VARIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS, BACTERIAS E FUNGOS EM
BOVINOS SUBMETIDOS À DIETA DE CANA-DE-AÇÚCAR SUPLEMENTADA COM
CAROÇO DE ALGODÃO.

GILVÂNIA CORRÊA CLÍMACO

Farm./ Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. WILSON R. S. MATTOS

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiróz", da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Agronomia, Área de
concentração: Ciência animal e Pastagens.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Março - 1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - FCLQ/USP

C639v Clímaco, Gilvânia Corrêa
Variação da população de protozoários, bactérias e fungos
em bovinos submetidos à dieta de cana-de-açúcar suplementada com
caroço de algodão. Piracicaba, 1992.
101p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bovino - Dieta 2. Cana-de-açúcar para bovino - Dieta
3. Caroço de algodão para bovino - Dieta 4. Microrganismo em bovi
no - População - Efeito da dieta I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 636.2084

VARIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS, BACTÉRIAS E FUNGOS EM BOVINOS SUBMETIDOS À DIETA DE CANA-DE-AÇÚCAR SUPLEMENTADA COM CAROÇO DE ALGODÃO.

GILVÂNIA CORRÊA CLÍMACO

Aprovada em : 17.03.93

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Wilson Roberto Soares Mattos ESALQ/USP

Prof. Dr. Celso Boin ESALQ/USP

Dr. Luiz Januário Magalhães Aroeira EMBRAPA/CNP-GL

Prof. Dr. Wilson Roberto Soares Mattos

Orientador

"Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como sino que tine. E ainda que tivesse o dom de profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria".

Coríntios, cap. 13, 1:2.

Aos meus pais
Cleveland e Irene

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Wilson R. S. Mattos pela amizade e orientação na condução do presente trabalho.
- Ao Prof. Irineu H. Packer pela dedicada atenção e amizade.
- Ao Prof. Celso Boin pelas sugestões.
- Ao Prof. Burk A. Dehority pela valiosa contribuição na condução do experimento.
- Aos estagiários: Denise, Lucila, Adriana, Jane e Aurélio na condução do trabalho.
- À João Elias pela colaboração na composição gráfica da tese.
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa pela concessão da bolsa de estudo.
- À todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Efeitos dos lipídeos no rúmen	4
2.2. Estabelecimento da população microbiana no rúmen	12
2.3. Microrganismos do rúmen	17
2.3.1. Fungos	18
2.3.1.1. Espécies e características dos fungos	19
2.3.1.2. Fermentação de carboidratos	22
2.3.1.3. Atividade proteolítica dos fungos	24
2.3.1.4. Influência da dieta na população dos fungos	26
2.3.1.5. Interação dos fungos com outros microrganismos	27
2.3.2. Bactérias	30
2.3.3. Protozoários	37

2.3.3.1 Importância dos protozoários pa-	
ra o animal ruminante	39
2.4. Método do número mais provável (MPN)	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1. Animais e Instalações Experimentais	48
3.2. Tratamentos e Delineamento Experimental	48
3.3. Amostragem e Inoculação	50
3.3.1. Meios de cultura	51
3.3.1.1. Solução de Na_2CO_3 12%	53
3.3.1.2. Soluções de cisteína.Hcl 3%	53
3.3.1.3. Solução de minerais	54
3.3.1.4. Solução de antibiótico	54
3.3.1.5. Rezarsurina 0,1%	55
3.3.1.6. Solução heme 0,1%	55
3.3.1.7. Solução de diluição anaeróbica	
(ADS)	55
3.4. Obtenção dos resultados	56
3.5. Análise Estatística	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5. CONCLUSÕES	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICE	97

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Relação entre o número de fungos totais, em log, e o nível de caroço de algodão	70
2. Relação entre o número de bactérias totais, em log, e o nível de caroço de algodão	71
3. Relação entre o número de protozoários ciliados totais, em log, e o nível de caroço de algodão . . .	72
4. Relação entre o número de protozoários do gênero <i>Entodinium</i> , em log, e o nível de caroço de algodão .	73
5. Relação entre o número de protozoários do gênero <i>Iso-tricha</i> , em log, e o nível de caroço de algodão . .	74
6. Relação entre o número de protozoários do gênero <i>Dasytricha</i> , em log, e o nível de caroço de algodão .	75
7. Relação entre o número de protozoários do gênero <i>Epidinium</i> , em log, e o nível de caroço de algodão . . .	76

8. Relação entre o número de protozoários do gênero *Diplodinium*, em log, e o nível de caroço de algodão. 77

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Páginas
1. Características de algumas espécies de bactérias do rúmen	32
2. Propriedades dos compartimentos no modelo de quatro compartimentos do rúmen	36
3. Números de protozoários do rúmen	37
4. Composição da ração	49
5. Média percentual da composição bromatológica das rações fornecidas nas quatro dietas	49
6. Esquema do delineamento em quadrado latino	50
7. Composição do meio de cultura para fungos	52
8. Composição do meio de cultura para bactérias.	53
9. Composição da Solução de Diluição Anaeróbica (ADS)	56
10. Média das populações microbianas observadas/ml de con	

teúdo ruminal	59
11. Média dos cinco gêneros de protozoários/ml de conteúdo ruminal nas dietas	66

LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

Tabelas	Páginas
1. Valor calculado da população de protozoários cilia- dos no rúmen do animal 1	97
2. Valor calculado da população de protozoários cilia- dos no rúmen do animal 2	97
3. Valor calculado da população de protozoários cilia- dos no rúmen do animal 3	98
4. Valor calculado da população de protozoários cilia- dos no rúmen do animal 4	98
5. Valores estimados para a população de bactérias totais do rúmen	99
6. Valores estimados para a população de fungos totais do rúmen	99
7. População média (log) de microrganismos do rúmen . .	99
8. População média (log) dos cinco gêneros de protozoá- rios do rúmen	100
9. Média das percentagens das populações dos gêneros dos	

protozoários 100

10. Grau de extrato etéreo nas dietas na base seca . . 101

VARIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS, BACTÉRIAS E FUNGOS EM BOVINOS SUBMETIDOS À DIETA DE CANA-DE-AÇÚCAR SUPLEMENTADA COM CAROÇO DE ALGODÃO

Autora: GILVÂNIA CORRÊA CLÍMACO

Orientador: Prof. Dr. WILSON R. S. MATTOS

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da adição de caroço de algodão em dietas a base de cana-de-açúcar sobre a população de protozoários, bactérias e fungos do rúmen de bovinos. Quatro vacas providas de cânulas ruminais foram usadas em um delineamento em quadrado latino 4x4. As populações de bactérias e fungos totais foram quantificadas utilizando um método de diluições decimais da amostra (Método do número mais provável - MNP), e a população de protozoários, através de contagem direta.

A dieta foi constituída por 66,3% de volumoso (base seca) . Os tratamentos consistiram de níveis crescentes de substituição de farelo + casca de algodão por caroço de algodão mantendo-se um nível de 30% de concentrado (base seca) nas dietas. Os níveis de caroço de algodão foram : 0,

10, 20 e 30% (Tratamentos: T_0 , T_1 , T_2 e T_3 , respectivamente).

Os resultados indicaram que houve efeito dos tratamentos sobre o crescimento das populações dos microrganismos do rúmen. Os valores estimados para fungos totais foram os seguintes: $131,5 \times 10^2$; $150,75 \times 10^2$; $226,67 \times 10^2$ e $14,0 \times 10^2$ /ml de conteúdo ruminal nos tratamentos T_0 , T_1 , T_2 e T_3 , respectivamente. As análises dos dados desses microrganismos mostraram uma resposta quadrática e o valor máximo calculado foi a 12% de caroço de algodão.

As contagens das bactérias totais do rúmen apresentaram a mesma tendência das contagens para fungos totais. A população máxima calculada foi alcançada a 22% de caroço de algodão na matéria seca da ração. As análises dos seus dados apresentaram, dessa forma, uma regressão do tipo quadrática. Os valores encontrados nos tratamentos foram: $109,5 \times 10^6$; $228,25 \times 10^6$; $2150,0 \times 10^6$ e $717,5 \times 10^6$ /ml de conteúdo ruminal nos tratamentos T_0 , T_1 , T_2 e T_3 , respectivamente.

A população dos protozoários ciliados totais do rúmen teve seu número reduzido com o aumento dos níveis de caroço de algodão adicionados à dieta. Os números para sua população obtidos em contagem direta foram: $T_0 = 18,09 \times 10^4$, $T_1 = 12,64 \times 10^4$, $T_2 = 7,12 \times 10^4$ e $T_3 = 3,94 \times 10^3$ /ml de conteúdo ruminal. Os gêneros observados neste trabalho foram *Entodinium*, *Diplodinium*, *Isotricha*, *Dasytricha* e *Epidinium*.

Entodinium, que prevaleceu em todos os tratamentos,

apresentou um decréscimo com o aumento dos níveis de caroço de algodão ($T_0 = 15,5 \times 10^4$, $T_1 = 7,07 \times 10^4$, $T_2 = 3,56 \times 10^4$ e $T_3 = 3,08 \times 10^4$ / ml) . A participação percentual deste gênero foi de: 86,6; 56,5; 49,6; 76,2% nos tratamentos T_0 , T_1 , T_2 e T_3 , respectivamente. A população de *Isotricha* apresentou uma resposta quadrática ($T_0 = 0,27 \times 10^4$, $T_1 = 0,64 \times 10^4$, $T_2 = 0,40 \times 10^4$ e $T_3 = 0,16 \times 10^4$ / ml de conteúdo ruminal), sendo a concentração máxima dos valores calculados encontrados a 16% de caroço de algodão. Os *Dasytricha* responderam de forma semelhante aos *Isotricha* quando foi adicionado caroço de algodão na ração. Este gênero de protozoário alcançou população máxima calculada a 14% de suplementação ($T_0 = 0,37 \times 10^4$, $T_1 = 2,78 \times 10^4$, $T_2 = 1,77 \times 10^4$ e $T_3 = 0,11 \times 10^4$ /ml de conteúdo ruminal). Os *Diplodinium* apresentaram uma concentração máxima dos valores calculados ao nível de 10% de suplementação. Os valores observados foram os seguintes: $1,89 \times 10^4$; $1,80 \times 10^4$, $1,88 \times 10^4$ e $0,55 \times 10^4$ /ml nos tratamentos T_0 , T_1 , T_2 e T_3 , respectivamente. Os *Epidinium* foram os protozoários observados em menores quantidades em todos os tratamentos ($T_0 = 0,06 \times 10^4$, $T_1 = 0,36 \times 10^4$, $T_2 = 0,13 \times 10^4$ e $T_3 = 0,04 \times 10^4$ /ml de conteúdo ruminal). Foi obtido um aumento de quase 6 vezes no tratamento T_1 em relação à ração controle. A máxima população calculada para este gênero foi no nível de 11% de caroço de algodão.

VARIATIONS OF PROTOZOA, BACTERIA AND FUNGI POPULATIONS IN
COWS FED SUGARCANE BASED DIETS SUPPLEMENTED WITH WHOLE
COTTONSEED.

Author: GILVÂNIA CORRÊA CLÍMACO

Adviser: WILSON R. S. MATTOS

SUMMARY

This work had the objective to evaluate the effect of whole cottonseeds (WCS) to addition sugarcane based diets on protozoa, bacteria and fungi populations. Four adult cannulated cows were used, in a 4x4 Latin square design. Total bacteria and fungi were determined by the use of a sample decimal dilution method (Most Probable Number - MPN) and the total protozoa was determined by direct count.

The diets contained 66.3% of roughage (dry matter basis). Treatments consisted in diets with increasing levels of WCS replacing cottonseed meal + cottonseed hulls (0, 10, 20 e 30%, for treatments T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , respectively). The concentrate level was maintained at 30% (dry matter basis).

Treatments showed as effect on the growth of rumen

microorganisms population. In the counts to total fungi population was: $131,5 \times 10^2$; $150,75 \times 10^2$; $226,67 \times 10^2$ e $14,0 \times 10^2$ / ml ruminal contents. These microorganisms reaching the maximum calculated population at the 12% level of WCS analyses of the datas showed a quadratic response.

The total bacteria count showed a trend similar to the one obtained for fungi. The results for total rumen bacteria showed a quadratic response ($T_0 = 109,5 \times 10^6$; $T_1 = 228,25 \times 10^6$; $T_2 = 2150,0 \times 10^6$ e $T_3 = 717,5 \times 10^6$ / ml ruminal contents). The greatest calculated population was at the 22% level of WCS.

The ciliate population was decreased as diet WCS level was increased ($T_0 = 18,09 \times 10^4$; $T_1 = 12,64 \times 10^4$; $T_2 = 7,12 \times 10^4$ e $T_3 = 3,94 \times 10^4$ / ml ruminal contents). The genus observed in this work were *Entodinium*, *Diplodinium*, *Isotricha*, *Dasytricha* and *Epidinium*.

Entodinium, the prevalent species in all diets, showed a decrease in population as the WCS level increased ($T_0 = 15,5 \times 10^4$; $T_1 = 7,07 \times 10^4$; $T_2 = 3,56 \times 10^4$ e $T_3 = 3,08 \times 10^4$ / ml ruminal contents). The percentage for this genera for T_0 , T_1 , T_2 and T_3 was: 86.6, 56.5, 49.6 and 76.2, respectively. The *Isotricha* population showed a quadratic response with the utilization of the differents levels of WCS. The maximum calculated population was obtained at the 16% level of WCS ($T_0 = 0,27 \times 10^4$; $T_1 = 0,64 \times 10^4$; $T_2 = 0,40 \times 10^4$ e $T_3 = 0,16 \times 10^4$ / ml ruminal contents). The *Dasytricha* population showed

a similar pattern of response at *Isotricha* to the supplementation, reaching the maximum calculated population at the 14% level. The *Diplodinium* population showed a maximum calculated concentration at the 10% level of supplementation. The observed values in the treatments was: $T_0 = 1,89 \times 10^4$; $T_1 = 1,80 \times 10^4$; $T^2 = 1,88 \times 10^4$ e $T_3 = 0,55 \times 10^4$ /ml ruminal contents). These microorganisms showed a quadratic regression. *Epidinium* was the species found in smallest numbers for all diets. A six fold increase was obtained with T_1 when compared to the control diet. The maximum calculated population was at the 11% of the WCS supplementation.

1. INTRODUÇÃO

Grandes avanços vem sendo feitos na nutrição animal com o estudo de compostos ou substâncias que controlam o metabolismo objetivando aumentar a produção dos animais. Na tentativa de se evitar a competição por alimento entre o homem e os animais, vem sendo pesquisada com bastante frequência, a utilização de resíduos agrícolas que não são potencialmente utilizáveis pelo homem.

Em países desenvolvidos, o progresso genético alcançado em termos de produção de leite nas últimas décadas, tem sido elevado. Para estes animais atenderem as suas necessidades de energia, tem-se recorrido cada vez mais a alimentos ricos em carboidratos não estruturais. Uma série de problemas associados a este procedimento tem ocorrido com frequência em alguns rebanhos leiteiros como: aumento na incidência de acidose, timpanismo, deslocamento de abomaso, laminites. Dessa forma, o uso de lipídeos vem aumentando devido a uma maior demanda de energia de animais com alto mérito genético, a um maior conhecimento da prática de alimentação e a um aumento na disponibilidade de suplementos de gordura e/ou lipídeos.

O fornecimento de lipídeos na dieta reduz o incremento calórico da mesma. Em função do baixo incremento calórico, uma dieta contendo caroço de algodão integral pode garantir um suprimento adequado de energia, para vacas de alta produção.

A prática de utilização do caroço de algodão integral, tem-se tornado uma alternativa interessante para a alimentação de bovinos leiteiros por se tratar de um alimento rico em fibra, proteína e energia, pois a maioria dos alimentos ricos em energia são relativamente baixos em fibra. Há evidências de que os lipídeos dietéticos causam extensas modificações na fermentação do rúmen com reduções na degradação da fibra, com consequente alteração na população de microrganismos. Torna-se importante o estudo sobre as alterações nas populações destes microrganismos, principalmente porque todas as informações a respeito da quantidade e composição da população microbiana do rúmen, são obtidas de trabalhos realizados no exterior sob condições, muitas vezes, diferentes das condições do nosso país.

Devido à disponibilidade da cana-de-açúcar coincidir com o período de paralização do crescimento das demais forrageiras tropicais, esta cultura é muito utilizada na dieta destes animais, sendo, desta forma, o volumoso escolhido.

Em vários trabalhos cuja dieta era rica em volumoso representado pela cana-de-açúcar, que assegura uma população

mista de protozoários ciliados, a família ISOTRICHIDAE prevaleceu em termos de massa microbiana. A taxa de passagem dos protozoários, de uma forma geral, é menor que a taxa de passagem do alimento; assim sendo, em dietas à base de cana-de-açúcar, uma população alta destes microrganismos poderá acarretar uma perda de nitrogênio para o animal hospedeiro.

Dentre as características já destacadas do caroço de algodão e dos lipídeos assegurar uma redução nos números dos protozoários, este trabalho tem por objetivo verificar a variação das populações de protozoários e bactérias totais do rúmen com este alimento em dieta de cana-de-açúcar. Além disto, os fungos, pela sua possível importância no rúmen, vem despertando a atenção de profissionais da área como um novo grupo produtor de celulase, sendo importante incluir as alterações de suas populações em trabalhos que estudam os efeitos de diferentes alimentos na dinâmica dos microrganismos do rúmen.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Efeitos dos lipídeos no rúmen

Suplementos lipídicos na dieta são conhecidos por causarem grandes modificações na fermentação ruminal. Essas modificações incluem: redução na digestão da fibra e matéria orgânica, diminuição da concentração de amônia (PALMQUIST e JENKINS, 1980; IKWUEGBU e SUTTON, 1982), redução no número de protozoários (CZERKAWSKI et al, 1975; IKWUEGBU e SUTTON, 1982; SUTTON et al, 1983), aumento no número de bactérias (HENDERSON, 1973; CZERKAWSKI et al, 1975; LEGAY-CARMIER e BAUCHART, 1989), diminuição na proporção molar de acetato e butirato e aumento na proporção molar de propionato, sem alteração da concentração dos ácidos graxos voláteis totais ou AGV (IKWUEGBU e SUTTON, 1982; SUTTON et al, 1983; MOHAMED et al, 1988). Embora CZERKAWSKI et al (1975) e SUTTON et al (1975) tenham observado uma diminuição na concentração total de AGV.

O principal e consistente efeito dos ácidos graxos de cadeia longa no rúmen fornecidos pelo alimento, é a inibição da metanogênese Czerkowski et al (1966a, 1966b, 19966c),

citados por HENDERSON (1973). Segundo os autores citados, existe efeito com ácidos graxos saturados de cadeia longa e o mesmo aumenta com o aumento do número de duplas ligações.

Quanto aos efeitos sobre digestibilidade, em 1954, BROOCKS et al notaram uma depressão na digestibilidade da celulose e da proteína em ovinos alimentados com dietas ricas em volumoso contendo 3,2 a 6,4% de óleo de milho.

Sobre os efeitos sobre a síntese de proteína e de lipídeos pelos microrganismos do rúmen, CZERKAWSKI et al (1975) sugeriram que o óleo livre adicionado à dieta pode provocar alterações nestas sínteses. Segundo estes autores estas alterações, provavelmente, são devido à redução da digestão da matéria orgânica. Sendo assim, SUTTON et al (1983) trabalharam com dietas suplementadas com óleos livres e protegidos e observaram uma considerável depressão na digestão da matéria orgânica causada pelos óleos livres, concordando com trabalhos anteriores de CZERKAWSKI et al (1975). Knight et al (1978) e Kowalczyk et al (1977), citados por SUTTON et al (1983), também observaram uma redução na digestão da matéria orgânica pelo óleo livre. Os mesmos autores, porém, observaram uma redução do efeito depressivo na digestão quando forneceram óleo na forma protegida. O principal fator limitante da quantidade de lipídeos que podem ser adicionados em dietas de ruminantes, é portanto a depressão da digestão no rúmen.

IKWUEGBU e SUTTON (1982) trabalharam com diferentes

níveis de óleo de linhaça e relataram que o grau da depressão na digestão da matéria orgânica no rúmen estava relacionado com a quantidade de óleo livre incluído na dieta. Confirmando PALMQUIST e JENKINS (1980). Esses autores relataram que a gordura adicionada deve ser usada em quantidades limitadas em virtude de seu efeito inibitório sobre a atividade microbiana do rúmen. Um nível de 3 a 5% pode ser adicionado em dietas de vacas em lactação favorecendo o aumento do consumo de energia de vacas de alta produção.

Devendra e Lewis (1974), citados por PALMQUIST e JENKINS (1980), resumem quatro teorias para explicar a redução na digestibilidade da fibra em dietas suplementadas com lipídeos: 1. Cobertura física da fibra com lipídeos impedindo o ataque microbiano; 2. Modificação da população microbiana do rúmen, possivelmente à partir do efeito tóxico dos ácidos graxos dos lipídeos sobre certos microrganismos; 3. Inibição da atividade microbiana a partir dos efeitos dos ácidos graxos sobre a superfície ativa da membrana celular; 4. Redução na disponibilidade de cátions a partir da formação de complexos insolúveis com ácidos graxos de cadeia longa, ou indiretamente por afetar o pH.

A redução na digestibilidade da fibra devido a ingestão de lipídeos, pode, segundo PALMQUIST e JENKINS (1980), ser revertida pela adição de cátions à dieta. Sabe-se que a suplementação de cálcio aumenta a digestibilidade das fibras em dietas com alto teor de lipídeos por formar sabões

insolúveis. Estes, removem os ácidos graxos da solução tornando-os menos disponíveis para "intoxicarem" os microrganismos do rúmen. PALMQUIST (1989) sugere uma suplementação na dieta de 0,9% de cálcio e 0,3% de magnésio para corrigir os efeitos inibitórios dos lipídeos no rúmen.

Outro efeito dos lipídeos na dieta de bovinos, foi observado por SAW e ENSOR (1959), IKWUEGBU e SUTTON (1982) e SUTTON et al (1983). Eles notaram que quando as gorduras cujas composição continham ácidos graxos de cadeia longa eram adicionados, a relação acetato:propionato era reduzida, havendo assim, uma depressão na produção da gordura do leite. Esses autores não observaram alteração na concentração total de AGV pela suplementação de óleo, mas as proporções molares de acetato e butirato decresceram e a de propionato aumentou, em maiores concentrações de óleo na dieta.

O caroço de algodão integral, rico em ácido linoleico ($C_{18}:2$), tem despertado a atenção dos pesquisadores pelo fato de ser um resíduo agrícola rico em fibra, proteína e energia tornando, assim, uma medida alternativa interessante para a alimentação de bovinos leiteiros. A adição de gordura suplementar permite a formulação de dietas com menores concentrações de amido, com maiores concentrações de cálcio, mantendo-se um nível adequado de fibra.

Tem sido observado alterações no teor de gordura do leite em dietas contendo gordura suplementar. SMITH et al (1981) observaram aumento nestes teores com os níveis

de 15 e 25% de suplementação de caroço de algodão. MOHAMED et al (1988) encontraram uma redução no percentual da gordura do leite com adição de óleo livre. Outros autores, trabalhando com caroço de algodão, não encontraram alteração no percentual de gordura (ANDERSON et al, 1979; LINDSEY et al, 1980; HAWKINS et al, 1985). Segundo MOHAMED et al (1988), as formas como os lipídeos são fornecidos nas rações de gado leiteiro parecem determinar os efeitos sobre o teor de gordura do leite. PALMQUIST e JENKINS (1980) sugerem que a enzima acetil CoA carboxilase é inibida por ácidos graxos insaturados de cadeia longa, um fator que pode causar redução no teor de gordura do leite. Também a ingestão de baixa quantidade de fibra, bem como a redução em sua digestibilidade pela ingestão de ácidos graxos poliinsaturados, podem causar um decréscimo na proporção acetato:propionato, produzidos no rúmen, como já discutido anteriormente. Proporções entre C2:C3 menores que 3:1 podem ser responsáveis pela redução no teor de gordura do leite.

O aumento na proporção molar do propionato, além de ser devido a redução no número de protozoários, pode ser também devido a baixa sensibilidade que as bactérias gram negativas apresentam aos ácidos graxos, já que no trabalho de HENDERSON (1973), das cinco cepas de bactérias gram negativas testadas, quatro não foram afetadas pela presença de ácidos graxos e todas contribuíram para a produção de propionato diretamente, ou indiretamente através da produção de succinato que é

descarboxilado para propionato. Parece certo, todavia, que os efeitos dos ácidos graxos sobre os microrganismos dependerá de sua taxa de hidrólise (IKWUEGBU e SUTTON, 1982).

Há muito tem sido observado o efeito dos lipídeos sobre a população microbiana do rúmen. Os protozoários são severamente reduzidos em número quando a concentração de óleo é aumentada na dieta; em níveis mais elevados, são quase que completamente eliminados (PURSER e MOIR, 1966; CZERKAWSKI et al, 1975; IKWUEGBU e SUTTON, 1982). É provável que a ausência de protozoários contribuía para a redução na digestão da fibra e na alteração da eficiência da síntese de proteína bacteriana (DEMEYER, 1981). Logo, a síntese de proteína pela população de bactérias do rúmen dependerá, de um balanço entre um aumento na síntese (devido a defaunação) e um decréscimo (devido ao efeito tóxico do agente, no caso ácido graxo) no metabolismo das bactérias.

Devendra e Lewis (1974), citados por SUTTON et al (1983) demonstraram um aumento no fluxo diário do nitrogênio total na digesta duodenal em dietas suplementadas com óleo, provavelmente devido a uma redução do número de protozoários. IKWUEGBU e SUTTON (1982) encontraram um aumento no fluxo de nitrogênio para o duodeno de 50% quando 39g de óleo foram adicionadas por kg de dieta; para uma quantidade maior (60g/kg), o aumento foi menor. A concentração de amônia no rúmen e duodeno tendeu a reduzir-se quando maiores concentrações de óleo foram fornecidas.

A população de bactérias do rúmen também sofre alterações quando dietas são suplementadas com diferentes níveis de lipídeos. CZERKWASKI et al (1975) trabalharam com os níveis de 30, 60 e 90g de óleo de linhaça/animal/dia e observaram um aumento considerável e com posterior decréscimo na população de bactérias do rúmen quando se aumentava a concentração de óleo na dieta de ovinos. Essa população crescente até determinado ponto, pode ser explicada pela queda no número de protozoários, mas em determinada concentração, onde a população de protozoários está quase que completamente eliminada, a baixa população de bactérias pode ser justificada pelo efeito inibitório da gordura no seu metabolismo. LEGAY-CARMIER e BAUCHART (1989), também observaram aumento na população das bactérias do rúmen com a adição de óleo à dieta de vacas. Na verdade, o óleo livre, tem como efeito direto na bactéria a depressão da síntese de proteína, mas este efeito é mascarado pela redução no número de protozoários (IKWUEGBU e SUTTON, 1982).

Trabalhos como o de BICKERSTAFFE et al (1972) descrevem a síntese de lipídeos no rúmen. Esta síntese é muito maior com dietas ricas em gorduras. Esses lipídeos da dieta são hidrolisados e biohidrogenados pelos microrganismos e isto resulta na maioria das vezes num aumento de ácidos graxos endógenos ou passagem de ácidos graxos para o duodeno (HARTFOOT, 1978; NOBLE, 1978).

A concentração de lipídeos no rúmen de ovinos aumentou

consideravelmente quando as concentrações de óleo na dieta foram aumentadas, CZERKAWSKI et al (1975). KLUSMEYER e CLARCK (1991) observaram que as bactérias do rúmen coletadas do animal que recebia suplemento de gordura, tinham uma maior concentração de ácidos graxos que aquelas coletadas de um animal que não recebia suplemento de gordura. E Erwin et al (1963), citados por KLUSMEYER e CLARCK (1991) verificaram que a composição de ácidos graxos da bactéria ruminal, depende da composição de ácidos graxos do suplemento de gordura.

BAUCHART et al (1990) encontraram um aumento de 39 para 138% na concentração total de ácidos graxos na bactéria ruminal quando os animais receberam dietas suplementadas com gordura.

Sobre os efeitos que os lipídeos da dieta possam exercer sobre a população dos fungos anaeróbicos do rúmen, nada foi encontrado na literatura, provavelmente por se tratar de uma população recentemente descoberta. Kemp et al (1984), citados por FONTY (1990¹), demonstraram que, preliminarmente, existe uma evidência de que os fungos anaeróbicos do rúmen podem influenciar o suprimento de ácidos graxos mono-insaturados de cadeia longa para o animal; também eles parecem poupar os ácidos graxos linoleico e linolênico da hidrogenação no rúmen.

Enfim, para controlar os efeitos dos ácidos graxos dos lipídeos no rúmen, no caso de se usar caroço de algodão

¹ = FONTY, G. Laboratoire de Microbiologie. INRA Centre de Recherches de Clermont-Ferrand Theix, Saint-Genes. Champanelle, 63122 Ceyrat, France. Comunicação Pessoal. 1990.

integral, o mesmo deve ser fornecido de forma parcelada para evitar a redução na digestibilidade da fibra da dieta e facilitar a atuação do mecanismo detoxificante do gossipol, que é potencialmente tóxico tanto para ruminantes jovens quanto para adultos (REISER e FU, 1962).

2.2. Estabelecimento da população microbiana no rúmen

O rúmen é rapidamente colonizado após o nascimento por uma microflora muito diversificada, embora seu conteúdo seja somente muco, saliva e células descamadas do epitélio. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, por exemplo, que são predominantes no trato digestivo de muitos monogástricos após o nascimento, são raramente encontrados no rúmen de um pré-ruminante, exceto na flora da parede do rúmen DEHORITY (1985²)

A microflora de um animal pré-ruminante é também diferente daquela de um animal ruminante adulto. As espécies bacterianas que colonizam o rúmen imediatamente após o nascimento, desenvolvem um papel importante na criação de um ambiente favorável ao estabelecimento das bactérias celulolíticas, fungos e protozoários. Em ambos, ovinos (FONTY et al, 1987) e bovinos (ANDERSON et al, 1987), o rúmen é rapidamente colonizado por uma população abundante e

² = DEHORITY, B. A. Department of Animal Science, Ohio Agricultural Research and Development Center. The Ohio State University, Wooster, Ohio. Comunicação pessoal. 1991.

diversificada. O estabelecimento dos microrganismos em ruminantes jovens é dependente, principalmente, da presença de um animal adulto e de um ambiente ruminal compatível com o crescimento dos microrganismos.

A principal fração da população microbiana consiste de bactérias e protozoários ciliados estritamente anaeróbicos, mas há também um pequeno número de bactérias anaeróbicas facultativas (que pode ser muito importante para ruminantes jovens), bactérias aeróbicas, protozoários flagelados, micoplasma e os fungos anaeróbicos (HUNGATE, 19866).

O tamanho da população microbiana do rúmen, bem como sua composição, é afetada por vários fatores, dos quais a dieta parece ser um dos mais importantes. O rúmen, na verdade, é um sistema aberto, e embora certos organismos estejam presentes, muitas bactérias capazes de crescer neste ambiente não são geralmente consideradas verdadeiras bactérias do rúmen (DEHORITY, 1985³).

Nos trabalhos conduzidos por BRYANT e SMALL (1960), muitas bactérias similares àquelas que ocorrem em animais adultos estão presentes em animais jovens após 6 semanas de nascimento, e após 9-17 semanas, as bactérias predominantes são aquelas típicas de um bovino adulto. Os anaeróbicos estritos são predominantes. A densidade da flora aneróbica aumenta levemente durante as primeiras semanas de vida e então começa a se estabilizar perto do nível encontrado em

³ = Op. Cit.

animais adultos, uma vez que alimento sólido é ingerido (3-4 semanas). Durante a primeira semana a microflora é composta, principalmente, de espécies que não estão presentes na microflora do animal adulto (DEHORITY, 1985⁴).

Os números das bactérias aeróbicas + anaeróbicas facultativas são de 10 a 100 vezes menores que a microflora estritamente anaeróbica; havendo um decréscimo, nos primeiros, com a idade em ovinos (FONTY et al, 1987) e em bovinos (BRYANT e SMALL, 1960; JAYNE-WILLIAMS, 1979; ANDERSON et al, 1987). Nos ovinos jovens, a microflora consiste, principalmente de *Streptococcus* (*Streptococcus bovis*) e *E. coli* (FONTY et al, 1987), enquanto que em bovinos jovens *Lactobacillus* parece ser mais abundante (ANDERSON et al, 1987).

Contrariamente ao que em geral se acredita, as bactérias celulolíticas estão presentes bem antes da ingestão de alimentos sólidos (FONTY e GOUET, 1989). O contato entre a mãe e o animal jovem nos primeiros dias de vida é essencial para a transmissão destas espécies (FONTY et al, 1987).

Nos ovinos (FONTY et al, 1987) como nos bovinos (ANDERSON et al, 1987), as bactérias metanogênicas começam a se estabelecer logo após o nascimento (3-4 dias).

Há um grande número de bactérias amilolíticas, proteolíticas e bactérias que utilizam lactato no rúmen de

⁴ = Op. Cit.

bovinos nos primeiros dias de vida e os números de amilolíticas e proteolíticas aumentam quando os animais se tornam adultos, enquanto que os números das bactérias que utilizam lactato diminuem (ANDERSON et al, 1987).

À medida em que o animal se torna adulto, começa a predominar, no rúmen, uma flora bem característica: *Bacteroides ruminicola*, *Bacteroides amylophilus*, *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*⁵, *Ruminococcus flavefaciens*, *R. albus*, *Megasphaera elsdenii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Lachospira multiparus*, etc. (HUNGATE, 1966).

A parede do rúmen, também, é rapidamente colonizada após o nascimento (MUELLER et al, 1984a, b). A composição e tamanho desta população se altera com a idade do animal, sendo a maioria das espécies constituídas por cepas ureolíticas. Dentre as espécies estritamente anaeróbicas, nela presentes, as mais comumente encontradas são: *Bacteroides fragilis*, *Clostridium ramosum*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Propionibacterium*, *Clostridium sp.*, *Bacteroides sp.*, *Peptostreptococcus sp.*, *Selenomonas ruminantium*, *Veilonella*, *Bacteroides ruminicola*, *Bifidobacterium* (MUELLER et al, 1984b). Alterações na composição da microflora, neste local, podem estar ligadas a diferentes fatores como

⁵ = Anteriormente *Bacteroides succinogenes*, Montgomery et al (1988), citados por OSBORNE e DEHORITY (1989).

morfologia da papila, queratinização da célula epitelial, modificação da pressão de oxigênio, dieta e concentração de produtos de fermentação (MUELLER et al, 1984a).

A colonização do rúmen pelos fungos anaeróbicos, também ocorre muito cedo, uma vez que eles aparecem por volta do 8º - 10º dia após o nascimento (FONTY et al, 1987). Apesar destes fungos serem capazes de se estabelecerem nos animais antes da ingestão de alimentos sólidos, parece entretanto, que sua sobrevivência e desenvolvimento é condicionado pela composição da dieta.

Os protozoários ciliados aparecem mais tarde que as bactérias e os fungos, e são raramente encontrados antes de 2 semanas de idade (EADIE, 1962a, b). Em ovinos e bovinos o fator essencial ao seu estabelecimento é o pH do rúmen. Em um pH menor que 6,0 os ciliados são encontrados somente em pequenos números, pH pouco acima de 6,0 favorece o desenvolvimento de *Entodinium*, e pH maior que 6,5 o desenvolvimento de uma população mista (EADIE, 1962a).

Alimentos concentrados que condicionam pH ácido, não são favoráveis ao desenvolvimento de ciliados e são causa frequente de seu desaparecimento do rúmen. Os protozoários cilados se estabelecem numa clara sequência com o gênero *Entodinium* sempre sendo o primeiro a aparecer (BRYANT et al, 1958; EADIE, 1962a). Juntamente com o pH e a composição da dieta, outros fatores, tais como, as interações entre as espécies também desempenham papel importante no

desenvolvimento das diferentes populações de ciliados (EADIE, 1962a,b). Há muito, BRYANT e SMALL (1960), sugeriram que as bactérias do rúmen são muito mais resistentes ao stress ambiental e conseguem sobreviver em condições onde os protozoários não conseguem.

Na verdade, o rúmen é completamente colonizado após o nascimento, antes mesmo do próprio órgão se tornar funcional. O estabelecimento do ecossistema é ordenado e progressivo, e a principal população microbiana aparece em uma sequência claramente definida.

2.3. Microrganismos do rúmen

A biomassa microbiana total do rúmen, é compreendida basicamente por bactérias, protozoários e fungos. As bactérias são, frequentemente, predominantes, mas quando as condições são ideais para os protozoários ciliados, eles podem representar acima de 40% do N microbiano no rúmen (HUNGATE, 1966). Orpin (1981), citado por NOLAN (1989), estimou que a população de fungos pode, às vezes representar 8% da biomassa total.

Uma ênfase maior será dada ao estudo de fungos, devido ao fato de se tratar de uma população recentemente descoberta no rúmen apesar de ser um antigo habitante deste órgão.

2.3.1. Fungos

Até recentemente, acreditava-se que a população microbiana do rúmen era composta por bactérias e protozoários. Os microrganismos anaeróbicos originalmente identificados como protozoários flagelados, eram na verdade zoósporos multiflagelados de fungos (ORPIN, 1975; 1977a). Logo, apesar dos fungos serem uma descoberta recente (ORPIN, 1975; 1976; BAUCHOP, 1979), alguns microbiologistas do passado, como Liebetanz (1910); Braune (1913), citados por ORPIN e JOBLIN (1988), haviam reconhecido pequenos microrganismos flagelados no rúmen. Assim, fungos estritamente anaeróbicos, comprovadamente, fazem parte desta microbiota.

Esses fungos foram encontrados no rúmen de vários ruminantes, como ovinos, bovinos, cervídeos, caprinos e no intestino grosso de equinos, elefante, rinoceronte e também de ruminantes (GRENET et al, 1989).

Os fungos são os invasores primitivos do material da planta no rúmen (ORPIN, 1989). Eles colonizam os tecidos lignocelulósicos, destacando uma preferência por tecidos das plantas retidos por períodos mais longos no rúmen (BAUCHOP, 1989). Essa associação com a fibra da planta, sugere que esses microrganismos possam possuir a habilidade para degradar componentes da parede celular.

Observações obtidas por GRENET e BARRY (1988) indicaram

que os fungos anaeróbicos do rúmen podem ser encontrados em grande número nas frações ricas em lignina e celulose no rúmen de bovinos ou ovinos alimentados com forragens. Apesar do ataque preferencial ser nos tecidos compactos da parede celular e igualmente nas paredes celulares altamente lignificadas, estes tecidos são particularmente resistentes à digestão no rúmen.

2.3.1.1. Espécies e características dos fungos.

A maioria dos fungos isolados até o presente são do tipo monocêntrico (ORPIN, 1989), ou seja, seu rizóide conduz um único esporângio e pode ser exemplificado pelas espécies: *Neocallimastix frontalis*, *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis* (AKIN e BONERMAN, 1990).

A taxonomia desses fungos ainda não está bem definida. A recente descoberta de um fungo policêntrico, ou seja, vários esporângios associados com um único rizóide, em bubalinos, bovinos, ovinos (Borneman et al, 1989; Breton et al 1989; Ho et al, 1989), citados por FONTY (1990⁶), indica que a diversidade dos fungos encontrados nos ruminantes é muito maior do que se pensava.

⁶ = Op. Cit.

O ciclo biológico desses microrganismos, envolve dois estágios:

1. uma célula flagelada móvel, chamada de zoósporo, que vive livre na fase líquida do rúmen.
2. uma forma reprodutiva, vegetativa, imóvel, que se encontra fixa nas partículas da digesta (ORPIN, 1975, 1976, 1977a; BAUCHOP, 1979).

O estágio reprodutivo, vegetativo, imóvel, maduro, consiste de um sistema rizoidal, que pode ser altamente ramificado ou simples e um órgão reprodutor simples chamado de esporângio (ORPIN, 1989). O rizóide invade a parede celular da planta e se desenvolve dentro do tecido (BAUCHOP, 1989), podendo, assim, romper e degradar os tecidos fibrosos das plantas no rúmen (BAUCHOP, 1979, 1981). O esporângio se desenvolve no exterior do fragmento da planta podendo ter 100 μm de comprimento (BAUCHOP, 1989).

O zoósporo se desenvolve dentro do esporângio e a dissolução eventual de parte da parede do esporângio resulta na liberação do zoósporo flagelado, que também apresentando movimento amebóide (ORPIN, 1989), pode atacar um fragmento de planta apropriado e desenvolver um novo organismo vegetativo, repetindo, assim, o ciclo biológico (BAUCHOP, 1989).

Este zoósporo pode apresentar flagelo simples ou múltiplo, dependendo do gênero (ORPIN, 1989). Por exemplo, o gênero *Neocallimastix* apresenta zoósporo poliflagelado enquanto que o gênero *Sphaeromonas*, tem um zoósporo

monoflagelado.

Se o animal é alimentado uma vez por dia, a zoosporogênese e a liberação do zoósporo do estágio vegetativo ocorre logo após a ingestão de alimento pelo animal (ORPIN e JOBLIN, 1988). Com o gênero *Neocallimastix*, o pico da população de zoósporo foi encontrado de 15-30 minutos após a alimentação (ORPIN, 1974, 1975), mas com o gênero *Sphaeromonas* e *Piromonas*, ocorreu uma hora após alimentação (ORPIN, 1976, 1977b). O "tempo de geração", em experimentos *in vivo* e *in vitro*, do *Neocallimastix* spp., durou 24-34 horas (Joblin, 1981; Bauchop, 1983; Lowe et al, 1987a) citados por ORPIN e JOBLIN (1988). Esses autores relataram ainda que a alimentação contínua nos animais pode reduzir o ciclo biológico para apenas oito horas.

BAUCHOP e MOUNTFORD (1981) mostraram que alguns fungos do rúmen são celulolíticos. Exames microscópicos feitos por ORPIN (1984), mostraram que os rizóides penetram na parede celular das plantas, indicando alguma capacidade para digerir polímeros da parede celular. Uma outra observação importante a respeito desses microrganismos, é a capacidade que eles demonstraram, *in vitro*, de reduzir o tamanho da partícula (ORPIN, 1984). Essa observação sugere que os fungos participam da degradação física das partículas das plantas no rúmen, facilitando, assim, o trabalho para outros microrganismos.

Os fungos não vivem, exclusivamente, no ambiente

ruminal. Foi confirmada a presença deles no intestino dos ruminantes (GRENET et al, 1989). Esses autores constataram que essa população é bem mais baixa no intestino dos ruminantes em comparação com o rúmen. E a presença dos fungos no ambiente intestinal segue as mesmas alterações que ocorrem no rúmen, ou seja, dietas desfavoráveis à presença desses fungos no rúmen, diminuem o número desses microrganismos no intestino. A presença dos fungos no intestino, mostra que eles deixam o rúmen com o conteúdo digestivo e que sobrevivem às condições ácidas do abomaso. É provável, que quando os fungos deixam o rúmen, eles estejam ligados às partículas das plantas (GRENET et al, 1989).

2.3.1.2. Fermentação de carboidratos

A produção de enzimas que degradam fibras e utilização de carboidratos pelos fungos foram recentemente investigadas. As enzimas são extra-celulares e produzidas tanto durante o estágio vegetativo quanto pelo zoósporo (Williams e Orpin, 1987), citados por FONTY (1990⁷).

Os produtos finais da fermentação da celulose pelos fungos são: acetato, lactato, formato, etanol, CO₂ e H₂ (GORDON e PHILLIPS, 1989). Entretanto, o etanol e o formato não são produzidos pelo *N. patriciarum* ou produzidos em

⁷ = Op. Cit.

pequenas quantidades, ORPIN e JOBLIN (1988); (Orpin e Munn, 1986), citados por FONTY (1990⁸). Essa degradação dos polissacarídeos estruturais das plantas pelos fungos é extremamente importante para o entendimento da contribuição desses microrganismos na digestão da fibra do rúmen.

De acordo com os trabalhos conduzidos por ORPIN (1984), nenhum fungo conseguiu ainda utilizar pectina para crescimento, embora a pectina tenha desaparecido dos tecidos das plantas quando o substrato era incubado com os fungos do rúmen. A perda de pectina pode contribuir para o pool de carboidratos no líquido de rúmen, tornando-os disponíveis para outros microrganismos. Da mesma forma a arabinose, que embora possa ser removida das xilanas pelas glicosidases desses microrganismos, mas que não pode ser utilizada para crescimento, também contribui para o pool de carboidratos na fase líquida do rúmen. Uma justificativa para o desaparecimento dos componentes da parede celulare dos vegetais e o não crescimento dos microrganismos pode ser devido à característica dos microrganismos de apresentarem capacidade muito maior de fermentar substratos que sua capacidade de utilizar o ATP produzido para mostrarem crescimento.

Embora os fungos do rúmen colonizem, preferencialmente, os tecidos lignocelulósicos das plantas, seu papel na

⁸ = Op. Cit.

degradação de lignina não está claro. *In vitro*, eles são capazes de solubilizar parte da lignina das paredes celulares das plantas, mas não há evidência de que eles são capazes de utilizar lignina como fonte de carbono (ORPIN, 1984) .

Recentemente, os fungos mostraram capacidade para produzir esterases, que liberam os ácidos p-cumáricos e ferúlicos dos seus ésteres metílicos e da parede celular da planta intacta, Bonerman et al (1989), citados por AKIN e BONERMAN (1990). É possível que essas enzimas desempenham um papel significativo na degradação da parede celular das plantas ricas em compostos fenólicos.

Segundo AKIN e BONERMAN (1990), são os monômeros dos compostos fenólicos e não os dímeros que são tóxicos aos fungos. Entretanto, a influência de esterases e liberação de altas concentrações dos ácidos p-cumáricos e fenólicos na digestibilidade dos alimentos, requerem mais estudos.

2.3.1.3. Atividade proteolítica dos fungos

De acordo com a literatura, bactérias e protozoários são considerados por diversos autores como os principais grupos proteolíticos do rúmen, NOLAN (1989).

A atividade proteolítica do *N. frontalis*, isolado do rúmen de ovinos, foi mostrada por Wallace e Joblin (1985),

citados por FONTY (1990⁹). Resultados *in vitro*, sugerem que os fungos do rúmen poderão contribuir significativamente para a proteólise *in vivo*.

Segundo NOLAN (1989), bactérias, protozoários e fungos possuem atividade proteolítica, e esta atividade é atribuída aos microrganismos associadas às partículas. Os protozoários contribuem mais para a atividade proteolítica no rúmen quando proteínas estão presentes na forma de partículas insolúveis e os fungos parecem contribuir mais na atividade proteolítica no caso de proteínas solúveis.

Warner (1956) e Blackburn & Hobson (1960) citados por NOLAN (1989), concluíram que metade da atividade proteolítica no rúmen era atribuída aos protozoários presentes. Em contraste, NUGENT e MANGAM (1981) mostraram que os protozoários eram responsáveis somente por 10-20% da atividade proteolítica no rúmen, ao passo que BROCK et al (1982) sugeriram que as bactérias são responsáveis pela maioria das atividades proteolíticas no rúmen. NOLAN (1989) comenta que essas diferenças devem resultar das variações nas proporções relativas de bactérias e protozoários presentes no rúmen de animais em diferentes dietas.

Bactérias e protozoários competem com os fungos por nutrientes e as sugestões de engolfamentos de zoósporos pelos protozoários são, provavelmente, fatores importantes afetando

⁹ = Op. Cit.

atividade proteolítica desses fungos. A atividade proteolítica destes microrganismos, oferece a eles uma vantagem metabólica, uma vez que as bactérias celulolíticas não são proteolíticas (FONTY, 1990¹⁰).

2.3.1.4. Influência da dieta na população de fungos

O tipo de dieta que o animal hospedeiro ingere exerce, frequentemente, uma influência significativa na população de microrganismos do rúmen (HUNGATE, 1966).

ORPIN (1977a) relatou que componentes da planta de uma variedade de forragens induziu esporogênese em fungos do rúmen, resultando num grande aumento da população. Em pesquisas posteriores, Orpin e Greenwood (1986a), citados por ORPIN e JOBLIN (1988) indicaram que compostos do grupo heme, mostraram ser ativos na indução da esporogênese. Esses compostos na forma quimicamente oxidada ou reduzida estão presentes em todos os tecidos vivos das plantas como enzimas do grupo prostético; na forma oxidada ocorre nos tecidos mortos das plantas.

De acordo com BAUCHOP (1979), os fungos anaeróbicos vivem em maior abundância no rúmen de animais que se alimentam de forragens maduras ou fenos em comparação com animais que se alimentam de forragens novas ou grãos de

¹⁰ = Op. Cit.

cereais. É provável que a pequena população de fungos encontrada no rúmen de ovinos alimentados com grãos não seja devido a carência de atividade amilolítica dos fungos e sim incapacidade destes em viver em um meio de baixo pH.

O número de fungos é muito maior em dietas ricas em fibra do que ricas em concentrado (ORPIN, 1977a; DEHORITY e OBISPO, 1991¹¹). A relação positiva da fibra com os fungos também foi demonstrada por BAUCHOP (1981), ORPIN (1984) e BAUCHOP (1989).

Os fungos são encontrados em pequenos números em animais que se alimentam com dietas ricas em açúcar, como beterraba, em pastos jovens (BAUCHOP; 1979, 1981, 1989), ou dietas ricas em cereais (BAUCHOP, 1981).

2.3.1.5. Interações dos fungos com outros microrganismos

Entre os microrganismos do rúmen existem várias e constantes interações. Os protozoários engolfam bactérias e também competem com as mesmas por substratos como amido e outros nutrientes, incluindo minerais e vitaminas. Como consequência, há uma relação negativa entre número de bactérias e protozoários ciliados.

Estudos com ruminantes em dietas fibrosas de baixo teor proteico sugerem que também há uma interação competitiva

¹¹ = Op. Cit.

entre protozoários e fungos. Em estudos envolvendo ovinos defaunados, os números de zoósporos no fluido de rúmen eram de 2 a 5 vezes maior que em ovinos faunados na mesma dieta (BIRD e LENG, 1984). Mas por outro lado, pouco se sabe sobre interação de protozoários e fungos. Os protozoários ciliados podem ingerir bactérias do tamanho similar aos zoósporos de modo que é provável que a predação de zoósporos por protozoários ocorra. Não há nenhuma evidência direta sobre isto, mas ORPIN (1977a) também observou em animais defaunados um aumento na população de fungos.

Joblin (dados não publicados) citado por FONTY (1990¹²) constatou, durante observações microscópicas de colonização de fungos nas partículas de plantas de digesta ruminal de ovinos, que os protozoários entodínomorfos permaneciam próximo do esporângio dos fungos. Isto poderia indicar que *in vivo*, os protozoários ciliados são atraídos para os sítios de degradação dos fungos nos tecidos das plantas ou em função das bactérias atraídas para estes sítios.

Em virtude da alta produção de hidrogênio pelos fungos, eles podem formar coculturas estáveis com as bactérias metanogênicas, Bauchop e Mountford (1981); Fonty et al (1988b); Stewart e Richardson (1989), citados por FONTY (1990¹³). A associação de fungos e bactérias metanogênicas

¹² = Op. Cit.

¹³ = Op. Cit.

leva a um aumento na biomassa de fungos (Bernalier et al, 1989b), citados por FONTY (1990¹⁴) e um aumento na taxa de hidrólise e na quantidade de celulose degradada do papel de filtro (BAUCHOP e MOUNTFORD, 1981).

A atividade celulolítica dos fungos do rúmen é muito maior em cocultura que em monocultura, Mountfod e Asher (1985), citados por FONTY (1990¹⁵). Em coculturas com metanogênicas, o metabolismo do fungo é alterado, levando a uma maior produção de metano, BAUCHOP e MOUNTFORD (1981).

Em coculturas *N. frontalis* e *R. flavefaciens* (bactéria celulolítica), a atividade do fungo foi parcialmente inibida. Em contraste, na presença de outra bactéria celulolítica, *Fibrobacter succinogenes*, a atividade celulolítica não foi afetada, Bernalier et al (1988) citados por FONTY (1990¹⁶). Em trabalhos desses mesmos autores, a incubação de *N. frontalis* ou *P. communis* com *Selenomonas ruminantium* (bactéria proteolítica), levou a inibição completa da degradação de celulose pelos fungos.

A verdade é que as interações entre as bactérias e os fungos parecem ser bastante variáveis de acordo com as espécies e muito a respeito dessas interações ainda tem que ser elucidado.

¹⁴ = Op. Cit.

¹⁵ = Op. Cit.

¹⁶ = Op. Cit.

Os fungos do rúmen, já vem sendo estudado em detalhes e despertando a atenção de profissionais da área devido a algumas de suas características, como a associação com a fibra da planta. Esta associação sugere que eles possam possuir habilidade para degradar componentes da parede celular. Esses microrganismos não são essenciais para ruminantes que recebem dieta pobre em fibra, mas é provável que eles desenvolvam um papel importante na digestão de forragem de baixa qualidade.

O papel desses fungos *in vivo* e a sua contribuição para a degradação da parede celular das plantas e proteólise, ainda é uma questão em aberto, sendo assim, mais trabalhos são necessários para melhor entendimento de seu potencial no rúmen.

2.3.2. Bactérias

As bactérias do rúmen são adaptadas para viver em pH 5,5-7,0, na ausência de oxigênio, temperatura entre 39-40°C, na presença de uma concentração moderada de produtos de fermentação e às custas de ingesta consumida pelo animal ruminante. O fornecimento constante de alimento e a remoção contínua dos produtos de fermentação e resíduos alimentares mantêm relativamente constante as condições sobre as quais uma densa população se desenvolve.

É necessário discutir, antes, alguns critérios para determinar se uma espécie é uma autêntica bactéria do rúmen ou apenas um organismo passageiro veiculado ao alimento. Parece que o critério mais importante é aquele em que o organismo cresce no rúmen e apresenta um metabolismo compatível com as reações que ocorre neste ambiente. O número de uma dada espécie que ocorre no rúmen em relação ao seu número no alimento e água consumidos, também apresenta valor considerável no estabelecimento de sua população (DEHORITY, 1985¹⁷).

O organismo em questão, ou seja, aquele que vive no ambiente ruminal, será capaz de atacar o substrato presente no rúmen (celulose, hemicelulose, pectina, amido, proteína...), os produtos hidrolíticos destes substratos ou produtos finais de fermentação de outros microrganismos, como ácidos orgânicos e hidrogênio. Os produtos de fermentação de um organismo serão compatíveis com aqueles presentes ou rapidamente metabolizados no rúmen. Características como pH, temperatura e exigências nutricionais serão compatíveis com o ambiente ruminal (HUNGATE, 1966). Isolamentos repetidos de uma espécie em períodos de tempo, de diferentes animais hospedeiros de várias localizações, serão uma evidência de sua autenticidade como uma bactéria ruminal. Segundo GALL e HUHTANEM (1950), anaerobiose e o número pelo menos igual a um milhão por grama de conteúdo fresco do rúmen e ser isolado

¹⁷ = Op. Cit.

pelo menos 10 vezes em dois ou mais animais, também são critérios que estabelecem se uma determinada espécie de bactéria é do rúmen.

Um resumo de algumas destas bactérias e suas características pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Características de algumas espécies de bactéria do rúmen.

organismo	coloração Gram	produtos*	substrato principal
<u>Fibrobacter succinogenes</u>	G ⁻	F,A,S	celulose
<u>Ruminococcus flavefaciens</u>	G ⁺ , a variável	F,A,L,S E,H ₂	fibra
<u>Ruminococcus albus</u>	G ⁺ a variável	F,A,L,S E,H ₂	fibra
<u>Bacteroides amylophilus</u>	G ⁻	F,A,L,S E	amido
<u>Succinomonas amylolytica</u>	G ⁻	A,P,S	amido
<u>Veillonella alcalescens</u>	G ⁻	A,P,H ₂	lactato
<u>Methanobacterium ruminantium</u>	G ⁻	CH ₄	CO ₂ + H ₂
<u>Anaerobrio lipolítica</u>	G ⁻	A,P,S >C ₄ (traços)	glicerol
<u>Peptostreptococcus elsdenii</u>	G ⁻	A,P,B,H ₂ >C ₄	lactato
<u>Clostridium lochheadii</u>	G ⁺	F,A,B,S E,H ₂	celulose/amido
<u>Clostridium longisporum</u>		F,A,L,E H ₂	celulose/inulina
<u>Borrelia sp.</u>	G ⁻	F,A,S	vários monossacarídeos
<u>Lachnospira multiparus</u>	G ⁺ quando jovem	F,A,L,E H ₂	pectina

organismo	coloração Gram	produtos*	substrato principal
<u>Cillobacterium cellulosolvens</u>	G ⁻ quando jovem	F, A, L, S H ₂	celulose
<u>Butyrivibrio fibrisolvens</u>	G ⁻	F, A, B, L E, H ₂	amido a profundamente adaptado para utilizar vários outros substratos
<u>Butyrivibrio alactacidigens</u>		F, A, B, H ₂	ídem
<u>Bacteroides rumicola</u>	G ⁻	F, A, S	profundamente adaptado
<u>Selenomonas ruminantium</u>	G ⁻	F, A, P, B L, S	ídem
<u>Selenomonas lactilytica</u>		A, P, L, S	lactato ou vários
<u>Succinivibrio dextrinosolvens</u>	G ⁻	A, L, S	dextrina
<u>Streptococcus bovis</u>	G.	F, A, L, E	amido ou vários
<u>Eubacterium ruminantium</u>	G ⁺ , mas torna-se G ⁻ com a idade	F, A, B, L	açúcares, xilanas

* F-formato, A-acetato, P-propionato, B-butirato, >C⁴-ácidos com mais de 4 carbonos na cadeia, L-lactato, S-succinato, E-etanol.

Fonte: HUNGATE (1966) e DEHORITY (1985¹⁸)

Como pode ser visto, é grande a diversidade das espécies de bactérias no rúmen e de acordo com HUNGATE (1966), existem algumas explicações para isto. O alimento do ruminante é complexo, contendo carboidratos, proteínas, gorduras e outros numerosos compostos orgânicos e minerais. Duas vias de adaptação são abertas. Os organismos podem se tornar

¹⁸ = Op. Cit.

estritamente adaptados (altamente especializados), competir por um pouco de alimento e ocupar um nicho limitado, ou tornar-se profundamente adaptado e capaz de usar muitos nutrientes. Exemplos de ambas as espécies e espécies intermediárias são encontrados no rúmen.

Um segundo fator auxilia na diversidade da população do rúmen. E isto pode ser expressado como a seleção para máximo trabalho bioquímico. Durante a fermentação, os componentes contendo energia (principalmente os carboidratos) nos alimentos dos ruminantes, são convertidos em células microbianas + AGV + CH_4 + CO_2 , e alguns destes produtos são alimentos para o animal hospedeiro. A hipótese do máximo trabalho bioquímico postula que num sistema como o rúmen, aberto a invasão de inúmeros microrganismos, aquele organismo que conduzir o máximo crescimento sobreviverá. Já que o crescimento é limitado pela quantidade de alimento disponível, a eficiência de transformação dos alimentos em células microbianas conduz valores de sobrevivência.

Durante a conversão ruminal de carboidratos para ácidos acético, propiônico, butírico, CO_2 , CH_4 , a produção celular é maior que em outros possíveis caminhos bioquímicos. Entre as inúmeras reações bioquímicas teoricamente possíveis para formação de novas células, certas combinações produzem mais células que outras. Estas combinações incluem muitas reações individuais. As condições necessárias para cada tipo de reação diferem entre si, e um simples tipo de célula não pode

conter a diversidade das condições para a produção máxima de crescimento celular. Há limites para a capacidade biocatalítica de uma simples célula. O máximo crescimento total requer uma população complexa na qual estão incluídos muito mais caminhos para os trabalhos bioquímicos que podem ser acomodados numa simples célula (DEHORITY, 1985¹⁹).

A grande população de bactérias presentes no rúmen (10^{11} /ml) foi reconhecida a muito tempo atrás, nos estudos de HUNGATE (1966). Em estudos conduzidos por BRYANT e ROBINSON (1968) foi observado que o número de bactérias é muito maior na área dorsal do rúmen em relação à parte ventral. Mais recentemente, o uso do microscópio eletrônico de varredura tem permitido observar que a microflora do rúmen é compartimentalizada, sendo diferentes populações associadas com partículas de alimento, parede do rúmen e fase líquida do conteúdo ruminal. A tabela 2 apresenta as propriedades gerais destes compartimentos. No compartimento 1 estão os microrganismos, preferencialmente, amilolíticos e proteolíticos, são os microrganismos que apresentam curto tempo de geração. O compartimento 3 é constituído pelos microrganismos associados com as partículas do alimento, são de tempo de geração longo. Os microrganismos que apresentam propriedades intermediárias estão no compartimento 2, e os microrganismos ligados à parede do rúmen pertencem ao

¹⁹ = Op. Cit.

compartimento 4.

Tabela 2. Propriedades dos compartimentos no modelo de 4 compartimentos do rúmen.

	compartimentos			
	4	1	2	3
função	controle estratégico	meio de transporte	serviços intercompartimentais	degradação de fibra
influência do hospedeiro	forte	nitidamente forte	alguma influência	muito pouca influência
população microbiana	aeróbicos facultativos	utilizadores de substratos solúveis	complexa, ligadas ao substrato	digestores de fibra
espécies predominantes	<u>Fusobacterium</u> cocos G ⁺	<u>Bacteroides</u> <u>Streptococos</u>	<u>L.multiparus</u> <u>R. albus</u> <u>B. fibrisolvens</u>	<u>F. succinogenes</u> <u>R. flavefaciens</u>

Fonte: CZERKAWSKI e CHENG (1988).

Desta forma, segundo CZERKAWSKI e CHENG (1988), o rúmen pode ser descrito em termos de um modelo multicompartimentalizado. No presente, este parece ser o caminho mais sensível para se estudar o rúmen, controlá-lo e melhorar sua eficiência.

2.3.3. Protozoários

Os protozoários ciliados do rúmen pertencem a duas famílias que são da subclasse vestibulifera: ISOTRICHIDAE, constituída por três espécies e OPHRYOSCOLECIDAE, altamente complexa, constituída por várias espécies. A população numérica dos ciliados totais do rúmen é inferior a população das bactérias bactérias. Alguns números podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Números de protozoários no rúmen de ovinos.
(concentração/ml de conteúdo ruminal).

ração	protozoários/ml	referências
1500g de feno	12,4-19,5 x 10 ⁴	NAKAMURA e
1500g de feno + 600g de conc.	73,7-102,4 x10 ⁴	KANEGASAKI (1969).
alfafa peletizada 2 em 2 horas.	49,8 x 10 ⁴	HUNGATE et al (1971).
alfafa peletizada 2 vezes ao dia.	23,7 x 10 ⁴	
45% espiga de mi- lho + 35% farinha alfafa + 12,6% de aveia + supl.	74 x 10 ⁴	POTTER e DEHORITY (1973)
40% alfafa + 28% milho + 25% espi- ga de milho + supl.	85,7 x 10 ⁴	DEARTH et al (1974)
feno 60% milho + 40% de feno	40-53 x 10 ⁴ 101-163 x 10 ⁴	GRUBB e DEHORITY (1975)

Alguns fatores que influenciam o número e a composição dos protozoários, como dieta e frequência de alimentação,

podem ser vistos na tabela anterior. Os protozoários também sofrem variações diárias de acordo com o efeito do nível de consumo e pH.

Baseado em observações de trabalhos anteriores, o pH do rúmen parece ser importante no estabelecimento e manutenção dos protozoários. Dietas ricas em concentrados com uma correspondente queda de pH, praticamente elimina os protozoários do rúmen. Entretanto, nem todos estudos evidenciam este fato. SLYTER et al (1970) trabalhando com novilhos recebendo ração de concentrado *ad libitum* contendo 90% de milho ou 90% de trigo, encontraram número de protozoários entre 6 e 12 semanas de $6,5 \times 10^3/\text{ml}$ para milho e de $8,0 \times 10^3/\text{ml}$ para trigo. Somente protozoários do gênero *Entodinium* foram observados em valores de pH 5,0-5,2.

De todas as observações feitas, parece que rações contendo 40-50% de volumoso, poderão suportar um número máximo de protozoários com uma fauna diversificada, contendo espécies de muitos gêneros. Quando a ração é rica em concentrado ou constituída apenas de concentrado, o pH ruminal cai para valores abaixo de 6, os números de protozoários diminuem e o principal gênero constituinte é *Entodinium*. Entretanto algumas discrepâncias entre os diferentes estudos sugerem que fatores adicionais não medidos devem, também, estar envolvidos (DEHORITY, 1985²⁰).

²⁰ = Op. Cit.

2.3.3.1. Importância dos protozoários para o animal ruminante.

Desde que as primeiras observações de ocorrência de protozoários ciliados no rúmen foram feitas, mais ou menos, na metade do século passado, duas questões tem sido de extremo interesse. Primeiro, a especificidade destes ciliados para este habitat e segundo, a essencialidade destes para o animal hospedeiro.

Se o protozoário ciliado do rúmen é específico para este ambiente, os trabalhos com animais sem protozoários parecem confirmar isto. Tem sido demonstrado, claramente, que os ciliados são transmitidos unicamente pelo contato direto (HUNGATE, 1966). O isolamento de um animal livre de protozoários recebendo dieta normal de feno, sugere que estes microrganismos sejam um grupo altamente especializado que sobrevivem somente no rúmen ou em ambiente similar (DEHORITY, 1985²¹). O papel desses organismos vem sendo discutido (HUNGATE, 1966; COLEMAN, 1979; VEIRA, 1986).

A essencialidade desses organismos, vem sendo estudada há muito tempo. Estudos tem sugerido que embora os protozoários não sejam essenciais, eles podem desempenhar importante papel no rúmen (ABOU AKKADA et al, 1964, 1969). A importância da proteína celular, frações de lipídeos e carboidratos do protozoário para o hospedeiro são dependentes

²¹ = Op. Cit.

da quantidade e disponibilidade da biomassa que chega ao trato digestivo posterior. Como a maioria das dietas suporta uma enorme biomassa de protozoários no rúmen, sempre assumiu-se que os ciliados são uma importante fonte de nutrientes para o hospedeiro.

A grande biomassa existente no rúmen, 40-80% da massa microbiana (Harrison e McAllan, 1980), citados por VEIRA (1986) e sua habilidade para atacar os principais componentes dos alimentos (COLEMAN, 1983, 1985) sugerem que, embora não essencial, eles podem desempenhar um importante papel na fermentação ruminal. A observação de que o protozoário ciliado é retido no rúmen (HUNGATE et al, 1971; HARRISON et al, 1979; ANKRAH et al, 1991), e, assim, não contribui fornecendo nutrientes em quantidades relativa à sua proporção no rúmen, tem levado a muitas especulações sobre sua significância na nutrição de ruminantes.

Baseados em resultados de estudos *in vitro*, Coleman, 1975, citado por DEHORITY (1985²²), tem sugerido o seguinte papel para o protozoário do rúmen: o protozoário engolfa grandes quantidades de bactérias, 1% do total/min. nos animais que se alimentam de dietas ricas de concentrado, do qual metade do material é retido pela célula e a outra metade liberada de volta para o meio, principalmente na forma de aminoácidos.

²² = Op. Cit.

Logo, esses microrganismos, produzem substrato para promover crescimento bacteriano e fermentação de AGV e amônia, que resulta em perdas de aminoácidos para o hospedeiro. DEHORITY (1985²³) comenta que esta perda de proteína bacteriana para o hospedeiro é balanceada pela maior digestibilidade da proteína do protozoário. De acordo com o referido acima, vale destacar o importante papel regulador de pH desses organismos em dietas ricas de concentrado. Coleman concluiu neste trabalho, que maiores concentrações de amônia em animais faunados podem ser explicadas pela digestão de bactérias pelos protozoários. Esta sugestão é compatível com a hipótese de MALES e PURSE (1970), que em animais faunados, a amônia do rúmen seria ciclada pela incorporação em proteína microbiana, digestão da bactéria pelo protozoário e deaminação do aminoácido liberado para o fluido.

Nos animais faunados grandes números de bactérias utilizam amônia do rúmen para síntese de célula e as células passam, então, do rúmen junto com fluido. A competição entre bactérias e protozoários por energia é também um fator que contribui na diminuição do número de bactérias nos animais faunados. Para os protozoários serem vantajosos para o hospedeiro eles tem que passar para o trato digestivo posterior. WELLER e PILGRIN (1974) trabalhando com ovinos alimentados continuamente, estimaram que os protozoários deixam o rúmen a 20% ou menos da taxa do fluido. E o

²³ = Op. Cit.

"turnover" do fluido é muito mais lento em animais alimentados uma vez por dia (POTTER e DEHORITY, 1973). Assim, a contribuição da proteína do protozoário para o animal hospedeiro pode ser muito limitada.

Os ciliados do rúmen são capazes de transformar os principais componentes da dieta consumida pelo animal em uma variedade de metabólitos que são utilizados pelo hospedeiro. Aproximadamente 1/4-1/3 da degradação da fibra no rúmen é devida a atividade dos protozoários (ORPIN, 1984). A ingestão de bactérias e a proteólise pelos protozoários diminuem a eficiência de utilização de nitrogênio pelo hospedeiro (LENG e NOLAN, 1984). A proteólise dos protozoários e a retenção seletiva dos ciliados no rúmen, reduzem a produção de nitrogênio microbiano neste órgão, e assim os protozoários influenciam diretamente a proporção de proteína e energia nos nutrientes absorvidos. BIRD e LENG (1978) sugerem que a ausência de protozoários pode aumentar a disponibilidade de proteína para o duodeno e produzir uma relação relativamente constante de proteína e energia.

Em síntese, parece que o protozoário não é essencial para o hospedeiro e na sua ausência a fermentação é assumida por uma população de bactérias que teve seu número aumentado. Algumas diferenças, não claramente entendidas, parecem existir entre ruminantes faunados e ruminantes destituídos de protozoários, por exemplo, animais sem protozoários, geralmente, não crescem tão bem quanto os seus controles

faunados. Se os protozoários conduzem ou não atividades metabólicas no rúmen tão eficientes ou mais que a grande população de bactérias, ainda não é possível afirmar com clareza.

2.4. Método do número mais provável (MPN)

Para investigar o tamanho da população de bactérias e fungos anaeróbicos totais do rúmen tem sido proposto o uso do método MPN (número mais provável), que utiliza meio líquido. Trata-se de um método que atualmente vem sendo usado pela Universidade de Ohio (EUA) para quantificar os microrganismos.

Este método é uma maneira de estimar a densidade dos organismos viáveis que podem viver na amostra OBLINGER e KOBURGER (1984). Esta técnica é baseada na probabilidade estatística e os resultados de um tipo de análise MPN estão diretamente relacionados com a frequência de ocorrência de uma série de resultados positivos muito prováveis de ocorrer quando um dado tipo de organismo está presente na amostra contida em tubos de ensaio. A estimativa é obtida a partir das preparações de diluições decimais da amostra e transferência de alíquotas para vários tubos. Frequentemente usa-se de 3 a 5 tubos por diluição.

Segundo OBLINGER e KOBURGER (1984), a precisão associada com a técnica MPN, não é tão grande quanto com uma técnica de

contagem direta. Obviamente a técnica MPN, como outros métodos, também apresenta certos problemas próprios e está sujeito a várias fontes de erro. Mas é bom lembrar que poucos métodos microbiológicos, se é que existem, estão isentos de críticas. Sendo assim, torna-se importante o número de tubos inoculados com amostra por diluição, pois pode-se aumentar a exatidão do método. A série de 3 a 5 tubos é mais comumente usada, embora tabelas para outros números de tubos por diluição podem ser encontradas na literatura, (Hoskins, 1933; Oblinger e Koburger, 1975; American Public Health Association, 1980), citados por OBLINGER e KOBURGER (1984).

Existem alguns fatores que contribuem para erro no uso desta metodologia. A variação entre as alíquotas repicadas é de longe a principal fonte de erro. Todo cuidado é necessário na preparação das diluições para transferir alíquotas para os tubos de mesma diluição. Outro fator que contribui para resultados ilegítimos é a dificuldade em se obter uma amostra verdadeiramente representativa de um dado lote, no caso deste trabalho, do conteúdo ruminal. Também, a possibilidade de distribuição desigual de microrganismos pode conferir resultados ilegítimos. Este método tem sido extensivamente usado para estimar números de bactérias celulolíticas em conteúdo ruminal, intestinal. Entretanto, este procedimento não tem recebido maior atenção para estimativa do número de bactérias totais do rúmen. Embora, como mencionado anteriormente, e também por COCHRAN (1950),

que este método tenda a ter uma menor precisão que os métodos de contagem direta, vários fatores poderiam torná-lo uma escolha desejável. De acordo com DEHORITY et al (1989), se o isolamento e a identificação das espécies bacterianas não são requeridas, o método MPN é mais simples e consome menos tempo que o método de contagem direta -"roll tubes"- (SOCKEY e DEHORITY, 1989). Além disto, a manutenção de condições anaeróbicas é muito mais fácil com um meio líquido, tanto na preparação quanto na inoculação do meio.

Em se tratando de estudos em silagens, a complementação do trabalho com a quantificação microbiana, pode ser feita também com este método. Em trabalho recente realizado por SOCKEY e DEHORITY (1989), para comparar a estimativa da população de bactérias totais do rúmen com o método MPN e o método de contagem direta ("roll tubes") em silagem e forragem fresca, nenhuma diferença foi encontrada entre os dois métodos, exceto para as bactérias resistentes ao ácido (pH 4,5), onde o método MPN deu uma contagem bem maior. Sendo assim, de acordo com estes autores, existem três vantagens para se utilizar o método MPN em relação ao "roll tubes": 1. o nível de treino de laboratório e competência requerida para preparar meios e inóculo anaerobicamente é menor que para "roll tubes"; 2. menos tempo é necessário para preparo de meios de cultura e inoculação da amostra; 3. a estimativa do crescimento pela turbidez visual e pH final é consideravelmente mais rápida que contagem de colônias em

"roll tubes". Esses autores comentaram que as vantagens do MPN está no menor tempo necessário para análise com uma economia de 70-80% de tempo na leitura dos tubos e uma resposta melhor para estimativa da população de bactérias tolerantes ao ácido em silagens, já que o MPN dá uma resposta maior e os microrganismos anaeróbios capazes de crescer em pH 4,5 proliferam mais rapidamente em meio líquido que em meio sólido.

Este método, também foi investigado por DEHORITY et al (1989) para, simultaneamente, estimar o número de bactérias totais e o número de bactérias celulolíticas no rúmen. Com este estudo ficou evidente que, simultaneamente, pode se obter ambas informações ao mesmo tempo. E o tempo requerido para gerar os dados foi menor que seria necessário para estimar o número total no mesmo tempo usando "roll tubes".

A óbvia desvantagem do método MPN está na incapacidade para isolar e identificar os microrganismos que são características da técnica "roll tubes". As aplicações deste método são numerosas, mas vale destacar, antes, duas suposições que dizem respeito ao seu uso: a primeira e mais importante é que se uma amostra contém microrganismos, esses estão casualmente distribuídos pela amostra.

Segundo, deve-se assumir que quando uma alíquota é colocada num meio apropriado e inoculada corretamente, observar-se-á um resultado positivo quando a mesma alíquota contiver um ou mais microrganismo em questão. Quando a

amostra homogênea é dividida em subamostras por uma série de diluições e distribuídas, algumas das alíquotas que eventualmente contém pequenas quantidades da amostra poderá não conter nenhum dos microrganismos visados. Sendo assim, como o método MPN é baseado nestas subdivisões da amostra, ele pode ser descrito como "método de diluição múltipla em tubos até à extinção", OBLINGER e KOBURGER (1984).

Como mencionado anteriormente, as aplicações do método MPN são diversas. Seu uso é de particular importância nos estudos de coliformes associados com água como em alimentos de uma maneira geral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e instalações experimentais

O experimento foi realizado no estábulo experimental do departamento de Zootecnia da ESALQ/USP no período de Outubro/91 a Fevereiro/92. Três vacas holandesas e uma mestiça fistuladas no rúmen foram alocadas aos quatro tratamentos. Os animais permaneceram em baias individuais, recebendo alimento à nível de manutenção, uma vez por dia sempre às 8:00 hs da manhã, com livre acesso à água.

3.2. Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos (T) foram quatro dietas designadas por T_0 , T_1 , T_2 e T_3 que continham os níveis de 0, 10, 20 e 30% de caroço de algodão, conforme apresentado na Tabela 4. Na Tabela 5 estão as médias percentuais da composição bromatológica das rações fornecidas. O concentrado participava com um percentual de 30% (base seca), onde os níveis de caroço de algodão entravam em substituição crescente aos níveis de farelo + casca de algodão. Essa

mistura continha 60,42% de farelo + 39,58% de casca de algodão. À ração foi adicionado uma mistura que continha 85% de uréia + 15% de sulfato de amônio e suplementos minerais. Os animais também receberam vitamina ADE, via parenteral.

Tabela 4. Composição da ração.

	Tratamentos (% na matéria seca)			
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
cana-de-açúcar	66,3	66,3	66,3	66,3
caroço de algodão	-	10,0	20,0	30,0
farelo + casca de algodão	30,0	20,0	10,0	-
uréia + sulfato	1,7	1,7	1,7	1,7
sal mineral	0,5	0,5	0,5	0,5
sal comum	0,5	0,5	0,5	0,5
calcário	1,0	1,0	1,0	1,0

Tabela 5. Média percentual da composição bromatológica das rações fornecidas.

Parâmetros	Tratamentos (% na matéria seca)			
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
MS	37,07	36,73	38,08	38,42
MM	5,50	5,21	5,24	5,16
PB	11,93	11,57	12,09	12,18
EE	0,51	2,65	4,74	6,74
FDN	54,72	52,85	49,73	47,46
FDA	36,44	34,90	32,78	33,00

MS = matéria seca

MM = matéria mineral

PB = proteína bruta

EE = extrato etéreo

FDN = fibra em detergente neutro

FDA = fibra em detergente ácido

Fonte : LUDOVICO (1992²⁴).

O delineamento experimental foi o quadrado latino 4x4, Tabela 6. Cada período teve a duração de 18 dias, sendo 14 de adaptação e 4 de coletas.

Tabela 6. Esquema do delineamento quadrado latino.

	Animais			
	1	2	3	4
Períodos				
1ª	T ₂	T ₀	T ₃	T ₁
2ª	T ₃	T ₁	T ₀	T ₂
3ª	T ₀	T ₂	T ₁	T ₃
4ª	T ₁	T ₃	T ₂	T ₀

3.3. Amostragens e inoculação

Um animal era amostrado por dia. A coleta de conteúdo ruminal era sempre 4 horas após a alimentação.

Poucos minutos antes da coleta, 180 ml de solução de diluição anaeróbica (ADS), Tabela 9, era adicionada anaerobicamente e assepticamente, no liquidificador e ali permanecia até ser adicionada à ela 20 g de amostra do conteúdo ruminal retirada manualmente do animal, colocada em recipiente fechado e levado imediatamente ao laboratório, onde então era pesada. O liquidificador permanecia ligado por 3 minutos. Esta diluição do conteúdo do rúmen (10^{-1}) foi então

diluída em tubos de ensaio contendo 9,0 ml de solução ADS, formando a diluição 10^{-2} . Dos tubos com a diluição 10^{-2} , formava-se a diluição 10^{-3} à partir da qual começava-se a inocular em meios de cultura para estimar a população de fungos (três tubos por diluição), Tabela 7. E prosseguia-se até 10^{-6} para fungos e 10^{-12} para bactérias, Tabela 8, onde o tubo final, para fungos, continha 1×10^{-6} g de conteúdo ruminal/ ml de meio de cultura. As diluições eram sempre processadas com pipetas graduadas, esterilizadas, descartáveis.

A inoculação do conteúdo ruminal para avaliação da população de bactérias, iniciava-se a partir da diluição 10^{-6} , já que esta população é muito maior que a população de fungos. Após a inoculação para a estimação das populações de fungos e bactérias, os tubos de ensaio permaneciam em estufa a 38°C por 7 dias.

3.3.1. Meios de cultura

Na segunda semana de adaptação da dieta, as amostras do fluido ruminal eram coletadas manualmente do animal que recebia a dieta controle antes do fornecimento do alimento. O fluido era obtido por filtragem em quatro camadas de pano de queijo e levado ao laboratório onde era centrifugado a 1000 g/20 minutos e então preparado o meio de cultura para bactérias e fungos totais do rúmen, Tabela 7. Este meio era

preparado com fluxo de CO_2 e quando estava quase em ebulição adicionava-se anaerobicamente Na_2CO_3 12%. Após 12 minutos de fluxo com CO_2 adicionava-se cisteína Hcl 3% e deixava-se CO_2 borbulhando por mais 10-15 minutos.

Tabela 7. Composição do meio de cultura para fungos.

Ingredientes	Quantidades
solução mineral 1	45,0 ml
solução mineral 2	45,0 ml
rezarsurina 0,1%	0,3 ml
heme 0,1%	0,3 ml
glicose	0,3 g
celobiose	0,3 g
maltose	0,3 g
xilose	0,3 g
tripticase	0,6 g
levedura	0,15 g
mistura de AGV	1,35 ml
fluido de rúmen (centrifugado a 1000g/20mins.)	60,0 ml
suspensão de celulose 3%	75,0 ml
água destilada	15,2 ml
Na_2CO_3 12%	10,0 ml
cisteína Hcl 3%	5,0 ml

O pH dos meios de cultura era ajustado para 6,7-6,9, se necessário, com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio. A seguir esse meio era distribuído, com auxílio de uma pipeta graduada em alíquotas de 8,0 ml (bactérias), em alíquotas de 6,0 ml (fungos), para tubos de ensaio (1,3 cm de diâmetro) e autoclavados por 15-20 minutos.

Tabela 8. Composição do meio de cultura para bactérias totais.

ingredientes	Quantidades
solução mineral 1*	90,0 ml
solução mineral 2**	90,0 ml
resarzurina 0,1%	0,6 ml
glicose	0,45 g
celobiose	0,45 g
maltose	0,45 g
xilose	0,45 g
água destilada	150,0 ml
fluido ruminal	240,0 ml
Na ₂ CO ₃ 12%	20,0 ml
cisteína Hcl 3%	10,0 ml

Solução em g/l

mineral 1* = K₂HPO₄ 3,0

mineral 2** = KH₂PO₄ 3,0; (NH₄)₂SO₄ 6,0; NaCl 6,0; MgSO₄ 0,6; CaCl₂.2H₂O 0,795

3.3.1.1. Solução de Na₂CO₃ 12%

A solução de Na₂CO₃ 12% era preparada adicionando 36 g de Na₂CO₃ a um volume final de 300 ml de água destilada e depois transferida para um balão de vidro de fundo redondo de 500 ml onde recebia fluxo de CO₂ por 30 minutos. Em seguida, era adicionado, anaerobicamente, uma alíquota de 10,0 ml (pipeta graduada) em tubos de ensaio e autoclavados por 20 minutos.

3.3.1.2. Solução de cisteína.Hcl 3%

A solução de cisteína Hcl 3% era preparada em um frasco de vidro de fundo redondo, onde era adicionado 300 ml de água

destilada que era aquecida para eliminar gases enquanto recebia fluxo de CO_2 por 20-30 minutos. Em seguida adicionava-se 9,0 g de cisteína HCl e continuava fluxando CO_2 por mais 15 minutos. Essa solução era, então, distribuída anaerobicamente (pipeta graduada) em tubos de ensaio em alíquotas de 5,0 e 10,0 ml e autoclavados por 20 minutos.

3.3.1.3. Soluções minerais

As soluções minerais 1 e 2 eram preparadas antecipadamente e armazenadas em geladeira, igualmente a mistura de AGV que teve a seguinte composição: 17,0 ml de ácido acético, 6,0 ml de ácido propiônico, 4,0 ml de ácido butírico, 1,0 ml de ácido n-valérico, 1,0 de ácido isovalérico e 1,0 ml de ácido alfa metil butírico.

3.3.1.4. Solução de antibiótico

A solução de antibiótico, para o meio de cultura de fungos, era preparada dissolvendo os antibióticos em água destilada que foi borbulhada com CO_2 por 20 minutos e então filtrada, através de uma membrana (acrodisco nº 4192, Med. Device Division Gelman Sciences, Inc., 674 S. Wagner Rd., Ann Arbor, Michigan 48106) que continha um poro de tamanho igual a 0,2 micra, para um recipiente estéril, com a ajuda de uma seringa de 50 ml e agulha nº 14. Um ml (pipeta graduada,

esterilizada e descartável) foi, então, adicionado em cada tubo de ensaio contendo meio de cultura, anaerobicamente. Essa solução de antibiótico era adicionada dois dias antes da incubação e continha 14.000 U de penicilina e 920 U de estreptomicina por ml. A penicilina G potássica e a estreptomicina usadas continham, respectivamente, 1.600 e 700 U/mg. Essa solução de antibióticos foi adicionada para inibir crescimento bacteriano.

3.3.1.5. Rezarsurina 0,1%

A solução de rezarsurina foi preparada adicionando 100 mg do substrato em 100 ml de água destilada contida num frasco volumétrico e estocada em frasco de vidro.

3.3.1.6. Solução heme 0,1%

100 mg de heme foi dissolvido em NaOH 0,02% e então diluído para um volume final de 100 ml de água destilada.

3.3.1.7. Solução de diluição anaeróbica (ADS)

Juntamente com o preparo e distribuição do meio de cultura em tubos de ensaio, era preparada uma solução para posterior diluição da amostra do conteúdo ruminal, (Tabela 9) sendo a mesma preparada anaerobicamente e distribuída em

alíquotas de 9,0 ml por tubos de ensaio para posterior esterelização em autoclave por 20 minutos. Também era preparada 180 ml de solução de diluição anaeróbica para a primeira diluição (10^{-1}) que acontecia dentro do liquidificador onde foi colocada 20 g da amostra do conteúdo ruminal.

Tabela 9. Composição da solução de diluição anaeróbica(ADS).

Ingredientes	Quantidades
solução mineral 1	90,0 ml
solução mineral 2	90,0 ml
rezarsurina 0,1%	0,6 ml
água destilada	394,0 ml
Na ₂ CO ₃ 12%	25,0 ml
cisteína Hcl 3%	10,0 ml

A solução de Na₂CO₃ 12% e cisteína Hcl 3% era adicionada da mesma forma que era adicionada nos meios de cultura. Quando a solução ADS estava bem reduzida (totalmente sem cor), era, então, adicionadas 9,0 ml em tubos de ensaio e 180 ml em frascos de vidro de fundo redondo e, assim, autoclavadas por 20 minutos.

3.4. Obtenção dos resultados

O crescimento das bactérias foi estimado através da turbidez visual, confirmado através do pH final e com o

auxílio de uma tabela, DEHORITY et al (1988²⁵), que também foi utilizada para fungos. Os valores de pH foram determinados em potenciômetro digital da Digimed, modelo TE - 902. O crescimento de fungos foi determinado através da observação visual do crescimento de colônias no meio de cultura e pH final.

Da amostra coletada para os estudos da população de bactérias e fungos, retirava-se também uma subamostra para a contagem dos protozoários. Esta amostra foi transferida para um recipiente junto com a solução de formaldeído 40% na proporção de 1:1, segundo metodologia de DEHORITY (1984).

3.5. Análise estatística

Os dados foram transformados para $\log_{10}$ porque a distribuição logarítima tende a ser mais uniforme que a distribuição dos valores das densidades estimadas. Como para algumas variáveis, em alguns tratamentos não foi observado crescimento, as transformações foram as seguintes:

Protozoários totais: $\log_{10}(x + 0)$

Entodinium: $\log_{10}(x + 0)$

Isotricha: $\log_{10}(x + 0,5)$

Dasytricha: $\log_{10}(x + 1)$

Diplodinium: $\log_{10}(x + 0)$

²⁵ = Op. Cit.

Epidinium: $\log_{10}(x + 1)$

Diplodinium: $\log_{10}(x + 0)$

Bactérias totais: $\log_{10}(x + 0)$

Fungos totais: $\log_{10}(x + 1)$

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SANEST de acordo com o seguinte modelo:

$$Y = M + A + P + T + E$$

onde:

M = média geral

A = efeito do animal

P = efeito do período

T = efeito do tratamento

E = erro

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Números de Fungos

Os fungos totais do rúmen tiveram um aumento em suas populações quando foi aumentado o nível de energia da dieta, mas estas populações começaram a decrescer com maiores níveis de suplementação. Um aumento também foi observado por Akin et al, (1988), citados por AKIN e WINDHAN, (1989), que observaram aumento na população dos fungos cujos animais recebiam suplementos ricos em energia em relação à dieta sem suplemento. Os resultados da população dos fungos totais do rúmen, podem ser vistos na Tabela 10. Esses microrganismos desenvolveram uma resposta quadrática ($P < 0,017$), como pode ser observado na Figura 1, apresentando uma população máxima calculada pela sua equação, a 12% de caroço de algodão na dieta.

Tabela 10. Média das populações microbianas observadas.

	Médias das populações/ml			
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
Protozoários (x 10 ⁶)	18,09	12,64	7,12	3,94
Bactérias (x 10 ⁶)	109,50	228,25	150,0	717,50
Fungos (x 10 ²)	131,50	150,75	226,67	14,0

Vale comentar aqui o resultado de um dos animais no tratamento T₂, onde o valor obtido foi muito superior aos dos outros animais no mesmo tratamento. Apesar de todo cuidado no laboratório para manuseio asséptico das amostras, tendo desta forma distribuído cada coleta de cada animal para cada dia, uma hipótese de contaminação não pode ser descartada, pois o valor alcançado foi maior que 75×10^5 /ml de conteúdo ruminal. Os valores encontrados para os outros animais no mesmo tratamento foram de 2300, 2400, e 2100/ml de conteúdo ruminal. No entanto, o valor alto não modificou a tendência da curva, sendo desta forma não descartado.

Este resultado para fungos é semelhante ao das bactérias totais. Sendo assim, os ácidos graxos dos lipídios, em determinada concentração, provavelmente, são tóxicos para os fungos totais do rúmen. Este trabalho, confirma as observações microscópicas de trabalhos anteriores em que os fungos também sofrem o efeito predatório dos protozoários, pois quando houve decréscimo dos ciliados totais, ocorreu uma aumento em sua população, e o decréscimo observado, provavelmente é devida a toxidez do lipídeo. Na verdade, as populações de fungos e bactérias totais, para apresentarem um efeito positivo em relação a lipídeos na dieta vão depender de um balanço entre um aumento (devido a ausência de protozoários) e uma diminuição (devido ao efeito tóxico desses lipídeos sobre o metabolismo destes microrganismos).

Número de Bactérias

Conforme ilustrado na Figura 2, as análises dos valores estimados para a população das bactérias totais do rúmen apresentaram uma regressão do tipo quadrática ($P < 0,002$). O aumento inicial é, provavelmente, devido ao decréscimo na população de protozoários que foram afetados pelos lipídeos contidos no caroço de algodão.

A principal variável que influenciou a população microbiana do rúmen foi a percentagem de extrato etéreo na matéria seca da ração (0,51; 2,65; 4,74; 6,74% nos tratamentos T_0 , T_1 , T_2 , T_3 , respectivamente, Tabela 5). Mas o farelo de algodão que participava, juntamente com a casca de algodão, em níveis crescentes de substituição do caroço integral, provavelmente aumentou a concentração da proteína degradável a nível de rúmen. Podendo, dessa forma, aumentar a eficiência de síntese de proteína bacteriana. Logo, o aumento inicialmente observado na população de bactérias totais pode estar relacionado, também, com o aumento da proteína degradável. Mesma observação pode ser feita para os fungos totais, que já demonstraram capacidade proteolítica.

De modo geral, neste trabalho, a população de bactérias encontrada nos tratamentos variou de $1,8 \times 10^8$ a $2,1 \times 10^9$ /ml de conteúdo ruminal, Tabela 10. De acordo com a literatura, a população de bactérias do rúmen é grande e diversificada. Segundo HUNGATE (1966) as bactérias estão na ordem de 10^{11} /ml.

ZAKIN el-DIN e el-SHAZLY (1969) obtiveram contagem igual a $3,0 \times 10^9$ /ml em amostras coletadas quatro horas após a alimentação e incubadas por uma hora. A população de bactérias totais do rúmen é constituída por um importante grupo de bactérias celulolíticas. A participação numérica de bactérias celulolíticas na amostra coletada 4 horas após a alimentação não é tão significativa quanto sua população contida numa amostra coletada 12 horas após alimentação, pois estes microrganismos apresentam um tempo de geração longo. Em se tratando de estudos com bactérias celulolíticas o ideal seria aumentar o tempo de amostragem.

A provável causa do decréscimo na população bacteriana no tratamento T_3 , pode ser o alto nível de extrato etéreo na ração que excede o nível recomendado, tornando-se tóxico. O pico da população calculada, segundo a equação de regressão destes microrganismos, foi alcançado a 22% de caroço de algodão adicionados à dieta.

LEGAY-CARMIER e BAUCHART (1989) determinaram massa bacteriana e encontraram 190 g de bactérias associadas à fase sólida /kg de matéria seca total das partículas do rúmen coletadas após alimentação. Este número subiu para 234 quando óleo de soja foi adicionado à dieta.

Nos trabalhos de IKWUEGBU e SUTTON (1982), o nível de óleo, 26ml/dia, que eliminou os protozoários do rúmen de ovinos, coincidiu com uma maior eficiência de síntese de proteína bacteriana. Quando uma maior quantidade de óleo de

linhaça foi adicionado, 40ml/dia, a síntese de proteína bacteriana foi reduzida, provavelmente devido ao efeito inibitório do óleo de linhaça sobre as bactérias. CZERKWASKI et al (1975) também encontraram um aumento no número de bactérias resultante da adição de gordura na dieta de ovinos. Eles trabalharam com níveis crescentes de óleo de linhaça nas dietas e encontraram uma população bacteriana de $3,5 \times 10^{10}$ /ml na dieta controle e de $4,0 \times 10^{10}$ /ml na dieta que continha 30g de óleo.

Números dos protozoários

A concentração de protozoários ciliados totais do rúmen foi afetada de modo linear ($P < 0,001$) pelo aumento do nível de caroço de algodão na dieta, conforme Tabela 10. À medida em que se elevou o teor de caroço de algodão com consequente aumento no teor de extrato etéreo na ração, ocorreu correspondente decréscimo na concentração dos ciliados totais do rúmen. Esses microrganismos alcançaram máximas contagens no tratamento controle ($18,09 \times 10^4$ /ml de conteúdo ruminal), onde o teor de extrato etéreo foi de 0,51%. A Figura 3 ilustra a relação entre o número dos protozoários totais e o nível de caroço de algodão adicionado à dieta. O valor médio encontrado nas contagens de $18,09 \times 10^4$ /ml de conteúdo

ruminal na ração controle (Tabela 10) está de acordo com o trabalho de PRESTON e LENG (1980). Eles relataram que em dietas de cana-de-açúcar, a população de protozoários é cerca de $1 \text{ a } 5 \times 10^5/\text{ml}$ de conteúdo ruminal.

Com o aumento da participação do caroço de algodão na dieta, os ciliados totais apresentaram reduções percentuais de: 30,5; 60,9 e 78,3% nos tratamentos de 10, 20 e 30% de suplementação de caroço de algodão, respectivamente, em relação ao controle. Essa redução no número de protozoário com a utilização de caroço de algodão, possivelmente é devida a toxidez dos ácidos graxos dos lipídios contidos neste alimento sobre o metabolismo destes microrganismos, pois os níveis de extrato etéreo na ração se elevaram com os aumentos do caroço de algodão, Tabela 5. Redução no número de protozoário devido a adição de lipídios foram observados por PURSER e MOIR (1966), CZERKAWSKI et al (1975), IKWUEGBU e SUTTON (1982) e LUDOVICO (1992²⁶).

Os protozoários ciliados encontrados no rúmen dos animais submetidos às dietas do experimento são pertencentes aos gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Isotricha*, *Dasytricha* e *Epidinium*. As médias dos valores observados estão na Tabela 11. Dos gêneros encontrados, apenas o *Entodinium* predominou em todos os tratamentos, representando cerca de 86,6; 56,5; 49,6 e 76,2% do total dos protozoários nos tratamentos T_0 , T_1 ,

²⁶ = Op. Cit.

T₂ e T₃, respectivamente (Tabela 9, apêndice). Esse gênero de protozoário obteve valor máximo de contagem no tratamento T₀ (15,5 x 10⁴ /ml de conteúdo ruminal). A predominância deste gênero em dietas à base de cana-de-açúcar, também foi observado por ARCURI (1988²⁷). Estudos sobre os gêneros de protozoários são escassos na literatura, dificultando, pois, níveis de comparação. LENG e PRESTON (1976) relataram que bovinos alimentados com dietas de cana-de-açúcar apresentam uma grande massa de ciliados totais no rúmen, e isto tem explicação na manutenção de valores altos e constantes de pH, o que foi também confirmado no trabalho de LUDOVICO (1992²⁸).

Quando os níveis de caroço de algodão na dieta dos animais foram aumentados para 10, 20 e 30% (2,65; 4,74 e 6,74% de extrato etéreo, respectivamente), a população de *Entodinium* diminuiu para os seguintes percentuais: 54,4; 77,0 e 80,1, respectivamente em relação ao tratamento controle, demonstrando uma redução linear ($P < 0,00034$) com o aumento da percentagem de caroço de algodão, Figura 4. O teor de 30% de caroço de algodão determinou um decréscimo de 80,1% na população destes protozoários em relação à sua população na ração controle, onde a população média foi de 155 x 10³/ml de conteúdo ruminal (Tabela 11). Esse decréscimo, provavelmente,

²⁷ = ARCURI, P. B. Centro nacional de Pesquisa de Gado de Leite, EMBRAPA, Coronel Pacheco, MG. Comunicação pessoal. 1988.

²⁸ = Op. Cit.

é resultado do excesso de extrato etéreo no tratamento T_3 , pois de acordo com a literatura o limite está entre 5 e 6% de lipídeos na dieta. Sendo o gênero *Entodinium* o principal constituinte dos ciliados totais observados em maiores proporções em todos os tratamentos, o efeito da suplementação de caroço de algodão na população deste gênero direcionou os efeitos na população de ciliados totais.

Tabela 11. Média dos cinco gêneros de protozoários do rúmen/ml.

Gêneros	Médias das populações (x 10 ⁴)			
	T_0	T_1	T_2	T_3
<u>Entodinium</u>	15,50	7,07	3,56	3,08
<u>Diplodinium</u>	1,89	1,80	1,88	0,55
<u>Isotricha</u>	0,27	0,64	0,40	0,16
<u>Dasytricha</u>	0,37	2,78	1,77	0,11
<u>Epidinium</u>	0,06	0,35	0,13	0,04

Da família ISOTRICHIDAE, foram observados os gêneros *Isotricha* e *Dasytricha*. As somas dos valores encontrados para estes dois gêneros de protozoários, em cada tratamento, conduz, os mesmos, a um ponto máximo que é inferior ao ponto máximo correspondente as somas de todos os outros gêneros encontrados. Sendo esta família constituída por protozoários grandes, é provável que o valor máximo, mesmo sendo inferior em relação ao valor máximo para as somas dos outros gêneros em todos os tratamentos, represente uma maior massa

microbiana, pois os outros gêneros são menores em tamanho. Resposta semelhante para esta família de protozoários também foi encontrada por LUDOVICO (1992²⁹) em tratamentos iguais a estes.

Os valores observados para a população do gênero *Isotricha* ($T_0 = 0,27 \times 10^4$; $T_1 = 0,64 \times 10^4$; $T_2 = 0,40 \times 10^4$ e $T_3 = 0,16 \times 10^4$ /ml de conteúdo ruminal) estão na Tabela 11. Esses microrganismos apresentaram uma regressão do tipo quadrática ($P < 0,10015$), conforme Figura 5. Esse gênero atingiu sua concentração máxima calculada pela equação de regressão a 16% de suplementação de caroço de algodão.

O gênero *Dasytricha* apresentou a mesma tendência do gênero *Isotricha*. Sua população máxima calculada foi a 14% de adição de caroço de algodão à dieta. Nos tratamentos com 20 e 30% de suplementação deste resíduo, foi observado decréscimos nas populações deste gênero ($17,77 \times 10^4$ /ml e $0,11 \times 10^4$ /ml, respectivamente, Tabela 11). As análises destes resultados mostraram uma regressão do tipo quadrática ($P < 0,014$), Figura 6. Este gênero demonstrou possuir uma sensibilidade maior aos ácidos graxos dos lipídeos do caroço de algodão, pois sofreram um decréscimo de cerca de 96% entre sua população máxima ($2,78 \times 10^4$ /ml) e mínima ($0,11 \times 10^4$ /ml) dos valores observados em relação aos *Isotricha*, onde o decréscimo foi de 75%. Os números obtidos nas contagens para

²⁹ = Op. Cit.

este gênero foram, entretanto, maiores em relação aos obtidos para *Isotricha*, exceto no tratamento t_3 , Tabela 11.

Os protozoários do rúmen apresentam um potencial amilolítico maior que celulolítico. Mas, espécies do gênero *Epidinium* também são grandes utilizadores de celulose (BAUCHOP e CLARKE, 1976) e o valor encontrado de $0,06 \times 10^4$ /ml de conteúdo ruminal (Tabela 11) para este gênero no tratamento T_0 (controle), constitui um valor relativamente baixo. As análises dos valores observados indicaram uma resposta quadrática ($P < 0,038$), Figura 7. O crescimento máximo calculado foi encontrado no nível de 11% de suplementação de caroço de algodão. Os *Epidinium* apresentaram as seguintes participações percentuais nos tratamentos: 0,5% no T_0 ; 3,4% no T_1 ; 1,9% no T_2 e 0,6% no T_3 , Tabela 12.

O gênero *Diplodinium* apresentou pequena variação em sua população nos níveis de 0, 10 e 20% de caroço de algodão ($1,89 \times 10^4$ /ml; $1,80 \times 10^4$ /ml; $1,88 \times 10^4$ /ml respectivamente), Tabela 11. O efeito inibitório foi mais evidente ao nível de suplementação testado de 30% ($0,55 \times 10^4$ /ml), observando-se uma resposta quadrática ($P < 0,05$), Figura 8. No tratamento T_2 , os *Diplodinium* apresentaram o segundo maior valor percentual (26,6%) dos protozoários totais; o primeiro correspondeu aos *Entodinium*, com 49,2%, Tabela 9, apêndice. O máximo crescimento calculado pela equação de regressão para esses microrganismos foi no nível de 10% de suplementação.

Os microrganismos do rúmen, cada qual na sua extensão,

foram afetados pelos efeitos nocivos dos ácidos graxos contido no caroço de algodão adicionados à dietas dos animais. Infelizmente, não foi possível aumentar o período experimental devido a disponibilidade de alimento, o que seria desejável em dietas contendo caroço de algodão. Para este tipo de dieta o ideal seria um período de adaptação de 3 a 4 semanas por causa do efeito residual do caroço de algodão.

$$y = 8,8116 + 0,3834x - 0,0162x^2$$

Figura 1. Relação entre o número de fungos totais, em log, e o nível de caroço de algodão.

$$y = 18,2019 + 0,2197x - 0,0049x^2$$

Figura 2. Relação entre o número de bactérias totais, em log, e o nível de caroço de algodão.

$$y = 12,1629 - 0,0542x$$

Figura 3. Relação entre o número de protozoários ciliados totais, em log, e o nível de caroço de algodão.

$$y = 11,8157 - 0,0592x$$

Figura 4. Relação entre o número de protozoários do gênero *Entodinium*, em log, e o nível de carvão de algodão.

$$y = 6,0479 + 0,3217x - 0,0098x^2$$

Figura 5. Relação entre o número de protozoários do gênero *Isotricha*, em log, e o nível de carço de algodão.

$$y = 6,1427 + 0,5714x - 0,0200x^2$$

Figura 6. Relação entre o número de protozoários do gênero *Dasytricha*, em log, e o nível de caroço de algodão.

$$y = 5,3230 + 0,2717x - 0,0134x^2$$

Figura 7. Relação entre o número de protozoários do gênero *Epidinium*, em log, e o nível de caroço de algodão.

$$y = 9,5796 + 0,0582x - 0,0030x^2$$

Figura 8. Relação entre o número de protozoários do gênero *Diplodinium*, el log, e o nível de caroço de algodão.

5. CONCLUSÕES

1 - A inclusão de caroço de algodão, em quantidades limitadas, nas dietas básicas de cana-de-açúcar pode ser benéfica, pois tende a reduzir os números de protozoários com subsequente aumento nos números de bactérias e fungos totais do rúmen.

2 - As bactérias e os fungos totais do rúmen também mostraram sensibilidade aos ácidos graxos dos lipídeos contidos no caroço de algodão. O número máximo calculado para a população de bactérias totais foi alcançado a 22% de adição de caroço de algodão na dieta (base seca) com decréscimos a partir de 23%. Os fungos também apresentaram esta sensibilidade, pois sua população máxima calculada foi alcançada a 12% de caroço de algodão na dieta com posteriores decréscimos. Logo, nestas condições, mesmo com uma baixa população de protozoários, a não observação de um aumento nas populações de bactérias e fungos totais indica uma toxidez do ácido graxo do lipídeo no metabolismo destes microrganismos.

3 - O aumento na população de fungos com o decréscimo da população de protozoários confirma a sugestão de que

protozoários também são predadores de zoósporos de fungos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU AKKADA, A.R.; BARLEY, E.E. e FINA, L.R. Ciliate protozoa in the rumen of the lactating cow. Journal of Dairy Science, Champain , 52:1088-1091, 1969.

ABOU AKKADA, A.R. & EL-SHAZLY, K. Effect of absenc of ciliate protozoa from the rumen on microbial activity and growth of lambs. Applied Microbiology, Washington, 12:384-390, 1964.

AKIN, D. E. & WINDHAN, W. R. Influence of diet on rumen fungi. In NOLAN, J. V.; LENG, R. A.; DEMEYER, D. I. ed. The roles of protozoa and fungi in ruimant digestion. Armidale, 1989. p. 75-81.

AKIN, D.E. & BONERMAN, W.S. Role of rumen fungi in fiber degradation. Journal of Dairy Science, Champain, 73(10):3023-3032, 1990.

- ANDERSON, M. J.; ADAMS, D. C.; LAMB, R. C. & WALTERS, J. L.
Feeding whole cottonseed to lactating dairy cows. Journal of Dairy Science, Champaign, **62**(7):1098-1103, 1979.
- ANDERSON, K. L.; NAGARAJA, T. C.; MORILL, J. L.; AVERY, T. B.; GALITSER, S. J. & BOYER, S. E. Ruminant microbial development in conventionally or early weaned calves. Journal of Animal Science, Menasha , **64**(4):1215-1226, 1987.
- ANKRAH, P.; LOERCH, S. C. & DEHORITY, B. A. Sequestration, migration and lysis of protozoa in the rumen. Journal of General Microbiology, London, **136**:1869-1875, 1990.
- BAUCHART, D.; LEGAY-CARMIER, F; DORIAU, M. & GAILLARD, B. Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid supplemented diets. British Journal of Nutrition, London, **63**:563-578, 1990.
- BAUCHOP, T. & CLARKE, R. T. J. Attachment of ciliate *Epidinium* crawley to plant fragments in the sheep rumen. Applied and Environmental Microbiology, Washington, **32**:417-422. 1976.

BAUCHOP, T. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. Applied and Environmental Microbiology, Washington, **38**:148-158, 1979.

BAUCHOP, T.; MUONTFORD, D. O. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and presence of rumen methanogens. Applied of Environmental Microbiology, Washington, **42**(6):1103-1110, 1981.

BAUCHOP, T. Colonization of plant fragments by protozoa and fungi. In NOLAN, J. V.; LENG, R. A.; DEMEYER, D. I., ed. The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Armidale, 1989. p. 13-96.

BICKERSTAFFE, R.; NOAKES, D. E. & ANNISON, E. F. Quantitative aspects of fatty acid biohydrogenation, absorption e transfer into milk fat in the lactating goat, with special reference to the CIS and TRANS isomers of octadecenoate and linoleate. Biochemical Journal, London , **130**(130):607-617, 1972.

BIRD, S. H. & LENG, R. A. The effects of defaunation of the rumen on the growth of catttle on low-protein high-energy diets. British Journal Nutrition, London , **40**:163-167, 1978.

BIRD, S. H. & LENG, R. A. Further studies on the effects on the presence or absence of protozoa in the rumen on live-weight gain and wool growth of sheep. British Journal of Nutrition, London, **52**(3):607-611, 1984.

BROOCKS, C. C.; GARNER, G. B.; PFANDER, W. H. The effect of added fat on the digestion of cellulose and protein by ovine rumen microorganisms. Journal of Animal Science, Menasha , **13**(3):758-764, 1954.

BRYANT, C. C. & SMALL, N. Observations on the ruminal microorganisms of isolated and inoculated calves. Journal of Dairy Science, Champain, **43**:654-667, 1960.

BRYANT, M. P. & ROBINSON, I. M. Effects of diet, time after feeding, and position sampled on numbers of viable bacteria in the bovine rumen. Journal of Dairy Science, Champain , **51**(12):1950-1955, 1968.

COCHRAN, W. G. Estimation of bacterial by means of the "Most Probable Number". Biometrics, Washington, **5**:105-116, 1950.

COLEMAN, G. S. The role of rumen in the metabolism of ruminants given tropical diets. Tropical of Animal Production, Santo Domingo, **41**:199-213, 1979.

COLEMAN, G. S. Hidrolysis of fraction 1 leaf protein and casein by rumen Entodiniomorphid protozoa. Journal of Applied Bacteriology, London, **55**:111-118, 1983.

COPPOCK, D. E.; MOYA, J. R.; WEST, J. W.; NAVE, D. H. & LABORE, J. M. Effect of lint on whole cottonseed passage and digestibility and diet choice on intake of whole cottonseed by holstein cows. Journal of Dairy Science, Champain, **68**(5):1198-1206, 1985.

CZERKAWSKI, J. W. & CHENG, K. J. Compartmentation in the rumen . In ROBSON, P. N., ed. The rumen microbial ecosystem. Washington, 1988. p. 361-86.

CZERKAWSKI, J. W.; CHRISTIE, W. W.; BRECKENRIDGE, G. & HUNTER, M. L. Changes in the rumen metabolism on sheep given increasing amounts of linseed oil in their diet. British Journal of Nutrition, London, **34**:25, 1975.

DEARTH, R. N.; DEHORITY, B. A. & POTTER, E. L. Rumen microbiol numbers in lambs as affected by level of feed intake and dietary diethylsbestrol. Journal of Animal Science, Menasha , **38**:991-996, 1974.

DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P. A. & GRIFO, A. P. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. Applied and Environmental Microbiology, Washington , 48(1):182-185, 1984.

DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P. A. & GRIFO, A. P. Most-probable-number procedures for enumeration ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of the total and cellulolytic numbers in one medium. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 55(11):2789-2792, 1989.

DEMEYER, D. I. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. Journal of Agricultural Environment, Cambridge, 6:295-337, 1981.

EADIE, J. M. The development of rumen microbiol populations in lambs and calves under various conditions of management. Journal of General Microbiology, London, 29:563-578, 1962a.

EADIE, J. M. Inter-relationship between certain ciliate protozoa. Journal of General Microbiology, London, 29:579-588, 1962b.

FONTY, G.; GOUET, P.; JOUANY, T. P. & SENAUD, J.
Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the
rumen of lambs. Journal of General Microbiology,
London, 133:1835, 1987.

FONTY, G. & GOUET, P. Establishment of microbial populations
in the rumen. Utilization of an animal model to study the
role of the different cellulolytic microorganisms *in vivo*.
In NOLAN, J. V.; LENG, R. A.; DEMEYER, D. I., ed. The
roles of protozoa and fungi in ruminant digestion.
Armidale, 1989. p. 39-49.

GALL, L. S. e HUHTANEM, C. N. J. Criteria for considering a
bacterium isolated from the rumen as a bona fide rumen
organism. Journal of Animal Science, Menasha,
9:656,abstr., 1950.

GORDON, G. L. R; PHILLIPS, M. W. Comparative fermentation
properties of anaerobic fungi from the rumen. In NOLAN, J.
V.; LENG, R. A.; DEMEYER, D. I., ed. The roles of
protozoa and fungi in ruminant digestion. Armidale, 1989.
p. 127-38.

GRENET, E.; BARRY, P. Colonization of thick-walled plant
tissues by aerobic fungi. Animal Feed Science and
Technology, Amsterdam, 19(1-2):25-31, 1989.

GRENET, E.; FONTY, G. & BARTRY, P. SEM study of degradation of maize and lucerne stems in the rumen of gnotobiotic lambs harbouring only fungi as cellulolytic microorganisms. In NOLAN, J. V.; LENG, R. A.; DEMEYER, D. I., ed. The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion, Armidale, 1989. p. 265-7.

GRUBB, J. A. & DEHORITY, B. A. Effects of an abrupt change in ration from all roughage to high concentrate upon rumen microbial numbers in sheep. Applied Microbiology, Washington, 30:404-412, 1975.

HARFOOT, C. G. Lipid metabolism in the rumen. Progress in Lipid Research, Oxford, 17:21, 1978.

HARRISON, D. G.; BEEUER, D. E. & OSBOURN, D. F. The contribution of protozoa to the protein entering the duodenum of sheep. British Journal of Nutrition, London, 41:521, 1979.

HAWKINS, G. E.; CUMMING, K. A.; SILVERIO, M. & JILEK, J. J. Physiological effects of whole cottonseed in diet of lactating dairy cows. Journal of Dairy Science, Champaign, 68(10):2608-2614, 1985.

HENDERSON, C. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. Journal of Agricultural Science, Cambridge, 89:107-112, 1973.

HUNGATE, R. E.; REICHL, J. & PRINS, R. Parameters of rumen fermentation in a continuously fed sheep: Evidence of a microbial ruminant pool. Applied Microbiology, Washington, 22:1104-1113, 1971.

HUNGATE, R. E. The rumen and its microbes. Academic Press. Nova York, 1966.

IKWUEGBU, O. A. & SUTTON, J. D. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. British Journal of Nutrition, London, 48:365-375, 1982.

JAYNE-WILLIAMS, D. J. J. The bacterial flora of the rumen of the healthy and bloating calves. Applied Bacteriology, London, 47:271, 1979.

KLUSMEYER, T.H. & CLARK, J.H. Effects of dairy fat and protein on fatty acid flow to the duodenum and in milk produced by dairy cows. Journal of Dairy Science, Champaign, 74:3055-3067, 1991.

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

LENG, R. A. & NOLAN, J. V. Nitrogen metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science, Champaign, **67**:1072-1089, 1984.

LENG, R. A. & PRESTON, T. R. Sugar cane for cattle production present constraints perspectives and research priorities. Tropical Animal Production, Santo Domingo, **1**:1-22, 1976.

LINDSEY, T. O.; HAWKINS, G. E. & GUTHRIE, L. D. Physiological responses of lactating cows to gossypol from cottonseed meal reactions. Journal of Dairy Science, Champaign, **63**(4):562-573, 1980.

MALES, J. R. & PURSER, D. B. Relationship between rumen ammonia levels and the microbial population and volatile fatty acid proportions in faunated and defaunated sheep. Applied Microbiology, Washington, **19**:485-490, 1970.

- MOHAMED, D. E.; SATTER, L. D; GRUMMER, R. R. & EHLE, F. R. Influence of dietary cottonseed and soybean on milk production and composition. Journal of Dairy Science, Champaign, 71(10):2677-2688, 1988.
- MUELLER, R. E.; IANNOTTI, E. L. & ASPLUND, J. M. Isolation and identification of adherent epimural bacteria during succession in young lambs. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 47:724, 1984a.
- MUELLER, R. E.; JANNOTTI, E. L. & ASPLUND, J. M. Successive changes in the epimural bacterial community of young lambs as revealed scanning electron microscopic. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 47:715, 1984b.
- NAKAMURA, K. & KANEGASAKI. Densities of ruminal protozoa of sheep established under different dietary conditions. Journal of Dairy Science, Champaign, 52:250-255, 1969.
- NOBLE, R. C. Digestion, absorption and transport of lipids in ruminant animals. Progress in Lipid Research, Oxford, 17:55, 1978.

- NOLAN, J. V. Implications of protozoa and fungi for the protein nutrition. In NOLAN, J. V.; LENG, R. A.; DEMEYER, D. I., ed. The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Armidale, 1989. p. 211-221.
- NUNGENT, J. H. A. & MANGAM, J. L. Characteristics of the rumen proteolysis of fraction 1 (185) leaf protein from lucerne (*Medicago sativa*). British Journal of Nutrition, London, **46**:39-58, 1981.
- OBLINGER, J. L. & KOBURGER, J. A. The most probable number technique. In SPECK, M. L., ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, Washington, 1984. p. 99-111.
- ORPIN, C. G. Ecology of rumen anaerobic fungi in relation on the host animal. In NOLAN, J. V.; LENG, R. A.; DEMEYER, D. I., ed. The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Armidale, 1989. p. 129-138.
- ORPIN, C. G. & JOBLIN, K. N. The rumen anaerobic fungi. In ROBSON, P. N., ed. The rumen microbial ecosystem. Washington, 1988. p. 129-150.

ORPIN, C. G. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell plants. Animal Feed Science and Technology, Amsterdam, 10:121-143, 1984.

ORPIN, C. G. The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life history and invasion of plant material in the rumen. Journal of General Microbiology, London, 99:107-117, 1977a.

ORPIN, C. G. The occurrence of chitin in the cell walls of the rumen organisms *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*. Journal of General Microbiology, London, 99:215-218, 1977b.

ORPIN, C. G. Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. Journal of General Microbiology, London, 94:270-280, 1976.

ORPIN, C. G. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. Journal of General Microbiology, London, 91:249-262, 1975.

ORPIN, C. G. The rumen flagellate *Callimastix frontalis*: does sequestration occur? Journal of General Microbiology, London, 84:395-398, 1974.

OSBORNE, J. M. & DEHORITY, B. A. Synergism in degradation and utilization of intact forage cellulose, hemicellulose and pectin by three pure cultures of ruminal bacteria. Applied and Environmental Microbiology, Washington, **55**(9):2247-2250, 1989.

PALMQUIST, D. L. Suplementação de lipídeos para vacas em lactação. In PEIXOTO, A. M.; de MOURA, J. C. & de FARIA, V. P., ed. Simpósio sobre produção animal, Piracicaba, 1989.

PALMQUIST, D. L. e JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: review. Journal of Dairy Science, Champaign, **63**:1-14, 1980.

POTTER, E. L. & DEHORITY, B. A. Effects of changes in feed level, starvation and level of feed after starvation upon the concentration of rumen protozoa in the ovine. Applied Microbiology, Washington, **26**:692-698, 1973.

PRESTON, T. R. & LENG, R. A. Utilization of Tropical feeds by ruminants. In . Digestive physiology and metabolism in ruminants. Lancaster, M.T.P. Press Ltd., 1980. p. 621-

PURSER, D. B. & MOIR, R. J. Dietary effects upon concentrations of protozoa in the rumen. Journal of Animal Science, **25**:668, 1966.

REISER, R. & FU, C. H. The mechanism of gossypol detoxification by ruminant animals. Journal of Nutrition, **76**:215, 1962.

SHAW, J. C. & ENSOR, W. L. Effect of feeding cod liver oil and insaturated fatty acids on rumen volatile fatty acids and milk fat content. Journal of Dairy Science, Champaign, **42**:1238-1240, 1959.

SOCKEY, W. L. & DEHORITY, B. A. Comparison of two methods for enumeration of the ethylene oxide treatment for forage sterelization. Applied and Environmental Microbiology, Washington, **55**(7):1766-1768, 1989.

SLYTER. L.; OLTJEN, R. R.; KERN, D. L. & BLANK, F. C. Influence of type and level of grain and diethylsbestrol on the rumen microbial population of steers feed all concentrate diets. Journal of Animal Science, Menasha, **31**:996-1002, 1970.

SMITH. N. E.; COLLAR, L. S.; BATH, D. L.; DUNKLEY, W. LO. & FRANKE, A. A. Digestibility and effects of whole cottonseed

fed to lactating dairy cows. Journal of Dairy

SUTTON, J. D.; KNIGHT, R.; McALLAN, A. B. & SMITH, R. H.
Digestion and synthesis in the rumen of sheep given diets
supplement with and protected oils. British Journal of
Nutrition, London, 49:419, 1983.

SUTTON, J. D.; SMITH, R. H.; McALLAN, A. B. ; STORRY, J. E.
& CORSE, D. A. Effect of variation in dietary protein and
of supplement of cod-liver oil on energy digestion and
microbial synthesis in the rumen of sheep fed hay and
concentrates. Journal of Agricultural Science, Cambridge,
84:317-326, 1975.

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. In O
& B Books, Inc., ed. Corvales, 1983.

VEIRA, D. M. The role of ciliate protozoa in nutrition of
the ruminant. Journal of Animal Science, Menasha,
63:1547-1560, 1986.

ZAKIN el-DIN, M. ; el-SHAZLY, K. Evaluation of method of
measuring fermentation rates and net growth of rumen
microorganisms. Applied Microbiology, Washington,
17:801-804, 1969.

WELLER, R. A. & PILGRIN, A. F. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. British Journal of Nutrition, London, 32:341-351, 1974.

APÊNDICE

Tabela 1. Valor calculado da população de protozoários no rúmen do animal 1.

% de caroço de algodão	população (/ml)	gêneros*					
		Ent.	Dipl.	Iso.	Dasy	Epi.	total
0	$\times 10^4 =$	10.8	1,0	0,32	0,08	0,14	12,16
	% =	88,81	8,22	2,63	0,65	0,32	100
10	$\times 10^4 =$	10.04	2.96	1,12	3,84	0,32	18,28
	% =	54.92	16.19	6,13	21,01	1,75	100
20	$\times 10^4 =$	3.72	1.08	0,36	1,76	0	6,84
	% =	54.38	15.79	5,26	25,73	0	100
30	$\times 10^4 =$	3.12	0.76	0,12	0	0	4,0
	% =	78,0	19,0	3,0	0	0	100

* gêneros: Ent. Entodinium, Dipl. Diplodinium, Iso. Isotricha, dasy. Dasytricha, Epi. Epidinium.

Tabela 2. Valor calculado da população de protozoários no rúmen do animal 2.

% de caroço de algodão	população (/ml)	gêneros*					
		Ent.	Dipl.	Iso.	Dasy.	Epi.	total
0	$\times 10^4 =$	20,36	3,4	0,52	0,44	0,16	24,84
	% =	81,96	13,69	2,09	1,77	0,64	100
10	$\times 10^4 =$	5,44	2,24	0,72	4,28	0,32	13,04
	% =	41,72	17,18	5,52	32,82	2,45	100
20	$\times 10^4 =$	2,92	3,0	0,56	0,68	0,24	7,4
	% =	39,46	40,54	7,57	9,19	3,24	100
30	$\times 10^4 =$	5,2	0,52	0,4	0,28	0,16	6,56
	% =	79,27	7,93	6,09	4,27	2,44	100

* gêneros: Ent. Entodinium, Dipl. Diplodinium, Iso. Isotricha, Dasy. Dasytricha, Epi. Epidinium.

Tabela 3. Valor calculado da população de protozoários no rúmen do animal 3.

% de caroço de algodão	população (/ml)	gêneros*					
		Ent.	Dipl.	Iso.	Dasy	Epi.	total
0	$\times 10^4 =$	16,12	1,28	0	0	0	17,40
	% =	92,64	7,36	0	0	0	100
10	$\times 10^4 =$	6,56	1,08	0,4	1,88	0,48	10,4
	% =	63,08	10,08	3,84	18,08	4,61	100
20	$\times 10^4 =$	4,24	2,32	0,2	1,0	0,28	8,04
	% =	52,74	28,85	2,49	12,44	3,48	100
30	$\times 10^4 =$	3,04	0,6	0,04	0,08	0	3,76
	% =	80,85	15,96	1,06	2,13	0	100

* gêneros: Ent. Entodinium, Dipl. Diplodinium, Iso. Isotricha, dasy. Dasytricha, Epi. Epidinium

Tabela 4. Valor calculado da população de protozoários no rúmen do animal 4.

% de caroço de algodão	população (/ml)	gêneros*					
		Ent.	Dipl.	Iso.	Dasy	Epi.	total
0	$\times 10^4 =$	14,72	1,88	0,24	0,96	0,04	17,76
	% =	82,89	10,58	1,35	5,40	0,22	100
10	$\times 10^4 =$	5,52	0,92	0,40	1,08	0,40	8,32
	% =	66,35	11,06	4,81	12,98	4,81	100
20	$\times 10^4 =$	2,72	1,12	0,40	0,96	0,04	5,24
	% =	51,91	21,37	7,63	18,32	0,76	100
30	$\times 10^4 =$	0,96	0,32	0,08	0,08	0	1,44
	% =	66,67	22,22	5,55	5,55	0	100

* gêneros: Ent. Entodinium, Dipl. Diplodinium, Iso. Isotricha, Dasy. Dasytricha, Epi. Epidinium

Tabela 5. Valores estimados para o crescimento das bactérias totais do rúmen.

	crescimento/ml de conteúdo ruminal				
	Animais				MÉDIA
	1	2	3	4	
% de caroço de algodão					
0	93x10 ⁶	75x10 ⁶	120x10 ⁶	150x10 ⁶	109,5x10 ⁶
10	440x10 ⁶	93x10 ⁶	230x10 ⁶	150x10 ⁶	228,25x10 ⁶
20	230x10 ⁶	280x10 ⁶	200x10 ⁶	150x10 ⁶	2150,0x10 ⁶
30	110x10 ⁶	930x10 ⁶	930x10 ⁶	900x10 ⁶	717,5x10 ⁶

Tabela 6. Valores estimados para o crescimento dos fungos totais do rúmen.

	crescimento/ml de conteúdo ruminal				
	Animais				MÉDIA
	1	2	3	4	
% de caroço de algodão					
0	93,0x10 ²	150,0x10 ²	240,0x10 ²	43,0x10 ²	131,5x10 ²
10	120,0x10 ²	150,0x10 ²	93,0x10 ²	240,0x10 ²	150,75x10 ²
20	230,0x10 ²	>75,0x10 ⁵	240,0x10 ²	210,0x10 ²	226,67x10 ²
30	0,0	23,0x10 ²	4,0x10 ²	15,0x10 ²	14,0x10 ²

Tabela 7. População média (log) dos microrganismos do rúmen.

	Médias das populações/ml					C.V.		Probabilidades para as regressões	
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	%			Linear	Quadrática
Protozoários	5,26	5,10	4,85	4,59	1,75			(0,00014)	(0,123)
Bactérias	8,04	8,36	9,33	8,85	3,16			(0,0025)	(0,019)
Fungos	4,19	4,18	6,28	3,02	22,14			(0,058)	(0,017)

Tabela 8. População média (log) dos cinco gêneros de protozoários.

Gêneros	Média das populações/ml				C.V. (%)	Probabilidades para as regressões	
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃		Linear	Quadrática
<u>Entodinium</u>	5,19	4,85	4,55	4,49	2,67	(0,00033)	(0,14221)
<u>Diplodinium</u>	4,28	4,25	4,27	3,74	5,07	(0,02404)	(0,04418)
<u>Isotricha</u>	3,43	3,81	3,60	3,20	27,21	(0,55979)	(0,10014)
<u>Dasytricha</u>	3,57	4,44	4,07	3,05	29,88	(0,58648)	(0,01313)
<u>Epidinium</u>	2,78	3,54	3,11	2,60	43,28	(0,02650)	(0,03703)

Tabela 9. Média das percentagens dos gêneros de protozoários.

Gêneros	Médias das percentagens			
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
<i>Entodinium</i>	86,57	56,52	49,62	76,19
<i>Diplodinium</i>	9,96	13,70	26,64	16,28
<i>Isotricha</i>	1,52	5,07	5,74	3,91
<i>Dasytricha</i>	1,96	21,22	16,42	2,99
<i>Epidinium</i>	0,50	3,40	1,87	0,61

Tabela 10. Composição em extrato etéreo das dietas na matéria seca.

	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
Período 1	0,49	2,62	4,44	6,16
Período 2	0,46	2,55	5,02	7,37
Período 3	0,52	2,83	4,78	6,73
Período 4	0,55	2,60	4,71	6,70
Média	0,51	2,65	4,74	6,74
Desvio Padrão	0,03	0,11	0,21	0,43