospectivo realizado entre os anos de 2002 e 2006, VECHIATO (2009) relata ocorrência de ruminite em 11,9% dos animais oriundos de confinamentos e ocorrência de abscesso hepático em 3,3% dos bovinos. A acidose sub-clínica, caracterizada por pH ruminal abaixo de 5,6 (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007), ocorre devido ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e resulta em queda no consumo de MS e de EM.

Carboidratos não fibrosos (CNF - açúcares, amido e pectina) provêm a maior parte da energia para o crescimento de animais na fase de terminação em confinamento, sendo que o excesso de fermentação ruminal de CNF pode levar a acidose ruminal, redução na

digestibilidade da fibra, queda no consumo e, conseqüentemente, redução no ganho de peso dos animais (GONZÁLEZ et al., 2012). O poder acidogênico de uma dieta depende, dentre outros, do conteúdo de CNF e de sua taxa de degradação ruminal, variando conforme a fonte e o processamento dos CNF. Sabe-se que a polpa cítrica, rica em pectina, apesar de ser rapidamente degradável no rúmen, apresenta menor efeito acidogênico ruminal do que o milho (NOCEK; TAMMINGA, 1991). Assim sendo, a formulação de dietas deve levar em conta não somente a quantidade de grãos, mas também a fonte, método de processamento, concentração de fibra e tamanho de partículas da dieta, além do uso de aditivos. O desejável é aumentar a extensão de digestão dos alimentos, sem aumentar o risco de acidose ruminal e sem causar redução no consumo (OWENS et al., 1997).

Como a cana-de-açúcar apresenta características diferentes (elevado teor de açúcares solúveis, fibra de alta retenção ruminal) dos demais volumosos comumente utilizados em experimentos de nutrição de ruminantes, como a silagem de milho, silagem de alfafa e feno de gramíneas, o efeito da suplementação com fontes de CNF sobre a acidose ruminal e consumo de MS precisa ser redefinido. Simas et al. (2008) forneceram diferentes fontes de amido (milho grosseiramente moído, milho finamente moído, milho floculado em duas densidades, ou raspa de mandioca) à vacas em lactação em dietas com 40% de cana-de-açúcar picada fresca e 60% de concentrado e não observaram efeito dos tratamentos sobre o consumo de MS, mesmo nos tratamentos com maior digestibilidade ruminal do amido.

Poucos trabalhos avaliaram diferentes fontes de carboidratos solúveis em dietas tendo a cana-de-açúcar, *in natura* ou em silagem, como fonte de volumoso (PEREIRA et al., 2007; SIMAS et al., 2008), sendo fundamental o entendimento dos efeitos de diferentes fontes energéticas sobre o metabolismo ruminal e desempenho animal. A elucidação dos mecanismos pelos quais o excesso de fermentação ruminal de CNF leva a queda da digestibilidade da fibra e a acidose ruminal, bem como das principais populações afetadas, auxiliará no desenvolvimento de técnicas para manutenção da função ruminal, como uso de probióticos, processamento do amido, ionóforos e vacina contra microrganismos ruminais indesejados. Ainda, os resultados deste experimento auxiliarão na formulação de dietas para animais de alto desempenho, tendo como volumosos a silagem de cana-de-açúcar.

Assim, pretende-se com este estudo quantificar o efeito do fornecimento de diferentes fontes de CNF sobre a população de microrganismos ruminais de bovinos de corte da raça Nelore.

4.2 OBJETIVOS E HIPÓTESES

O objetivo do presente estudo foi caracterizar as mudanças na população bacteriana ruminal ocasionadas pelo aumento de concentrado na dieta e pela utilização de fontes diferentes de CNF, determinando a quantidade relativa de bactérias amilolíticas, celulolíticas e fermentadoras de ácido láctico.

Espera-se que o uso da polpa cítrica leve a um aumento do pH ruminal, favorecendo o crescimento de bactérias celulolíticas em detrimento de amilolíticas, especialmente na dieta com 80% de concentrado. Já em relação ao milho floculado, que apresenta maior digestibilidade do amido, espera-se maior população total de bactérias ruminais, levando à maior produção de proteína microbiana. Entretanto, a maior digestibilidade ruminal do amido do milho floculado pode levar à queda do pH ruminal. Porém, devido à alta efetividade da fibra da cana-de-açúcar, é possível que o rúmen permaneça tamponado o suficiente para que não ocorra queda no consumo de MS. A maior proliferação de bactérias utilizadoras do ácido láctico (*Megasphaera elsdenii*) na dieta com milho floculado também é esperada, e poderia prevenir a queda do pH ruminal.

Além disso, espera-se que o aumento da inclusão de concentrado na dieta resulte em aumento da população de bactérias amilolíticas (*R. amylophilus* e *S. bovis*) e da consumidora de lactato (*M. elsdenii*), ao passo que ocorra a redução das bactérias celulolíticas.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Local e animais

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte (LPGC) do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VNP/FMVZ/USP), localizado em Pirassununga, SP. O experimento foi realizado no confinamento do LPGC, sendo utilizadas três baias de 27 m² cada uma, com piso de concreto. As baias eram providas de comedouros e bebedouros

individuais. Para manter um ambiente adequado aos animais, o piso, o comedouro e o bebedouro foram limpos diariamente.

Foram utilizados seis animais da raça Nelore, castrados, com peso aproximado de 350 kg, 20 meses de idade e canulados no rúmen. Os animais foram confinados por seis períodos de 10 dias de adaptação e quatro dias para coleta de amostras e medição de variáveis. O delineamento experimental foi de dois quadrados latinos 6x6 não contemporâneos (CÔNSOLO et al., 2012), com arranjo fatorial de tratamentos 3x2, com três níveis do fator tipo de CNF, e dois níveis do teor de concentrado na dieta, totalizando 6 tratamentos.

As dietas experimentais foram formuladas com dois níveis de concentrado: 60% ou 80%, sendo que o volumoso utilizado foi silagem de cana-de-açúcar (variedade IACSP 93-3046). Dentro de cada nível de inclusão de concentrado, foram utilizados três fontes de CNF: milho floculado a vapor (MFV), polpa cítrica peletizada (PCP), ou milho moído (MM). MFV e PCP foram incluídas na dieta em substituição parcial de 70% do MM.

4.3.2 Dietas experimentais

Após 14 dias de adaptação às instalações, os animais receberam seis dietas experimentais, formuladas com base na composição em matéria seca, formuladas com base nas exigências de bovinos de corte sugeridas pelo NRC *software* – Nutrient Requirements of Beef Cattle (1996) para DOS®, utilizando-se dois níveis de concentrado na dieta: 60% ou 80%, respectivamente (Tabela 1). A silagem de cana-de-açúcar foi confeccionada a partir da colheita e ensilagem de 2 ha da variedade IACSP 93-3046, utilizando-se inoculante bacteriano LALSIL Cana (Katec-Lallemand) e colhedora de silagem Premium Flex FM2-90 (Menta Mit, Cajuru, SP).

O milho floculado utilizado (SL Alimentos, Londrina, PR) permaneceu a 100°C e 17% de umidade por 30 minutos, sendo então laminado em cilindros regulados para espessura final de 1,0 mm. Após a floculação, os flocos de milho foram secos em temperatura de 100 a 200°C e resfriados, ficando a umidade final reduzida à 13%. A dieta foi fornecida à vontade, duas vezes por dia, mantendo de 5-10% de sobras, e as sobras foram pesadas diariamente. O controle da alimentação foi feito individualmente, por meio da pesagem diária do alimento fornecido e das sobras, permitindo uma sobra de 10%. As sobras foram descartadas e não reutilizadas na alimentação do dia seguinte. Cada período experimental teve duração de 14

dias, sendo 10 de adaptação à dieta e quatro de coleta de amostras da dieta, determinação do consumo, da cinética ruminal e coleta de fluido ruminal (CÔNSOLO et al., 2012).

Tabela 1- Composição das dietas experimentais (% da MS)

Ingredientes	Nível de Concentrado na Dieta					
	60%			80%		
	Milho	Floculado	Polpa	Milho	Floculado	Polpa
Silagem de cana-de-açúcar	40	40	40	20	20	20
Milho moído	52	15,5	15,5	72	21,5	21,5
Milho floculado	-	36,5	-	-	50,5	-
Polpa cítrica	-	-	36,5	-	-	50,4
Farelo de soja	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Uréia	1,0	1,0	1,2	0,8	0,8	1,4
Calcário	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	-
Sal mineral comercial	1,5	1,5	1,5	1,7	1,7	1,7
Ganho diário estimado (kg/d)	1,0	1,1	1,0	1,4	1,5	1,3

Fonte: NRC (1996).

4.3.3 Coleta de líquido ruminal

O conteúdo ruminal foi evacuado manualmente através da cânula ruminal nos animais em jejum (0 horas após a alimentação), e 4 horas após alimentação. A massa total do conteúdo ruminal e volume foram determinados. Durante a evacuação, uma alíquota de 10% da digesta foi separada para facilidade de sub-amostragem. Uma alíquota de 600g foi retirada para determinação da MS e composição bromatológica. Uma segunda amostra foi filtrada através de uma membrana de náilon (1 mm de tamanho de poro) para separar as fases sólidas e líquidas. Amostras foram retiradas de ambas as fases para determinação do tamanho do compartimento ruminal (pool) de componentes da digesta. Uma amostra de 600 mL representativa da fase líquida e sólida (proporcionalmente) foi utilizada para determinação posterior da população bacteriana. Tais amostras foram armazenadas adequadamente em

freezer -20°C, onde a fase líquida foi armazenada em tubos Falcon (50mL), e a fração sólida embrulhada em papel alumínio, devidamente identificados para cada animal.

4.3.4 Processamento das amostras de conteúdo ruminal

Para o processamento das amostras, foi preparada uma solução tampão ruminal (para cada coleta, utiliza-se em média 1,2L de tampão). Em um liquidificador, gelo foi batido com um pouco de água destilada, e em seguida foi adicionado a fase sólida com 75 mL de solução tampão para líquido ruminal gelada e foi homogeneizado por dois minutos. O liquidificador foi lavado com 25 mL de solução tampão para líquido ruminal. Em seguida, este material foi filtrado, transferindo este filtrado para dois tubos Falcon (50 mL) devidamente identificados. Posteriormente, estes tubos foram centrifugados a 500 *xg* por 15 min a 4°C, e foi filtrado o sobrenadante com auxílio de lã de vidro, juntamente com a fase líquida. Em seguida, foi realizada uma centrifugação deste material a 10.000 *xg* por 30 min a 4°C. Após este procedimento, o sobrenadante foi descartado, ressuspensando o sedimento microbiano em 700 µL de solução tampão. Por fim, este material foi armazenado em freezer a -80°C até a extração de DNA.

4.3.5 Análises laboratoriais – quantificação relativa de bactérias ruminais

Três microrganismos ruminais importantes para a degradação da celulose (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*), dois microrganismos importantes na degradação de amido e na produção de ácido lático (*Streptococcus bovis* e *Ruminobacter amylophilus*) e um microrganismo utilizador de lactato e produtor de ácido propiônico (*Megasphaera elsdenii*) foram quantificados por PCR em tempo real (qPCR) para determinação do efeito da mudança do ambiente ruminal sobre a população de microrganismos. As análises foram realizadas no Laboratório de Genômica Funcional, do Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte (LPGC), coordenado pelo Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva.

O DNA extraído, a partir das amostras de conteúdo ruminal previamente processadas, foi utilizado como molde para a reação de qPCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para as bactérias ruminais desejadas, juntamente com oligonucleotídeo universal, *Eubacteria universal* (Tabela 2). Dessa forma, foi realizada uma quantificação relativa destas bactérias em relação ao total de bactérias presentes na amostra de conteúdo ruminal.

Tabela 2 -Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste projeto.

Espécie de bactéria	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Anelamento tamanho produto
<i>F.succinogenes</i> ¹	GGTATGGGATGAGCTTGC	GCCTGCCCCTGAACTATC	60°C/445 pb
<i>R.albus</i> ²	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG	CCTCCTTGCGGTTAGAACA	55°C/175 pb
<i>R.flavefaciens</i> ³	TCTGGAAACGGATGGTA	CCTTTAAGACAGGAGTTTACA	60°C/295 pb
<i>S.bovis</i> ⁴	CTAATACCGCATAACAGCAT	AGAAACTTCCTATCTCTAGG	57°C/127 pb
<i>R.amylophilus</i> ¹	CAACCAGTCGCATTGAGA	CACTACTCATGGCAACAT	57°C/642 pb
<i>M.elsdenii</i> ⁵	GACCGAAACTGCGATGCTAGA	CGCCTCAGCGTCAGTTGTC	55°C/129 pb
<i>Eubacteria</i> ⁶	CCTACGGGAGGCAGCAG	ATTACCGCGGCTGCTGG	58°C/193 pb

Fonte: ¹Tajima et al. (2001); ²Wang et al. (1997); ³Koike e Kobaishi (2001); ⁴Stevenson e Weimer (2007); ⁵Ouwerkerk et al. (2002); ⁶Muyzer et al. (1993).

4.3.6 Extração de DNA

Foi realizada a extração de DNA das amostras de conteúdo ruminal, utilizando o kit comercial QIAmp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®), seguindo as recomendações do fabricante. Para a extração foram utilizados 200µL de amostra de conteúdo ruminal.

O procedimento de extração de ácido nucléico compreende uma sequência de etapas: a primeira consiste na lise de células bacterianas, utilizando tampão adequado para lise sob incubação; em seguida, tem-se a retirada de impurezas ou substâncias inibidoras da reação de qPCR; posteriormente, tem-se a digestão de proteínas por meio de incubação com proteinase; em seguida, vem uma etapa importante da extração, que se trata da filtragem e lavagens do material extraído, através de uma coluna contendo uma membrana em seu interior. Condições tamponantes são, então, ajustadas para permitir uma ligação adequada do DNA com esta membrana, garantindo que restos de proteínas degradadas e outras impurezas, que podem porventura inibir a reação de qPCR, não fiquem retidas na membrana. Dessa forma, o DNA

retido na membrana é lavado com tampões de lavagem adequados, garantindo a remoção de impurezas. Por fim, o DNA purificado é eluído da membrana, em um volume total de 200µL.

Finalizada a etapa de extração, foi adicionado ao material extraído 20µL de acetato e 440µL de etanol para posterior precipitação. Posteriormente, o material foi armazenado em freezer a temperatura de -20°C.

4.3.7 Análise quantitativa e qualitativa do produto extraído

Após a extração de DNA, foi realizada a precipitação do material. Para tanto, o material foi centrifugado a 20.000 xg por 35 minutos (a 4°C). Em seguida, o conteúdo foi descartado cuidadosamente, e foi adicionado ao tubo 500µL de etanol 75%. Este tubo foi homogeneizado, seguido por uma centrifugação a 7500 xg por 5 minutos. Em sequência, o conteúdo foi descartado novamente, e os tubos mantidos invertidos por 15 minutos, para secar à temperatura ambiente. Terminada esta etapa, foram adicionados aos tubos 40µL de Tampão Tris-EDTA (TE), homogeneizados, e transferidos para banho-maria a 55°C por 10 minutos (YU; MORRISON, 2004). Em seguida, estes tubos foram mantidos em gelo por 5 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro (Nanodrop 2000 – Thermo Scientific®), com o intuito de se averiguar a qualidade do DNA extraído, assim como a quantificação de ácido nucleico presente nas amostras analisadas. Para o estudo em questão, o DNA utilizado nas análises apresentou a razão A260/A280 maior que 1,8.

4.3.8 Preparação dos tubos para qPCR – diluição das amostras

Após a análise quantitativa e qualitativa do material extraído por espectrofotômetro, realizou-se a diluição das amostras de DNA, com o intuito de deixá-las na mesma concentração de ácido nucleico, possibilitando desta forma a análise comparativa entre elas. Para tanto, realizou-se um cálculo, tendo como base a amostra cujo valor de ácido nucleico verificado foi o menor, obtendo um fator de diluição, o qual foi utilizado em todas as amostras submetidas à análise.

Foi retirado o volume de 5µl de cada amostra e transferido para um único microtubo, com o intuito de formar o *pool* de todas as amostras de DNA para avaliar a eficiência de anelamento dos *primers* ou oligonucleotídeos iniciadores específicos, tanto o *Reverse* quanto o *Forward*, no procedimento de qPCR. Com este *pool*, foi realizada uma diluição seriada, a fim de montar uma curva de diluição, e assim avaliar a eficiência da reação de amplificação. Para tanto, tem-se o *pool* puro (padrão com concentração 1000), e fez-se um cálculo para diluí-lo à 600, 300, 150, 50 e 25.

Com a curva pronta, a próxima etapa foi a preparação da placa de PCR. Além destas diluições, o *pool* puro foi utilizado na montagem da placa de PCR (diluição 1000), além de um negativo. Na tabela 3, estão descritos os componentes para reação de qPCR, sendo que o volume final da reação foi 20µL. Vale ressaltar que todas as análises foram feitas em duplicata na placa de PCR, além do fato de que cada placa apresentava um negativo para controle da amplificação.

Tabela 3 - Composição de cada tubo de PCR utilizado na análise de qPCR

Descrição	Quantidade (µl)
Master Mix (SYBR™ Green)	10,0
<i>Primer Forward</i>	1,2
<i>Primer Reverse</i>	1,2
Água MiliQ	6,6
Amostra (Curva)	1,0
TOTAL	20

A tecnologia utilizada foi *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems® - Life Technologies do Brasil), que é composto pelo corante *SYBR Green*, cloreto de magnésio (MgCl₂, com a função de coativador, indispensável para ativação da enzima *Taq*), tampão, DNTP (Nucleotídeos: ATP, TTP, CTP, GTP) e *AmpliTaQ Gold® DNA polymerase* (enzima *Taq* polimerase). Os fluoróforos presentes no SYBR Green se ligam em toda a dupla fita de DNA formada, emitindo fluorescência. Durante a desnaturação da dupla fita, a fluorescência é drasticamente reduzida. Porém, durante a extensão das novas fitas por ação da enzima polimerase, os fluoróforos se ligam às duplas fitas em formação, resultando na emissão de fluorescência.

Após a preparação, os tubos foram centrifugados (1300 RPM por 2 minutos) para remoção de gotículas de material aderido à parede. Em seguida, os tubos foram transferidos para o equipamento 7500 Real-Time PCR System ® (Applied Biosystems® - Life Technologies do Brasil), para análise das amostras.

Para tanto, o protocolo de termociclagem para todos os pares de *primers*, específicos para cada bactéria de interesse, consistia em uma etapa inicial de 10min a 95°C, seguida por 44 ciclos, cada um contendo três etapas: 95°C por 15 segundos; 55 a 60°C por 30 segundos, dependendo da temperatura de anelamento para cada bactéria, apresentado na tabela 2, e por fim, 72°C por 30 segundos, sendo que a única exceção foi a *R. amylophilus*, onde esta etapa foi padronizada com 72°C por 1 minuto. Ao final do processo, é possível analisar os resultados por meio de gráficos de amplificação, gerados pelo equipamento.

Analisando a figura 3, é possível observar a curva padrão para a bactéria *Megasphaera elsdenii*, representando uma curva de diluição com o intuito de se avaliar a eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores. No momento em que a amostra é diluída, a concentração de ácido nucleico é reduzida, desta forma quanto maior a diluição utilizada, mais tarde o material será amplificado, ou seja, maiores são as quantidades de ciclos para amplificar o material. Isso justifica as diferentes curvas de amplificação que ocorreram na figura em questão para os genes de interesse. Além desta curva de amplificação, o aparelho nos fornece o dado de eficiência de amplificação dos *primers*, pela análise da *Standard Curve*, conforme a figura 3.

Figura 3 - Curva padrão e Standard curve (curva padrão) para a bactéria *M. elsdenii*, realizada com diferentes diluições utilizadas como molde da reação de qPCR

Fonte: Souza, J. M. (2015)

Por meio desta curva, é possível avaliar a eficiência de amplificação dos *primers* a serem utilizados nas reações de qPCR. Analisando os dados de amplificação, ajustamos a curva padrão para se obter a melhor eficiência e, conseqüentemente, possibilitando a escolha da melhor diluição para a quantificação relativa de todas as amostras para todas as bactérias de interesse.

Dessa forma, para cada bactéria foi escolhida a diluição adequada para as amostras. Geralmente, a escolha se baseia no intervalo de ciclos, que deve estar entre 15 a 30 ciclos, indicando uma boa eficiência de amplificação. A diluição escolhida no presente estudo foi a de 300. Desta forma, todas as amostras referentes à este projeto foram diluídas individualmente à esta concentração.

4.3.9 Quantificação relativa das bactérias de interesse

Com a diluição adequada realizada, a próxima etapa foi análise em qPCR de todas as amostras extraídas para cada bactéria de interesse. Vale ressaltar que os reagentes utilizados são os mesmos apresentados anteriormente para a curva de diluição (Tabela 4).

Ao final do processo, foram analisados os resultados por meio de curvas de amplificação gerados pelo equipamento, sendo que um exemplo pode ser observado na figura 4.

Figura 4 - Representação gráfica da curva de amplificação para a bactéria *M. elsdenii*, a partir de uma quantificação relativa pela técnica de qPCR

Fonte: Souza, J.M. (2015)

Observa-se na figura 4 que, ao final da reação de qPCR, o *threshold* foi ajustado para ambos os *primers* utilizados, cuja definição consiste no limiar de detecção, ou seja, indica o número mínimo de ciclos para a amplificação. Dessa forma, o ponto *threshold* cruza a curva de amplificação, permitindo assim determinar o número de ciclos necessários para o início da amplificação, denominado de Ct (*Cycle Threshold*).

O Ct é proporcional ao logaritmo da quantidade inicial da bactéria alvo em uma determinada amostra. Assim, quanto menor for o número inicial do Ct obtido da bactéria alvo existente na amostra, comparativamente com o *Eubacter*, indica que a amostra em questão apresenta maior quantidade de cópias do gene da bactéria alvo. Ao fim da reação de qPCR, fez-se a diferença dos valores de Ct obtidos entre o *Eubacter* e a bactéria alvo, gerando o dCT para cada amostra. Outro resultado importante diz respeito à *Melt Curve* (curva de dissociação), que pode ser observado na figura 5, demonstrando a especificidade do material amplificado.

Figura 5 - Curva Melt para *Eubacter* (A) e *M. elsdenii* (B), demonstrando a especificidade do material amplificado

Fonte: Souza, J.M. (2015)

Após a reação de qPCR, a análise dos fragmentos de DNA bacteriano foi realizada por eletroforese convencional em gel de agarose a 2%, com auxílio de um *ladder* de 100pb, para avaliar a especificidade da reação. Na figura 6, é possível observar os produtos de qPCR em gel de agarose, comprovando a especificidade da reação de qPCR para cada bactéria do presente estudo.

Figura 6 – Produtos de qPCR em gel de agarose 2% das bactérias ruminais quantificadas. Coluna 1, *F. succinogenes*, 445pb; 2, *R. albus*, 175pb; 3, *R. flavefaciens*, 295pb; 4, *S. bovis*, 127pb; 5, *R. amylophilus*, 642pb; 6, *M. elsdenii*, 129pb; 7, *Eubacteria universal*, 193pb

Fonte: Souza, J. M. (2015)

4.3.10 Análise estatística

Os dados foram analisados em um delineamento em Quadrado Latino utilizando-se o procedimento MIXED do SAS versão 9.2, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Levene. O modelo contemplou como causas de variação o efeito de tratamento e suas interações como fatores fixos, assim como o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diferentes momentos de coleta. Como fatores aleatórios incluídos no modelo têm-se efeito de quadrado, animal e período dentro de quadrado. Os graus de liberdade e testes foram ajustados usando a opção Kenward-Roger. Significância foi declarada à $P \leq 0,05$.

4.4 RESULTADOS

Os resultados referentes ao ecossistema ruminal foram analisados quanto ao nível de concentrado (60 ou 80%) e quanto aos tipos CNF (milho, polpa cítrica e milho floculado), assim como a interação entre os fatores descritos. Sendo assim, tais resultados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – População relativa de microrganismos ruminais em relação ao controle, em função do nível de concentrado e de diferentes tipos de carboidratos não fibrosos.

	Tratamentos							Valor de p^3		
	60% ¹			80% ¹			EPM ²			
	MM	MFV	PCP	MM	MFV	PCP		CON ⁴	CNF ⁵	C*C ⁶
<i>F.succinogenes</i>	1,00	0,86	1,31	0,18	0,22	0,21	1,0309	< 0,01	0,87	0,84
<i>R. albus</i>	1,00	0,12	0,99	0,93	0,23	0,31	0,7249	0,63	0,01	0,22
<i>R. flavefaciens</i>	1,00	0,66	0,41	2,41	0,97	0,64	0,6187	0,05	0,01	0,71
<i>S. bovis</i>	1,00	0,62	1,60	0,38	0,35	0,46	0,4306	<0,01	0,01	0,20
<i>R. amylophilus</i>	1,00	0,81	0,11	4,91	0,52	0,22	0,9287	0,30	<0,01	0,37
<i>M. elsdenii</i>	1,00	0,99	0,81	1,46	14,68	0,63	0,9613	0,04	0,01	0,02

Notas: ¹ níveis de concentrado na dieta; MM=milho moído; MFV=milho floculado a vapor; PCP=polpa cítrica peletizada; ² Erro padrão da média. ³ significância declarada a 5%. ⁴ efeito do nível de concentrado. ⁵ efeito do tipo de CNF. ⁶ efeito da interação CON vs. CNF. Valores proporcionais ao tratamento com 60% de concentrado contendo MM, considerado como referência.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 4, observa-se que o aumento de concentrado na dieta resultou em queda da população de *F. succinogenes* ($P<0,01$) e *S. bovis* ($P<0,01$), ao passo que a população de *R. flavefaciens* ($P=0,05$) aumentou nestas condições, sem alterar a população de *R. albus* ($P=0,63$) e *R. amylophilus* ($P=0,30$).

A substituição parcial do MM por PCP resultou em aumento da população de *S. bovis* ($P=0,01$) e redução de *R. flavefaciens* ($P<0,01$) e *R. amylophilus* ($P<0,01$). Já a substituição do MM por MFV reduziu *R. albus* ($P<0,01$), sem alterar a população de *R. amylophilus* ($P>0,05$).

Observa-se também que houve uma interação entre o nível de concentrado na dieta e o tipo de CNF apenas para a *M. elsdenii* ($P=0,02$), onde o MFV aumentou a população de *M. elsdenii* apenas na dieta com 80% de concentrado (Figura 7).

Figura 7 - População relativa de *M. elsdenii*, em função dos tipos de CNF e níveis de concentrado, normalizada para a dieta com 60% de concentrado contendo MM

Com relação ao tempo de coleta de conteúdo ruminal, foi observado efeito apenas para *F. succinogenes* ($P < 0,01$), sendo que sua população relativa reduziu no tempo pós alimentação (Figura 8).

Figura 8 - População relativa de *F. succinogenes* em função do tempo de coleta do conteúdo ruminal

Importante ressaltar que houve efeito de interação entre a fonte de CNF e o tempo de coleta de conteúdo ruminal para a bactéria *R. amylophilus* ($P=0,04$), em que a dieta com MM resultou em um aumento expressivo da população de *R. amylophilus* no Pós, ao passo que na dieta com MFV houve uma redução da população desta bactéria no tempo pós (Figura 9).

Também foi observado efeito de interação significativa entre a fonte de CNF e o tempo de coleta de conteúdo ruminal para *M. elsdenii* ($P=0,04$), como pode ser observado na figura 10, sendo que o efeito de CNF ocorreu apenas na coleta Pós alimentação, onde a população deste microrganismo foi maior na dieta com MFV, diferindo significativamente das demais fontes de CNF em ambos os tempos de coleta.

Figura 9 - População relativa de *R. amylophilus*, em função dos tipos de CNF e do tempo de coleta, normalizada para a dieta contendo MM no tempo de coleta Pré alimentação

Figura 10 - População relativa de *M. elsdenii*, em função dos tipos de CNF e do tempo de coleta, normalizada para a dieta contendo MM no tempo de coleta Pré alimentação

4.5 DISCUSSÃO

4.5.1 Efeito do nível de concentrado sobre a população das bactérias ruminais

A composição da dieta é um dos principais fatores que afetam a composição da microbiota ruminal, sendo que as bactérias fibrolíticas são sensíveis à mudança brusca de dieta, particularmente com relação ao nível de inclusão de concentrado (KOIKE et al., 2003; MOSONI et al., 2007). Com o aumento da concentração de carboidratos fermentáveis no rúmen, o crescimento microbiano é estimulado, resultando no aumento da taxa de fermentação ruminal. Entretanto, este aumento de concentrado na dieta resulta na queda do pH ruminal, devido a maior produção de AGCC, reduzindo a atividade das bactérias fibrolíticas e, conseqüentemente, prejudicando desta forma a digestibilidade da fibra (TAJIMA et al., 2001; NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). No presente estudo, o aumento da inclusão de concentrado na dieta reduziu a população da bactéria fibrolítica *Fibrobacter succinogenes*. Entretanto, o aumento de concentrado na dieta aumentou a população de *R.*

flavefaciens no presente estudo. Singh et al. (2014) relataram maior população de *R. flavefaciens* na dieta com relação volumoso:concentrado de 75:25 em comparação à 100:00.

Esta redução da população de bactérias celulolíticas em resposta ao aumento do nível de inclusão de concentrado na dieta é consistente com dados reportados em vários trabalhos científicos. Petri et al. (2012) observaram que em dietas com alto concentrado, em substituição ao volumoso, a população de bactérias fibrolíticas, tais como a *F. succinogenes*, foi menor, quando comparado à dietas com alto concentrado e inclusão de forragem. Da mesma forma, Wanapat e Cherdthong (2009) relataram que a população de três bactérias celulolíticas avaliadas em seu estudo foi reduzida em resposta ao aumento de concentrado na dieta. Tajima et al. (2001) relataram que a prevalência da *F. succinogenes* em animais recebendo feno caiu 20 vezes no terceiro dia da mudança para uma dieta de alto concentrado, seguida por uma nova diminuição, com 28 dias, apresentando uma redução de 57 vezes no tamanho da população.

Fernando et al. (2010) observaram que a prevalência das bactérias *Ruminococcus albus* e *Fibrobacter succinogenes* reduziu gradativamente em animais adaptados à dieta de alto concentrado, e seu número foi até 40 vezes menor que em animais recebendo feno. Singh et al. (2014) observaram que alterando a porcentagem de volumoso de 75% para 25% promoveu uma redução na população das bactérias celulolíticas, de $2,22 \times 10^8$ para $1,70 \times 10^8$ cópias/mL para *R. flavefaciens*, $1,11 \times 10^8$ para $1,33 \times 10^6$ cópias/mL para *F. succinogenes* no fluido ruminal, respectivamente, demonstrando que possivelmente as condições dietéticas podem ter proporcionado a redução no número de bactérias celulolíticas.

Neste sentido, as características do rúmen como câmara de fermentação, em consequência das condições alimentares, podem influenciar no desenvolvimento dos microrganismos ruminais. O pH ruminal, juntamente com a natureza do substrato, fatores ambientais como temperatura e a existência de cátions e carboidratos solúveis são alguns fatores que afetam a aderência das bactérias celulolíticas ao substrato (MIRON et al., 2001). Dentre estes fatores, o pH ruminal é um dos mais importantes, pelo fato das bactérias celulolíticas serem muito sensíveis à variação de pH (SUNG et al., 2007). As principais bactérias celulolíticas, como *F. succinogenes*, *R. albus* e *R. flavefaciens*, importantes na degradação da fibra, são sensíveis à baixos valores de pH. Estudos anteriores com microbiologia ruminal demonstram que as bactérias fibrolíticas tem predileção de crescimento em uma faixa de pH ruminal em torno de 6,2 (RUSSELL; DOMBROWSKI, 1980; WEIMER, 1993).

Aumentando o nível de inclusão de concentrado, mais açúcares, amido e outros CNF são consumidos, que por sua vez contribuem para maior produção de AGCC, inclusive de ácido lático. Essa maior concentração destes ácidos oriundos da fermentação no rúmen contribuem para queda de pH e, conseqüentemente, proporciona a redução da quantidade e atividade das bactérias celulolíticas. Golder et al. (2012) descreve que o fornecimento de uma dieta com grãos resultou em queda de pH ruminal e aumento nas concentrações de AGCC (acetato, propionato, butirato) quando comparado ao tratamento controle sem inclusão de grãos.

Ao contrários dos microrganismos fibrolíticos, as bactérias amilolíticas apresentam predileção por alimentos ricos em carboidratos, e assim, são mais tolerantes à queda de pH. O aumento de concentrado na dieta resulta em maior disponibilidade de carboidratos não fibrosos, como açúcares e amido, permitindo que bactérias amilolíticas (por exemplo, *Ruminococcus amylophilus*, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus spp.*) se proliferem, produzindo, conseqüentemente, quantidades excessivas de AGCC oriundos da fermentação (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003). Entretanto, no presente estudo, a população de *S. bovis* reduziu em resposta ao aumento de concentrado.

É importante ressaltar que o volumoso utilizado no presente projeto foi silagem de cana, que por sua vez apresenta elevado teor de carboidratos solúveis (açúcares) em sua composição. Dessa forma, justifica-se a maior população de *S. bovis* na dieta com 60% de concentrado, pelo fato da maior disponibilidade de CNF prontamente fermentescíveis em relação à dieta com inclusão de 80% de concentrado. Além disso, outro fator que pode justificar tal resultado consiste na afinidade por parte da *S. bovis* por determinados substratos.

Em estudo realizado por Golder et al. (2014), cujo objetivo foi avaliar o efeito da combinação de grãos, frutose e histidina em novilhas de leite não-adaptadas para este desafio sobre a composição da microbiota ruminal, observaram que a *S. bovis* se tornou mais prevalente em novilhas alimentadas com frutose, indicando que esta bactéria responde rapidamente à alterações na dieta, devido à exposição brusca a fontes de carboidratos prontamente fermentescíveis, atuando nas alterações iniciais da microbiota ruminal em bovinos que não foram adaptados à este desafio. O autor cita que a frutose é mais rapidamente metabolizada quando comparado ao amido. Assim, tem-se a suposição de que a *S. bovis* pode apresentar maior afinidade pela sacarose do que pelo próprio amido, justificando a maior população deste microrganismos no tratamento com maior inclusão de silagem de cana-de-açúcar.

4.5.2 Efeito do tipo de carboidrato não fibroso sobre a população das bactérias ruminais

Outros fatores como tipo de carboidrato consumido e processamento dos ingredientes podem alterar o padrão de fermentação ruminal, modificando a composição da população microbiana ruminal.

Tanto a pectina quanto o amido são fontes primárias de carboidratos nas dietas de bovinos, mas apresentam diferença significativa quanto as características digestivas e fermentativas. A pectina é um carboidrato estrutural mas não fibroso (CNF), com alta digestibilidade, rapidamente degradada no rúmen à acetato e propionato, e desta forma a fermentação da pectina não causa acidose ou outro distúrbio metabólico que ocorre com o amido (HATFIELD; WEIMER, 1995).

A polpa cítrica, um subproduto da indústria citrícola, é rica em pectina, quase completamente digerida no rúmen (90 a 100%), fornecendo energia rapidamente disponível aos microrganismos ruminais, com teor de amido reduzido, e teor médio de fibra em detergente neutro (FDN) altamente digestível (NOCEK; TAMMINGA, 1991), podendo ser uma fonte viável para a substituição parcial ou total do milho em rações de bovinos de corte com alta proporção de concentrado.

A pectina é degradada por bactérias pectinolíticas, dentre elas tem-se a *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Lachnospira multipara* (GRADEL; DEHORITY, 1972; DUSKOVA; MAROUNEK, 2001), *Streptococcus bovis* (ZIOLECKI et al., 1972). Além destas espécies, a pectina pode ser degradada por espécies menos conhecidas, que é o caso da *Treponema saccharophilum*, que tem um papel importante na digestão deste CNF à nível ruminal (LIU et al., 2014b).

Um ponto importante é que *S. bovis* participa de fato da degradação da pectina, convertendo-a à oligogalacturonídeos insaturados (fragmentos pécticos derivados de parede celular). Entretanto, este microrganismo não utiliza este substrato para seu próprio desenvolvimento. Slováková et al. (2002) comentam que *S. bovis* recupera açúcares passíveis de utilização associados com a fração de pectina em plantas. Ainda, a falta da atividade de uma enzima em *S. bovis*, a KDPG aldolase (2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato), pode ser a justificativa da falta de utilização de pectina por este microrganismo.

Com base nestas informações, pelo fato de *S. bovis* auxiliar na degradação da pectina, em uma dieta contendo PCP poderia aumentar a população deste microrganismo, justificando

o resultado obtido no presente estudo, onde a substituição parcial do MM por PCP resultou em aumento da população de *S. bovis*. Além disso, pelo fato da fermentação da pectina ser acética, a suplementação com pectina poderia resultar em melhores condições ruminais para desenvolvimento de microrganismos celulolíticos, pelo fato de não produzir lactato como produto final da fermentação. Esta afirmação vem ao encontro com os resultados obtidos por Cônsolo et al. (2012), onde o maior valor de pH ruminal foi obtido dos animais alimentados com PCP, diferindo significativamente do MM e MFV.

Substituindo MM por PCP retiramos amido e estamos incluindo pectina, e consequentemente estamos reduzindo substrato para bactérias utilizadoras de amido. Liu et al. (2014a), ao avaliarem em diferentes inclusões de pectina ou amido à dieta de ovinos, observaram que a abundância de bactérias tipicamente amilolíticas, como *Succinovibrio dextrinosolvens*, *Ruminobacter amylophilus* e *Succinomonas amylolytica*, foram maiores quando o amido foi suplementado. Isso explica o fato de que a substituição do MM por PCP reduziu a população de *R. amylophilus* no presente estudo, pelo fato de reduzir a disponibilidade de amido no ambiente ruminal para utilização por esta bactéria.

Outra fonte de CNF comumente utilizada na alimentação de bovinos de corte é o milho floculado à vapor (MFV). Métodos de processamento de grãos, como por exemplo floculação e moagem, são estratégias eficientes no rompimento da matriz proteica que envolve o grânulo de amido, proporcionando desta forma maior digestibilidade, pelo fato de expor o amido à ação microbiana (McALLISTER, 2007). Neste contexto, a floculação do milho resulta na gelatinização do amido, aumentando desta forma a superfície do grão passível à ação de microrganismos ruminais, resultando em maior digestão ruminal do amido (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986).

De acordo com Zinn et al. (2002), a floculação, quando comparado com a moagem grosseira ou laminação a seco, resulta em aumentos de 15% a mais no teor de energia líquida de manutenção e 18% no teor de energia líquida para ganho, respectivamente. Passini et al. (2004) relatam que a floculação aumentou a degradabilidade da matéria seca do milho em 19,07% em relação à moagem fina, e ocasionou um aumento de 54,43% em relação ao milho quebrado. Além disso, o MFV apresenta digestibilidade do amido no trato digestivo total em torno de 99,09% em bovinos de corte em crescimento e/ou terminação, ao passo que para o grão inteiro de milho o valor é menor, em torno de 87,08% (OWENS; SODERLUND, 2007).

Com base nos dados obtidos por Cônsolo et al. (2012), o menor valor de pH ruminal foi encontrado para animais alimentados com MFV. Concomitantemente, observou-se que os animais alimentados com MFV tiveram queda mais abrupta de pH em relação aos demais

tipos de CNF, fato que pode ter interferido na atividade fibrolítica das bactérias ruminais (OWENS; GOETSCH, 1993; VAN SOEST, 1994). Com base nestas informações, justifica-se o resultado observado neste estudo para o microrganismo *R. albus*, cuja população foi reduzida devido à substituição parcial do MM por MFV. Desta forma, o MFV proporcionou maior fermentação ruminal, maior produção de AGCC e, assim, acarretando em queda de pH ruminal, e, conseqüentemente, saindo da faixa de pH ideal para atividade e desenvolvimento de microrganismos fibrolíticos.

O fornecimento de dietas compostas por grande quantidade de carboidratos prontamente fermentescíveis pode proporcionar mudanças drásticas na população e fermentação ruminal, pelo fato de darem condições a microrganismos facultativos oportunistas, tais como *S. bovis* e *Lactobacillus spp.*, que podem dominar a fermentação, resultando em distúrbios metabólicos (acidose). Esse quadro deve-se ao aumento das concentrações de lactato no rúmen e à incapacidade do aumento na população das bactérias consumidoras de ácido láctico, fazendo com que haja acúmulo deste ácido e, conseqüentemente, queda do pH ruminal a níveis críticos.

A *S. bovis* é uma bactéria tolerante à pH baixo e pode produzir ácido láctico em uma faixa de pH entre 5,4 e 5,1 (RUSSEL et al., 1979). No momento em que o pH está abaixo de 5,1, as bactérias mais tolerantes à meio ácido, os *Lactobacillus*, ao invés da *S. bovis*, continuam a produzir o lactato e assim o pH continua a cair. Todavia, pelo fato de *M. elsdenii* também ser tolerante à acidez, a mesma pode continuar a consumir este lactato para produzir outro AGCC mesmo quando o pH estiver abaixo de 5,4, juntamente com outras espécies de bactérias consumidoras de lactato, fato que pode contribuir para redução da concentração de ácido láctico ruminal e manter o pH acima de 5,4 (LONG et al., 2014). Se a utilização de ácido láctico por estes microrganismos for tão rápida quanto a produção, não haverá acúmulo de lactato e, assim, o pH ruminal continua a subir a níveis seguros.

De acordo com Khafipour et al. (2009), em ensaios realizados para avaliar as mudanças no ecossistema ruminal durante fases de acidose por meio da técnica de RT-PCR, a espécie *S. bovis* predominou durante acidose severa e *M. elsdenii* foi a espécie dominante durante acidose mediana causada por fornecimento de grãos. Long et al. (2014) relatam que a *M. elsdenii* (cepa H6F32) reduziu o acúmulo de lactato e aumentou o pH *in vitro*, indicando que tal microrganismo tem potencial para prevenir acidose ruminal.

No presente estudo, realizamos a quantificação relativa de *M. elsdenii*, que se trata de uma bactéria consumidora de lactato com papel importante no controle do pH ruminal. A substituição parcial do MM por MFV da dieta com 80% de concentrado resultou em aumento

da população de *M. elsdenii*, justamente na dieta com maior propensão à queda de pH ruminal, devido ao processamento do milho e ao nível de concentrado utilizado. Como a *M. elsdenii* utiliza o lactato como substrato, o crescimento da população deste microrganismo neste tratamento pode ser atribuído ao aumento da produção de lactato, auxiliando, consequentemente, no controle do pH ruminal.

Neste sentido, vale destacar um ponto importante: a remoção dos produtos oriundos da fermentação ruminal deve acompanhar a produção dos mesmos, a fim de não ocorrer acúmulo de AGCC no rúmen que podem promover queda brusca de pH, dando condições a microrganismos facultativos produtores de ácido láctico. Em outras palavras, quando a taxa de produção de lactato excede a taxa de absorção ou fermentação, seu acúmulo pode levar à queda do pH ruminal e redução na eficiência de conversão de alimentos à AGCC e proteína microbiana (OUWERKERK et al., 2002).

Outro ponto importante a ser discutido consiste no aporte de CNF na dieta, que pode alterar o padrão de fermentação e, por conseguinte, a população relativa dos microrganismos, e isso fica bem evidente nas diferenças observadas dentre as coletas de líquido ruminal, pré e pós alimentação, onde o aporte de substrato prontamente fermentescível tende a ser maior após alimentação. Além de sua complexidade, o rúmen é um sistema dinâmico, no qual os microrganismos ali presentes devem se adaptar continuamente às mudanças na composição da dieta, quantidade e frequência de alimentação (CALABRÒ et al., 2014).

Mosoni et al. (2007) relataram a diminuição da população de *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens* 3 horas após alimentação, em ovelhas alimentados com uma dieta com relação volumoso:concentrado 50:50. Já Singh et al. (2014) relataram que a população de *R. flavefaciens* e *F. succinogenes* apresentou tendência de ser menor 2 horas após a alimentação. Do mesmo modo, a população de *R. amylophilus* foi maior no jejum (0 horas após a alimentação), enquanto que a *Selenomonas ruminantium*, uma consumidora de lactato, foi maior 2 horas após alimentação.

No presente estudo, a população de *M. elsdenii* apresentou comportamento semelhante, sendo que foi maior 4 horas após alimentação nos animais recebendo a dieta contendo MFV. Como descrito anteriormente, pelo fato de se tratar de uma bactéria consumidora de lactato, a justificativa para maior população de *M. elsdenii* neste tratamento com MFV após a alimentação pode ser atribuído ao maior aporte de CNF, elevando a taxa fermentativa e, consequentemente, levando ao acúmulo de lactato. Assim, este microrganismo em questão estaria auxiliando no controle do pH ruminal, consumindo este lactato e evitando o acúmulo do mesmo no ambiente ruminal.

Estudos realizados por Petri et al. (2012) demonstraram que, em dietas de alto concentrado, a inclusão de silagem de cevada como fonte volumosa aumentou a população de *Ruminobacter amylophilus*, ao passo que nas dietas sem fonte volumosa a população de *M. elsdenii* foi maior.

Cherdthong et al. (2015) observaram que a substituição de 100% do farelo de soja por digesta ruminal seca resultou em aumento da população de *R. flavefaciens* 4 horas após a alimentação, mostrando que este produto alterou a composição da microbiota ruminal em bovinos de corte alimentados com palha de arroz.

4.6 CONCLUSÕES

O aumento da inclusão de concentrado na dieta, de 60% para 80%, reduziu a população da bactéria celulolítica *F. succinogenes*, ao passo que não afetou a população de *R. amylophilus*. Entretanto, este aumento de concentrado resultou em aumento da população de *R. flavefaciens* e redução da população de *S. bovis*, contrariando as hipóteses.

A substituição de MM por PCP resultou em um aumento apenas na população de *S. bovis*, reduzindo a população de *R. amylophilus* por conta da redução no substrato para este microrganismo amilolítico. Entretanto, esta substituição resultou em redução da bactéria fibrolítica *R. flavefaciens*, contrariando as hipóteses.

Já a substituição de MM por MFV reduziu *R. albus* e aumentou *M. elsdenii* justamente na dieta com 80% de concentrado, vindo de encontro com as hipóteses, visto que a maior digestibilidade ruminal do amido do MFV pode levar à queda do pH ruminal, e a maior proliferação desta bactéria utilizadoras do ácido lático contribuiu para o controle do pH ruminal.

Dessa forma, o nível de concentrado e tipo de CNF contribuíram para mudanças significativas sobre a microbiota ruminal, em dietas com silagem de cana-de-açúcar como fonte de volumoso.

REFERÊNCIAS

- CALABRÒ, S.; CUTRIGNELLI, M. I.; GONZALEZ, O. J.; CHIOFALO, B.; GROSSI, M.; TUDISCO, R.; PANETTA, C.; INFASCELLI, F. Meat quality of buffalo young bulls fed Faba bean as protein source. **Meat Science**, v. 96, p. 591–596, 2014.
- CHERDTHONG, A.; WANAPAT, M. Manipulation of in vitro ruminal fermentation and digestibility by dried rumen digesta. **Livestock Science**, v. 153, p. 94-100, 2013.
- CÔNSOLO, N. R. B.; MARQUES, B. S.; RODRIGUEZ, F. D.; MAGALHAES, J. D.; CARVALHO, M. V.; SOUSA, D. O.; MACIEL, R. A. P.; PRADA SILVA L. F. Consumo e desempenho de bovinos nelore terminados em confinamento com três tipos de fontes energéticas em dieta com silagem de cana como volumoso. In: SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA EM NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL, 6., 2012, Pirassununga. **Anais...** 2012.
- DUSKOVÁ, D.; MAROUNEK, M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rumen bacterium *Lachnospira multiparus*. **Letter in Applied Microbiology**, v. 33, p. 159-163, 2001.
- GONZÁLEZ, L. A.; MANTECA, X.; CALSAMIGLIA, S.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; FERRET, A. Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (review). **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, p. 66-79, 2012.
- GRADEL, C. M.; DEHORITY, B. A. Fermentation of isolated pectin and pectin from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 23, p. 332–340, 1972.
- HATFIELD, R. D.; WEIMER, P. J. Degradation characteristics of isolated and in situ cell wall lucerne pectic polysaccharides by mixed ruminal microbes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 69, p. 185–196, 1995.
- KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, p. 361–366, 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, p. 215–236, 2006.
- KREHBIEL, C. R.; CARTER, J. N.; RICHARDS, C. J. Feed additives in beef cow nutrition. In: TENNESSEE NUTRITION CONFERENCE, 2006, Franklin, TN, USA. **Proceedings...**, Franklin, TN, USA: Univ. Tennessee, 2006. p. 12.
- LIU, J.; LIU, M.; LIU, J. X. Comparison of the effects of pectin and starch on the rumen fermentation, growth performance and microbial populations in sheep. In: JOINT ANNUAL MEETING, 2014, Kansas city, Mo. 2014a. Disponível em: <<https://asas.confex.com>>. Acesso em: 07 maio 2015.

- LIU, J.; WANG, J. K.; ZHU, W.; PU, Y. Y.; GUAN, M. M.; LIU, J. X. Monitoring the rumen pectinolytic bacteria *Treponema saccharophilum* using real-time PCR. **Federation of European Microbiological Societies - Microbiology Ecology**, v. 87, p. 576–585, 2014b.
- LONG, M.; FENG, W. J.; LI, P.; ZHANG, Y.; HE, R. X.; YU, L. H.; HE, J. B.; JING, W. Y.; LI, Y. M.; WANG, Z.; LIU, G. W. Effects of the acid-tolerant engineered bacterial strain *Megasphaera elsdenii* H6F32 on ruminal pH and the lactic acid concentration of simulated rumen acidosis in vitro. **Research in Veterinary Science**, v. 96, p. 28–29, 2014.
- MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; ARRIGONI, M. D. B.; GALYEAN, M. L.; VASCONCELOS, J. T. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 3427–3439, 2009.
- MIRON, J.; BEN-GHEDALIA, D.; MORRISON, M. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1294–1309, 2001.
- MOSONI, P.; DURAND, F. C.; MAILLET, C. B.; FORANO, E. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. **Applied Microbiology**, v. 103, p. 2676–2685, 2007.
- MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITIERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.
- NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 17–38, 2007. Supplement 1.
- NAGARAJA, T. G.; LECHTENBERG, K. F. Acidosis in feedlot cattle. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 23, p. 333–350, 2007.
- NOCEK, J. E.; TAMMINGA, S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk and composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3598, 1991.
- OUWERKERK, D.; KLIEVE, A. V.; FORSTER, R. J. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 753–758, 2002.
- OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; GILL, D. R. Impact of grain sources and grain processing on feed intake by and performance of feedlot cattle. In: SYMPOSIUM: INTAKE BY FEEDLOT CATTLE P-942, 1995, Oklahoma State University, Stillwater. 1995. p. 235–256.
- OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 868–879. 1997.

OWENS, F. N.; SODERLUND, S. Ruminant and postruminal starch digestion by cattle. In: PIONEER HI-BRED, a dupont business conference, Jonston, 2007. Disponível em: <<http://beefextension.com>>. Acesso em: 07 maio 2015.

PACHECO, P. S.; RESTLE, J.; VAZ, F. N.; FREITAS, A. K.; PADUA, J. T.; NEUMANN, M.; ARBOITTE, M. Z. Avaliação econômica da terminação em confinamento de novilhos jovens e superjovens de diferentes grupos genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 309-320, 2006.

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**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 271-276, 2004.

PEREIRA, J. C.; CUNHA, D. N. F. V.; CECON, P. R.; FARIA, E. S. Comportamento Ingestivo e taxa de passagem de partículas em novilhas leiteiras de diferentes grupos genéticos submetidas a dietas com diferentes níveis de fibra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 2134-2142, 2007.

PETRI, R. M.; FORSTER, R. J.; YANG, W.; MCKINNON, J. J.; MCALLISTER, T. A. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. **Journal of Applied Microbiology**, Canada, v. 112, p. 1152-1162, 2012.

SINGH, K. M.; PANDYA, P. R.; TRIPATHI, A. K.; PATEL, G. R.; PARNERKAR, S.; KOTHARI, R. K.; JOSHI, C. G. Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. **Meta Gene**, 2, p. 191-199, 2014.

SIMAS, J. M. C.; PIRES, A. V.; SUSIN, I.; SANTOS, F. A. P.; MENDES, C. Q.; OLIVEIRA, R. C.; FERNANDES, J. J. R. Efeitos de fontes e formas de processamento do amido na utilização de nutrientes e parâmetros ruminiais de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1128-1134, 2008.

SLOVÁKOVÁ, L.; DUSKOVÁ, D.; MAROUNEK, M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*. **Letters in Applied Microbiology**, Czech Republic, v. 35, p. 126-130, 2002.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 165-174, 2007.

SUNG, H. G.; KOBAYASHI, Y.; CHANG, J.; HA, A.; HWANG, H.; HA, J. K. Low ruminal pH reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 20, p. 200-207, 2007.

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, p. 2766-2774, 2001.

VECHIATO, T. A. F.; MASCHIO, W.; BOM, L. C.; LOPES, P. D.; ORTOLANI, E. L. Estudo retrospectivo de abscessos hepáticos em bovinos abatidos em um frigorífico paulista. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 384-391, 2011.

WANG, R. F.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. PCR detection of *Ruminococcus* spp. in human and animal faecal samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 11, p. 259–265, 1997.

ZINN, R. A.; OWENS, F. N.; WARE, R. A. Flaking corn: processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, El Centro, v. 80, p. 1145-1156, 2002.

ZIOLECKI, A.; TOMERSKA, H.; WOJCIECHOWICZ, M. Pectinolytic activity of rumen streptococci. **Acta microbiologica Polonica**. v. 4, n. 4, p. 183–187, 1972.

YU, Z.; MORRISON, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. **BioTechniques**, v. 36, p. 808-812, 2004.

5 EXPERIMENTO 2 – “Efeito da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), fornecida fresca ou ensilada, com alta ou baixa digestibilidade da fibra, sobre a população de bactérias ruminais”

5.1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é amplamente utilizada na alimentação de gado de corte, nos mais diversos sistemas de produção, pelo fato de apresentar uma série de vantagens em sua utilização como volumoso, comparando com outras culturas tradicionais (QUEIROZ, 2006). Apesar do menor valor nutritivo em relação às silagens de milho e sorgo (ANDRADE et al., 2004), a cana-de-açúcar apresenta características de grande interesse aos bovinocultores como elevada produção de matéria seca por hectare, facilidade de cultivo e persistência da cultura, boa aceitação pelos animais e elevado teor de carboidratos solúveis e menor custo de produção (LANDELL et al., 2002; FREITAS et al., 2006).

A utilização mais usual dessa forragem na dieta de ruminantes ocorre na forma fresca, picada diariamente como capineira. Porém, o manejo correto de canaviais exige que o corte dos talhões seja realizado de forma concentrada, para evitar uma rebrota desuniforme e ainda aumentar a eficiência dos tratos culturais. Além disso, ocorre diminuição da qualidade da fibra da cana com o avançar da idade e o corte diário é uma atividade que exige dedicação de tempo e mão-de-obra. Devido a todas essas situações descritas, a ensilagem da cana apresenta-se como uma boa alternativa para minimizar tais problemas, permitindo a colheita de grandes áreas em curto espaço de tempo (NUSSIO; SCHMIDT, 2004). Assim, a conservação da planta inteira da cana-de-açúcar na forma de silagem permite sua utilização por um número maior de pecuaristas nos mais diversos sistemas de produção (SCHMIDT et al., 2007; QUEIROZ et al., 2008).

Mesmo com grandes vantagens, a cana-de-açúcar apresenta determinadas limitações que levam à baixa ingestão de matéria seca dos animais. A principal limitação para o uso da cana-de-açúcar na nutrição de animais de elevado potencial de produção é a baixa digestibilidade da fibra, aliado ao baixo teor de proteína bruta (PEREIRA et al., 2001). Em comparação com a fibra do milho, a cana-de-açúcar apresenta aproximadamente metade da digestibilidade da fibra em detergente neutro, o que leva ao menor consumo e desempenho animal (CORRÊA et al., 2003). Apesar da manutenção do valor energético da cana durante o

período seco, este teor constante de energia se dá pela redução da digestibilidade da FDN e aumento do teor de açúcares da cana (KUNG; STANLEY, 1982; CARVALHO et al., 2010). Assim, a ensilagem da cana pode permitir a utilização de um volumoso com maior digestibilidade da fibra, ainda que com menor valor energético total, do que o fornecimento anual da cana picada.

Além disso, o processo de ensilagem altera a composição nutricional da cana-de-açúcar, onde verifica-se aumento no valor da FDN, aumento do teor de lignina e redução no teor de açúcares solúveis (KUNG; STANLEY, 1982). Concomitantemente, a ensilagem aumenta a concentração de ácidos orgânicos e a concentração de etanol (KUNG; STANLEY, 1982; PEDROSO et al., 2007). Todos estes fatores estão relacionados, geralmente, com redução do consumo e do desempenho de animais consumindo a silagem de cana em relação à cana fresca picada (MENDES et al., 2008; PEDROSO et al., 2008).

Em pesquisa realizada com 31 nutricionistas brasileiros, Millen et al. (2009) concluíram que os volumosos mais utilizados durante a fase de terminação são a cana-de-açúcar fresca picada (32%), seguida pela silagem de milho (26%) e silagem de sorgo (22%). Ao contrário de outras forrageiras, a cana não reduz seu valor nutritivo de forma expressiva no período de estiagem, e destaca-se pelo aumento no teor de sacarose nesta época do ano (BORGES; PEREIRA, 2003).

Com base nestas informações, se torna fundamental o entendimento dos efeitos do fornecimento de cana-de-açúcar como fonte de volumoso, fornecida fresca ou ensilada, assim como o efeito da digestibilidade da FDN, sobre a composição da microbiota ruminal.

5.2 OBJETIVOS E HIPÓTESES

Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da digestibilidade da FDN da cana-de-açúcar fornecida fresca ou ensilada sobre a população de bactérias ruminais, celulolíticas e amilolíticas, de bovinos de corte da raça Nelore.

A hipótese seria que a maior digestibilidade da FDN resultaria em crescimento da população de microrganismos fibrolíticos, aqui representado por *F. succinogenes*, *R. albus* e *R. flavefaciens*. Além disso, acredita-se que a população de *S. bovis* responderá positivamente ao tratamento com cana fresca, aumentando sua população devido ao elevado teor de carboidratos não estruturais na cana fornecida na forma *in natura*. Neste sentido, espera-se

aumento da população de *M. elsdenii* neste tratamento, consumindo o ácido láctico produzido pela *S. bovis*, contribuindo para o controle do pH ruminal.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Local e animais

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte (LPGC) do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VNP/FMVZ/USP), localizado em Pirassununga, SP. O experimento foi desenvolvido no confinamento do LPGC, sendo utilizadas quatro baias de 12 m² cada uma, com piso de concreto. As baias eram providas de comedouro e bebedouro individuais. Para manter um ambiente adequado aos animais, o piso, o comedouro e o bebedouro foram limpos diariamente.

Foram utilizados oito bovinos da raça Nelore, castrados e fistulados no rúmen, com peso vivo de 275 ± 22 kg e 18 meses de idade. Os animais foram confinados em baias individuais. O delineamento experimental foi de dois quadrados latinos 4x4 contemporâneos (SOUSA, 2013), com arranjo fatorial de tratamentos 2x2, com dois níveis o fator digestibilidade da FDN (Alta ou Baixa) e dois níveis do método de conservação da cana-de-açúcar (Fresca ou Ensilada), totalizando 4 tratamentos.

5.3.2 Dietas experimentais

As rações experimentais (Tabela 5) foram compostas de 60% de concentrado e 40% de volumoso na matéria seca. Como volumoso, foram utilizados dois genótipos de cana-de-açúcar, com alta (IAC86-2480) ou baixa digestibilidade da fibra (SP91-1049), fornecidas na forma de silagem ou picada fresca, perfazendo quatro dietas experimentais. As dietas foram formuladas de acordo com recomendações do NRC (1996) visando um ganho de peso de 1,2

kg/dia e de modo a serem isoprotéicas em relação à estimativa do fornecimento de proteína metabolizável. Os ingredientes utilizados foram: milho grão moído fino, farelo de soja, ureia e sal mineral comercial. O alimento foi fornecido à vontade, duas vezes por dia. O controle da alimentação foi feito individualmente, por meio da pesagem diária do alimento fornecido e das sobras, permitindo uma sobra de 10%. As sobras foram descartadas e não reutilizadas na alimentação do dia seguinte. Cada período experimental teve duração de 14 dias, sendo 10 de adaptação à dieta e quatro de coleta de amostras da dieta, determinação do consumo, da cinética ruminal e coleta de fluido ruminal (SOUSA, 2013).

Tabela 5 - Composição percentual das dietas experimentais (% da MS)

Ingredientes	Tratamento			
	Alta DFDN ¹		Baixa DFDN ²	
	Fresca	Silagem	Fresca	Silagem
Cana Fresca IAC2480	40	-	-	-
Silagem da cana IAC2480	-	40	-	-
Cana Fresca SP1049	-	-	40	-
Silagem da cana SP1049	-	-	-	40
Milho moído	46,7	46,7	46,7	46,7
Farelo de soja	10,0	10,0	10,0	10,0
Uréia	1,24	1,24	1,24	1,24
Calcário	0,50	0,50	0,50	0,50
Sal Branco (NaCl)	0,25	0,25	0,25	0,25
Núcleo Minerthal Leite MD ³	1,3	1,3	1,3	1,3

Notas: ¹ Alta digestibilidade da fibra em detergente neutro; ² Baixa digestibilidade da fibra em detergente neutro; ³ Composição química: cálcio (mín) 242g; cálcio (máx) 302g; cobalto 30mg; cobre 1.008mg; enxofre 80g; flúor (máx) 390g; fósforo 39g; iodo 60mg; magnésio 20g; manganês 2.998mg; selênio 30mg; zinco 4.032mg; Vit. A 4.000UI; Vit. D3 40.000UI; Vit. E 1.450UI; VIT. E 1.100mg.

5.3.3 Coleta de líquido ruminal

O conteúdo ruminal foi evacuado manualmente através da cânula ruminal nos animais em jejum (0 horas após a alimentação) e 4 horas após alimentação. A massa total do conteúdo ruminal e volume foram determinados. Durante a evacuação, uma alíquota de 10% da digesta foi separada para facilidade de sub-amostragem. Uma alíquota de 600g foi retirada para determinação da MS e composição bromatológica. Uma segunda amostra foi filtrada através de uma membrana de náilon (1 mm de tamanho de poro) para separar as fases sólidas e líquidas. Amostras foram retiradas de ambas as fases para determinação do tamanho do compartimento ruminal (pool) de componentes da digesta. Uma amostra de 600 mL representativa da fase líquida e sólida (proporcionalmente) foi utilizada para determinação posterior da população bacteriana. Tais amostras foram armazenadas adequadamente em freezer -20°C, onde a fase líquida foi armazenada em tubos Falcon (50mL), e a fração sólida embrulhada em papel alumínio, devidamente identificados para cada animal.

5.3.4 Processamento das amostras de conteúdo ruminal

Para o processamento das amostras, foi preparada uma solução tampão ruminal (para cada coleta, utiliza-se em média 1,2L de tampão). Em um liquidificador, gelo foi batido com um pouco de água destilada e, em seguida, foi adicionado a fase sólida com 75 mL de solução tampão para líquido ruminal gelada, e foi homogeneizado por dois minutos. O liquidificador foi lavado com 25 mL de solução tampão para líquido ruminal. Em seguida, este material foi filtrado, transferindo este filtrado para dois tubos Falcon (50 mL) devidamente identificados. Posteriormente, estes tubos foram centrifugados a $500 \times g$ por 15 min a 4°C, e foi filtrado o sobrenadante com auxílio de lã de vidro, juntamente com a fase líquida. Em seguida, foi realizada uma centrifugação deste material a $10.000 \times g$ por 30 min a 4°C. Após este procedimento, o sobrenadante foi descartado, ressuspensando o sedimento microbiano em 700 µL de solução tampão. Por fim, este material foi armazenado em freezer a -80°C até a extração de DNA.

5.3.5 Análises laboratoriais – quantificação relativa de bactérias ruminais

Três microrganismos ruminais importantes para a degradação da celulose (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*), dois microrganismos importantes na degradação de amido e na produção de ácido láctico (*Streptococcus bovis* e *Ruminobacter amylophilus*), e um microrganismo utilizador de lactato e produtor de ácido propiônico (*Megasphaera elsdenii*) foram quantificados por PCR em tempo real (qPCR) para determinação do efeito da mudança do ambiente ruminal sobre a população de microrganismo. As análises foram realizadas no Laboratório de Genômica Funcional, do Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte (LPGC), coordenado pelo Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva.

O DNA extraído, a partir das amostras de conteúdo ruminais previamente processadas, foi utilizado como molde para a reação de qPCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para as bactérias ruminais desejadas, juntamente com oligonucleotídeo universal, *Eubacter* (Tabela 2). Dessa forma, foi realizada uma quantificação relativa destas bactérias em relação ao total de bactérias presentes na amostra de conteúdo ruminal.

Foi realizada a extração de DNA das amostras de líquido ruminal, utilizando o kit comercial QIAmp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®), seguindo as recomendações do fabricante. Para a extração foram utilizados 200µL de amostra de líquido ruminal. Ao final da extração, foi adicionado 20µL de acetato e 440µL de etanol para posterior precipitação.

Na precipitação, o material foi centrifugado a 20.000 $\times g$ por 35 minutos (a 4°C). Em seguida, o conteúdo foi descartado cuidadosamente, e foram adicionados ao tubo 500 µL de etanol 75%. Este tubo foi homogeneizado, seguido por uma centrifugação a 7500 $\times g$ por 5 minutos. Em sequência, o conteúdo foi descartado novamente, e os tubos mantidos invertidos por 15 minutos, para secar à temperatura ambiente. Terminada esta etapa, foram adicionados aos tubos 40µL de Tampão Tris-EDTA (TE), homogeneizados, e transferidos para banho-maria a 55°C por 10 minutos. Em seguida, estes tubos foram mantidos em gelo por 5 minutos (YU; MORRISON, 2004).

Terminada a precipitação, foi avaliada a qualidade e a quantidade de DNA extraído por meio de leitura em espectrofotômetro (Nanodrop 2000 – Thermo Scientific®). Em seguida, realizou-se a diluição das amostras de DNA extraído, com o intuito de deixá-las na mesma concentração de ácido nucleico.

Na sequência, foi retirado o volume de 5µL de cada amostra e transferido para um único microtubo, formando um *pool* utilizado como molde para uma reação de PCR com o intuito de se avaliar a eficiência de amplificação dos *primers* em diferentes diluições. Para tanto, fez-se uma diluição seriada a partir do *pool* (1000, 600, 300, 150, 50 e 25). O volume final da reação de PCR para cada amostra foi de 20µL, sendo 10µL de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems® - Life Technologies do Brasil), 1,2µL do primer *Forward*, 1,2µL do primer *Reverse*, 6,6µL de água MiliQ, e 1µL da amostra. Vale ressaltar que todas as análises foram feitas em duplicata na placa de PCR, além do fato de que cada placa apresentava um negativo para controle da amplificação. A reação de PCR foi realizada no equipamento 7500 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems® - Life Technologies do Brasil). Foi realizada a análise dos resultados para determinar a melhor eficiência de amplificação. Assim, as amostras foram diluídas para 300 por apresentar boa eficiência.

Com a diluição adequada obtida, foi realizada a quantificação relativa (qPCR) das bactérias de interesse para todas as amostras referentes ao experimento. Ao término da qPCR, o *threshold* foi ajustado para os *primers* utilizados (*Eubacter* e bactéria alvo), definindo o limiar de detecção. Com os dados obtidos, fez-se a diferença dos valores de Ct obtidos entre o *Eubacter* e a bactéria alvo, gerando o dCT para cada amostra.

5.3.6 Análise estatística

Os dados foram analisados em um delineamento em Quadrado Latino utilizando-se o procedimento MIXED do SAS versão 9.2, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Levene. O modelo contemplou como causas de variação o efeito de tratamento e suas interações como fatores fixos, assim como o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diferentes momentos de coleta. Como fatores aleatórios incluídos no modelo têm-se efeito de quadrado, animal dentro de quadrado e período. Os graus de liberdade e testes foram ajustados usando a opção Kenward-Roger. Significância foi declarada à $P \leq 0,05$.

5.4 RESULTADOS

Os resultados referentes ao ecossistema ruminal foram analisados quanto ao genótipo da cana (Alta ou Baixa DFDN), quanto ao modo de conservação da forragem (Fresca ou Ensilada) e quanto ao tempo de coleta de conteúdo ruminal (Pré e Pós), assim como quanto à interação entre os fatores descritos. Desta forma, os resultados obtidos estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - População relativa de microrganismos ruminais em relação ao controle, em função da digestibilidade da fibra em detergente neutro (alta ou baixa DFND) e do método de conservação (Fresca ou Silagem) da cana-de-açúcar

Variáveis	Tratamentos				EPM ³	Valor de P		
	Baixa		Alta					
	DFDN ¹		DFDN ²			DFDN ⁴	CONS ⁵	D*C ⁶
	Fresca	Silagem	Fresca	Silagem				
<i>F. succinogenes</i>	1,00	1,67	2,63	0,65	0,58	0,98	0,22	0,01
<i>R. albus</i>	1,00	0,50	2,22	1,01	0,69	0,12	0,17	0,91
<i>R. flavefaciens</i>	1,00	0,48	0,63	0,43	0,71	0,37	0,27	0,59
<i>S. bovis</i>	1,00	0,11	0,62	0,11	0,53	0,53	<0,01	0,47
<i>R. amylophilus</i>	1,00	1,01	0,69	0,58	0,49	0,13	0,82	0,77
<i>M. elsdenii</i>	1,00	0,12	0,52	0,13	1,61	0,61	0,06	0,51

Notas: ¹baixa digestibilidade da fibra em detergente neutro; ²alta digestibilidade da FDN; ³erro padrão da média; ⁴efeito da digestibilidade da FDN; ⁵efeito da conservação da cana de açúcar; ⁶efeito da interação DFDN vs. conservação da cana de açúcar; o tratamento baixa DFDN fresca foi considerado como referência.

Houve efeito de interação entre a DFDN e modo de conservação da cana sobre a população de *F. succinogenes* (P=0,01), sendo que a população desta bactéria foi maior na cana fornecida fresca somente com alta DFDN, sem apresentar diferença significativa entre as de baixa DFDN (P=0,31), conforme a figura 11.

Tanto o genótipo da cana de açúcar quanto o método de conservação não influenciaram a população de *R. albus* (P=0,12 e P=0,17, respectivamente), e *R. flavefaciens* (P=0,37 e P=0,27, respectivamente). Concomitantemente, não houve interação significativa

entre os fatores descritos para ambos os microrganismos ruminais ($P=0,91$ e $P=0,59$, respectivamente).

Figura 11 - População relativa de *F. succinogenes*, em função da digestibilidade de fibra e da conservação da cana de açúcar, normalizada para cana fresca com baixa DFDN.

Da mesma forma, o genótipo da cana-de-açúcar não influenciou a população de *S. bovis* ($P=0,53$) e de *M. elsdenii* ($P=0,06$). Entretanto, o fornecimento de cana na forma fresca resultou em um aumento da população de *S. bovis* ($P<0,01$) e tendência do mesmo efeito para *M. elsdenii* ($P=0,06$), quando comparado à silagem (Tabela 6).

Outros resultados importantes estão relacionados ao tempo de coleta de conteúdo ruminal realizado para o estudo em questão. Foi observado efeito de tempo para a *M. elsdenii* ($P<0,01$) e *R. amylophilus* ($P<0,01$), onde a população de ambas foi maior 4 horas após a alimentação (Figuras 12 e 13, respectivamente).

Figura 12 - População relativa de *M. elsdenii*, em função do tempo de coleta de líquido ruminal, normalizada para o tempo de coleta Pré alimentação

Figura 13 - População relativa de *R. amylophilus*, em função do tempo de coleta de líquido ruminal, normalizada para o tempo de coleta Pré alimentação

Além destes resultados, foi observado efeito de interação entre método de conservação e tempo de coleta ($P=0,01$) para *F. succinogenes*, conforme a figura 14. A população deste microrganismo ruminal foi maior na cana fresca quando comparada à silagem apenas no

tempo Pré ($P<0,01$), sem apresentar diferença significativa dentre as formas de conservação no Pós ($P=0,43$).

Figura 14 - População relativa de *F. succinogenes*, em função da conservação da cana de açúcar e do tempo de coleta de líquido ruminal, normalizada para cana fresca no tempo de coleta Pré alimentação

5.5 DISCUSSÃO

As bactérias responsáveis pela degradação da fibra estão aqui representadas pelas espécies *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*, sendo que apenas a população de *F. succinogenes* apresentou crescimento significativo no tratamento com cana fresca de alta DFDN. Vale ressaltar que, observando os resultados, a *R. albus* apresentou comportamento semelhante à *F. succinogenes*, aumentando sua população no tratamento com cana fresca de alta DFDN, entretanto tal efeito não foi estatisticamente significativo ($P=0,12$).

Muitos autores que trabalharam com microbiologia do rúmen mostraram que as bactérias fibrolíticas tem predileção de crescimento em pH em torno de 6,2 (RUSSELL; DOMBROWSKI, 1980; SHI; WEIMER, 1992; WEIMER, 1993). Fernando et al. (2010), trabalhando com a adaptação de novilhos de corte à dietas de alto teor de concentrado,

observaram a diminuição da prevalência de *R. albus* e *F. succinogenes*, em número até 40 vezes menor que em animais com dietas de alto teor de volumoso na dieta.

Com base nos resultados obtidos por Sousa (2013), observa-se que os parâmetros bromatológicos foram influenciados pelo genótipo da cana-de-açúcar, onde o teor de lignina (LIG) e o teor de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) foram maiores na cana de baixa DFDN, enquanto que o coeficiente de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e a digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN) foram maiores para a variedade com alta DFDN.

A proporção de forragem de boa qualidade influencia positivamente o crescimento das populações das espécies de bactérias celulolíticas no ambiente ruminal (FERNANDO et al., 2010). Dessa forma, a cana com alta DFDN apresentou os melhores resultados bromatológicos, justificando a maior população de microrganismos fibrolíticos nos animais que receberam este tratamento. O tratamento forneceu fibra de qualidade para a adesão das bactérias e pH ideal para o crescimento dessas espécies. As bactérias fibrolíticas são responsáveis pela digestão da fibra e estão predominantemente presentes em dietas com alto teor de fibra de boa qualidade (KOIKE; KOBAYASHI, 2001).

Outro ponto importante avaliado no presente estudo consiste no efeito da conservação da cana-de-açúcar sobre a composição da microbiota ruminal. É evidente que a ensilagem altera a qualidade nutricional de volumosos. Em relação à cana-de-açúcar, o processo de ensilagem aumenta o valor da FDN, aumenta o teor de lignina e reduz o teor de açúcares solúveis (KUNG; STANLEY, 1982). Com base nos resultados obtidos por Sousa (2013), observa-se que os parâmetros bromatológicos também foram influenciados pelo modo de conservação da cana-de-açúcar, onde o teor de LIG e FDNi foram maiores na cana-de-açúcar ensilada, enquanto que a DIVMS e DIVFDN foram maiores na cana-de-açúcar fornecida fresca.

Assim, justifica-se a maior população de bactérias fibrolíticas nos animais recebendo o tratamento com cana fresca, pelo fato de proporcionar fibra de qualidade para a adesão das bactérias em pH ideal para o crescimento dessas espécies, além do teor de CNF maior quando comparado com a silagem, aumentando a fermentação e, conseqüentemente, a população de microrganismos ruminais como um todo. Para Tafaj et al. (2005), é esperado que uma quantidade moderada de concentrado na dieta possa aumentar a utilização da fibra pelo fato de fornecer melhor suprimento de matéria orgânica fermentável, energia e nitrogênio para as bactérias ruminais. Entretanto, com o aumento da fermentabilidade do concentrado no rúmen, o efeito depressivo do nível de concentrado sobre a digestibilidade da fibra aumenta. Dietas

ricas em concentrado apresentam grande quantidade de CNF que são rapidamente degradados no rúmen, produzindo grande quantidade de AGCC em curto espaço de tempo (ALLEN, 1997), e consequentemente reduzindo o pH ruminal. Este baixo pH ruminal, juntamente com a competição por substratos, resulta na inibição de crescimento e atividade das bactérias fibrolíticas.

As hipóteses do estudo realizado por Sousa (2013) foram que a maior digestibilidade da FDN aumentaria o consumo de novilhos Nelore alimentados com cana-de-açúcar fornecida fresca. E que o efeito da maior DFDN não seria mantido na silagem de cana, pelo fato de que, durante o processo de fermentação da silagem, parte dos carboidratos não estruturais é consumido, aumentando a proporção de componentes fibrosos e, consequentemente, reduzindo o CMS. No entanto, de acordo com os dados obtidos por Sousa (2013), a alimentação com o genótipo de alta DFDN aumentou o consumo de MS, somente na forma de silagem. O processo de ensilagem não alterou o efeito da alta DFDN sobre o CMS, contrariando as hipóteses iniciais.

Com a fermentação do CNF no processo de conservação da silagem, o teor de fibra aumentou. Dessa forma, o efeito da alta DFDN ficou mais evidente nesse tratamento, visto que a silagem de alta DFDN obteve maior CMS em relação à silagem de baixa DFDN. Forbes e Provenza (2000) teorizaram que o CMS pelos ruminantes é regulado pelo fator físico de enchimento ruminal, onde o animal para de comer para minimizar o desconforto causado pelo excesso de alimento fibroso no rúmen. Segundo Rinne, Huhtanen e Jaakkola (2002), o CMS é limitado pelo enchimento do rúmen, somente para as forragens de menor digestibilidade da fibra e não para as de maior DFDN, como ocorreu na pesquisa desenvolvida por Sousa (2013).

Devido ao elevado teor de carboidratos não estruturais na cana-de-açúcar, Sousa (2013) observou que os tratamentos com cana fresca não tiveram diferença no CMS quanto ao genótipo da cana. Indicando assim, que os animais recebendo a dieta com cana-de-açúcar *in natura* atingiram a saciedade metabólica, limitando o consumo. Em outras palavras, o efeito da maior DFDN na cana fresca foi mascarado pelo alto teor de açúcar da cana. Tal fato pode ser explicado pela Teoria da oxidação hepática (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009).

Esta teoria se baseia no acúmulo de propionato no fígado, resultando em hipofagia ou queda na ingestão de MS. O propionato e os ácidos graxos não esterificados são considerados os substratos primários extensivamente utilizados pelo fígado de ruminantes. Dessa forma, no momento em que a quantidade de propionato, oriundo da fermentação ruminal, que chega ao fígado ultrapassa a capacidade da gliconeogênese, o resultado é o acúmulo de propionato no

fígado, sendo que este AGCC foi possivelmente oxidado. Esta oxidação do propionato que ocorre no fígado durante a ingestão resulta em aumento do status energético hepático, gerando saldo positivo de ATP que, por meio de reações múltiplas, desencadeia um sinal de saciedade que cessa a sensação de fome, ocasionando a interrupção do consumo por parte dos animais (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009).

Esta teoria pode ser confirmada com base nos resultados obtidos por Sousa (2013) quanto à produção de AGCC. Observou-se que a produção de propionato foi maior no tratamento com cana fresca, devido ao teor de açúcar disponível à fermentação, ao passo que a silagem de alta DFDN aumentou a concentração de acetato, elevando consequentemente a razão Acetato:Propionato, mostrando a atividade dos microrganismos celulolíticos.

Além disso, Sousa (2013) observou que a maior digestibilidade da fibra e a conservação na forma de silagem aumentaram a taxa de renovação da FDN (Turnover FDN) e a taxa de renovação da FDN digestível (Turnover FDNd). Este resultado geralmente acompanha o maior consumo em dietas com alto teor de fibra, pois o animal terá que comer mais para suprir sua exigência energética. De forma semelhante ao que aconteceu com o Turnover FDN, ocorreu com a taxa de passagem, sendo maior para o tratamento com silagem de cana de alta DFDN.

A possível explicação para tal fato é que, devido à melhor qualidade da fibra, o consumo foi maior e o alimento permaneceu menos tempo no rúmen para ser digerido e passar para o retículo. Vários estudos na literatura encontraram o mesmo resultado, onde em dietas com elevado teor de FDN de boa qualidade, a taxa de passagem foi aumentada para reduzir os efeitos do enchimento ruminal, evitando, assim, redução no consumo (WOODFORD; JORGENSEN; BARRINGTON, 1986; JOHNSON; COMBS, 1991; DADO; ALLEN, 1995). A taxa de digestão foi maior para os tratamentos com silagem de cana, devido às mudanças no comportamento alimentar dos animais para digerir mais eficientemente o alimento com maior teor de FDN, evitando reduções no CMS.

Dessa forma, com base nas informações descritas, apesar de não ter sido observado aumento das bactérias celulolíticas no tratamento com silagem de cana de alta DFDN, é evidente a ação de microrganismos celulolíticos sobre esta fonte volumosa. Levando em consideração a complexidade do ambiente ruminal, outros microrganismos fibrolíticos, não quantificados no presente estudo, podem ter atuado na degradação deste volumoso.

Diferentemente dos microrganismos fibrolíticos, as bactérias amilolíticas tem predileção por alimentos ricos em carboidratos, além de serem mais tolerantes à queda de pH. Neste contexto, a alimentação com cana fresca aumentou a população de *Streptococcus bovis*,

devido a maior disponibilidade de carboidratos não estruturais prontamente fermentáveis em relação à silagem. Golder et al. (2014) relata maior população de *S. bovis* em novilhas alimentadas com frutose do que com amido, indicando que este microrganismo responde rapidamente às alterações na dieta, visto que a frutose é mais rapidamente metabolizada quando comparada com o próprio amido. Tais resultados coincidem com os obtidos no experimento descrito anteriormente, em que a população de *S. bovis* foi maior na dieta com inclusão de 40% de silagem de cana-de-açúcar, devido à maior concentração de sacarose.

De acordo com os resultados obtidos por Sousa (2013), o genótipo da cana-de-açúcar (Alta ou baixa DFDN) não interferiu nos resultados de pH ruminal. No entanto, o modo de conservação da cana influenciou o pH ruminal, sendo que a alimentação com a silagem de cana proporcionou pH ruminal maior do que a alimentação com a cana *in natura* (6.69 vs. 6.37 ± 0.08 , respectivamente). Concomitantemente, o pH ruminal dos animais tratados com cana fresca foi menor ao longo de todo o dia quando comparado ao tratamento com silagem, favorecendo o crescimento de *S. bovis*. Como é conhecido na literatura, esta espécie tem a habilidade de se multiplicar em ambiente de menor pH (RUSSELL; HINO, 1985; GARNER; FLINT; RUSSELL, 2002). Nagaraja e Titgemeyer (2007) relatam que o rápido crescimento do *S. bovis* não foi observado em animais adaptados a dietas ricas em carboidratos, mas sim em animais que sofreram de uma acidose láctica.

S. bovis está relacionada com a produção de ácido láctico. O grande problema é o acúmulo deste ácido no ambiente ruminal, favorecendo a queda de pH ruminal e, conseqüentemente, acarretando em distúrbios metabólicos. Alguns microrganismos presentes no ambiente ruminal, também tolerantes à ambiente ácido, podem consumir este lactato para produzir outro AGCC, que é o caso da *M. elsdenii*, objeto de estudo nesta pesquisa. De acordo com Khafipour et al. (2009), em ensaios realizados para avaliar as mudanças no ecossistema ruminal durante fases de acidose por meio da técnica de RT-PCR, demonstram que *S. bovis* dominaram durante acidose severa, e *M. elsdenii* foi a espécie dominante durante acidose mediana causada por fornecimento de grãos. Long et al. (2014) relatam que a *M. elsdenii* (cepa H6F32) reduziu o acúmulo de lactato e aumentou o pH *in vitro*, indicando que tal microrganismo tem potencial para prevenir acidose ruminal.

Neste contexto, uma informação importante a ser discutida diz respeito ao aporte de CNF na dieta, que pode alterar o padrão de fermentação e, por conseguinte, a população relativa dos microrganismos. Isso fica bem evidente nas diferenças observadas dentre as coletas de líquido ruminal, pré e pós alimentação, onde o aporte de substrato prontamente fermentescível tende a ser maior após alimentação. Além de sua complexidade, o rúmen é um

sistema dinâmico, no qual os microrganismos ali presentes devem se adaptar continuamente às mudanças na composição da dieta, quantidade e frequência de alimentação (CALABRÒ et al., 2014).

No presente estudo, a quantificação relativa por qPCR apontou que a população da bactéria consumidora de lactato, *M. elsdenii*, foi maior após a alimentação, resultado do maior aporte de carboidratos passíveis de fermentação no rúmen, aumentando a taxa fermentativa, e consequentemente, a produção de AGCC, inclusive lactato, que por sua vez pode promover queda brusca de pH ruminal. Uma vez que a *M. elsdenii* utiliza o lactato como substrato, o crescimento de sua população neste tratamento pode ser atribuído ao acúmulo de lactato, auxiliando no controle do pH ruminal. Entretanto, a população de *F. succinogenes* foi maior no jejum (pré alimentação), reduzindo sua população após alimentação, justamente devido à maior fermentação ruminal, resultando em maior produção de AGCC que promovem a queda do pH ruminal, saindo da faixa ideal de atuação dos microrganismos celulolíticos.

5.6 CONCLUSÕES

O fornecimento de cana-de-açúcar de maior digestibilidade favoreceu o crescimento de bactérias fibrolíticas. O fornecimento da cana-de-açúcar na forma fresca proporcionou crescimento da população de *S. bovis* e *M. elsdenii*, em resposta ao maior aporte de açúcares prontamente fermentescíveis.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1447-1462, 1997.
- ALLEN, M. S.; BRADFORD, B. J.; OBA, M. Board-invited review: the hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 10, p. 3317-3334, 2009.
- ANDRADE, J. B.; FERRARO JR., E.; POSSENTI, R. A.; OTSUK, I. P.; ZIMBACK, L.; LANDELL, M. G. A. Composição química de genótipos de cana-de-açúcar em duas idades, para fins de nutrição animal. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 3, p. 341-349, 2004.
- BORGES, A. L. C. C.; PEREIRA, L. G. R. Cana-de-açúcar como volumoso para bovinos. In: MARQUES, D. C. (Ed.). **Criação de bovinos**. 7. ed. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, 2003, p. 221-224.
- CALABRÒ, S.; CUTRIGNELLI, M.I.; GONZALEZ, O. J.; CHIOFALO, B.; GROSSI, M.; TUDISCO, R.; PANETTA, C.; INFASCELLI, F. Meat quality of buffalo young bulls fed Faba bean as protein source. **Meat Science**, v. 96, p. 591-596, 2014.
- CARVALHO, M. V.; RODRIGUES, P. H. M.; LIMA, M. L. P.; ANJOS, I. A. dos; LANDELL, M. G. A.; SILVA, L. F. P. Composição bromatológica e digestibilidade de cana-de-açúcar colhida em duas épocas do ano. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, p. 298-306, 2010.
- CORREA, C. E. S.; PEREIRA, M. N.; OLIVEIRA, S. G. Performance of Holstein cows fed sugarcane or corn silages of different grain textures. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, p. 621-629, 2003.
- DADO, R. G.; ALLEN, M. S. Intake limitations, feeding behavior, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber or inert bulk. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 1, p. 118-133, 1995.
- FERNANDO, S. C.; PURVIS II, H. T.; NAJAR, F. Z.; SUKHARNIKOV, L. O.; KREHBIEL, C. R.; NAGARAJA, T. G.; ROE, B. A.; DESILVA, U. Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet. **Applied and Environmental Microbiology**, Oklahoma, v. 76, n. 22, p.7482-7490, nov. 2010.
- FORBES, J. M.; PROVENZA, F. D. Integration of learning and metabolic signals into a theory of dietary choice and food intake. In: CRONJE, P. B. (Ed.). **Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction**. New York: CABI Publishing, 2000. p. 3-19.
- FREITAS, A.W. P.; PEREIRA, J. C.; ROCHA, F. C.; DETMANN, E.; BARBOSA, M. H. P.; RIBEIRO, M. D.; COSTA, M. G. Avaliação da divergência nutricional de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 229-236, 2006.
- GARNER, M. R.; FLINT, J. F.; RUSSELL, J. B. *Allisonella histaminiformans* gen. nov., sp. nov. A novel bacterium that produces histamine, utilizes histidine as its sole energy source,

and could play a role in bovine and equine laminitis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 498- 506, 2002.

GOLDER, H. M.; DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C.; CELI, P.; LEAN, I. J. Ruminal bacterial community shifts in grain-, sugar-, and histidine-challenged dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.5131–5150, 2014.

JOHNSON, T. R.; COMBS, D. K. Effects of prepartum diet, inert rumen bulk, and dietary polyethylene glycol on dry matter intake of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 3, p. 933-944, 1991.

KHAFIPOUR, E.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1060–1070, 2009.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, p. 361–366, 2001.

KUNG, L.; STANLEY, R. W. Effect of stage of maturity on the nutritive-value of wholeplant sugarcane preserved as silage. **Journal of Animal Science**, v. 54, n. 4, p. 689-696, 1982.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; RODRIGUES, A. A.; CRUZ, G. M.; BATISTA, L. A. R.; FIGUEIREDO, P.; SILVA, M. A.; BIDOIA, M. A. P.; ROSSETTO, R.; MARTINS, A. L. M.; GALLO, P. B.; KANTHACK, R. A. D.; CAVICHIOLI, J. C.; VASCONCELOS, A. C. M.; XAVIER, M. A. **A variedade IAC86-2480 como nova opção de cana-de-açúcar para fins forrageiros: manejo de produção e uso na alimentação animal**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2002. 39 p. (Série Tecnologia APTA, boletim técnico IAC; 193).

LONG, M.; FENG, W.J.; LI, P.; ZHANG, Y.; HE, R.X.; YU, L.H.; HE, J.B.; JING, W.Y.; LI, Y.M.; WANG, Z.; LIU G.W. Effects of the acid-tolerant engineered bacterial strain *Megasphaera elsdenii* H6F32 on ruminal pH and the lactic acid concentration of simulated rumen acidosis in vitro. **Research in Veterinary Science**, v. 96, p. 28–29, 2014.

MENDES, C. Q.; SUSIN, I.; NUSSIO, L. G. Efeito do *Lactobacillus buchneri* na fermentação, estabilidade aeróbia e no valor nutritivo de silagem de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 2191-2198, 2008.

MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D.; ARRIGONI, M. D.; GALYEAN, M. L.; VASCONCELOS, J. T. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 10, p. 3427- 3439, 2009.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. E17–E38, 2007. Supplement 1.

NUSSIO, L. G.; SCHMIDT, P. Tecnologia de produção e valor alimentício de silagens de cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2004. Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO, 2004. p. 1-33.

PEDROSO, A. F.; RODRIGUES, A. A.; BARIONI JR., W. Características da fermentação e perdas em silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos ou inoculantes bacteriano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44., 2007, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: SBZ: UNESP, 2007.

PEDROSO, A. F.; RODRIGUES, A. A.; SANTOS, F. A. P. Desempenho de tourinhos alimentados com rações preparadas com silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos ou inoculante bacteriano. In: Congresso Nordeste de Produção Animal, 5.; SIMPÓSIO NORDESTINO DE ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 11.; SIMPÓSIO SERGIPANO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 2008, Aracaju. **Anais...** Aracaju: SNPA, 2008.

PEREIRA, E. S.; QUEIROZ, A. C.; PAULINO, M. F.; CECON, P. R.; VALADARES FILHO, S. C.; MIRANDA, L.F.; ARRUDA, A. M. V.; FERNANDES, A. M.; CABRAL, L. S. Fontes nitrogenadas e uso de *Sacharomyces cerevisiae* em dietas à base de cana-de-açúcar para novilhos: consumo, digestibilidade, balanço nitrogenado e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 563-572, 2001.

QUEIROZ, O. C. M.; NUSSIO, L. G.; SCHMIDT, P.; RIBEIRO, J. L.; SANTOS, M. C.; ZOPOLLATTO, M. Silagem de cana-de-açúcar comparada a fontes tradicionais de volumosos suplementares no desempenho de vacas de alta produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 2, p. 358-365, 2008.

QUEIROZ, O. M. C. **Associação de aditivos microbianos na ensilagem e o desempenho de vacas em lactação recebendo silagem de cana-de-açúcar comparada a volumosos tradicionais**. 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de 64 Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RINNE, M.; JAAKKOLA, S.; HUHTANEN, P. Grass maturity effects on cattle fed silagebased diets .1. Organic matter digestion, rumen fermentation and nitrogen utilization. **Animal Feed Science and Technology**, v. 67, n. 1, p. 1-17, 1997.

RUSSELL, J. R.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 604-610, 1980.

SCHMIDT, P.; MARI, L. J.; NUSSIO, L. G.; PEDROSO, A. F.; PAZIANE, S. F.; WECHSLER, F. S. Aditivos químicos e biológicos na ensilagem de cana-de-açúcar. 1. Composição química das silagens, ingestão, digestibilidade e comportamento ingestivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1666, 2007.

SHI, Y.; WEIMER, P. J. Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2583-2591, 1992.

SOUSA, D. O. **Consumo, cinética e ecossistema ruminal de tourinhos alimentados com dietas contendo cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) fresca ou ensilada, com alta ou baixa digestibilidade da fibra**. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

TAF AJ, M.; KOLANECI, V.; JUNCK, B.; MAULBETSCH, A.; STEINGASS, H.; DROCHNER, W. Influence of fiber content and concentrate level on chewing activity,

ruminal digestion, digesta passage rate and nutrient digestibility in dairy cows in late lactation. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 18, n. 8, p.1116-1124, 2005.

WEIMER, P. J. Effects of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose fed continuous culture. **Archives of Microbiology**, v. 160, n.4, p.288-294, 1993.

WOODFORD, J. A.; JORGENSEN, N. A.; BARRINGTON, G. P. Impact of dietary fiber and physical form on performance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 4, p. 1035-1047, 1986.

YU, Z.; MORRISON, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. **BioTechniques**, v. 36, p. 808-812, 2004.

6 EXPERIMENTO 3 – “Efeito da digestibilidade da fibra da cana-de-açúcar e do nível de concentrado sobre a população de bactérias ruminais”

6.1 INTRODUÇÃO

A utilização de forragem na dieta constitui a base da alimentação em sistemas de produção dos bovinos de corte no Brasil, com destaque para a maciça produção em pastagem, porém com crescente participação de confinamento no número final de animais terminados no Brasil. Estudos apontam a digestibilidade da fibra, além do baixo teor de proteína, como grande limitador do desempenho de bovinos e apontam a cana-de-açúcar como um volumoso de grande produtividade e baixo custo de produção (PEREIRA et al., 2001).

Outra vantagem de impacto no cultivo da cana de açúcar é o valor de sua energia por área cultivada. De acordo com James (1975), o potencial da cana como produtora de energia em forma de nutrientes digestíveis totais (NDT), por área, atinge de 15 a 20 toneladas, valor esse maior nos dias de hoje em razão do melhoramento genético voltado para a indústria sucroalcooleira. Ainda segundo o autor, esse valor é superior aos encontrados para o milho e o sorgo que raramente conseguem atingir 10 toneladas de NDT por hectare. Essa cultura apresenta ainda, características agrônômicas importantes como boa resistência à seca e grande adaptabilidade às diferentes condições edafoclimáticas (BETT, 2002).

Mesmo com grandes vantagens, a cana-de-açúcar apresenta determinadas limitações que estão relacionadas ao seu processo de manejo, que levam à baixa ingestão de matéria seca dos animais, em razão da baixa qualidade nutricional (proteína e lipídeos), a limitações físicas (tamanho de partícula) e à digestibilidade de sua fibra (BOIN; TEDESCHI, 1993). Por isso a importância de se suplementar os animais alimentados com cana-de-açúcar através de estratégias alimentares práticas, eficientes e econômicas, como a correção de seu teor de proteína com uréia e sulfato de amônio, o fornecimento de concentrado balanceado e de minerais. Tal procedimento permitirá com que as bactérias ruminais sintetizem cada vez mais proteínas, além de melhorar a digestibilidade da fibra e, conseqüentemente, o CMS e o desempenho animal.

Nesse contexto, a cana-de-açúcar como alimento volumoso para bovinos em confinamento, apesar de possuir baixo valor nutricional, quando corretamente associada com concentrados pode ser uma alternativa, principalmente em regiões sucroalcooleiras, visando

corrigir suas deficiências nutricionais e, conseqüentemente, podendo proporcionar excelente desempenho animal.

Os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar estão focados no teor e produção total de sacarose, com pequenas tentativas de avaliação de parâmetros de qualidade para a nutrição animal, apesar de a cana-de-açúcar ser amplamente utilizada como volumoso em dietas de ruminantes (FREITAS et al., 2006).

Porém, além do teor de sacarose, a qualidade da fibra é de fundamental importância quando a cana-de-açúcar é fornecida a animais ruminantes, evidenciando a necessidade do estabelecimento de critérios de seleção, visando especificamente à alimentação animal (FREITAS et al., 2006).

Assim, a linha de estudo voltada para o estabelecimento do impacto da qualidade da fibra, de genótipos de cana-de-açúcar com melhor digestibilidade, sobre o desempenho de bovinos de corte pode auxiliar a introduzir parâmetros de qualidade da fibra em programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar. Além disso, a elucidação dos mecanismos envolvidos na degradação da fibra por microrganismo ruminais, juntamente com os diversos fatores que influenciam a fermentação ruminal, representa um potencial incremento à pecuária de corte.

6.2 OBJETIVOS E HIPÓTESES

Deste modo, o presente estudo visou elucidar o impacto da qualidade da fibra da cana-de-açúcar, fornecida em diferentes níveis na dieta, sobre o desempenho técnico e econômico de bovinos de corte em terminação.

A hipótese é que a maior digestibilidade da FDN resultará em crescimento da população de microrganismos fibrolíticos, aqui representado por *F. succinogenes*, *R. albus* e *R. flavefaciens*. Além disso, espera-se que o aumento da inclusão de concentrado na dieta resulte em aumento da população de bactérias amilolíticas (*R. amylophilus* e *S. bovis*) e da consumidora de lactato (*M. elsdenii*), ao passo que ocorra a redução das bactérias celulolíticas.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 Local e animais

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte (LPGC) do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VNP/FMVZ/USP), localizado em Pirassununga, SP. O experimento foi desenvolvido no confinamento do LPGC, sendo utilizadas quatro baias de 12 m² cada uma, com piso de concreto. As baias eram providas de comedouro e bebedouro individuais. Para manter um ambiente adequado aos animais, o piso, o comedouro e o bebedouro foram limpos diariamente.

Foram utilizados oito bovinos da raça Nelore, castrados e fistulados no rúmen, com peso vivo de 275 ± 22 kg e 18 meses de idade. Os animais foram confinados em baias individuais. O delineamento experimental foi de dois quadrados latinos 4x4 contemporâneos (MESQUITA, 2013), com arranjo fatorial de tratamentos 2x2, com dois níveis o fator digestibilidade da FDN (Alta ou Baixa) e dois níveis do teor de concentrado na dieta (60 ou 80%), totalizando 4 tratamentos.

6.3.2 Dietas experimentais

As rações experimentais (Tabela 7) foram formuladas com base nas exigências nutricionais de bovinos de corte segundo o NRC (1996), visando ganho médio diário de peso vivo (GMD) de 1,2 kg/animal/dia, para dietas com 60% de concentrado e 1,4 kg/animal/dia para dietas com 80% de concentrado com base na matéria seca. Para tanto, estabeleceu-se que as dietas contivessem em sua composição química 73,3% de NDT e 13,8% de PB para as dietas com 60% de concentrado e 78,1% de NDT e 13,4% de PB nas dietas com 80% de concentrado em sua constituição baseada na matéria seca. Quanto à fonte de volumoso, foram utilizadas duas variedades de cana: IAC86-2480, genótipo de alta digestibilidade da FDN (alta DFDN) do colmo; e SP91-1049, com baixa digestibilidade da FDN do colmo (baixa DFDN).

O alimento foi fornecido à vontade, duas vezes por dia. O controle da alimentação foi feito individualmente, por meio da pesagem diária do alimento fornecido e das sobras, permitindo uma sobra de 10%. As sobras foram descartadas e não reutilizadas na alimentação do dia seguinte. Cada período experimental teve duração de 14 dias, sendo 10 de adaptação à dieta e quatro de coleta de amostras da dieta, determinação do consumo, da cinética ruminal e coleta de fluido ruminal (MESQUITA, 2013).

Tabela 7 - Composição percentual das dietas experimentais (% da MS)

Ingredientes	Nível de Concentrado na Dieta			
	60%		80%	
	Variedade de Cana			
	Alta DFDN	Baixa DFDN	Alta DFDN	Baixa DFDN
Alta DFDN	40	-	20	-
Baixa DFDN	-	40	-	20
Milho moído	46,7	46,7	64,4	64,4
Farelo de soja	10,0	10,0	13,4	13,4
Uréia	1,24	1,24	0,13	0,13
Calcário	0,50	0,50	0,50	0,50
Sal Branco (NaCl)	0,25	0,25	0,25	0,25
Núcleo Minerthal Leite	1,3	1,3	1,3	1,3
MD¹				

Notas: ¹ Composição química: cálcio (mín) 242g; cálcio (máx) 302g; cobalto 30mg; cobre 1.008mg; enxofre 80g; flúor (máx) 390g; fósforo 39g; iodo 60mg; magnésio 20g; manganês 2.998mg; selênio 30mg; zinco 4.032mg; Vit. A 4.000UI; Vit. D3 40.000UI; Vit. E 1.450UI; VIT. E 1.100mg.

6.3.3 Coleta de líquido ruminal

O conteúdo ruminal foi evacuado manualmente através da cânula ruminal nos animais em jejum (0 horas após a alimentação) e 4 horas após alimentação. A massa total do conteúdo ruminal e volume foram determinados. Durante a evacuação, uma alíquota de 10% da digesta foi separada para facilidade de sub-amostragem. Uma alíquota de 600g foi retirada para

determinação da MS e composição bromatológica. Uma segunda amostra foi filtrada através de uma membrana de náilon (1 mm de tamanho de poro) para separar as fases sólidas e líquidas. Amostras foram retiradas de ambas as fases para determinação do tamanho do compartimento ruminal (pool) de componentes da digesta. Uma amostra de 600 mL representativa da fase líquida e sólida (proporcionalmente) foi utilizada para determinação posterior da população bacteriana. Tais amostras foram armazenadas adequadamente em freezer -20°C, onde a fase líquida foi armazenada em tubos Falcon (50mL), e a fração sólida embrulhada em papel alumínio, devidamente identificados para cada animal.

6.3.4 Processamento das amostras de conteúdo ruminal

Para o processamento das amostras, foi preparada uma solução tampão ruminal (para cada coleta, gasta em média 1,2L de tampão). Em um liquidificador, gelo foi batido com um pouco de água destilada e, em seguida, foi adicionado a fase sólida com 75 mL de solução tampão para líquido ruminal gelada, e foi homogeneizado por dois minutos. O liquidificador foi lavado com 25 mL de solução tampão para líquido ruminal. Em seguida, este material foi filtrado, transferindo este filtrado para dois tubos Falcon (50 mL) devidamente identificados. Posteriormente, estes tubos foram centrifugados a $500 \times g$ por 15 min a 4°C, e foi filtrado o sobrenadante com auxílio de lã de vidro, juntamente com a fase líquida. Em seguida, foi realizada uma centrifugação deste material a $10.000 \times g$ por 30 min a 4°C. Após este procedimento, o sobrenadante foi descartado, ressuspensando o sedimento microbiano em 700 µL de solução tampão. Por fim, este material foi armazenado em freezer a -80°C até a extração de DNA.

6.3.5 Análises laboratoriais – quantificação relativa de bactérias ruminais

Três microrganismos ruminais importantes para a degradação da celulose (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*), dois microrganismos importantes na degradação de amido e na produção de ácido láctico (*Streptococcus bovis* e

Ruminobacter amylophilus), e um microrganismo utilizador de lactato e produtor de ácido propiônico (*Megasphaera elsdenii*) foram quantificados por PCR em tempo real (qPCR) para determinação do efeito da mudança do ambiente ruminal sobre a população de microrganismo. As análises foram realizadas no Laboratório de Genômica Funcional, do Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte (LPGC), coordenado pelo Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva.

O DNA extraído, a partir das amostras de conteúdo ruminal previamente processadas, foi utilizado como molde para a reação de qPCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para as bactérias ruminais desejadas, juntamente com oligonucleotídeo universal, *Eubacter* (Tabela 2). Dessa forma, foi realizada uma quantificação relativa destas bactérias em relação ao total de bactérias presentes na amostra de conteúdo ruminal.

Foi realizada a extração de DNA das amostras de líquido ruminal, utilizando o kit comercial QIAmp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN®), seguindo as recomendações do fabricante. Para a extração foram utilizados 200µL de amostra de líquido ruminal. Ao final da extração, foi adicionado 20µL de acetato e 440µL de etanol para posterior precipitação.

Na precipitação, o material foi centrifugado a 20.000 *xg* por 35 minutos (a 4°C). Em seguida, o conteúdo foi descartado cuidadosamente, e foi adicionado ao tubo 500 µL de etanol 75%. Este tubo foi homogeneizado, seguido por uma centrifugação a 7500*xg* por 5 minutos. Em sequência, o conteúdo foi descartado novamente, e os tubos mantidos invertidos por 15 minutos, para secar à temperatura ambiente. Terminada esta etapa, foi adicionado aos tubos 40µL de Tampão Tris-EDTA (TE), homogeneizados, e transferidos para banho-maria a 55°C por 10 minutos. Em seguida, estes tubos foram mantidos em gelo por 5 minutos (YU; MORRISON, 2004).

Terminada a precipitação, foi avaliada a qualidade e a quantidade de DNA extraído por meio de leitura em espectrofotômetro (Nanodrop 2000 – Thermo Scientific®). Em seguida, realizou-se a diluição das amostras de DNA extraído, com o intuito de deixá-las na mesma concentração de ácido nucleico.

Na sequência, foi retirado o volume de 5µL de cada amostra e transferido para um único microtubo, formando um *pool* utilizado como molde para uma reação de PCR com o intuito de se avaliar a eficiência de amplificação dos *primers* em diferentes diluições. Para tanto, fez-se uma diluição seriada a partir do *pool* (1000, 600, 300, 150, 50 e 25). O volume final da reação de PCR para cada amostra foi de 20µL, sendo 10µL de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems® - Life Technologies do Brasil), 1,2µL do primer *Forward*, 1,2µL do primer *Reverse*, 6,6µL de água MiliQ, e 1µL da amostra. Vale ressaltar que todas as

análises foram feitas em duplicata na placa de PCR, além do fato de que cada placa apresentava um negativo para controle da amplificação. A reação de PCR foi realizada no equipamento 7500 Real-Time PCR System ® (Applied Biosystems® - Life Technologies do Brasil). Foi realizada a análise dos resultados para determinar a melhor eficiência de amplificação. Assim, as amostras foram diluídas para 300 por apresentar boa eficiência.

Com a diluição adequada realizada, foi realizada a quantificação relativa (qPCR) das bactérias de interesse para todas as amostras referentes ao experimento. Ao término da qPCR, o *threshold* foi ajustado para os *primers* utilizados (*Eubacter* e bactéria alvo), definindo o limiar de detecção. Com os dados obtidos, fez-se a diferença dos valores de Ct obtidos entre o *Eubacter* e a bactéria alvo, gerando o dCT para cada amostra.

6.3.6 Análise estatística

Os dados foram analisados em um delineamento em Quadrado Latino utilizando-se o procedimento MIXED do SAS versão 9.2, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Levene. O modelo contemplou como causas de variação o efeito de tratamento e suas interações como fatores fixos, assim como o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diferentes momentos de coleta. Como fatores aleatórios incluídos no modelo têm-se efeito de quadrado, animal dentro de quadrado e período. Os graus de liberdade e testes foram ajustados usando a opção Kenward-Roger. Significância foi declarada à $P \leq 0,05$.

6.4 RESULTADOS

Os resultados referentes ao ecossistema ruminal foram analisados quanto ao nível de concentrado (60 ou 80%), quanto a digestibilidade da fibra (alta e baixa), e quanto ao tempo de coleta de conteúdo ruminal (Pré e Pós), assim como a interação entre os fatores descritos. Sendo assim, tais resultados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - População relativa de microrganismos ruminais em relação ao controle, em função dos níveis de concentrado na dieta (60% ou 80%) e da digestibilidade da fibra em detergente neutro (alta ou baixa DFND) da cana-de-açúcar

Variáveis	Tratamentos					Valor de P		
	Dieta 60% ¹		Dieta 80%		EPM ⁴			
	Baixa	Alta	Baixa	Alta				
	DFDN ²	DFDN ³	DFDN	DFDN	CON ⁵	DFDN ⁶	C*D ⁷	
<i>F. succinogenes</i>	1,00	1,92	0,82	0,52	0,58	0,02	0,74	0,06
<i>R. albus</i>	1,00	6,39	2,20	0,99	0,59	0,20	0,21	<0,01
<i>R. flavefaciens</i>	1,00	0,69	1,13	2,65	0,69	0,07	0,49	0,09
<i>S. bovis</i>	1,00	0,80	0,15	0,20	0,86	<0,01	0,94	0,57
<i>R. amylophilus</i>	1,00	0,64	1,44	1,43	0,48	0,07	0,47	0,37
<i>M. elsdenii</i>	1,00	0,48	1,64	1,76	1,71	0,25	0,38	0,29

Notas: ¹níveis de concentrado na dieta (60% ou 80%); ²baixa digestibilidade da fibra em detergente neutro; ³alta digestibilidade da FDN; ⁴erro padrão da média; ⁵efeito dos níveis de concentrado na dieta; ⁶efeito da digestibilidade da FDN; ⁷efeito da interação CON vs. DFDN; o tratamento Dieta 60% com baixa DFDN foi considerado como referência.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 8, houve tendência de efeito significativo para a interação entre o nível de concentrado na dieta e DFDN ($P=0,06$) para a *F. succinogenes*, onde a população deste microrganismo foi maior na cana de maior digestibilidade na dieta com 60% de concentrado quando comparado com a dieta 80%. Vale ressaltar que não ocorreu diferença significativa entre a cana de menor e maior digestibilidade na dieta com 80% de concentrado ($P=0,30$), conforme a figura 15.

Foi observado efeito significativo da interação entre o nível de concentrado na dieta e DFDN para a *R. albus* ($P<0,01$), onde a cana de maior digestibilidade aumentou a população de *R. albus* na dieta com 60% de concentrado, sendo que não houve diferença entre as digestibilidades de cana na dieta com 80% de concentrado ($P=0,18$). O resultado em questão pode ser observado na figura 16.

Figura 15 - População relativa de *F. succinogenes*, em função da digestibilidade da fibra e níveis de concentrado, normalizada para a cana de baixa DFDN na dieta com 60% de concentrado.

Figura 16 - População relativa de *R. albus*, em função da digestibilidade da fibra e níveis de concentrado, normalizada para a cana de baixa DFDN na dieta com 60% de concentrado.

Observa-se também que houve tendência de interação significativa entre a DFDN da cana-de-açúcar e o nível de concentrado na dieta para a *R. flavefaciens* ($P=0,09$), onde a cana com alta DFDN favoreceu o aumento da população deste microrganismo apenas na dieta com 80% de concentrado, conforme a figura 17.

Figura 17 - População relativa de *R. flavefaciens*, em função da digestibilidade da fibra e níveis de concentrado, normalizada para a cana de baixa DFDN na dieta com 60% de concentrado

Além destes resultados, o aumento de concentrado na dieta, de 60% para 80%, resultou em uma redução significativa na população de *S. bovis* ($P < 0,01$). Por outro lado, houve tendência de aumento da população de *R. amylophilus* ($P = 0,07$) em resposta ao aumento de concentrado na dieta. Não foram observados os efeitos de Dieta ou DFDN, nem a interação dentre estes fatores, sobre a população de *M. elsdenii* ($P > 0,10$).

Outros resultados importantes estão relacionados ao tempo de coleta de conteúdo ruminal realizado para o estudo em questão. Foi observado efeito de tempo para a *R. amylophilus* ($P < 0,01$), em que a população deste microrganismos foi maior no tempo de coleta Pós alimentação (Figura 18).

Com relação à *F. succinogenes*, houve efeito da interação entre a DFDN e o tempo de coleta de conteúdo ruminal (Pré e Pós alimentação), sendo que a população deste microrganismo foi maior na cana de maior digestibilidade quando comparada com a de menor digestibilidade no tempo pré ($P = 0,04$), sem diferenças entre as variedades de cana no pós ($P = 0,11$), conforme a figura 19.

Figura 18 - População relativa de *R. amylophilus*, em função do tempo de coleta de líquido ruminal, normalizada para o tempo de coleta Pré alimentação

Figura 19 - População relativa de *F. succinogenes*, em função da digestibilidade da fibra e do tempo de coleta do conteúdo ruminal, normalizada para a cana de baixa DFDN no tempo de coleta Pré alimentação

A bactéria consumidora de lactato, *M. elsdenii*, também apresentou a interação significativa entre a DFDN e o tempo de coleta de conteúdo ruminal ($P=0,05$), sendo que a população deste microrganismo foi maior na cana de maior digestibilidade no tempo pós quando comparado ao pré (Figura 20). Este microrganismo em questão também apresentou significância na interação entre o nível de concentrado na dieta e tempo de coleta de conteúdo

ruminal (0,04), onde a população de *M. elsdenii* foi maior na dieta com 80% de concentrado no tempo pós, não diferindo da dieta com 60% no mesmo tempo (0,71), conforme a figura 21. Com relação à dieta com 60% de concentrado, a população desta bactéria foi maior no tempo Pós quando comparado ao Pré ($P < 0,01$).

Figura 20 - População relativa de *M. elsdenii*, em função da digestibilidade da fibra e do tempo de coleta do conteúdo ruminal, normalizada para a cana de baixa DFDN no tempo de coleta Pré alimentação

Figura 21 - População relativa de *M. elsdenii*, em função dos níveis de concentrado e do tempo de coleta do conteúdo ruminal, normalizada para a dieta com 60% de concentrado no tempo de coleta Pré alimentação

6.5 DISCUSSÃO

A composição da dieta é um dos principais fatores que afetam a composição da microbiota ruminal, sendo que as bactérias fibrolíticas são sensíveis à mudança brusca de dieta, particularmente com relação ao nível de inclusão de concentrado (KOIKE et al., 2003; MOSONI et al., 2007). Com o aumento da concentração de carboidratos fermentáveis no rúmen, o crescimento microbiano é estimulado, resultando no aumento da taxa de fermentação ruminal. Entretanto, este aumento de concentrado na dieta resulta na queda do pH ruminal, devido à maior produção de AGCC, reduzindo a atividade das bactérias fibrolíticas e, conseqüentemente, prejudicando a digestibilidade da fibra (TAJIMA et al., 2001; NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). No presente estudo, o aumento da inclusão de concentrado na dieta reduziu a população da bactéria fibrolítica *Fibrobacter succinogenes*.

Esta redução da população de bactérias celulolíticas em resposta ao aumento do nível de inclusão de concentrado na dieta é consistente com dados reportados em vários trabalhos científicos (TAJIMA et al., 2001; WANAPAT; CHERDTHONG, 2009; FERNANDO et al., 2010; PETRI et al., 2012; SINGH et al., 2014).

Neste sentido, as características do rúmen como câmara de fermentação, em consequência das condições alimentares, podem influenciar no desenvolvimento dos microrganismos ruminais. O pH ruminal, juntamente com a natureza do substrato, fatores ambientais como temperatura, e a existência de cátions e carboidratos solúveis são alguns fatores que afetam a aderência das bactérias celulolíticas ao substrato (MIRON et al., 2001). Dentre estes fatores, o pH ruminal é um dos mais importantes, pelo fato das bactérias celulolíticas serem muito sensíveis à variação de pH (SUNG et al., 2007). As principais bactérias celulolíticas, como *F. succinogenes*, *R. albus* e *R. flavefaciens*, importantes na degradação da fibra, são sensíveis à baixos valores de pH. Estudos anteriores com microbiologia ruminal demonstram que as bactérias fibrolíticas tem predileção de crescimento em uma faixa de pH ruminal em torno de 6,2 (RUSSELL; DOMBROWSKI, 1980; WEIMER, 1993).

A qualidade do volumoso é um fator importante que afeta a ingestão e utilização da forragem, bem como por auxiliar na redução da inclusão de concentrado na dieta dos ruminantes (TAF AJ et al., 2005). Fibra de baixa digestibilidade, geralmente associada a alto grau de lignificação, resulta em baixa taxa de degradação e disponibilidade ruminal, levando a prolongado tempo de mastigação, reduzindo a taxa de passagem, digestibilidade total da fibra

e do consumo voluntário de volumoso. Esses efeitos da fibra sobre o processo digestivo também são influenciados pela quantidade e composição do concentrado incluso na dieta.

Para Tafaj et al. (2005), é esperado que uma quantidade moderada de concentrado na dieta possa aumentar a utilização da fibra pelo fato de fornecer melhor suprimento de matéria orgânica fermentável, energia e nitrogênio para as bactérias ruminais. Entretanto, com o aumento da fermentabilidade do concentrado no rúmen, o efeito depressivo do nível de concentrado sobre a digestibilidade da fibra aumenta. Dieta ricas em concentrado apresentam grande quantidade de CNF que são rapidamente degradados no rúmen, produzindo grande quantidade de AGCC em curto espaço de tempo (ALLEN, 1997) e, conseqüentemente, reduzindo o pH ruminal. Este baixo pH ruminal, juntamente com a competição por substratos, resulta na inibição de crescimento e atividade das bactérias fibrolíticas.

Aumentando o nível de inclusão de concentrado, mais açúcares, amido e outros carboidratos não-estruturais são consumidos, que por sua vez contribuem para maior produção de AGCC. Essa maior concentração de AGCC no rúmen contribuem para queda de pH e, conseqüentemente, proporciona a redução da quantidade e atividade das bactérias celulolíticas. Golder et al. (2012) descrevem que o fornecimento de uma dieta com grãos resultou em queda de pH ruminal e aumento nas concentrações de AGCC (acetato, propionato, butirato) quando comparado ao tratamento controle sem inclusão de grãos.

Ao contrários dos microrganismos fibrolíticos, as bactérias amilolíticas apresentam predileção por alimentos ricos em carboidratos e, assim, são mais tolerantes à queda de pH. O aumento de concentrado na dieta resulta em maior disponibilidade de carboidratos não fibrosos, como açúcares e amido, permitindo que bactérias amilolíticas (por exemplo, *Ruminococcus amylophilus*, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus spp.*) se proliferem, produzindo, conseqüentemente, quantidades excessivas de AGCC oriundos da fermentação (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003). Assim, justifica-se a maior população de *R. amylophilus* em resposta ao aumento de concentrado na dieta. Entretanto, no presente estudo, a população de *S. bovis* reduziu em resposta ao aumento de concentrado.

É importante ressaltar que o volumoso utilizado no presente projeto foi a cana-de-açúcar fornecida fresca, que por sua vez apresenta elevado teor de carboidratos solúveis (açúcares) em sua composição. Um fator que pode justificar esta redução da *S. bovis* com o aumento do teor de concentrado na dieta consiste na afinidade por parte da *S. bovis* por determinados substratos.

Golder et al. (2014) observaram que *S. bovis* se tornou mais prevalente em novilhas alimentadas com frutose em comparação ao amido e histidina, indicando que este

microrganismo, além de responder rapidamente às alterações na dieta, o mesmo pode apresentar maior afinidade pela sacarose do que pelo próprio amido, justificando a maior população deste microrganismos no tratamento com maior inclusão de cana-de-açúcar fresca.

Além do nível de inclusão de concentrado na dieta, a digestibilidade da fibra pode alterar o padrão de fermentação ruminal, modificando a composição da população microbiana ruminal.

As bactérias responsáveis pela degradação da fibra estão aqui representadas pelas espécies *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*, onde todas apresentaram crescimento no tratamento com cana fresca de alta DFDN, porém apenas *F. succinogenes* e *Ruminococcus albus* responderam positivamente a esta melhor digestibilidade apenas na dieta com 60% de concentrado.

Mesquita (2013) relatou que o CMS (kg/d) foi maior para os animais que receberam a dieta contendo o genótipo de cana com maior DFDN quando comparado com a de menor digestibilidade. A maior digestibilidade da FDN do genótipo de alta DFDN permite com que a fibra seja digerida de maneira mais rápida e, conseqüentemente, tenham um maior fluxo pelo sistema rúmen-retículo, aumentando a taxa de passagem e reduzindo o período de retenção ruminal, logo, o CMS foi maior (OBA; ALLEN, 1999). Por outro lado, a diminuição da digestibilidade da fibra reduz a atividade de bactérias celulolíticas, reduz a taxa de passagem, aumenta a retenção ruminal e, por conseguinte, reduz o CMS, prejudicando o desempenho produtivo do animal.

Outro ponto importante a ser discutido consiste no aporte de CNF na dieta, que pode alterar o padrão de fermentação e, por conseguinte, a população relativa dos microrganismos. Isso fica bem evidente nas diferenças observadas dentre as coletas de líquido ruminal, pré e pós alimentação, onde o aporte de substrato prontamente fermentescível tende a ser maior após alimentação. Além de sua complexidade, o rúmen é um sistema dinâmico, no qual os microrganismos ali presentes devem se adaptar continuamente às mudanças na composição da dieta, quantidade e frequência de alimentação (CALABRÒ et al., 2014).

Mosoni et al. (2007) relataram a diminuição da população de *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens* 3 horas após alimentação, em ovelhas alimentados com uma dieta com relação volumoso:concentrado 50:50. Já Singh et al. (2014) relataram que a população de *R. flavefaciens* e *F. succinogenes* apresentou tendência de ser menor 2 horas após a alimentação. Do mesmo modo, a população de *R. amylophilus* foi maior no jejum (0 horas após a alimentação), enquanto que a *Selenomonas ruminantium*, uma consumidora de lactato, foi maior 2 horas após alimentação.

No presente estudo, a população de *M. elsdenii* apresentou comportamento semelhante, sendo que foi maior após alimentação nos animais recebendo a dieta com 80% de concentrado, e contendo cana-de-açúcar com alta DFDN. Mesquita (2013) relataram que apesar do maior consumo de FDN e de NDT na dieta contendo o genótipo de alta DFDN, que poderia limitar o CMS desse tratamento seja por efeito de físico de enchimento ou por saciedade metabólica, não prejudicou o consumo destes animais recebendo esta dieta.

Como descrito anteriormente, pelo fato de se tratar de uma bactéria consumidora de lactato, a justificativa para maior população de *M. elsdenii* neste tratamento com 80% de concentrado, contendo cana de alta DFDN, após a alimentação pode ser atribuído ao maior aporte de CNF, elevando a taxa fermentativa e, consequentemente, levando ao acúmulo de lactato. Assim, este microrganismo em questão estaria auxiliando no controle do pH ruminal, consumindo este lactato e evitando o acúmulo do mesmo no ambiente ruminal. Da mesma forma, a população de *R. amylophilus* foi maior após a alimentação, justamente em resposta ao aporte de CNF. Já a bactéria *F. succinogenes* respondeu positivamente à dieta com cana de alta DFDN, cuja população foi maior neste tratamento antes da alimentação.

6.6 CONCLUSÕES

O aumento da inclusão de concentrado na dieta, de 60% para 80%, reduziu a população da bactéria celulolítica *F. succinogenes*, ao passo que aumentou a população de *R. amylophilus*. Entretanto, este aumento de concentrado ocasionou a redução da população de *S. bovis*, contrariando as hipóteses.

O fornecimento de cana-de-açúcar de maior digestibilidade favoreceu o crescimento de bactérias fibrolíticas, *F. succinogenes* e *R. albus*, justamente na dieta com 60% de concentrado, resultando em melhora do desempenho animal. Vale ressaltar que a *R. flavefaciens* também respondeu positivamente ao fornecimento de cana de melhor qualidade, porém aumentando sua população na dieta com 80% de concentrado.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1447-1462, 1997.
- BETT, V. **Grãos de girassol em rações para vacas leiteiras**. 2002. 115 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- BOIN, C.; TEDESCHI, L.O. Cana-de-açúcar na alimentação de gado de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 5., 1993, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1993. p.107-126.
- CALABRÒ, S.; CUTRIGNELLI, M. I.; GONZALEZ, O. J.; CHIOFALO, B.; GROSSI, M.; TUDISCO, R.; PANETTA, C.; INFASCELLI, F. Meat quality of buffalo young bulls fed Faba bean as protein source. **Meat Science**, v. 96, p. 591–596, 2014.
- FERNANDO, S. C.; PURVIS II, H. T.; NAJAR, F. Z.; SUKHARNIKOV, L. O.; KREHBIEL, C. R.; NAGARAJA, T. G.; ROE, B. A.; DESILVA, U. Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet. **Applied and Environmental Microbiology**, Oklahoma, v. 76, n. 22, p.7482-7490, 2010.
- FREITAS, A. W. P.; PEREIRA, J. C.; ROCHA, F. C.; DETMANN, E.; BARBOSA, M. H. P.; RIBEIRO, M. D.; COSTA, M. G. Avaliação da divergência nutricional de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 229-236, 2006.
- GOLDER, H. M.; CELI, P.; RABIEE, A. R.; HEUER, C.; BRAMLEY, E.; MILLER, S. W.; KING, R.; LEAN, I. J. Effects of grain, fructose and histidine on ruminal pH and fermentation products during an induced subacute acidosis protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1971–1982, 2012.
- GOLDER, H. M.; DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C.; CELI, P.; LEAN, I. J. Ruminal bacterial community shifts in grain-, sugar-, and histidine-challenged dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 5131–5150, 2014.
- KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, p. 361–366, 2001.
- MESQUITA, B. S. **Efeito da digestibilidade da fibra da cana de açúcar e do nível de concentrado sobre o desempenho de tourinhos nelore em terminação**. 2013. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.
- MIRON, J.; BEN-GHEDALIA, D.; MORRISON, M. Invited review:adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1294–1309, 2001.

MOSONI, P.; DURAND, F. C.; MAILLET, C. B.; FORANO, E. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. **Applied Microbiology**, v. 103, p. 2676–2685, 2007.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. E17–E38, 2007. Supplement 1.

OBA, M.; ALLEN, S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: Effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 589–559, 1999.

PEREIRA, E. S.; QUEIROZ, A. C.; PAULINO, M. F.; CECON, P. R.; VALADARES FILHO, S. C.; MIRANDA, L. F.; ARRUDA, A. M. V.; FERNANDES, A. M.; CABRAL, L. S. Fontes nitrogenadas e uso de *Sacharomyces cerevisiae* em dietas à base de cana-de-açúcar para novilhos: consumo, digestibilidade, balanço nitrogenado e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 563-572, 2001.

PETRI, R. M.; FORSTER, R. J.; YANG, W.; MCKINNON, J. J.; MCALLISTER, T. A. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. **Journal of Applied Microbiology**, Canada, v. 112, p. 1152-1162, 2012.

RUSSELL, J. R.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 604-610, 1980.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; GIBB, D. J.; CREWS, D. H.; HICKMAN, D. D.; STREETER, M.; MCALLISTER, T. A. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 149-158, 2003.

SINGH, K. M.; PANDYA, P. R.; TRIPATHI A. K.; PATEL, G. R.; PARNERKAR, S.; KOTHARI, R. K.; JOSHI, C. G. Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. **Meta Gene**, 2, p. 191–199, 2014.

SUNG, H. G.; KOBAYASHI, Y.; CHANG, J.; HA, A.; HWANG, H.; HA, J. K. Low ruminal pH reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 20, p. 200–207, 2007.

TAF AJ, M.; KOLANECI, V.; JUNCK, B.; MAULBETSCH, A.; STEINGASS, H.; DROCHNER, W. Influence of Fiber Content and Concentrate Level on Chewing Activity, Ruminal Digestion, Digesta Passage Rate and Nutrient Digestibility in Dairy Cows in Late Lactation. Asian-Aust. **Journal of Animal Science**, v. 18, n. 8, p. 1116-1124, 2005.

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, p. 2766–2774, 2001.

WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A. Use of real-time PCR technique in studying rumen cellulolytic bacteria population as affected by level of roughage in swamp buffalo. **Current Microbiology**, v. 58, p. 294–299, 2009.

WEIMER, P. J. Effects of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose fed continuous culture. **Archives of Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 288-294, 1993.

YU, Z.; MORRISON, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. **BioTechniques**, v. 36, p. 808-812, 2004.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base em todos os resultados obtidos no presente estudo, a dieta exerce grande influência na composição de populações dos microrganismos ruminais, alterando o padrão de fermentação em função das características da dieta e, conseqüentemente, influenciando o desempenho animal. Dessa forma, conclui-se que o desempenho animal pode ser explicado pela modulação da população de microrganismos ruminais por meio da composição da dieta.

8 IMPLICAÇÕES

A composição da dieta é um fator extremamente importante nas mudanças da população bacteriana do rúmen e a compreensão do impacto da mudança da dieta sobre estes microrganismos pode influenciar diretamente sobre a saúde e produtividade animal. A elucidação dos mecanismos pelos quais o excesso de fermentação ruminal de carboidratos não fibrosos leva à queda da digestibilidade da fibra e a acidose ruminal, bem como das principais populações afetadas, auxiliará no desenvolvimento de técnicas para manutenção da função ruminal, como uso de probióticos, processamento do amido, ionóforos e vacinas contra microrganismos ruminais indesejados.

O presente estudo apresenta informações importantes no que diz respeito ao entendimento dos fatores que interferem na composição da microbiota ruminal. Entretanto, se torna imprescindível a realização de mais estudos nesta área de pesquisa, principalmente quando se leva em consideração a complexidade do ambiente ruminal, e as possíveis interações entre os microrganismos. No estudo em questão, avaliamos bactérias ruminais consideradas principais quanto à fermentação ruminal, mas deve-se levar em consideração a possibilidade de existir outros microrganismos ruminais ainda desconhecidos, que podem exercer influência no aproveitamento da dieta.

De fato, esta linha de pesquisa apresenta grande potencial para a geração de conhecimentos na nutrição de ruminantes, pois possibilita o entendimento acerca do modo de ação dos diferentes microrganismos em diferentes condições alimentares, e assim, permitindo a adoção de estratégias de manipulação da fermentação ruminal para situações específicas. Entretanto, uma das grandes limitações desta técnica da biologia molecular está relacionada ao custo associado a tal análise, que por sua vez é alto, e desta forma o planejamento deve ser bem elaborado para que tais procedimentos possam ser executados de forma adequada.