

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS RUMINAIS DE
NOVILHOS ALIMENTADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR OU
FENO DE TIFTON COM DIFERENTES RELAÇÕES
VOLUMOSO:CONCENTRADO**

Carlos Stefenson Ribeiro Júnior
Engenheiro Agrônomo

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS RUMINAIS DE
NOVILHOS ALIMENTADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR OU
FENO DE TIFTON COM DIFERENTES RELAÇÕES
VOLUMOSO:CONCENTRADO**

Carlos Stefenson Ribeiro Júnior

Orientadora: Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli

Co-orientadora: Dra. Roberta Carrilho Canesin

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

2014

R484q Ribeiro Júnior, Carlos Stefenson
Quantificação de microrganismos ruminais de novilhos alimentados com cana-de-açúcar ou feno de tifton com diferentes relações volumoso:concentrado / Carlos Stefenson Ribeiro Júnior. -- Jaboticabal, 2014
v, 63 p. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Telma Teresinha Berchielli

Co-orientador: Roberta Carrilho Canesin

Banca examinadora: Márcia Helena Machado da Rocha Fernandes, Maria Fernanda Soares Queiroz, Otávio Rodrigues Machado Neto, Ricardo Andrade Reis

Bibliografia

1. Carboidratos Fibrosos. 2. Fermentação Ruminal. 3. Microbiologia Ruminal. 4. PCR Tempo Real. 5. Proteína Microbiana. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.085.2:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS RUMINAIS DE NOVILHOS ALIMENTADOS
COM CANA-DE-AÇÚCAR OU FENO DE TIFTON COM DIFERENTES RELAÇÕES
VOLUMOSO: CONCENTRADO

AUTOR: CARLOS STEFENSON RIBEIRO JÚNIOR

ORIENTADORA: Profa. Dra. TELMA TERESINHA BERCHIELLI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ROBERTA CARRILHO CANESIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA , pela
Comissão Examinadora:



Profa. Dra. TELMA TERESINHA BERCHIELLI
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. MÁRCIA HELENA MACHADO DA ROCHA FERNANDES
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. RICARDO ANDRADE REIS
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. OTÁVIO RODRIGUES MACHADO NETO
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu



Profa. Dra. MARIA FERNANDA SOARES QUEIROZ
Universidade Federal de Mato Grosso / Cuiabá/MT

Data da realização: 22 de abril de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Carlos Stefenson Ribeiro Júnior filho de Carlos Stefenson Ribeiro (*in memorian*) e Maria Lúcia Toledo Ribeiro nasceu no dia 5 de julho de 1986 na cidade de Juiz de Fora - MG. Iniciou sua graduação em Engenharia Agrônômica em março de 2005 na Universidade Federal de Minas Gerais, obteve o título de Engenheiro Agrônomo em fevereiro de 2010. Em março de 2010 deu início a pós-graduação em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na área de nutrição de ruminantes, atualmente para a obtenção do título de Doutor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por tudo!

À minha mãe, pela pessoa maravilhosa que é e por sempre estar ao meu lado.

Ao meu pai (*in memoriam*), por tudo que fez por mim, enquanto pôde.

À Ana Rebeca, por tudo!

À Universidade Estadual Paulista, especialmente ao Departamento de Zootecnia e Tecnologia, pela oportunidade de realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2010/02036-4 e nº 2012/ 20617-7 pelos auxílios concedidos.

À minha orientadora Telma Teresinha Berchielli, pela confiança, incentivo, paciência e ensinamentos.

À minha co-orientadora e amiga Roberta Carrilho Canesin, pela amizade, compreensão e pela valiosa contribuição neste trabalho.

Aos amigos do GENA, em especial ao Rafael Azevedo, Sâmara Rufino, Luana Rufino, Antônio Carlos e Fabrício, obrigado pelo apoio.

Ao professor Ricardo Reis pelos momentos de discussão científica e contribuição ao trabalho e ao meu desenvolvimento profissional.

Ao professor Marcos Neves pelos ensinamentos, e a professora Luciana Geraseev pelo incentivo.

Aos Telmeiros e Ex-telmeiros, sem eles este trabalho não seria possível de ser realizado, um agradecimento especial à Juliana, Giovani e Yury, foram muito importantes durante a execução deste trabalho.

Aos funcionários e colaboradores do Laboratório de Nutrição Animal, pelos ensinamentos e colaboração durante a temporada de análises.

Aos funcionários, professores e colegas do Departamento de Tecnologia, em especial aos professores, Jesus Ferro, Maria Ignês Ferro e Luiz Roberto Furlan, por abrir as portas do laboratório para a realização da pesquisa e pelos valiosos ensinamentos.

Ao amigo Miguel, pelos ensinamentos.

Aos amigos da República 51, Gaúcho, Devasso, Minhoca, Nísio, Mandibú, Akuado, Érreum, e à agregada Guanabara.

Ao amigo Vlad que tanto contribuiu na parte de campo do experimento!

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

DEDICO!

Aos meus pais Carlos Stefenson Ribeiro (*in memoriam*), e Maria Lúcia Toledo Ribeiro por acreditar em mim. Obrigada por tudo que fazem, e o que representam na minha vida, são meus maiores exemplos.

À Ana Rebeca Castro Lima, por tudo que fez por mim.

Às minhas avós, Josefina e Léa, mesmo distantes sempre presentes.

À minha irmã e minha sobrinha, por fazer minha vida mais feliz!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura.	2
2.1. Volumoso na alimentação ruminantes.....	2
2.2. Microrganismos ruminais em dietas com diferentes frações carboidratos	5
2.2.1 Síntese de proteína microbiana.....	7
2.3. Técnicas de avaliação da microbiota ruminal.....	11
3. OBJETIVOS	14
4. REFERÊNCIAS.....	14
CAPÍTULO 2 – PROPORÇÕES CRESCENTES DE CONCENTRADO EM DIETAS COM CANA-DE-AÇÚCAR REDUZEM BACTERIAS FIBROLITICAS SEM ALTERAR A DIGESTIBILIDADE DA FIBRA	22
RESUMO.....	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Animais e dietas experimentais.....	24
2.2. Coleta de dados e processamento de amostras	26
2.3. Microbiologia ruminal.....	27
2.3.1.Quantificação de protozoários.....	29
2.4. Delineamento experimental e análise estatística	29
3. RESULTADOS	30
4. DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÃO.....	37
6. REFERÊNCIAS.....	38

CAPÍTULO 3 – FENO DE TIFTON 85 EM DIETAS COM PROPORÇÕES CRESCENTES DE CONCENTRADO REDUZEM OS RISCOS DE DISTÚRBIOS RUMINAIS EM NOVILHOS NELORE CONFINADOS.....	42
RESUMO.....	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. Animais e dietas experimentais.....	44
2.2. Coleta de dados e processamento de amostras	46
2.3. Microbiologia ruminal.....	47
2.3.1.Quantificação de protozoários.....	49
2.4. Delineamento experimental e análise estatística	50
3. RESULTADOS	51
4. DISCUSSÃO	54
5. CONCLUSÃO.....	58
6. REFERÊNCIAS.....	58



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 017621/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Caracterização molecular de bactérias ruminais, parâmetros ruminais e digestibilidade das dietas de novilhos alimentados com diferentes relações volumoso: concentrado na dieta**", sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Telma Teresinha Berchielli está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de Setembro de 2011.

Jaboticabal, 05 de Setembro de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS RUMINAIS DE NOVILHOS ALIMENTADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR OU FENO DE TIFTON COM DIFERENTES RELAÇÕES VOLUMOSO:CONCENTRADO

RESUMO – Objetivou-se com este estudo caracterizar as alterações na microbiota ruminal, parâmetros ruminais, consumo, digestibilidade das dietas e a eficiência de síntese microbiana, em novilhos Nelore confinados alimentados com diferentes relações volumoso:concentrado, utilizando como fontes de volumoso o feno de Tifton 85 ou cana-de-açúcar. Foram realizados dois experimentos, no experimento 1 utilizou a cana-de-açúcar como fonte de volumoso e no experimento 2 utilizou-se o feno de tifton 85 como volumoso. Em ambos os experimentos foram testadas diferentes relações V:C (70:30; 60:40; 40:60 e 20:80). Em cada experimento, utilizaram-se oito novilhos Nelore (331±8 kg PV), cânulados no rumen, distribuídos em duplo quadrado latino 4x4 balanceados para o controle do efeito residual. No experimento 1 (cana-de-açúcar), o aumento da proporção de concentrado na dieta reduziu a população de *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens*, e aumentou a população de *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*, porém o CDFDN não foi alterado. O aumento da participação de carboidratos não estruturais na dieta favoreceu a síntese de proteína microbiana e reduziu a população de bactérias fibrolíticas. A cana-de-açúcar como fonte de volumoso em dieta com proporções crescente de concentrado pode otimizar a síntese de proteína microbiana sem alterar digestibilidade da fibra. No experimento 2 (feno de Tifton 85), o aumento da proporção de concentrado na dieta reduziu a população de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* e aumentou a população de *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii* e *Streptococcus bovis* e o CDFDN diminuiu com o aumento da proporção de concentrado na dieta. Feno de Tifton 85 em dietas com altas proporções de concentrado pode minimizar o risco de distúrbios ruminais em novilhos confinados.

Palavras-chave: carboidratos fibrosos, fermentação ruminal, microbiologia ruminal, PCR tempo real, proteína microbiana

MEASUREMENT OF MICROORGANISMS RUMINAL OF STEERS FED WITH SUGAR CANE OR TIFTON 85 HAY WITH DIFFERENT RELATIONSHIPS FORAGE:CONCENTRATE

ABSTRACT - This trial aimed to characterize the changes in ruminal microbiota, ruminal fermentation, intake, diet digestibility and microbial efficiency in Nellore steers fed with different forage:concentrate proportions, using as sources of forage Tifton 85 hay or sugar cane. Two experiments were conducted: in experiment 1 the sugar cane was used as forage source and in Experiment 2 the Tifton 85 hay was used as forage source. In both experiments were tested different F:C proportions (70:30, 60:40, 40:60 and 20:80). On each experiment were used eight Nellore steers (331 ± 8 kg BW) cannulated in the rumen, in a double latin square 4x4 balanced to control the residual effect. In experiment 1 (sugar cane), increasing the proportion of concentrate in the diet reduced the population of *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens*, and increased the population of *Selenomonas ruminantium* and *Megasphaera elsdenii*, but the digestibility of NDF has not changed. The increased participation of non-structural carbohydrates in the diet favored microbial protein synthesis and reduced the population of fibrolytic bacteria. The use of sugar cane as forage source associated with the increases of concentrate proportions in the diet can optimize microbial protein synthesis without change the fiber digestibility. In experiment 2 (Tifton 85 hay), increasing the proportion of concentrate in the diet reduced the population of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens* and increased the population of *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii* and *Streptococcus bovis* and the digestibility of NDF decreased when increases the proportion of concentrate in the diet. Tifton 85 hay in diets with high proportions of concentrate can minimize the risk of ruminal disorders in feedlot steers.

Keywords: fiber carbohydrates, microbial protein, real time PCR, rumen microbiology, ruminal fermentation

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

No cenário mundial, o Brasil é o principal produtor de carne bovina, e a pecuária de corte assume um papel importante no setor econômico brasileiro. Segundo dados da Organização Mundial para Agricultura e Alimentos (FAO, 2009), haverá um aumento na demanda por carne bovina na ordem de 34% nos próximos 30 anos. Devido a esse aumento, pecuaristas terão que elevar a produtividade para atender as demandas do mercado. Desta forma, o sistema de produção deverá ser intensificado.

Com o intuito de aumentar os níveis de produção, a maioria dos confinamentos tem adotado dietas com altos níveis de inclusão de concentrados, usando como fonte de volumoso uma das opções a seguir: silagem (principalmente milho ou sorgo), cana-de-açúcar e seus derivados, e feno de capim.

O aumento da participação do concentrado na dieta pode afetar as características de fermentação ruminal tais como o pH e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003), essas mudanças impactam sobre a atividade dos microrganismos ruminais (PALMONARI et al., 2010). Dietas com baixo teor de carboidratos fibrosos apresentam altas taxas de digestão e produção de AGCC e proporcionam queda no pH ruminal (<6,0), que exerce efeitos negativos nos microrganismos celulolíticos do rumen (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*), diminuindo a digestibilidade da dieta (OWENS et al., 1998) e o consumo de matéria seca (STOCK et al., 1995). Essas condições no rumen podem reduzir a atividade de microrganismos celulolíticos, e aumentar a atividade das bactérias produtoras de lactato (*Streptococcus bovis*) (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007), podendo levar a uma diminuição da eficiência microbiana, o que, por sua vez, conduz a uma diminuição na digestibilidade e no consumo dos nutrientes (GONZÁLEZ et al., 2012).

Melhorar a eficiência do sistema ruminal, é uma estratégia fundamental na nutrição de ruminantes para obter melhor desempenho associado a uma redução nos impactos ambientais. O aumento da participação do concentrado na dieta diminui a concentração de N-NH₃ amoniacal ruminal, incorporando-o na síntese de

proteína microbiana (RUSSELL; SNIFFEN; VAN SOEST, 1983) reduzindo o N excretado na urina e conseqüentemente reduzindo a poluição ambiental, aumentando a eficiência de utilização desse nutriente (TAMMINGA, 1992). Outro benefício ambiental proporcionado pelo aumento dos teores de concentrado na dieta é a redução na produção de metano ruminal (BOADI et al., 2004), melhorando o metabolismo energético do animal, devido ao deslocamento da rota para a produção de propionato (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

A qualidade do volumoso é um fator importante na dieta que pode influenciar o consumo e o aproveitamento de nutrientes pelos ruminantes (TAF AJ et al., 2005) e o teor de fibra indigestível é fator determinante da qualidade dos volumosos, sendo o maior teor de fibra geralmente associado a uma baixa taxa de degradação ruminal e aumento no tempo de ruminação, diminuindo a taxa de passagem, a digestibilidade e o consumo de nutrientes (VAN SOEST, 1994).

Embora sejam conhecidos os efeitos das mudanças da relação V:C e da fonte de volumoso sobre o metabolismo ruminal, poucos estudos caracterizam os efeitos dessa relação na microbiota ruminal, relacionando-os com o aproveitamento dos nutrientes, visando maximização da eficiência da dieta e diminuição dos impactos ambientais causados pelos produtos excretados pelos ruminantes durante o processo de produção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Volumosos na alimentação de ruminantes

O grande desafio na alimentação de ruminantes de alta produção é aumentar sua capacidade de ingestão de alimento para suprir suas necessidades nutricionais sem prejudicar os processos fisiológicos no rumen, ou seja, mantendo a atividade de ruminação com consumo adequado de volumoso (VELHO et al., 2007).

As forragens são importantes fontes de nutrientes na nutrição de ruminantes. Além da proteína e energia, as forragens fornecem a fibra necessária nas rações para promover a mastigação, ruminação e condições adequadas ao funcionamento do rumen. Na formulação de dietas convencionais para bovinos, a qualidade e a quantidade de forragens são fatores a serem analisados no atendimento das

exigências nutricionais, principalmente por se tratarem da maior parte da dieta, enquanto os componentes concentrados são usados para complementar as contribuições nutricionais das forragens (CASTAGNARA et al., 2012).

As plantas forrageiras, sob suas diferentes formas de utilização, constituem o principal componente da dieta de ruminantes. A escassez de forragens com a consequente falta de volumosos adequados em quantidade e qualidade afeta o sistema de produção animal, e é um dos grandes problemas dos pecuaristas durante a entressafra (PINTO; PEREIRA; MIZUBUTI, 2003). Isto tem estimulado pesquisadores a estudarem as diferentes alternativas alimentares que supram esses problemas e minimizem o custo da alimentação.

Uma das formas de suprir esse problema é utilizar a conservação da forragem durante o período de chuvas, e a fenação é um processo bastante eficiente. Outra alternativa, seria a utilização de espécies forrageiras que acumulam nutrientes para o período de estiagem, como a cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar possui um comportamento fisiológico diferente das outras gramíneas tropicais, pois sua digestibilidade total aumenta com a maturidade da planta (MENDES NETO; NEIVA; VASCONCELOS, 1998). Com o avançar da idade da cana-de-açúcar, ocorrem decréscimos nos teores de proteína bruta (PB) e aumento nos teores de matéria seca (MS) e de carboidratos não fibrosos (CNF), sendo este último resultado do acúmulo de sacarose. Ocorre queda na digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN) com o avanço da idade, mas o aumento de CNF, pelo conteúdo celular, supera esta queda, fazendo com que haja aumento na digestibilidade da matéria orgânica (MO). Essa característica resulta em importante vantagem para a alimentação animal, particularmente no período seco e frio do ano, época em que o valor energético da cana-de-açúcar é máximo, enquanto o de outras gramíneas forrageiras atinge seus limites mínimos (GOODING, 1982).

Além disso, a simplicidade do cultivo agrônômico, a relativa resistência a pragas e doenças, a facilidade de compra e venda, o caráter semi-perene, além de ser uma cultura tradicional entre os produtores rurais brasileiros, justificam a utilização da cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. Porém, a cana-de-açúcar como alimento básico para ruminantes, apresenta limitações de ordem nutricional, devido aos baixos teores de proteína, minerais e ao alto teor de fibra de

baixa degradação ruminal (LENG, 1993). Desta forma, dietas que contém a cana-de-açúcar como volumoso necessitam de maior inclusão de concentrados proteicos para suprir as exigências dos animais (CORRÊA, 2001).

As variedades mais promissoras de cana-de-açúcar para alimentação de bovinos são as que apresentam menores teores de FDN, maiores valores de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), relações FDN/Pol (Pol - teor de sacarose) menores que 2,7 e baixos teores de lignina. Considerando-se que é característica da espécie o baixo conteúdo nitrogenado, o teor de PB não é critério para escolha de variedades (RODRIGUES et al., 2005).

Outro volumoso muito utilizado na alimentação de ruminantes é o feno. A fenação é um dos mais versáteis sistemas de conservação de forragem, pois desde que haja proteção adequada durante o armazenamento, apresenta muitas vantagens, como armazenamento por longos períodos e pequenas alterações no valor nutritivo; grande número de espécies forrageiras podem ser usadas no processo; produção em grande e pequena escala; pode ser colhido, armazenado e fornecido aos animais manualmente ou num processo inteiramente mecanizado; e ainda pode atender o requerimento nutricional de diferentes categorias animais.

Há várias forragens utilizadas para a produção de feno, dentre elas o híbrido Tifton 85 (*Cynodon* spp.) que surgiu do cruzamento da sul africana (PI 290884) e Tifton 68, sendo caracterizado pela alta produção de matéria seca e alta digestibilidade (BURTON; GATES; HILL, 1993), quando produzida em condições adequadas. Este híbrido apresenta porte alto, rápida taxa de crescimento e boa relação lâmina/colmo, quando comparado aos outros cultivares do gênero *Cynodon*. Em comparação com a Coastal bermuda, o Tifton 85 é 26% mais produtivo e 11% mais digestível, durante a época das chuvas, manejado para produção de feno (HILL; GATES; BURTON, 1993).

As plantas do gênero *Cynodon* são apropriadas para a produção de feno, por apresentarem morfologia adequada, principalmente haste fina e folhas bem aderidas ao colmo (HADDAD; CASTRO, 1998), sendo que os cultivares que apresentam maior relação folhas/hastes, como o Florarkik, Tifton 85, Coastcross e Florona, originam fenos de melhor qualidade. Independentemente do cultivar, o corte deve ser realizado buscando-se o equilíbrio entre valor nutricional e produtividade.

2.2. Microrganismos ruminais em dietas com diferentes frações carboidratos

Os ruminantes possuem dois sistemas metabólicos que diferem em relação a suas exigências nutricionais: o metabolismo microbiano ruminal e o metabolismo dos tecidos animais. A busca pela maximização ou otimização da produtividade dos ruminantes envolve, obrigatoriamente, o fornecimento de alimentos e as condições que possam suprir as necessidades dos dois sistemas (FARIA; LEITE, 2009).

Na bovinocultura de corte e/ou leite, na tentativa da maximização da produção animal tem, muitas vezes, promovido grandes alterações no ambiente ruminal, com instabilidade da microbiota e queda do pH ruminal. Estas alterações fazem com que o metabolismo e o crescimento da microbiota ruminal sejam insuficientes para suportar altos níveis de produtividade, devido à menor produção de proteína microbiana e de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Essas alterações levam não só a menores desempenhos produtivos, mas, muitas vezes, a enfermidades clínicas e subclínicas, tais como a acidose aguda, crônica ou o timpanismo (FARIA; LEITE, 2009).

O impacto da manipulação dos microrganismos do rumen na produção animal é visto como uma linha de pesquisa em pleno desenvolvimento. Para isso, faz-se necessário recorrer a ferramentas que permitam pequenos ajustes no sistema de produção para que se possa explorar o máximo potencial produtivo do animal (MILLEN et al., 2007). Dentro dessas ferramentas, uso de concentrado na dieta para modular a fermentação ruminal tem sido amplamente empregado na nutrição de ruminantes. Segundo Valadares Filho et al. (1987), carboidratos não fibrosos possuem coeficiente de digestibilidade aparente total acima de 90% e carboidratos fibrosos próximos de 50%, o que reflete na menor digestão da MS nas dietas com maiores teores de carboidratos fibrosos. Isso ocorre devido a menor taxa de crescimento e conseqüente menor capacidade competitiva dos microrganismos fermentadores de carboidratos fibrosos (ZORZI et al., 2009). Vários estudos reportaram o efeito linear positivo dos coeficientes de digestibilidade aparente total da MS e MO com o aumento dos níveis de concentrado na dieta (ATWELL et al., 1991; BERCHIELLI et al., 1996; BÜRGER et al., 2000). Putrino et al. (2007) observaram que a diminuição na relação volumoso:concentrado (V:C) na dieta

resultou em aumentos lineares nas digestibilidade total dos nutrientes, com exceção da digestibilidade aparente da FDN, que não sofreu influência do aumento de concentrado. Contudo, Atwell et al. (1991), Araujo et al. (1998) e Ítavo et al. (2002) reportaram o decréscimo linear da digestibilidade aparente da FDN com a diminuição da relação V:C na dieta de bovinos de corte.

Em ruminantes a quantidade e composição da dieta são variáveis externas que podem alterar as características de fermentação ruminal tais como o pH e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (CALSAMIGLIA et al., 2010), assim como o perfil da população de microrganismos ruminais (TAJIMA et al., 2001). A diminuição do pH ruminal ocorre, principalmente, após a ingestão de alimentos, especialmente concentrados, devido à sua rápida taxa de degradação, em dietas com alta proporção de concentrados, e esta diminuição do pH ruminal pode ser muito rápida e manter-se por longos períodos de tempo (ØRSKOV, 1986). Essas condições ruminais podem mudar o padrão de fermentação ruminal, já que o pH inferior a 5,5 é nocivo para a sobrevivência dos protozoários ciliados e pode ocasionar também o crescimento de bactérias produtoras de lactato, desencadeantes da acidose ruminal (FRANZOLIN et al., 2010). Dietas com alta proporção de grãos podem reduzir ou eliminar completamente as populações de protozoários ciliados, e essa redução ou eliminação pode ser atribuída à queda do pH ruminal e a rápida taxa de passagem, quando os níveis de concentrado na ração foram aumentados (NAGAJARA; TOWNE; BEHARKA, 1992).

As bactérias ruminais são vitais para a saúde e a produtividade do ruminante (WELKIE et al., 2010). Embora muitas espécies de microrganismos estejam presentes no rumen constantemente, a taxa de crescimento e a ação digestiva de cada espécie podem variar com as condições ruminais. Alterações que ocorrem após a alimentação no tipo de microrganismos ruminais, podem ser extremas quando a relação V:C é alterada, por causa de uma grande variedade de substratos e tamanhos de partículas, e pelas mudanças no pH ruminal (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

Ao aumentar a disponibilidade de carboidratos fermentáveis, o crescimento microbiano pode ser estimulado (SANTOS; MENDOÇA, 2011). No entanto, a proliferação de bactérias celulolíticas está diretamente correlacionada com a

quantidade de fibra na dieta, e a substituição da fibra por carboidratos rapidamente fermentáveis pode influenciar negativamente estes microrganismos fermentadores de carboidratos fibrosos e alterar a dinâmica do ecossistema ruminal (TAJIMA et al., 2001; KLIEVE et al., 2003).

2.2.1. Síntese de proteína microbiana

A disponibilidade ruminal de energia e nitrogênio são os fatores nutricionais que mais limitam o crescimento microbiano (CLARK et al., 1992). A energia para a síntese de proteína microbiana é oriunda principalmente dos carboidratos dietéticos cuja fonte pode afetar o crescimento microbiano. Se os carboidratos não fibrosos estiverem em alta proporção na ração e o pH ruminal for mantido, os microrganismos fermentadores deste substrato (ex. *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus bovis*) vão crescer rapidamente, resultando em aumento da produção microbiana. Por outro lado, se houver acúmulo de ácido láctico, ocorrerá diminuição do pH ruminal e alteração na ecologia microbiana e no consumo de matéria seca (SNIFFEN; ROBINSON, 1987).

A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) no rumen é indispensável para o crescimento microbiano, desde que associada a fontes de energia (COELHO DA SILVA; LEÃO, 1979), e sua determinação permite o conhecimento do desbalanceamento na digestão da proteína, pois, quando há altas concentrações de amônia, pode ocorrer excesso de proteína dietética degradada no rumen e/ou baixa concentração de carboidratos não fibrosos degradados no rumen. Segundo Stern e Hoover (1979), 40 a 100% do nitrogênio microbiano podem ser derivados do N amoniacal. De acordo com Morrison e Mackie (1996), mais de 80% das bactérias ruminais podem crescer tendo amônia como única fonte de nitrogênio.

A concentração mínima de N-NH₃ necessária para manter máxima a taxa de crescimento microbiano varia de acordo com a fermentação da dieta. Há variação nos dados relatados na literatura sobre os valores das concentrações de N-NH₃ ruminal requeridos para atender o crescimento máximo dos microrganismos ruminais: 5 mg/dL (SATTER; ROFFLER, 1975); 23,5 mg/dL (MEHREZ; ØRSKOV; MCDONALD, 1977); 9 mg/dL a 29 mg/dL (MILLER, 1973); 6,3 a 27,5 mg/dL (ORTEGA et al., 1979) e 3,3 a 8,5 mg/dL (KANG-MERZNARICH; BRODERICK,

1981). Van Soest (1994) citou como nível ótimo 10 mg de N-NH₃/dL. Entretanto, este valor não deve ser considerado como um número fixo, devido à capacidade de síntese de proteína e captação de amônia pelas bactérias depender da taxa de fermentação dos carboidratos e da capacidade de assimilação de nitrogênio pelos microrganismos.

Em estudos com diferentes relações V:C na dieta, maiores concentrações de N-NH₃ no rumen foi verificada quando bovinos foram alimentados com dietas com maiores relações V:C (SOITA et al., 2003; AGLE et al., 2010; GRANJA, 2013). Em estudos sobre eficiência de síntese microbiana, Hagemeister, Lüpping e Kaufmann (1981) relataram os valores de 18,0; 22,0; e 16,8 g/100 g de matéria orgânica digestível no rumen (MODR), nos níveis de 0 a 20%, 30 a 70% e 70 a 100% de concentrado, respectivamente. Esses autores verificaram que a alteração da relação V:C na dieta poderia influir no crescimento microbiano, em razão da variação na disponibilidade de energia. Entretanto, Dias et al. (2000), não observaram efeito da variação na relação V:C na dieta sobre a eficiência microbiana, em novilhos alimentados com relações V:C 20:80, 40:60, 60:40 e 80:20. Por outro lado, Tibo et al. (2000) encontraram efeito linear do nível de concentrado sobre a eficiência microbiana em novilhos confinados alimentados com dietas com relações V:C de 75:25; 62,5:37,5; 50:50; 37,5:62,5 e 25:75 utilizando o feno de capim como fonte de volumoso.

A quantidade e a composição da dieta são variáveis externas que afetam a taxa de digestão, a taxa de passagem e, dessa maneira o *turnover* ruminal. Assim, dietas com baixo teor em fibra, e que tendem a ter altas taxas de digestão e produção de AGCC, requerem um maior grau de tamponamento no sistema ruminal (VALADARES FILHO; PINA 2011). Tais condições favorecem espécies microbianas capazes de tolerar pH ruminal baixo (<6,0) e, geralmente, microrganismos celulolíticos (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*) e metanogênicos são menos tolerantes a tais mudanças (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2011).

Além da dieta, algumas características inerentes ao animal são necessárias para a manutenção de uma população microbiana ruminal ativa, essas características são mantidas pelo animal hospedeiro, como o suprimento de

alimentos mastigados ou ruminados, a remoção dos produtos de fermentação, a adição de tamponantes e nutrientes via saliva, a remoção de resíduos indigestíveis dos alimentos e a manutenção do pH, temperatura, anaerobiose e umidade ideais ao crescimento microbiano (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

Outro fator que influencia no crescimento microbiano, principalmente das bactérias celulolíticas é a concentração de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) no rumen, pois, estas bactérias requerem amônia como fonte de nitrogênio para crescimento (SANTOS; MENDONÇA 2011). O pH ruminal e a concentração de açúcares solúveis também influenciam a atividade microbiana, principalmente as fibrolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*) (RUSSELL; WILSON, 1988). O mesmo autor relata que pH abaixo de 6,0 limita a atividade de bactérias que degradam fibra, assim como a elevada concentração de carboidratos solúveis. Bactérias celulolíticas não suportam pH intracelular baixo, situações onde ocorre redução no pH extracelular tende produzir um desequilíbrio no gradiente de pH, em nível de membrana, acarretando uma toxicidade por acúmulo de ânions dentro da célula microbiana (RUSSELL; RYCHLIK, 2001). Já em situações com pH acima de 6,2 e elevado teor de carboidratos solúveis, há uma redução na degradação da fibra, devido a inativação da enzima carboximetilcelulase (PIWONKA; FIRKINS, 1996).

Um exemplo da alteração que o pH ruminal causa nos microrganismos ruminais é a bactéria *Streptococcus bovis*, que em pH neutro produz formato, acetato e etanol utilizando a enzima piruvato-formato liase e, com o decréscimo de pH do meio, ocorre, em paralelo, redução do pH intracelular, inibindo a ação desta enzima e, conseqüentemente, há produção de lactato (RUSSEL, 1992).

Diferentes relações volumoso:concentrado contribuem significativamente na alteração da população microbiana no rumen. Valadares Filho e Pina (2011) relataram que em dietas com alta relação volumoso:concentrado, ricas em celulose, com teores intermediários de carboidratos solúveis e pobres em amido há um predomínio de bactérias celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *R. Flavefaciens*), nesse caso a produção de acetato é elevada. Já em dietas ricas em amido, baixa relação volumoso:concentrado, a população microbiana predominante é a amilolítica, e esses microrganismos competem pelos carboidratos

solúveis, pelos produtos finais da hidrólise do amido e hemicelulose, principalmente em pH baixo e produzem maior quantidade de propionato.

Dietas ricas em fibra cuja fonte de fibra apresenta uma maior quantidade de carboidratos solúveis pode apresentar um maior consumo, devido à maior capacidade de colonização da fibra pelos microrganismos (CHURCH, 1993). Porém, a cana-de-açúcar, apesar de ter uma quantidade elevada de carboidratos solúveis (sacarose), tem seu consumo limitado, quando comparado à outra forragem com igual ou menor teor de carboidratos solúveis (feno de capim e silagem de milho), isso pode ser explicado pelo elevado teor da fração indigestível, impedindo a degradação pelos microrganismos (PEREIRA et al., 2001).

Como relatado anteriormente, a maioria dos confinamentos de bovinos de corte, estão usando dietas com alto nível de concentrado, e a preocupação com ambiente ruminal e com as interações existentes no mesmo ainda não é significativa. Um distúrbio metabólico comum de ocorrer no ambiente ruminal de animais confinados, alimentando-se com dietas de alto grão é a acidose ruminal, que pode apresentar-se na forma aguda ou sub-aguda.

A acidose ruminal aguda ocorre quando há ingestão exagerada de alimentos ricos em carboidratos, que fermentam rapidamente no rumen, produzindo grandes quantidades de ácido láctico e AGCC, principalmente o propionato. Esta condição favorece a multiplicação do *Streptococcus bovis* que produz quantidades significativas de ácido láctico diminuindo o pH (<5,5), comprometendo as bactérias Gram negativas e protozoários. Quando o pH chega a valores inferiores a 5,0 o crescimento *S. bovis* é inibido e ocorre a multiplicação do *Lactobacillus* sp, e a concentração de ácido láctico L (+) aumenta significativamente no interior do rumen, levando ao aumento da pressão osmótica e seqüestro de líquido para a luz do órgão. Desta forma, o conteúdo ruminal se torna aquoso e o animal apresenta hemoconcentração, desidratação, acidose metabólica, prostração, coma e, freqüentemente, morte (RADOSTITS et al., 2002).

A forma crônica da acidose é observada quando há ingestão prolongada de quantidades excessivas de carboidrato não fibrosos associada a níveis inadequados de volumoso com fibra fisicamente efetiva. A população microbiana ruminal se adapta e grandes quantidades de microrganismos utilizadores (*Megasphaera*

elsdenii, *Selenomonas ruminatum*) e produtores de lactato (*Spreptococcus bovis* e *Lactobacillus acidophilus*) são detectadas. Desta forma, o ácido láctico não acumula, pois é metabolizado pelas bactérias. Porém, as elevadas concentrações de AGCC principalmente butírico, estimulam o crescimento exagerado das papilas ruminais, causando danos a proteção de queratina, o que proporciona menor absorção dos AGCC e aumento da ocorrência de traumatismo e inflamações na parede do rumen. Os efeitos sobre os animais são crônicos e insidiosos, a contínua carga ácida pode reduzir a eficiência metabólica e desempenho produtivo do animal (SMITH, 2006).

Estudos que visam estudar e compreender as interações que ocorrem no ambiente ruminal, entre os microrganismos e os substratos, são escassos. Principalmente em relação a pesquisas com bovino de corte, onde os estudos inerentes ao ambiente ruminal não são tratados com prioridade, quando comparado com estudos realizados com vacas de leiteiras.

2.3. Técnicas de avaliação da microbiota ruminal

Segundo a classificação de Woese et al. (1990), o rumen é colonizado por três domínios, são eles: *Bacteria* (bactérias), *Arqueas* (metanogênicas) e *Eucarya* (fungos e protozoários). Sendo que, as bactérias são proporcionalmente mais influenciadas que os protozoários e fungos ruminais quando submetidos a diferentes substratos (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2011). Essa diversidade microbiana forma uma comunidade complexa que interage entre si e desempenha um papel muito importante na digestão dos alimentos e no fornecimento de nutrientes para o hospedeiro na forma de ácidos graxos de cadeia curta e da proteína microbiana (VAN SOEST, 1994).

Devido a essa complexidade, os estudos de caracterização, quantificação e identificação dos microrganismos ruminais tornam-se difíceis. Historicamente, as investigações que foram feitas em população microbiana ruminal, utilizavam-se de técnicas tradicionais, tais como: roll-tube technique (HUNGATE, 1969) ou a técnica de quantificação dos números mais prováveis (DEHORITY; TIRABASSO; GRIFO, 1989). No entanto, a maioria dos microrganismos não são identificados por meio dessas técnicas, devido à dificuldade de cultivo dos mesmos *in vitro*. Os poucos microrganismos identificados representam uma pequena fração da comunidade

microbiana do rumen, subestimando a diversidade microbiana (FERNANDO et al., 2010). Shin et al. (2004) relataram que apenas 5-10% da microbiota ruminal é conhecida, e que provavelmente a diversidade microbiana compreende mais de 1000 espécies individuais de bactérias, protozoários e fungos.

Recentemente, técnicas que se baseiam na análise da variabilidade de nucleotídeos do gene do DNA ribossomal 16S (16S rDNA) tem sido largamente utilizadas para analisar a diversidade de microrganismos presentes na microbiota intestinal de diversas espécies animais, inclusive de ruminantes, onde o cultivo desses microrganismos em meios artificiais é complexo. Além disso, torna-se possível avaliar a microbiota no seu ambiente autóctone, proporcionando um estudo mais completo e representativo, devido a complexidade das interações que ocorrem entre os microrganismos, não sendo necessário fazer cultivos e identificações *in vitro* (NOFTSGER et al., 2003).

O gene 16S rDNA apresenta tanto regiões altamente conservadas como variáveis em todos os procariotos, sendo que estas últimas têm sido utilizadas para prover informações taxonômicas em vários níveis de classificação e para distinção entre espécies (WEISBURG et al., 1991). Os primeiros nucleotídeos do terminal 5' do segmento 16 S rDNA contêm informação suficiente para se obter um seqüenciamento e por isso são de interesse na análise molecular (LIESACK et al., 1997).

Várias técnicas moleculares podem ser usadas no estudo da microbiota ruminal, são elas: DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante), *microarrays*, T-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição terminais), PCR convencional (reação em cadeia da polimerase) entre outras, onde todas apresentam vantagens e desvantagens.

Uma técnica que está sendo bastante utilizada como ferramenta nos estudos da microbiota ruminal é a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), uma técnica desenvolvida para detectar seqüências específicas de DNA (KOO; JAYKUS, 2000). As principais vantagens desta técnica são: a grande rapidez, pois são executadas em equipamentos "fast-cycling", menor possibilidade de contaminação laboratorial e a grande sensibilidade e especificidade, tornando uma ferramenta ideal para uso na identificação e quantificação dos microrganismos

ruminais. Tajima et al. (2001) avaliaram mudança da microbiota ruminal de animais submetidos a dietas de transição, e identificaram por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) mudanças significativas na população de bactérias celulolíticas quando os animais começaram a receber dietas de alto grão. Mosoni et al. (2007) concluíram que o uso de qPCR no estudo da dinâmica da população de microrganismos do rumem, quando os animais são alimentados com diferentes dietas, detectou diferenças que não poderiam ser facilmente identificadas com técnicas clássicas, como a identificação por números prováveis e por identificação bioquímica.

Com a inserção da biologia molecular nos estudos da microbiota ruminal, estudos com bactérias celulolítica (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*) tem sido amplamente realizados, devido a dificuldades encontradas em estudos com as metodologias clássicas (McSWEENEY et al., 2009). Tajima et al. (2001) e Mossoni et al. (2007), mostraram e discutiram os primers que já foram desenhados e validados para identificação desses microrganismos, e estes estão sendo utilizados com sucesso.

Estudos de Klieve et al. (2003) e Mossoni et al. (2007) foram desenvolvidos com bactérias celulolíticas (*F. succinogenes*, *R. albus* e *R. flavefaciens*), em nutrição de ruminantes, devido à sua importância na degradação da fibra, uma vez que são capazes de digerir celulose e hemicelulose. No entanto, as bactérias celulolíticas são suprimidas em dietas com elevados níveis de concentrado, como mostrado por Klieve et al. (2003) e Mosoni et al. (2007), que verificaram a dinâmica da população de bactérias celulolíticas e amilolíticas pela técnica de qPCR, em função da inclusão de grãos na dieta substituindo o ingrediente fibroso. Khafipour et al. (2009) observaram um aumento nas populações de *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus* spp. e de *E.coli* em animais submetidos a acidose ruminal aguda, e a predominância de bactérias do gênero *Prevotella* sp. em animais alimentados com dietas com alta quantidade de carboidratos não fibrosos e que não apresentaram sintomas de acidose, inferindo que bactérias desse gênero podem ser usadas como um probiótico para o controle da doença.

A inserção de grãos na dieta de bovinos de corte em confinamento está a cada dia mais eminente, e estudos que avaliam o desempenho e características de

carcaça são realizados, porém, estudos que avaliam as interações da população de microrganismos do rumen precisam ser mais abordados. Desta forma, a quantificação e identificação dos microrganismos ruminais por meio de técnicas que se baseiam na análise da variabilidade de nucleotídeos do gene do DNA ribossomal 16S (16S rDNA), são necessárias para dar suporte aos estudos de elevada produção animal pela utilização de grande quantidade de grãos na dieta.

3. OBJETIVOS

Objetivou-se com este estudo caracterizar as alterações na microbiota ruminal, parâmetros ruminais, consumo, digestibilidade das dietas e a eficiência de síntese microbiana, em novilhos Nelore confinados alimentados com diferentes relações volumoso:concentrado, utilizando como fontes de volumoso o feno de Tifton 85 ou cana-de-açúcar.

4. REFERÊNCIAS

AGLE, M.; HRISTOV, A. N.; ZAMAN, S.; SCHNEIDER, C.; NDEGWA, P. M.; VADDELLA, V. K. Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 93, n. 9, p. 4211 - 4222, 2010.

ARAÚJO, G. G. L.; COELHO DA SILVA, J. F.; VALDARES FILHO, S. C.; CAMPOS, O. F.; CASTRO, A. C. G.; SIGNORETTI, R. D.; TURCO, S. H. N.; HENRIQUES, L. T. Consumo e digestibilidade total dos nutrientes de dietas contendo diferentes níveis de volumoso, em bezerros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 345 - 354, 1998.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rumen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed). **Nutrição de Ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011, p. 111 - 140.

ATWELL, D. G.; MERCHEN, N. R.; JASTER, E. H.; FAHEY, L. L.; BERGER, E. C.; TITGEMEYER, E. C.; BOURQUIN, L. D. Intake, digestibility and in situ kinetics of treated wheat straw and alfalfa mixtures fed to Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 74, n. 10, p. 3524 - 3534, 1991.

BERCHIELLI, T. T.; RODRIGUEZ, N. M.; OLIVEIRA, H. P. Efeito de diferentes relações volumoso: concentrado no consumo, digestibilidade aparente e partição da digestão de dieta de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 48, n. 5, p. 607 - 617, 1996.

BOADI, D.; BENCHAAAR, C.; CHIQUETTE, J.; MASSÉ, D. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v. 84, n. 3, p. 319 - 335, 2004.

BÜRGER, P. J.; PEREIRA, J. C.; COELHO DA SILVA, J. F.; VALDARES FILHO, S. C.; QUEIROZ, A. C.; MONTEIRO, H. C. Consumo e digestibilidades aparentes total e parcial em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 206 - 214, 2000.

BURTON, G. W.; GATES, R. N.; HILL, G. M. Registration of "Tifton 85" bermudagrass. **Crop Science**, Madison, v. 33, n. 3, p. 644 - 645, 1993.

CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; REYNOLDS, C. K.; KRISTENSEN, N. B.; VAN VUUREN, A. M. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 1184 - 1196, 2010.

CASTAGNARA, D. D.; KRUTZMANN, A.; ZOZ, T.; STEINER, F.; CASTRO, A. M. C.; NERES, M. A.; OLIVEIRA, P. S. R. Effect of boron and zinc fertilization on white oats grown in soil with average content of these nutrients. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 7, p. 1598 - 1607, 2012.

CHURCH, D. C. **Rumiante: Fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Acríbia, 1993, p. 641.

CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 75, n. 8, p. 2304 - 2323, 1992.

COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I. **Fundamentos da nutrição de ruminantes**. 1.ed. Piracicaba: Livrocercos. 1979, 380p.

CORRÊA, C. E. S. **Silagem de milho ou cana-de-açúcar e o efeito da textura do grão de milho no desempenho de vacas holandesas**. 2001. 102 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P. A.; GRIFO, A. P. Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 55, n. 11, p. 2789–2792, 1989.

DIAS, H. L. C.; VALADARES FILHO, S. C.; COELHO DA SILVA, J. F.; PAULINO, M. F.; CECON, P.R; LEO, M. G.; OLIVEIRA, R. D. Consumo e digestões totais e parciais em novilhos F1 limousin x nelore alimentados com dietas contendo cinco níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 545 - 554, 2000.

FARIA, B. N.; LEITE, L. A. Manipulação da fermentação ruminal. In: GONÇALVES, L. C.; BORGES, I.; FERREIRA, P.D.S. (Ed). **Alimentos para gado de leite**. 1 ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2009, p. 212 - 245.

FERNANDO, S. C.; PURVIS II, H. T.; NAJAR, F. Z.; SUKHARNIKOV, L. O.; KREHBIEL, C. R.; NAGARAJA, T. G.; ROE, A.; De SILVA, U. Rumen microbial populations dynamics during adaptation to high-grain diet. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 72, n. 22, p. 7482 - 7490, 2010.

Food and Agriculture Organization. 2009. **How to Feed the World in 2050**. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf. Acesso em: 08/05/2013.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B. A. The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 10, p. 2262 - 2267, 2010.

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

GOODING, E. G. B. Effect of quality of cane on its value as livestock feed. **Tropical Animal Production**, Santo Domingo, v. 7, n. 2, p. 72 - 91, 1982.

Granja-Salcedo, Y. T. **Quantificação molecular de bactérias ruminais, parâmetros ruminais e digestibilidade das dietas de novilhos alimentados com diferentes relações de volumoso: concentrado na dieta**. 2013. 45 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

HADDAD, C. M.; CASTRO, F. G. F. Produção de feno. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 15., 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ-USP, 1998. p. 151 - 172.

HAGEMEISTER, H.; LÜPPING, W.; KAUFMANN, W. **Microbial synthesis and digestion in the high-yielding dairy cow**. In: HARESIGN, W. (Ed.) Recent advances in animal nutrition. London: Butterworths, 1981, p. 31 – 48.

HILL, G. M.; GATES, R. N.; BURTON, G. W. Forage quality and grazing steer performance from Tifton 85 and Tifton 78 bermudagrass pastures. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 71, n. 12, p. 3219 - 3225, 1993.

HUNGATE, R. E. **A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes**. In: Methods in Microbiology, Norris, J.R. and D.W. Ribbons (Ed). New York Academic Press, 1969, p. 117 - 132.

ÍTAVO, L. C. V.; VALDARES FILHO, S. C.; DA SILVA, F. F.; VALADARES, R. F. D.; LEÃO, M. I.; CECON, P. R.; ÍTAVO, C. F.; DE MORAES, E. H. B. K.; PAULINO, P. V. R. Consumo e digestibilidades aparentes totais e parciais de nutrientes em novilhos alimentados com dietas contendo vários níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 1543 -1552, 2002 (suplemento).

KANG - MERZNARICH, J. H.; BRODERICK, G. A. Effects of incremental urea supplementation on ruminal ammonia concentration and bacterial protein formation. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 51, n. 2, p. 422 - 431, 1981.

KHAFIPOUR, E.; LI, S.; PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O. Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 75, n. 22, p. 7115 - 7124, 2009.

KLIEVE, A. V.; HENNESSY, D.; OUWERKERK, D.; FORSTER, R. J.; MACKIE, R. I.; ATTWOOD, G. T. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 3, p. 621 - 630, 2003.

KOO, K.; JAYKUS, L. A. Selective amplification of bacterial RNA: use of a DNA primer containing mismatched bases near its 3' terminus to reduce false-positive signals. **Letter Applied Microbiology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 187 - 192, 2000.

LASCANO, G. J.; VELEZ, M.; TRICARICO, J. M.; HEINRICH, A. J. Nutrient utilization of fresh sugarcane-based diets with slow-release nonprotein nitrogen addition for control-fed dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 95, n. 1, p. 370 - 376, 2012.

LENG, R. A. Quantitative ruminant nutrition - a green science. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 44, n. 3, p. 363 - 380, 1993.

LIESACK, W.; JANSSEN, P. H.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L.; STACKEBRANDT, E. Microbial diversity in soil: the need for combined approach using molecular and cultivation techniques. In: ELSAS J. D., TREVORS J. T. (Ed). **Modern Soil Microbiology**, New York: Marcel Dekker, 1997, p. 375 - 439.

MCSWEENEY, C.; KANG, S.; GAGEN, E.; DAVIS, C.; MORRISON, M.; DENMAM, S. Recent developments in nucleic acid based techniques for use in rumen manipulation. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 341 - 351, 2009 (supl. especial).

MEHREZ, A. Z.; ØRSKOV, E. R.; MCDONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **The British Journal Nutrition**, Cambridge, v. 38, n. 3, p. 437 - 443, 1977.

MENDES NETO, J.; NEIVA, J. N. M.; VASCONCELOS, V. R. Uso da cana-de-açúcar na terminação de ovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1998. 1 CD-ROM.

MILLEN, D. D.; ARRIGONI, B. M.; PACHECO, R. D. L.; BASTOS, J. P. S. T.; MARIANI, T. M. Manipulação da fermentação ruminal: saúde animal e qualidade do produto final. **PUBVET (online)**, Londrina, v. 1, n. 5, Art. 306, 2007.

MILLER, E. L. Evaluation of foods as sources of nitrogen and amino acids. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 32, n. 2, p. 79 - 84, 1973.

MORRISON, M.; MACKIE, R. I. Nitrogen metabolism by ruminal microorganisms: current understanding and future perspectives. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 47, n. 2, p. 227 - 246, 1996.

MOSONI, P.; MARTIN, C.; FORANO, E.; MORGAVI, D. P. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 6, p. 2676 - 2685, 2007.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, New York, v.90, (Suppl 1) p.E17 - 38, 2007.

NAGARAJA, T. G.; TOWNE, G.; BEHARKA, A. A. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a High-Grain diet. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 8, p. 2410 - 2414, 1992.

NOFTSGER, S. M.; ST-PIERRE, N. R.; KARNATI, S. K. R.; FIRKINS, J. L. Effects of 2-Hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) on microbial growth in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 86, n. 8, p. 2629 - 2636, 2010.

ØRSKOV, E. R. Starch digestion and utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 63, n. 5, p. 1624 - 1633, 1986.

ORTEGA, M. E.; STERN, M.D .; SATTER, L. D. The effect of rumen ammonia concentration on dry matter disappearance in situ. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 62, p. 76 (Suppl. 1), 1979.

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

PALMONARI, A.; STEVENSON, D. M.; MERTENS, D. R.; CRUYWAGEN, C. W.; WEIMER, P. J. pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 93, n. 1, p. 279 - 287, 2010.

PEREIRA, M. N.; ARMENTANO, L. E. Partial replacement of forage with non-forage fiber sources in lactating cow diets. II. Digestion and rumen function. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 83, n. 12, p. 2876 - 2887, 2000.

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

PIWONKA, E. J.; FIRKINS, J. L. Effect of glucose fermentation on fiber digestion by ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 79, n. 12, p. 2196 - 2206, 1996.

PUTRINO, S. M.; LEME, P. R.; LUZ E SILVA, S.; MANELLA, M. Q.; NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; LIMA, C. G.; ALLEONI, G. F. Digestibilidade aparente de dietas com

níveis crescentes de concentrado em novilhos Brangus e Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 2, p. 406 - 413, 2007.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária. um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 1737.

RODRIGUES, A. A.; CRUZ, G. M.; BATISTA, L. A. R.; PEDROSO, A. F.; LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P. Qualidade de dez variedades de cana-de-açúcar como alimento para bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA., 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005. 1 CD ROM.

RUSSELL, J. B. Another Explanation for the Toxicity of Fermentation Acids at Low pH - Anion Accumulation Versus Uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 73, n. 5, p. 363 - 370, 1992.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, Washington, D. C, v. 292, n. 5519, p. 1119 – 1122, 2001.

RUSSELL, J. B.; SNIFFEN, C. J.; VAN SOEST, P. J. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 66, n. 4, p. 763 - 775, 1983.

RUSSELL, J. B.; WILSON. D. B. Potential opportunities and problems for genetically altered rumen microorganisms. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 118, n. 2, p. 271 - 279, 1988.

SANTOS, F. A. P; MENDOÇA, P. A. Metabolismo de proteínas In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed). **Nutrição de Ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011, p. 255 - 286.

SATTER, L. D.; ROFFLER, R. E. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 58, n. 8, p. 1219 - 1237, 1975.

SCHWARTZKOPF - GENSWEIN, K. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; GIBB, D. J.; CREWS, D. H.; JR., HICKMAN, D. D.; STREETER, M.; MCALLISTER, T. A. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 81 (E. Suppl. 2): E149 - E158, 2003.

SHIN, E. C.; CHOI, B. R.; LIM, W. J.; HONG, S. Y.; NA, C. L.; CHO, K. M.; KIM, Y. K.; AN, J. M.; KANG, J. M.; LEE, S. S.; KIM, H.; YUN, H. D. Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence. **Anaerobe**, London, v. 10, n. 6, p. 313 - 319, 2004.

SMITH, B. P. **Medicina interna de grandes animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2006. p.1728.

SNIFFEN, C. J.; ROBINSON, P. H. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 70, n. 20, p. 425 - 441, 1987.

SOITA, H. W.; CHRISTENSEN, D. A.; MCKINNON, J. J. Effects of barley silage particle size and concentrate level on rumen kinetic parameters and fermentation patterns in steers. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 83, n. 3, p. 533-539, 2003.

STERN, M. D.; HOOVER, W. H. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 49, n. 5, p. 1590 - 1603, 1979.

STOCK, R. A.; LAUDERT, S. B.; STROUP, W. W.; LARSON, E. M.; PARROTT, J. C.; BRITTON, R. A. Effect of monensin and monensin and tylosin combination on feed intake variation of feedlot steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 73, n. 1, p. 39 - 44, 1995.

TATAJ, M.; MAULBETSCH, A.; ZEBELI, Q.; STEINGASS, H. Effects of physically effective fibre concentration of diets consistin of hay and slowly degradable concentrate on chewing activity in mid lactation dairy cows under constant intake level. **Archive Animal Nutrition**, London, v. 59, n. 5, p. 313 - 324, 2005.

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

TAMMINGA, S. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 75, n. 1, p. 345 - 357, 1992.

TIBO, G. C.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; SILVA, J. F. C.; CECON, P. R.; LEO, M. I.; DA SILVA, B. R. Níveis de concentrado em dietas de novilhos mestiços F1 Simental x Nelore. 2. Balanço nitrogenado, eficiência microbiana e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 921 - 929, 2000.

VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I.; CASTRO, A. C. G. Estudo comparativo da digestão da matéria seca e carboidratos em bovinos e bubalinos alimentados com diferentes rações. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v. 16, n. 2, p. 120 - 130, 1987.

VALDARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed). **Nutrição de Ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011, p. 161 - 189.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd Ed. New York: Cornell University Press, 1994. p. 476.

VELHO, J. P.; MÜHLBACH P. R. F.; NÖRNBERG, J. L.; VELHO, I. M. P. H; GENRO, T. C. M.; KESSLER, J. D. Composição bromatológica de silagens de milho produzidas com diferentes densidades de compactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 1532 - 1538, 2007.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington D.C, v. 173, n. 2, p. 697 - 703, 1991.

WELKIE, D. G.; STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. **Anaerobe**, London, v. 16, n. 2, p. 94 - 100, 2010.

WOESE C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. **Proceeding National Academy of Sciences**, New York, v. 87, n. 12, p. 4576 -4579, 1990.

ZORZI, K.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A. C.; PAULINO, M. F.; MANTOVANI, H. C.; BAYÃO, G. F. *In vitro* degradation of neutral detergent fiber of high-quality tropical forage according to supplementation with different nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 5, p. 964 - 971, 2009.

CAPÍTULO 2 – PROPORÇÕES CRESCENTES DE CONCENTRADO EM DIETAS COM CANA-DE-AÇÚCAR REDUZEM BACTERIAS FIBROLITICAS SEM ALTERAR A DIGESTIBILIDADE DA FIBRA

RESUMO – O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de dietas à base de cana-de-açúcar e diferentes relações V:C (70:30; 60:40; 40:60 e 20:80) sobre a microbiota ruminal associada aos parâmetros de fermentação ruminal, consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes em novilhos Nelore. Foram utilizados oito novilhos Nelore (331±8 kg PV), cânulados no rumen, distribuídos em duplo quadrado latino 4x4 balanceados para o controle do efeito residual. O pH ruminal diminuiu e a concentração de N-NH₃, iso-valérico e valérico aumentaram linearmente em resposta a maior participação do concentrado na dieta. As concentrações de ácidos graxos de cadeia curta total e a relação ácido acético: propiônico não foram influenciadas pelas dietas testadas. O aumento da participação do concentrado na dieta reduziu a população de *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens*, e aumentou a população de *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*. As espécies *Ruminococcus albus* e *Streptococcus bovis* não foram influenciadas pelas dietas testadas. Na contagem dos protozoários, o gênero *Entodinium* foi predominante, representando 99,7 % do número total de protozoários. A menor população do gênero *Dasytricha* foi observada em animais alimentados com maior proporção de concentrado na dieta (20:80) e do gênero *Metadinium* foi maior em animais alimentados com dietas 60:40. O consumo de carboidratos não fibrosos (CCNF) aumentou e o consumo de fibra em detergente neutro (CFDN_{cp}) diminuiu com o aumento da participação do concentrado na dieta, e o coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro (CDFDN) não foi influenciado pelas dietas testadas. A síntese de N_{mic} (g/dia) e a eficiência de síntese microbiana (g/kg MODR) aumentaram com o aumento da participação do concentrado na dieta. O aumento da proporção de concentrado em dietas com cana-de-açúcar aumenta a síntese de proteína microbiana e não altera a digestibilidade da fibra, mesmo reduzindo a população de bactérias fermentadoras de carboidratos fibrosos.

Palavras-chave: bactérias, carboidratos fibrosos, fermentação ruminal, PCR tempo real, proteína microbiana

1. INTRODUÇÃO

A manutenção da microbiota ruminal é de suma importância para os ruminantes, pois a maior parte da energia utilizada nos processos biológicos é oriunda dos produtos da fermentação ruminal. Sua composição pode ser influenciada pela relação volumoso:concentrado (V:C) da dieta (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003), desta forma dietas com maior proporção de concentrado podem estimular o crescimento microbiano com o aumento da disponibilidade de carboidratos fermentáveis no rumen. Entretanto, essas dietas apresentam baixas quantidades de fibra e tendem a apresentar rápidas taxas de digestão e produção de ácidos graxos de cadeia curta, podendo resultar em pH ruminal baixo (<6,0) (YANG; BEAUCHEMIN, 2009). Essas condições no rumen podem reduzir a atividade de microrganismos fibrolíticos, como as bactérias *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*, e aumentar a atividade das bactérias produtoras de lactato (*Streptococcus bovis*) (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007).

Por outro lado, dietas contendo altas quantidades de volumoso podem limitar o consumo e a digestibilidade dos nutrientes (MERTENS, 1994; GONZALEZ et al., 2012), restringindo a disponibilidade de energia e amônia no rumen, fatores nutricionais que limitam o crescimento microbiano (CLARK et al., 1992). O consumo e aproveitamento dos nutrientes da forragem são influenciados pelo teor e pela composição química da fração fibrosa que é determinante da qualidade dos volumosos. O maior teor de fibra com elevada proporção de lignina é associado à baixa taxa de degradação ruminal, e conseqüentemente menor consumo e digestibilidade de nutrientes (VAN SOEST, 1994; TAJAJ et al., 2005).

Uma opção de volumoso que pode ser utilizada na alimentação de bovinos é a cana-de-açúcar que apresenta características como alto teor de sacarose, moderado teor de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e alta produção de matéria seca por unidade de área (LASCANO et al., 2012). Porém, a cana-de-açúcar como alimento básico para ruminantes, apresenta limitações de ordem nutricional, devido aos baixos teores de proteína, minerais e ao alto teor de fibra de baixa degradação ruminal (LENG, 1993; QUEIROZ et al., 2012). No entanto, até o momento, desconhecemos estudos sobre o efeito do aumento da relação cana-de-

açúcar concentrado sobre a população microbiana ruminal, e sua relação com parâmetros de fermentação ruminal, de novilhos da raça Nelore.

Diante do exposto hipotetizou-se que as populações de microrganismos ruminais poderiam ser afetadas com o aumento da proporção do concentrado nas deitas, conseqüentemente promovendo mudanças na fermentação ruminal, consumo, digestibilidade e eficiência de utilização das dietas oferecidas. Com base nessas premissas, objetivou-se neste estudo determinar o efeito de diferentes proporções de concentrado em dietas com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), sobre a população de microrganismos ruminais, consumo, digestibilidade e fermentação ruminal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo usado neste estudo está de acordo com as normas e diretrizes propostas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e foi aprovado pelo CEBEA (Comissão de Ética e Bem Estar Animal) da FCAV–UNESP–Campus Jaboticabal, Brasil (017621/11).

2.1. Animais e dietas experimentais

Oito novilhos Nelore (331 ± 08 kg PV), canulados no rumen e duodeno, foram distribuídos em um duplo quadrado latino 4x4 (4 tratamentos e 4 períodos). As dietas foram calculadas usando AFRC (1993). O volumoso foi a cana de açúcar (IAC-862480) fresca picada e o concentrado foi constituído por milho, farelo de soja e ureia (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química dos ingredientes dietéticos.

Composição	Cana-de-açúcar	Milho moído	Farelo de soja	Ureia	Sal mineral ¹
Matéria seca, %	27,6	88,5	86,6	99,0	99,0
Matéria orgânica, % MS	96,4	96,5	92,4	-	-
Proteína bruta, % MS	2,9	9,1	51,8	289,0	-
FDA, %MS	34,5	6,1	8,3	-	-
FDN, %MS	55,3	12,5	15,8	-	-
Lignina, % MS	4,6	0,8	0,2	-	-
CNF, % MS	38,1	71,1	23,4	-	-
Extrato etéreo, % MS	0,9	3,8	1,3	-	-
Energia bruta, MJ/kg	18,4	19,7	19,7	-	-

¹ Composição do produto (Cálcio: 146 g; Fósforo: 40 g; Magnésio: 20 g; Enxofre: 40 g; Sódio: 130 g; Cobre: 1350 mg; Manganês: 1040 mg; Zinco: 5000 mg; Iodo: 100 mg; Cobalto: 80 mg; Selênio: 26 mg; Flúor (máx.): 800 mg). FDA = fibra em detergente ácido, FDN = fibra em detergente neutro, CNF = carboidratos não fibrosos.

Os tratamentos foram os seguintes: 70:30 = contendo 700g/kg de volumoso e 300g/kg de concentrado; 60:40 = contendo 600g/kg de volumoso e 400g/kg de concentrado; 40:60 = contendo 400g/kg de volumoso e 600g/kg de concentrado; 20:80 = contendo 200g/kg de volumoso e 800g/kg de concentrado. As composições das dietas experimentais encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem dos ingredientes e composição química da dieta

	Dietas ¹			
	70:30	60:40	40:60	20:80
<i>Ingredientes, g/kg MS</i>				
Cana-de-açúcar	70,0	60,0	42,2	20,0
Milho moído	17,2	27,5	48,0	67,5
Farelo de soja	11,6	11,3	8,40	11,0
Ureia + sulfato de amônia	1,2	1,2	1,4	1,5
<i>Composição química</i>				
Matéria seca, %	47,8	54,0	62,7	76,3
Matéria orgânica, %MS	95,6	94,6	94,9	94,7
Proteína bruta, %MS	13,0	15,5	13,9	16,2
Fibra em detergente ácido, %MS	26,2	23,4	18,2	11,9
Fibra em detergente neutro, %MS	42,7	38,5	30,7	21,1
Carboidratos não fibrosos ² , % MS	41,9	43,0	52,2	59,1
Energia bruta, MJ/kg	18,9	18,9	19,1	19,3

¹ Dietas: 70:30= 700 g/kg de volumoso e 300 g/kg de concentrado; 60:40= 600 g/kg de volumoso e 400 g/kg de concentrado; 40:60= 400 g/kg de volumoso e 600 g/kg de concentrado; 20:80= 200 g/kg de volumosos e 800 g/kg de concentrado; ² Valor Calculado (SNIFFEN et al., 1992).

O experimento foi dividido em 4 períodos de 20 dias consecutivos. Cada período de estudo consistiu de 14 dias de adaptação, 6 dias para coleta de fezes, coleta de urina e um dia para a amostragem de fluido ruminal para a medição de pH ruminal, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), bem como a quantificação de bactérias e protozoários.

Os animais foram mantidos em baias com comedouros e bebedouros individuais. Os animais foram alimentados com cana-de-açúcar e os diferentes concentrados experimentais e 100 g/animal suplemento mineral BELLNUTRI ® uma vez por dia. A dieta foi fornecida na sua totalidade as 06:00h e as 16:00h o alimento era revolvido para estimular o consumo. Durante todo o período de estudo, as quantidades foram ajustadas para permitir excedente de aproximadamente 100 g/kg em relação à quantidade total de alimentos consumidos no dia anterior. As sobras das dietas foram recolhidas e pesadas e sub-amostras foram obtidas e congeladas a -20°C.

2.2. Coleta de dados e processamento das amostras

As fezes foram coletadas por 5 dias consecutivos para estimar a digestibilidade dos nutrientes da dieta. No final de cada dia de coleta, as fezes foram pesadas e homogeneizadas. No final de cada período de estudo de 20 dias, uma amostra composta de cada animal foi formada. Urina foi coletada durante 5 dias, utilizando coletores de funil acoplados aos animais. O coletor de funil foi ligado a um tubo flexível de polietileno, que encaminhou a urina para recipientes contendo 500 mL de H₂SO₄ (200 mL/L, V/V), para evitar a perda de compostos nitrogenados. Após cada período de 24 h coleta, foram determinados o peso total e o volume de urina excretada. Uma amostra composta foi feita a partir dos cinco dias de amostragem.

O conteúdo ruminal foi coletado no décimo quinto dia de cada período de amostragem para determinar os valores de pH e as concentrações de AGCC e N-NH₃. As amostras foram coletadas às 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 horas após a alimentação, e o pH foi mensurado imediatamente após a coleta. Duas alíquotas de 20 mL foram armazenadas a -10°C e depois utilizada para determinar N-NH₃ de acordo com a metodologia de Fenner (1965), adaptada para uso na destilação de Kjeldahl. A concentração de AGCC foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Palmquist e Conrad (1971).

Síntese de proteína microbiana foi estimada através da excreção urinária total de derivados de purinas (alantoína + ácido úrico) de acordo com a técnica de Fujihara et al. (1987), descrito por Chen e Gomes (1992), e foi calculada de acordo com Pina et al. (2009).

Amostras da dieta oferecida, assim como as amostras de sobras e fezes, foram secas a 55°C por 72 horas e moídas em moinho de facas (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) em peneira de 1 mm. As amostras dos ingredientes dietéticos, e das sobras foram analisadas para determinar os teores de matéria seca (MS; Association of Official Agricultural Chemists [AOAC] Oficial Método 934,01), matéria mineral (MM; AOAC Oficial Método 942,05) e extrato etéreo (EE; AOAC Oficial Método 920,39) de acordo com AOAC (1990). Nitrogênio foi determinado usando um analisador de nitrogênio LECO FP- 528 (LECO Corporation, St. Joseph, MI).

A fibra em detergente neutro foi determinada com a adição de α -amilase sem a adição de sulfito de sódio de acordo com Van Soest, Robertson e Lewis (1991) e

adaptado para o aparelho Ankom200 Fiber Analyzer (Ankom Tecnologia, Fairport, NY), e corrigidas para cinzas e proteína. A fibra em detergente ácido foi determinada usando o método descrito por Goering e Van Soest (1970) e adaptada para o aparelho Ankom200 Fiber Analyzer (Ankom Tecnologia, Fairport, NY). A lignina foi determinada por solubilização da celulose com ácido sulfúrico de acordo com Van Soest e Robertson (1985). Energia bruta (EB) foi obtido através do aquecimento de amostras em um calorímetro bomba adiabática IKA Modelo ® 2000.

2.3. Microbiologia ruminal

Na quantificação e identificação das bactérias ruminais, foram utilizados dois tratamentos (relação V:C 70:30 e 20:80). Esses tratamentos foram escolhidos por serem os tratamentos com maior participação de volumoso (70:30) e o outro maior participação de concentrado (20:80), respectivamente. Foram utilizados 4 animais distribuídos em 4 blocos caracterizado pelo período de amostragem do quadrado latino, o delineamento experimental utilizado foi blocos inteiramente casualizados. A amostragem do conteúdo ruminal foi realizada no último dia de cada período experimental. Foi amostrado 50g de conteúdo ruminal (sólida+líquida), na região ventral do rumen, armazenado em recipientes plásticos com tampa e colocado em caixas de isopor com gelo. No laboratório, adicionou-se 50 mL da solução de PBS (1% Tween 80, pH 7,4) e agitou-se vigorosamente por 3 minutos. Com auxílio de um funil e um tecido de malha (100 micras), o material foi filtrado e 45 mL foi acondicionado em um tubo falcon de 50 mL.

Esta solução foi centrifugada a 16000g por 10 minutos na temperatura de 10⁰C, formando um pellet bacteriano. Os pellets bacterianos foram ressuspensos em TE 10:1 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0), centrifugados a 16000g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e os pellets bacterianos congelados a -80⁰C até a extração de DNA. A recuperação foi maior que 95% das células bacterianas presentes no material coletado.

A extração do DNA total das amostras foi realizada com o AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit® (Axygen). A qualidade do DNA extraído foi verificada e uma amostra composta com a alíquota de DNA de todas as amostras foi preparada

e diluída a 10 ng/μL para os procedimentos iniciais, e as amostras concentradas congeladas a -20°C.

Na realização do ensaio de PCR quantitativo, foram escolhidos nove conjuntos de primers previamente descritos na literatura (Tabela 3). A especificidade dos primers abaixo citados foi analisada, através da ferramenta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Após a sintetização, amplificação e clonagem em vetor plasmídeo, a especificidade foi confirmada novamente pelo sequenciamento de amplicons obtidos nas reações de PCR realizadas com amostras de DNA do presente estudo.

Na quantificação absoluta do número de cópias de DNA bacteriano foi utilizada reação composta por 6,25μL do reagente 2X Power SYBR Green MasterMix (Applied Biosystems); 1,25μL de cada oligonucleotídeo iniciador específico para cada grupo de bactérias estudado; 12,5 ng de DNA genômico e água ultra-pura para completar o volume de reação de 12,5μL.

Tabela 3. Primers utilizado na reação de qPCR

Bactérias	Sequência (5' 3')	T an ¹	T am ²
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	F: GGTATGGGATGAGCTTGC R: GCCTGCCCTGAACTATC	60	435
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	F: GGACGATAATGACGGTACTT R: GCAATC(CT)GAACTGGGACAAT	62	835
<i>Ruminococcus bovis</i>	F: CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG R: CCTCCTTGCGTTAGAACAA	55	175
<i>Streptococcus bovis</i>	F: TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG R: ATGATGGCAACTAACAAATAGGGGT	59	127
<i>Selenomonas ruminantium</i>	F: GGCGGAAGGCAAGTCAGTC R: CCTCTCCTGCACTCAAGAAAGACAG	60	83
<i>Megasphaera elsdenii</i>	F: GACCGAACTGCGATGCTAGA R: CGCCTCAGCGTCAGTTGTC	60	129
<i>Lactobacillus sp.</i>	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: ATTCCACCGCTACACATG	61	345

¹ Temperatura de anelamento (°C). ² Tamanho do amplicon (Pb)

As reações foram realizadas no aparelho Applied Biosystems 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), e submetidas ao protocolo de ciclos descrito a seguir: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de anelamento específica por 1 minuto e 78°C por 30 segundos. Após os ciclos de amplificação, foi adicionada uma etapa em temperatura crescente de 60

a 95°C para obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação.

2.3.1 Quantificação de protozoários

A identificação e a quantificação dos protozoários dos gêneros de ciliados foram realizadas em câmara Sedgewick-Rafter, segundo Dehority (1984). A amostra de conteúdo ruminal (sólida+líquida), previamente conservada em formol 18%, foi homogeneizada e uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubos de ensaio, onde foram acrescentadas três gotas de lugol, em substituição ao verde brilhante conforme modificação proposta por D'Agosto e Carneiro (1999). Após 15 minutos, foi adicionado 9 mL de glicerina a 30%. Para proceder à quantificação dos protozoários, de cada tubo de ensaio foi pipetado 1 mL de amostra previamente coradas com lugol e fixadas com glicerina, para preencher a câmara de Sedgewick-Rafter. Utilizando-se uma grade de contagem em uma das oculares, foram quantificados os ciliados presentes em 50 campos e posteriormente, após rotação da câmara em 180°, mais 50 campos foram analisados. O cálculo do número total de ciliados por mililitro de amostra foi realizado multiplicando-se o número de protozoários ciliados encontrados por 80 e por 20, que correspondem à superfície total da câmara de contagem e à diluição, respectivamente (DEHORITY, 1984).

2.4. Delineamento experimental e análise estatística

Os animais foram distribuídos em duplo quadrado latino 4x4 (quatro tratamentos e quatro períodos), balanceado para efeito residual. Os dados de consumo alimentar, digestibilidade e derivados de purinas foram analisados considerando o delineamento em quadrado latino duplo com efeitos fixos dos tratamentos (3 graus de liberdade (GL)) e de quadrado latino (1 GL), e efeitos aleatórios de período (6 GL), animal (6 GL) e do erro, utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.2).

O modelo estatístico foi apresentado pela equação a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + TP_{ij} + e_{ij}$$

Onde: Y_{ij} é a variável dependente; μ é a média geral; T_i é o efeito do tratamento, P_j é o efeito do período, TP_{ij} é o efeito da interação entre tratamento i e período j , e e_{ij} é o erro do resíduo (TEMPELMAN, 2004).

Os dados de pH, N-NH₃ e AGCC foram analisados considerando um delineamento em quadrado latino duplo com medidas repetidas no tempo. Com efeito fixo de tratamento (3 GL), tempo (7 GL), interação tratamento x tempo (21 GL), e efeitos aleatórios de período (7 GL), animal (7 GL) e do erro. Foi utilizada a estrutura de erros que melhor se ajustou aos dados de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC).

Nas análises do consumo alimentar, digestibilidade, pH, N-NH₃ e AGCC as médias foram comparadas usando a opção CONTRAST do PROC MIXED do SAS e a significância declarada a $P < 0,05$ para os efeitos lineares ou quadráticos.

As análises estatísticas da população de bactérias foram realizadas por meio do software R, em delineamento casualizado em blocos, por meio da análise de variância e teste de T ($P < 0,05$). Fontes de variação: tratamentos (1GL), períodos (blocos com 3 GL), erro (19 GL) para um total de 23 GL. Foi analisada a normalidade dos dados por meio do teste Shapiro-wilk dos resíduos.

Os dados da contagem de protozoários ciliados foram analisados considerando o delineamento em quadrado latino duplo com efeitos fixos dos tratamentos (3 graus de liberdade (GL)) e de quadrado latino (1 GL), e efeitos aleatórios de período (6 GL), animal (6 GL) e do erro, utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.2). Os dados foram transformados para \log_{10} , acrescidos de uma unidade para atender aos requerimentos da análise do SAS para observações diferentes de zero.

3. RESULTADOS

A maior proporção de concentrado na dieta não influenciou o consumo de matéria seca (CMS), matéria orgânica (CMO) e de proteína bruta (CPB) ($P > 0,05$) (Tabela 4). Entretanto, o consumo de fibra em detergente neutro (CFDN_{cp}) apresentou comportamento linear, diminuindo com o aumento da participação do concentrado na dieta. A redução no CFND_{cp} foi de 39,1% dos animais alimentados com a dieta 70:30 em relação aos alimentados com a dieta 20:80. Porém, o CFDN_{cp}

foi menor que 1,2% do peso corporal em todos os tratamentos. Resultado contrário foi observado no consumo de carboidratos não fibrosos (CCNF), que aumentou linearmente com o aumento da participação do concentrado na dieta ($P<0,01$) (Tabela 4). O aumento no CCNF foi de 36,5%, quando se compara as dietas com menor participação de concentrado (70:30) e com maior participação de concentrado (20:80).

O coeficiente de digestibilidade da matéria seca (CDMS) e da matéria orgânica (CDMO) apresentaram comportamento linear, aumentando com a participação do concentrado na dieta ($P<0,01$).

Tabela 4. Consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, em bovinos Nelore alimentados com cana-de-açúcar e diferentes relações volumoso:concentrado na dieta.

	Dietas ¹				EPM	P-valor	Contrastes	
	70:30	60:40	40:60	20:80			L	Q
<i>Consumo, kg/dia</i>								
Matéria seca	6,0	6,9	7,1	6,9	0,6	0,47	-	-
Matéria orgânica	5,8	6,7	6,8	6,5	0,6	0,53	-	-
Proteína bruta	0,9	0,9	1,0	1,0	0,1	0,25	-	-
FDNcp	2,3	2,3	1,7	1,4	0,2	<0,01	<0,01	-
CNF	2,6	3,1	3,8	4,1	0,2	<0,01	<0,01	-
<i>Digestibilidade aparente total, %</i>								
Matéria seca	70,9	70,9	80,1	81,1	7,8	<0,01	<0,01	-
Matéria orgânica	69,9	70,8	79,8	81,8	2,5	<0,01	<0,01	-
Proteína bruta	69,6	63,4	72,9	74,8	3,1	0,12	-	-
FDNcp	58,0	52,5	62,4	65,4	3,3	0,14	-	-
CNF	71,7	79,6	79,5	70,0	7,1	0,07	-	0,01

¹Dietas: 70:30= 700 g/kg de volumoso e 300 g/kg de concentrado; 60:40= 600 g/kg de volumoso e 400 g/kg de concentrado; 40:60= 400 g/kg de volumoso e 600 g/kg de concentrado; 20:80= 200 g/kg de volumosos e 800 g/kg de concentrado. EPM= erro padrão da média; L=efeito linear; Q= efeito quadrático; FDNcp = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; CNF = carboidratos não fibrosos.

Os valores do pH ruminal, assim como as concentrações de N-NH₃ ruminal, foram influenciados pela participação do concentrado na dieta ($P<0,01$) (Tabela 5). Observou-se decréscimo linear nos valores de pH com o aumento da participação do concentrado na dieta, e o inverso foi verificado na concentração de N-NH₃ que aumentou linearmente com a aumento da participação do concentrado na dieta ($P<0,05$) (Tabela 5). O pH permaneceu abaixo de 6,0 após 6 horas da alimentação em animais alimentados com maior proporção de concentrado (20:80), enquanto nos tratamentos 60:40 e 40:60 isso aconteceu a partir de 10 horas após a alimentação (Figura 1).

Tabela 5. Médias de pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), iso-ácidos e síntese de proteína microbiana no rumen, em novilhos Nelore alimentados com cana-de-açúcar e diferentes relações volumoso:concentrado na dieta.

	Dietas ¹				EPM	P-valor		Contraste ²	
	70:30	60:40	40:60	20:80		Dieta	Tempo	Dieta	Tempo
N-NH ₃ , mg/dL	18,67	19,63	23,25	29,95	2,78	<0,01	<0,01	-	Q(<0,01)
pH	6,49	6,32	6,27	6,01	0,08	<0,01	<0,01	L(<0,01)	Q(0<0,01)
<i>Ácido graxo de cadeia curta (AGCC) (mM/L)</i>									
Total AGCC	90,43	93,28	93,34	93,82	7,74	-	0,03	-	-
Acetato (C2)	55,12	57,88	57,20	56,96	4,16	-	<0,01	-	-
Propiônico(C3)	21,79	20,62	20,85	19,56	2,10	0,89	<0,01	-	L(<0,01)
Butírico (C4)	9,88	10,94	11,38	11,55	1,95	-	-	-	L(<0,01)
Valérico	1,12	1,36	1,19	1,63	0,18	0,03	0,03	L(0,02)	L(0,01)
Isobutírico	0,88	0,86	1,08	1,34	0,17	-	<0,01	L(0,03)	L(<0,01)
Isovalérico	1,62	1,59	2,18	2,76	0,25	<0,01	<0,01	L(<0,01)	Q(<0,01)
C2:C3	3,06	2,97	2,86	2,76	0,23	0,74	<0,01	-	Q(<0,01)
<i>N microbiano</i>									
g/dia	17,4	51,3	61,2	64,4	15,2	<0,01	-	L(0,04)	-
gN mic/kgMODR ³	4,9	12,8	11,8	15,6	3,7	0,03	-	L(0,01)	-

¹Dietas: 70:30= 700 g/kg de volumoso e 300 g/kg de concentrado; 60:40= 600 g/kg de volumoso e 400 g/kg de concentrado; 40:60= 400 g/kg de volumoso e 600 g/kg de concentrado; 20:80= 200 g/kg de volumosos e 800 g/kg de concentrado. EPM = erro padrão da média; ²Contraste: L = linear, Q = quadrático; quando o P-valor não significativo (P>0,05) os valores do contrastes não são apresentados; ³g de N microbiano /kg de matéria orgânica degradada no rumen.

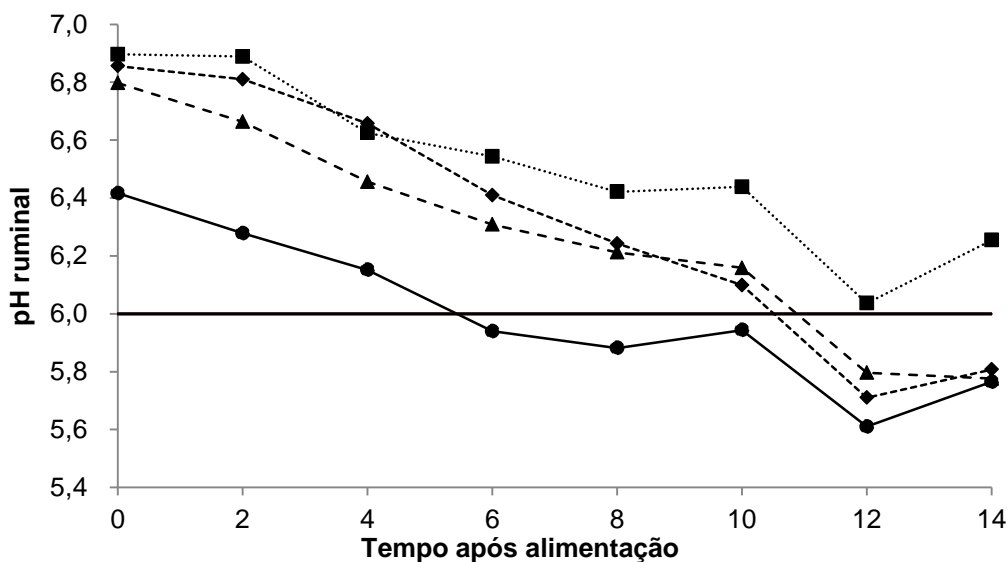


Figura 1. pH ruminal de novilhos alimentados com as dietas: 70:30= 700g/kg de volumoso e 300g/kg de concentrado (■); 60:40= 600g/kg de volumoso e 400g/kg de concentrado (◆); 40:60= 400g/kg de volumoso e 600g/kg de concentrado (▲); 20:80= 200g/kg de volumosos e 800g/kg de concentrado (●); ponto crítico do pH (-) segundo Russel e Dombrowski (1980). Erro padrão da média (EPM = 0,036); Interação tratamento x tempo (P<0,05).

Não foi verificado efeito das relações V:C em relação aos ácidos graxos de cadeia curta total, acético, propiônico, butírico, iso-butírico e na relação C2:C3. Por

outro lado, os ácidos iso-valérico e o valérico apresentaram comportamento linear crescente com o aumento da participação do concentrado ($P<0,01$) (Tabela 5). O tempo após a alimentação apresentou efeito significativo sobre as concentrações de todos os ácidos graxos de cadeia curta e ramificada ($P<0,05$), sendo que na concentração ruminal do ácido acético e o iso-valérico esse efeito foi quadrático ($P<0,01$). No entanto, os demais ácidos apresentaram efeito linear aumentando suas concentrações em função do tempo após a alimentação ($P<0,05$).

A população de bactérias fermentadoras de carboidrato fibrosos foi influenciada pelo aumento da participação do concentrado na dieta (Tabela 6).

Tabela 6. Número de cópias de diferentes espécies bacterianas no rumen de bovinos Nelore alimentados com cana-de-açúcar e diferentes relações volumoso:concentrado na dieta.

	Dietas ¹		EPM	P-valor
	70:30	20:80		
Bactérias, Log_{10} ²				
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	10,48	8,40	0,10	<0,01
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	9,41	6,80	0,10	<0,01
<i>Ruminococcus albus</i>	11,66	11,31	0,17	0,14
<i>Selenomonas ruminantium</i>	5,01	6,50	0,10	<0,01
<i>Streptococcus bovis</i>	4,85	5,23	0,33	0,46
<i>Megasphaera elsdenii</i>	4,83	6,59	0,19	<0,01
<i>Lactobacillus</i> sp.	4,15	6,47	0,13	<0,01

¹Dietas: 70:30= 700 g/kg de volumoso e 300 g/kg de concentrado; 20:80= 200 g/kg de volumosos e 800 g/kg de concentrado. EPM= erro padrão da média. ² Log_{10} do número de cópias do gene 16S rDNA em 25 ng de DNA genômico.

O número de cópias das espécies do gene 16S das espécies *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens* foram menores ($P<0,01$) nas dietas com maior participação de concentrado (V:C 20:80) (Tabela 6). As espécies caracterizadas como lácticas (consumidoras de ácido láctico) *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii* aumentaram quando os animais receberam dietas com maior participação de concentrado ($P<0,01$). O mesmo foi observado com a espécie *Lactobacillus* sp. ($P<0,01$). Já as espécies *Ruminococcus albus* e *Streptococcus bovis* não foram influenciadas pelas dietas testadas ($P>0,05$).

Na contagem dos protozoários, o gênero *Entodinium* foi predominante, e a população de protozoários totais diminuiu com o aumento do concentrado na dieta. Os gêneros *Dasytricha* e *Metadinium* foram influenciados pelas dietas testadas ($P=0,02$). Com o aumento do concentrado, o número de protozoários do gênero

Dasytricha diminuiu, sendo menor na relação V:C 20:80. O gênero *Metadinium* foi beneficiado pela dieta com a relação V:C 60:40, apresentou o mesmo número entre as dietas V:C 70:30 e 40:60 e reduziu com a dieta V:C 20:80.

Tabela 7. Quantificação de protozoários ciliados no rumen em bovinos Nelore alimentados com cana-de-açúcar e diferentes relações volumoso:concentrado na dieta.

Protozoários (n x 10 ⁻⁴) ¹	Dietas ²				EPM	P-valor
	70:30	60:40	40:60	20:80		
Protozoários totais	21,27 ^a	21,67 ^a	18,78 ^b	17,48 ^b	1,39	0,01
<i>Entodinium</i>	7,26	7,19	7,24	7,26	0,10	0,83
<i>Dasytricha</i>	3,97 ^a	2,56 ^{ab}	2,11 ^b	1,55 ^c	1,40	0,02
<i>Eudiplodinium</i>	2,84	2,31	2,46	2,27	1,32	0,81
<i>Metadinium</i>	1,47 ^b	2,93 ^a	1,47 ^c	1,00 ^c	0,49	0,02
<i>Eremoplastron</i>	1,95	2,51	1,49	1,93	0,62	0,72
<i>Diploplastron</i>	1,00	1,49	1,87	1,00	0,38	0,30
<i>Isotricha</i>	2,78	2,68	2,14	2,47	1,33	0,86

¹Log₁₀ do número de protozoários (n x 10⁻⁴); P-valor= níveis descritivos de probabilidade. Médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05). ²Dietas: 70:30= 700g/kg de volumoso e 300g/kg de concentrado; 60:40= 600g/kg de volumoso e 400g/kg de concentrado; 40:60= 400g/kg de volumoso e 600g/kg de concentrado; 20:80= 200g/kg de volumosos e 800g/kg de concentrado.

4. Discussão

Neste estudo foi avaliado o efeito do aumento da proporção do concentrado em dietas de novilhos Nelore alimentados com cana-de-açúcar sobre a fermentação ruminal e na alteração da população de microrganismos ruminais. Observou-se que o aumento da proporção de concentrado nas dietas, alterou a população de microrganismos ruminais e os parâmetros de fermentação, no entanto, a digestibilidade da fibra e a ingestão de matéria orgânica não foram alteradas.

O consumo de matéria seca em ruminantes é modulado por dois fatores: efeito de enchimento ruminal e fatores químicos (CARTER; GROVUM, 1990). Neste estudo, o consumo de matéria seca e de matéria orgânica não foram influenciados pelas dietas testadas, o que evidencia que nenhum dos fatores tenha limitado a ingestão (Tabela 4).

O consumo de CNF e de FDNcp foi alterado com o aumento da participação do concentrado na dieta, e essas alterações foram moduladas pela concentração destes na dieta, visto que o consumo de matéria seca não foi alterado (P=0,47), pelas dietas testadas (Tabela 4). A redução acentuada do pH ruminal dos animais alimentados com as dietas com maior proporção de concentrado é explicado pelo

aumento no consumo de carboidratos não fibrosos, favorecendo o acúmulo de AGCC no rumen e redução no consumo de FDN_{cp}, diminuindo o tempo de ruminação dos animais (ZEBELI et al., 2006).

O aumento da proporção de concentrado na dieta propiciou mudanças no fornecimento de substratos, bem como na população de bactérias ruminais, o que promoveu o aumento da população das bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus* sp.) em detrimento das bactérias fermentadoras de carboidratos fibrosos (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*).

A redução na população das bactérias fermentadoras de carboidratos fibrosos é denominado “efeito carboidrato”, em que a competição por nutrientes essenciais entre os grupos de espécies microbianas é ampliada (MOULD; ØRSKOV; MANN, 1983), o que desfavorece a utilização da fibra insolúvel pelos microrganismos fermentadores de carboidratos fibrosos, de menor taxa de crescimento e, conseqüentemente, menor capacidade competitiva.

Outro fator determinante na redução das bactérias fermentadoras de carboidratos fibrosos foi o pH ruminal que permaneceu abaixo de 6,0 a partir de 4 horas após a alimentação (Figura 1). Esses resultados estão de acordo com as observações de Russell e Dombrowski, (1980) que reportaram alta sensibilidade desses microrganismos ao baixo pH. Em concordância, Mould, Ørskov e Mann (1983) relataram que quando o pH do meio permanece abaixo de 6,0 a atividade das bactérias celulolíticas é reduzida.

Alguns autores reportaram que a atividade enzimática das bactérias fibrolíticas é inibida quando há presença de amido no ambiente ruminal e que as bactérias fermentadoras de carboidratos não fibrosos liberam compostos inibidores, de origem protéica (bacteriocinas) que inibem a atividade das bactérias fermentadoras de carboidrato fibroso (ARROQUY et al., 2005). Essa afirmativa corrobora com os resultados observados neste estudo, pois o aumento da participação do concentrado nas dietas aumentou a proporção de carboidratos não fibrosos e reduziu a população de bactérias fibrolíticas.

Mesmo com a redução das bactérias fermentadoras de carboidratos fibrosos, não foi observado diferenças estatísticas na digestibilidade da FDN_{cp}. Alguns autores relataram que as três espécies fibrolíticas estudadas nesse experimento

(*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus*), são as mais importantes na degradação da fibra (KOBAYASHI; SHINKAI; KOIKE, 2008), porém, existem outras espécies de microrganismos (*Prevotella* sp, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium polysaccharolyticum*, *Clostridium longisporum* e *Eubacterium cellulosolvens*), não estudadas no presente trabalho, que em simbiose são responsáveis pela degradação efetiva da fibra. Além disso, outros fatores nutricionais também são responsáveis pela digestibilidade de fibra, como a composição da dieta, consumo e taxa de passagem.

A predominância do gênero *Entodinium* está de acordo com as observações de outros autores que investigaram as populações de protozoários do rumen de bovinos em diferentes regimes alimentares, por exemplo, em dietas com maior participação de cana-de-açúcar (FRANZOLIN; FRANZOLIN, 2000), em dietas ricas em concentrado, com ou sem a adição de gordura (TOWNE et al., 1990), ou com o uso de ionóforos em dietas ricas em volumoso ou concentrado (GUAN et al., 2006). Em concordância com estes estudos houve a predominância do gênero *Entodinium* no presente trabalho.

As dietas com maior proporção de cana-de-açúcar (70:30 e 60:40) beneficiaram a população dos protozoários do gênero *Dasytricha* ($P=0,02$), este fato pode ser associado à capacidade que este gênero de protozoários tem de utilizar polissacarídeos e carboidratos solúveis (HUNGATE, 1966), uma vez que as dietas com maior participação de cana-de-açúcar apresentam níveis mais elevados de carboidratos solúveis (sacarose), devido a presença elevada desta fração na cana-de-açúcar (ALLI; FAIRBAIN; BAKER, 1983). Bem como o gênero *Metadinium* foi encontrado em quantidades maiores nas relações 60:40, pois este gênero é pertencente à subclasse dos Entodiniomorphos, que utilizam celulose no seu metabolismo (WILLIAMS, 1986).

Esses resultados corroboram com os verificados por Calsamiglia et al. (2012), em que o aumento da disponibilidade de carboidratos de alta fermentabilidade no rumen determina a taxa de crescimento microbiano e conseqüentemente melhora a eficiência de utilização de N-NH₃ ruminal, quando este não é limitante. Tal fato, foi observado neste estudo, em que o N-NH₃ não foi limitante, uma vez que as concentrações foram superiores à 5 mg/dL em todas as dietas testadas,

concentração mínima necessária (SATTE; ROFFLER, 1975) para não haver prejuízo na síntese de proteína microbiana.

O maior consumo de CNF proporcionado pelo aumento da participação do concentrado na dieta, também favoreceu o coeficiente de digestibilidade da energia bruta e da matéria seca. De acordo com Forbes (1996), dietas com maiores teores de carboidratos não fibrosos apresentam uma melhor digestibilidade e concentração energética, devido a maior taxa de degradação desses carboidratos no rumen.

Com relação aos ácidos graxos de cadeia curta, esperava-se com o aumento do consumo de CNF a elevação na concentração de ácido propiônico no rumen e consequente redução na relação C2:C3, visto que a população da espécie *Selenomonas ruminantium* aumentou junto à proporção de concentrado na dieta. Essa espécie bacteriana é uma importante produtora de ácido propiônico mediante descarboxilação do succinato (WOLIN; MILLER, 1997). Porém, essa alteração não ocorreu, tornando evidente que o volumoso utilizado (cana-de-açúcar) foi fundamental na manutenção das condições de fermentação ruminal, devido ao seu alto teor de carboidratos solúveis (sacarose). No entanto, o aumento dos ácidos graxos de cadeia ramificada, valérico e o iso-valérico foram decorrentes do aumento da população de *Megasphaera elsdenii*. Essa bactéria tem a capacidade de fermentar aminoácidos e produzir valerato e iso-valerato como produto da fermentação (KOZLOSKI, 2009).

A microbiota ruminal pode ser manipulada de acordo com a proporção de concentrado na dieta. No entanto, quando se utiliza cana-de-açúcar como volumoso em dieta com proporções crescente de concentrado podemos otimizar a síntese de proteína microbiana sem alterar a digestibilidade da fibra.

5. CONCLUSÃO

O aumento da proporção de concentrado em dietas com cana-de-açúcar promove alterações nos parâmetros ruminiais, reduz a população das bactérias *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens*, não altera a digestibilidade da fibra e, aumenta a síntese de proteína microbiana.

6. REFERÊNCIAS

- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC. **Energy and protein requirements of ruminants**. Oxon: CAB International, 1993. p. 159.
- ALLI, I.; FAIRBAIN, R.; BAKER, B. E. The effect of ammonia on the fermentation of chopped sugarcane. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 291-299, 1983.
- ARROQUY, J.I.; COCHRAN, R.C.; NAGARAJA, T.G. Effect of types of non-fiber carbohydrates on in vitro forage fiber digestion of low-quality grass hay. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 120, n. 1-2, p. 93-106, 2005.
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official Methods of Analysis**. 15. ed. Washington: 1990.
- CALSAMIGLIA, S.; BLANCH, M.; FERRET, A.; MOYA, D. Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 172, n. 1-2, p. 42–50, 2012.
- CARTER, R. R.; GROVUM, W. L. A review of the physiological significance of hypertonic body fluids on feed intake and ruminal function: salivation, motility and microbes. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 68, n. 9, p. 2811-2832, 1990.
- CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of technical details. Aberdeen: **Rowett Research Institute/International Feed Research Unit**, 1992. p. 21.
- CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 75: 2304-2323, 1992.
- D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M. E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 16, n. 3, p. 725-729, 1999.
- DEHORITY, B. A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 182-185, 1984.
- FENNER, H. Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 48, n. 2, p. 249–251, 1965.
- FORBES, J. M. Integration of regulatory signals controlling forage intake in ruminants. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 74, n. 12, p. 3029–3053, 1996.
- FRANZOLIN, R.; FRANZOLIN, M. H. T. População protozoários ciliados e degradabilidade ruminal em búfalos e bovinos zebuínos sob dieta à base de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 1853-1861, 2000.

FUJIHARA, T.; ØRSKOVA, E. R.; REEDSA, P. J.; KYLEA, D. J. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v. 109, n. 1, p. 7-12, 1987.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analysis: apparatus reagents, procedures and some applications**. Agricultural Handbook, Washington, D.C. 1970. p. 379.

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

GUAN, H.; WITTENBERG, K.M.; OMINSKI, K. H.; Krause, D. O. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 84, n. 7, p. 1896-1906, 2006.

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

KOBAYASHI, Y.; SHINKAI, T.; KOIKE, S. Ecological and physiological shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion-review. **Folia Microbiology**, Doidreht, v. 53, n. 3, p. 195–200, 2008.

KOZLOSKI, V. G. Metabolismo microbiano ruminal. In: **Bioquímica dos ruminantes** In: KOZLOSKI, V. G. 1. ed. Santa Maria: UFMS, 2009. p. 212.

LASCANO, G. J.; VELEZ, M.; TRICARICO, J. M.; HEINRICHS, A. J. Nutrient utilization of fresh sugarcane-based diets with slow-release nonprotein nitrogen addition for control-fed dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 95, n. 1, p. 370 - 376, 2012.

LENG, R. A. Quantitative ruminant nutrition - a green science. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 44, n. 3, p. 363 - 380, 1993.

MERTENS. D. R. Regulation of forage intake. In: **Forage quality: evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p. 450-493.

MOULD, F. L.; ØRSKOV, E. R.; MANN, S. O. Associative effects of mixed feeds. I. effects of type and level of supplementation and the influence of the rumenfluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 15–30, 1983.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 90, (Suppl 1) p. E17 - 38, 2007.

PALMIQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high fat diets. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 74, n. 7, p. 1025-1033, 1971.

PINA, D. S.; VALADARES FILHO, S. C.; TEDESCHI, L. O.; BARBOSA, A. M.; VALADARES, R.F.D. Influence of different levels of concentrate and ruminally undegraded protein on the digestive parameters in beef heifers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 87, n. 3, p. 1058-1067, 2009.

QUEIROZ, M. F. S.; BERCHIELLI, T. T.; SIGNORETTI, R. D.; RIBEIRO, A. F.; MORAIS, J. A. S. Metabolism and ruminal parameters of Holstein x Gir heifers fed sugarcane and increasing levels of crude protein. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 9, p. 2101-2109, 2012

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

SATTER, L. D.; ROFFLER, R. E. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 58, n. 8, p. 1219-1237, 1975.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; GIBB, D. J.; CREWS, D. H.; HICKMAN, D. D.; STREETER, M.; MCALLISTER, T. A. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: a review. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.81 (E. Suppl. 2), p. E 149–158, 2003.

SNIFFEN. C. J.; O'CONNOR. J. D.; VAN SOEST. P. J.; FOX. D. J.; RUSSEL. J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 70, n. 11, p. 3562- 3577, 1992.

TAJAJ, M.; MAULBETSCH, A.; ZEBELI, Q.; STEINGASS, H. Effects of physically effective fibre concentration of diets consistin of hay and slowly degradable concentrate on chewing activity in mid lactation dairy cows under constant intake level. **Archive Animal Nutrition**, London, v. 59, n. 5, p. 313 - 324, 2005.

TEMPELMAN, R. J. Experimental design and statistical methods for classical and bioequivalence hypothesis testing with an application to dairy nutrition studies. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 82, n. 13, p. 162-172, 2004.

TOWNE, G.; NAGARAJA, T. G.; BRANDT JR.; R. T. Ruminal ciliated protozoa in cattle fed finishing diets with or without supplemental fat. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 68, n. 7, p. 2150 - 2155, 1990.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd Ed. New York: Cornell University Press, 1994. p.476.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. **Analysis of Forages and Fibrous Foods**. New York: Cornell University Press, 1985. p. 202.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 74, n. 10, p. 3583 - 3597, 1991.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Increasing physically effective fiber content of dairy cow diets through forage proportion versus forage chop length: Chewing and ruminal pH. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 92, n. 4, p. 1603 - 1615, 2009.

WILLIAMS, A. G. Rumen holotricha ciliate protozoa. **Microbiological Reviews**, Bethesda, v. 50, n. 1, p. 25 - 49, 1986.

WOLIN, M. J.; MILLER, T. L. Microbe-microbe interactions. In; Hobson, P. N. Stewart, C. S. (Ed). **The rumen microbial ecosystem**. New York: Champan and Hall, 1997. P. 467.

ZEBELI, Q.; TAJAJ, M.; STEINGASS, H.; METZLER, B.; DROCHNER. W. Effects of physically effective fiber on digestive processes and milk fat content in early lactating dairy cows fed total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 89, n. 2, p. 651 - 668, 2006.

CAPÍTULO 3 – FENO DE TIFTON 85 EM DIETAS COM PROPORÇÕES CRESCENTES DE CONCENTRADO REDUZEM OS RISCOS DE DISTÚRBIOS RUMINAIS EM NOVILHOS NELORE CONFINADOS

RESUMO – O uso de dietas com aumento da proporção de concentrado em detrimento à fibra fornecem níveis energéticos adequados que podem resultar em maior eficiência energética em novilhos Nelore confinados. Nesse estudo, hipotetizou-se que maiores proporções de concentrado na dieta de novilhos Nelore poderia afetar a fermentação ruminal e a microbiota, como consequência de uma redução do pH ruminal. Avaliou-se o efeito de dietas com quatro diferentes relações volumoso (feno de Tifton 85):concentrado sobre o consumo, digestibilidade, fermentação e população de microrganismos ruminal de novilhos Nelore em confinamento. Maiores proporções de concentrado na dieta não afetaram o consumo e digestibilidade da matéria seca e orgânica ($P>0,05$). A concentração de nitrogênio amoniacal ruminal, ácidos graxos de cadeia curta total, acético, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico e nitrogênio microbiano não diferiram entre as dietas testadas ($P>0,05$). No entanto, proporções crescentes de concentrado na dieta resultou em uma redução linear no pH ruminal ($P <0,01$) e aumento da concentração de ácido propiônico ($P<0,01$), resultando em menor relação ácido acético:propiônico ($P<0,01$). A população das bactérias *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* diminuiu ($P<0,05$) no rumen. No entanto, as espécies bacterianas consumidoras de ácido láctico (*Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*) e os produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus* sp. e *Streptococcus bovis*) aumentaram quando os animais foram alimentados com dietas com maior participação de concentrado ($P<0,05$). O número total de protozoários foi semelhante ($P>0,05$) para as diferentes relações volumoso:concentrado. Somente o gênero *Dasytricha* foi influenciado pelas dietas testadas ($P<0,01$). O feno de Tifton 85 em dietas com altas proporções de concentrado pode minimizar o risco de distúrbios ruminais em novilhos confinados.

Palavras-chave: bactérias, carboidratos fibrosos, pH, protozoários, qPCR.

1. INTRODUÇÃO

A investigação de sistemas de alimentação que otimizem o desempenho animal em curto prazo é objetivo das pesquisas na produção de ruminantes. Uma forma de alcançar este objetivo é a utilização de dietas com proporções crescentes de concentrado em detrimento da fibra, em que, garantindo níveis energéticos adequados pode resultar em uma maior eficiência na produção animal.

No entanto, a utilização de dietas com elevada proporção de concentrado pode aumentar a possibilidade de ocorrência de acidose ruminal, o que pode levar a uma redução no desempenho do animal. Maiores proporções de carboidratos não fibrosos (CNF) na dieta de ruminantes proporcionam acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e lactato, tornando o pH ruminal ácido ($\text{pH} < 6,0$) e causando mudanças na microbiota ruminal (BLANCH et al., 2009; PETRI et al., 2012). Estas condições também promovem um aumento na atividade de bactérias amilolíticas e ácido lácticas, e ao mesmo tempo reduz a atividade de bactérias fibrolíticas no rumen (RUSSELL, 2002; KLIEVE et al., 2003), e conseqüentemente reduz a ingestão e a digestibilidade dos nutrientes.

Os animais alimentados com menores proporções de CNF e maiores proporções de fibra, por sua vez, apresentam menor eficiência energética e consumo de nutrientes, o que, reduz a síntese de proteína microbiana (YANG; BEAUCHEMIN, 2006). Estes processos dependem da qualidade física e química do volumoso, tais como a densidade e concentração de FDN e outros nutrientes que afetam a fermentação no rumen, e conseqüentemente a composição da microbiota ruminal (ZHU et al., 2013). No entanto, a ingestão de fibra fisicamente efetiva é fundamental para manter as funções do rumen (ZEBELI et al., 2010). Portanto, é de suma importância determinar a relação volumoso:concentrado ideal, minimizando o risco de distúrbios ruminais, sem prejudicar o desempenho animal.

Descobertas anteriores sobre os efeitos da relação volumoso:concentrado sobre o pH ruminal, foram controversas. Enquanto alguns estudos indicam que a maior digestibilidade da FDN das forrageiras têm um efeito positivo sobre as atividades de mastigação, e conseqüentemente o tamponamento ruminal, em bovinos (ZEBELI et al., 2006), outros têm mostrado efeito negativo (TAYLOR; ALLEN, 2005) ou nenhum efeito (OBA; ALLEN, 2000). Essas controversas podem

estar associadas às diferenças nas propriedades químicas e físicas da fibra, porém não estão completamente elucidadas.

Em regiões tropicais, a dieta dos bovinos consiste em uma maior proporção de volumoso. Nesta região, feno de Tifton 85 está entre as fontes predominante de forragem para os ruminantes, devido à sua alta produtividade e baixo custo, embora seja normalmente considerado um volumoso de baixa qualidade (HILL et al., 1993). No entanto, para o nosso conhecimento não houve nenhum estudo até o momento sobre o efeito do aumento de concentrado em detrimento ao feno de Tifton 85 sobre a população microbiana ruminal, e sua relação com parâmetros de fermentação ruminal, em novilhos da raça Nelore.

No presente estudo, avaliou-se dietas com quatro diferentes relações volumoso (feno de Tifton 85):concentrado sobre o consumo, a digestibilidade, fermentação e microbiota ruminal de novilhos Nelore em confinamento. Hipotetizou-se que maior proporção de concentrado na dieta desses animais Nelore poderia afetar a fermentação e a microbiota ruminal, como consequência de uma redução do pH ruminal. No entanto, os resultados indicam que na presença de feno de Tifton 85, pH ruminal foi mantido elevado ($\text{pH} > 6,0$) por longos períodos (14h após a alimentação), mesmo com proporções elevadas (80%) de concentrado. Estes resultados apontam que a adequação da quantidade de fibra da dieta, usando o feno de Tifton 85 podem minimizar o risco de distúrbios ruminais em novilhos alimentados com dietas ricas em grãos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo usado neste estudo está de acordo com as normas e diretrizes propostas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e foi aprovado pela CEBEA (Comissão de Ética e Bem Estar Animal) da FCAV–UNESP–Campus Jaboticabal, Brasil (017621/11).

2.1. Animais e dietas experimentais

Oito novilhos Nelore (331 ± 08 kg PV), canulados no rumen e duodeno, foram distribuídos em um duplo quadrado latino 4×4 (4 tratamentos e 4 períodos). As

dietas foram calculadas usando AFRC (1993). O volumoso foi o feno de Tifton 85 e o concentrado foi constituído por milho, farelo de soja e ureia (Tabela 1).

Os tratamentos foram os seguintes: 70:30 = contendo 700g/kg de volumoso e 300g/kg de concentrado; 60:40 = contendo 600g/kg de volumoso e 400g/kg de concentrado; 40:60 = contendo 400g/kg de volumoso e 600g/kg de concentrado; 20:80 = contendo 200g/kg de volumoso e 800g/kg de concentrado. As composições das dietas experimentais encontram-se na Tabela 2.

O experimento foi dividido em 4 períodos de 21 dias consecutivos. Cada período de estudo consistiu de 14 dias de adaptação, 6 dias para coleta de fezes, coleta de urina e um dia para a amostragem de fluido ruminal (período total do estudo de 21 dias) para a medição de pH ruminal, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), bem como a quantificação de bactérias e protozoários.

Tabela 1. Composição química dos ingredientes dietéticos.

	Feno de Tifton 85	Milho moído	Farelo de soja	Ureia	Sal mineral ¹
Matéria seca, %	92,8	88,5	86,6	99,0	99,0
Matéria orgânica, % MS	97,3	96,5	92,4	-	-
Proteína bruta, % MS	3,4	9,1	51,8	289,0	-
FDA, %MS	49,7	6,1	8,3	-	-
FDN,%MS	88,1	12,5	15,8	-	-
Lignina, % MS	7,2	0,8	0,2	-	-
CNF,% MS	5,7	71,1	23,4	-	-
Extrato etéreo, % MS	0,7	3,8	1,3	-	-
Energia bruta, MJ/kg	19,2	19,7	19,7	-	-

¹ Composição do produto (Cálcio: 146 g; Fósforo: 40 g; Magnésio: 20 g; Enxofre: 40 g; Sódio: 130 g; Cobre: 1350 mg; Manganês: 1040 mg; Zinco: 5000 mg; Iodo: 100 mg; Cobalto: 80 mg; Selênio: 26 mg; Flúor (máx.): 800 mg). FDA = fibra em detergente ácido, FDN = fibra em detergente neutro, CNF = carboidratos não fibrosos.

Os animais foram mantidos em baias com comedouros e bebedouros individuais. Os animais foram alimentados com feno de Tifton 85 e os diferentes concentrados experimentais e 100 g/animal suplemento mineral BELLNUTRI® uma vez por dia. A dieta foi fornecida na sua totalidade as 06:00h e as 16:00h o alimento foi revolvido para estimular o consumo. Durante todo o período de estudo, as quantidades foram ajustadas para permitir excedente de aproximadamente 100 g/kg em relação à quantidade total de alimentos consumidos no dia anterior. As sobras das dietas foram recolhidas e pesadas da e sub-amostras foram obtidas e congeladas a -20°C.

Tabela 2. Porcentagem dos ingredientes e composição química da dieta

	Dietas ¹			
	70:30	60:40	40:60	20:80
<i>Ingredientes, g/kg MS</i>				
Feno de Tifton 85	70,0	60,0	42,2	20,0
Farelo de milho	15,7	22,8	48,0	69,5
Farelo de soja	13,1	16,1	8,40	9,00
Ureia +sulfato de amônia	1,20	1,20	1,40	1,60
<i>Composição química</i>				
Matéria seca, %	89,0	91,0	90,3	88,8
Matéria orgânica, % MS	96,3	95,2	95,2	94,8
Proteína bruta, %,MS	14,0	15,9	14,1	14,6
Fibra em detergente ácido, % MS	36,9	32,6	24,6	23,0
Fibra em detergente neutro, %MS	65,7	58,2	44,5	27,7
Carboidratos não fibrosos ² , % MS	14,2	23,4	38,5	52,6
Energia bruta, MJ/kg	19,2	19,3	19,3	19,4

¹Dietas: 70:30= 700g/kg de volumoso e 300g/kg de concentrado; 60:40= 600g/kg de volumoso e 400g/kg de concentrado; 40:60= 400g/kg de volumoso e 600g/kg de concentrado; 20:80= 200g/kg de volumosos e 800g/kg de concentrado; ² Valor Calculado (SNIFFEN et al.,1992).

2.2. Coleta de dados e processamento das amostras

As fezes foram coletadas por 5 dias consecutivos para estimar a digestibilidade dos nutrientes da dieta. No final de cada dia de coleta, as fezes foram pesadas e homogeneizadas. No final de cada período de estudo de 20 dias, uma amostra composta de cada animal foi formada. Urina foi coletada durante 5 dias, utilizando coletores de funil acoplados aos animais. O coletor de funil foi ligado a um tubo flexível de polietileno, que encaminhou a urina para recipientes contendo 500 mL de H₂SO₄ (200 mL/L, V/V), para evitar a perda de compostos nitrogenados. Após cada período de 24 h coleta, foram determinados o peso total e o volume de urina excretada. Uma amostra composta foi feita a partir dos cinco dias de amostragem.

O conteúdo ruminal foi coletado no décimo quinto dia de cada período de amostragem para determinar os valores de pH e as concentrações de AGCC e N-NH₃. As amostras foram coletadas às 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 horas após a alimentação, e o pH foi mensurado imediatamente após a coleta. Duas alíquotas de 20 mL foram armazenadas a -10°C e depois utilizada para determinar N-NH₃ de acordo com a metodologia de Fenner (1965), adaptada para uso na destilação de Kjeldahl. A concentração de AGCC foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Palmquist e Conrad (1971).

Síntese de proteína microbiana foi estimada através da excreção urinária total de derivados de purinas (alantoína + ácido úrico) de acordo com a técnica de

Fujihara et al. (1987), descrito por Chen e Gomes (1992), e foi calculada de acordo com Pina et al. (2009).

Amostras da dieta oferecida, assim como as amostras de sobras e fezes, foram secas a 55°C por 72 horas e moídas em moinho de facas (Thomas Scientific, Swedesboro , NJ) em peneira de 1 mm. As amostras dos ingredientes dietéticos, e das sobras foram analisadas para determinar os teores de matéria seca (MS; Association of Official Agricultural Chemists [AOAC] Oficial Método 934,01), matéria mineral (MM; AOAC Oficial Método 942,05) e extrato etéreo (EE; AOAC Oficial Método 920,39) de acordo com AOAC (1990). Nitrogênio foi determinado usando um analisador de nitrogênio LECO FP- 528 (LECO Corporation, St. Joseph , MI) .

A fibra em detergente neutro foi determinada com a adição de α -amilase sem a adição de sulfito de sódio de acordo com Van Soest, Robertson e Lewis (1991) e adaptado para o aparelho Ankom200 Fiber Analyzer (Ankom Tecnologia, Fairport, NY), e corrigidas para cinzas e proteína. A fibra em detergente ácido foi determinada usando o método descrito por Goering e Van Soest (1970) e adaptada para o aparelho Ankom200 Fiber Analyzer (Ankom Tecnologia, Fairport, NY). A lignina foi determinada por solubilização da celulose com ácido sulfúrico de acordo com Van Soest e Robertson (1985). Energia bruta (EB) foi obtido através do aquecimento de amostras em um calorímetro bomba adiabática IKA Modelo ® 2000.

2.3. Microbiologia ruminal

Na quantificação e identificação das bactérias ruminais, foram utilizados dois tratamentos (relação V:C 70:30 e 20:80). Esses tratamentos foram escolhidos por serem os tratamentos com maior participação de volumoso (70:30) e o outro maior participação de concentrado (20:80), respectivamente. Foram utilizados 4 animais distribuídos em 4 blocos caracterizado pelo período de amostragem do quadrado latino, o delineamento experimental utilizado foi blocos inteiramente casualizados. A amostragem do conteúdo ruminal foi realizada no último dia de cada período experimental. Foi amostrado 50g de conteúdo ruminal (sólida+líquida), na região ventral do rumen, armazenado em recipientes plásticos com tampa e colocado em caixas de isopor com gelo. No laboratório, adicionou-se 50 mL da solução de PBS (1% Tween 80, pH 7,4) e agitou-se vigorosamente por 3 minutos. Com auxílio de um

funil e um tecido de malha (100 micras), o material foi filtrado e 45 mL foi acondicionado em um tubo falcon de 50 mL.

Esta solução foi centrifugada a 16000g por 10 minutos na temperatura de 10⁰C, formando um pellet bacteriano. Os pellets bacterianos foram ressuspensos em TE 10:1 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0), centrifugados a 16000g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e os pellets bacterianos congelados a -80⁰C até a extração de DNA. A recuperação foi maior que 95% das células bacterianas presentes no material coletado.

A extração do DNA total das amostras foi realizada com o AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit® (Axygen). A qualidade do DNA extraído foi verificada e uma amostra composta com a alíquota de DNA de todas as amostras foi preparada e diluída a 10 ng/μL para os procedimentos iniciais, e as amostras concentradas congeladas a -20⁰C.

Na realização do ensaio de PCR quantitativo, foram escolhidos nove conjuntos de primers previamente descritos na literatura (Tabela 3). A especificidade dos primers abaixo citados foi analisada, através da ferramenta Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Após a sintetização, amplificação e clonagem em vetor plasmídeo, a especificidade foi confirmada novamente pelo sequenciamento de amplicons obtidos nas reações de PCR realizadas com amostras de DNA do presente estudo.

Na quantificação absoluta do número de cópias de DNA bacteriano foi utilizada reação composta por 6,25μL do reagente 2X Power SYBR Green MasterMix (Applied Biosystems); 1,25μL de cada oligonucleotídeo iniciador específico para cada grupo de bactérias estudado; 12,5 ng de DNA genômico e água ultra-pura para completar o volume de reação de 12,5μL.

Tabela 3. Primers utilizado na reação de qPCR

Bactérias	Sequência (5' 3')	T an ¹	T am ²
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	F: GGTATGGGATGAGCTTGC R: GCCTGCCCTGAACTATC	60	435
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	F: GGACGATAATGACGGTACTT R: GCAATC(CT)GAACTGGGACAAT	62	835
<i>Ruminococcus bovis</i>	F: CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCCG R: CCTCCTTGCGTTAGAACA	55	175
<i>Streptococcus bovis</i>	F: TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG R: ATGATGGCAACTAACAATAGGGGT	59	127
<i>Selenomonas ruminantium</i>	F: GGCGGGAAGGCAAGTCAGTC R: CCTCTCCTGCACTCAAGAAAGACAG	60	83
<i>Megasphaera elsdenii</i>	F: GACCGAAACTGCGATGCTAGA R: CGCCTCAGCGTCAGTTGTC	60	129
<i>Lactobacillus sp.</i>	F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA R: ATTCCACCGCTACACATG	61	345

¹ Temperatura de anelamento (°C). ² Tamanho do amplicon (Pb)

As reações foram realizadas no aparelho Applied Biosystems 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), e submetidas ao protocolo de ciclos descrito a seguir: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, temperatura de anelamento específica por 1 minuto e 78°C por 30 segundos. Após os ciclos de amplificação, foi adicionada uma etapa em temperatura crescente de 60 a 95°C para obtenção da curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade da amplificação.

2.3.1 Quantificação de protozoários

A identificação e a quantificação dos protozoários dos gêneros de ciliados foram realizadas em câmara Sedgewick-Rafter, segundo Dehority (1984). A amostra de conteúdo ruminal (sólida+líquida), previamente conservada em formol 18%, foi homogeneizada e uma alíquota de 1 mL foi transferida para tubos de ensaio, onde foram acrescentadas três gotas de lugol, em substituição ao verde brilhante conforme modificação proposta por D'Agosto e Carneiro (1999). Após 15 minutos, foi adicionado 9 mL de glicerina a 30%. Para proceder à quantificação dos protozoários, de cada tubo de ensaio foi pipetado 1 mL de amostra previamente coradas com lugol e fixadas com glicerina, para preencher a câmara de Sedgewick-Rafter. Utilizando-se uma grade de contagem em uma das oculares, foram quantificados os ciliados presentes em 50 campos e posteriormente, após rotação da câmara em 180°, mais 50 campos foram analisados. O cálculo do número total de ciliados por

mililitro de amostra foi realizado multiplicando-se o número de protozoários ciliados encontrados por 80 e por 20, que correspondem à superfície total da câmara de contagem e à diluição, respectivamente (DEHORITY, 1984).

2.4. Delineamento experimental e análise estatística

Os animais foram distribuídos em duplo quadrado latino 4x4 (quatro tratamentos e quatro períodos), balanceado para efeito residual. Os dados de consumo alimentar, digestibilidade e derivados de purinas foram analisados considerando o delineamento em quadrado latino duplo com efeitos fixos dos tratamentos (3 graus de liberdade (GL)) e de quadrado latino (1 GL), e efeitos aleatórios de período (6 GL), animal (6 GL) e do erro, utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.2).

O modelo estatístico foi apresentado pela equação a seguir:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + TP_{ij} + e_{ij}$$

Onde: Y_{ij} é a variável dependente; μ é a média geral; T_i é o efeito do tratamento, P_j é o efeito do período, TP_{ij} é o efeito da interação entre tratamento i e período j , e e_{ij} é o erro do resíduo (TEMPELMAN, 2004).

Os dados de pH, N-NH₃ e AGCC foram analisados considerando um delineamento em quadrado latino duplo com medidas repetidas no tempo. Com efeito fixo de tratamento (3 GL), tempo (7 GL), interação tratamento x tempo (21 GL), e efeitos aleatórios de período (7 GL), animal (7 GL) e do erro. Foi utilizada a estrutura de erros que melhor ajustou aos dados de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC).

Nas análises de consumo alimentar, digestibilidade, pH, N-NH₃ e AGCC as médias foram comparadas usando a opção CONTRAST do PROC MIXED do SAS e a significância declarada a $P < 0,05$ para os efeitos lineares ou quadráticos.

As análises estatísticas da população de bactérias foram realizadas por meio do software R, em delineamento casualizado em blocos, por meio da análise de variância e teste de T ($p < 0.05$). Fontes de variação: tratamentos (1GL), períodos (blocos com 3 GL), erro (19 GL) para um total de 23 GL. Foi analisada a normalidade dos dados por meio do teste Shapiro-wilk dos resíduos.

Os dados da contagem de protozoários ciliados foram analisados considerando o delineamento em quadrado latino duplo com efeitos fixos dos tratamentos (3 graus de liberdade (GL)) e de quadrado latino (1 GL), e efeitos aleatórios de período (6 GL), animal (6 GL) e do erro, utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.2). Os dados foram transformados para \log_{10} , acrescidos de uma unidade para atender aos requerimentos da análise do SAS para observações diferentes de zero.

3. RESULTADOS

O aumento do concentrado na dieta não afetou o consumo, digestibilidade de matéria seca e matéria orgânica ($P>0,05$, Tabela 4). No entanto, animais alimentados com proporção crescente de concentrado na dieta apresentaram aumento linear do consumo de carboidratos não fibrosos ($P<0,01$) não alterando a digestibilidade deste nutriente. O consumo de proteína bruta foi similar entre todas as dietas, porém a digestibilidade apresentou comportamento quadrático ($P=0,01$), apresentando os menores valores nas relações 60:40 e 40:60 (Tabela 4). Houve redução linear no consumo e digestibilidade de fibra em detergente neutro ($P<0,01$, Tabela 4) quando aumentou a proporção de concentrado nas dietas.

Tabela 4. Consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, em bovinos Nelore alimentados com feno de Tifton 85 e diferentes relações volumoso:concentrado na dieta.

	Dietas ¹				EPM	P-valor	Contrastes	
	70:30	60:40	40:60	20:80			L	Q
<i>Consumo (kg/dia)</i>								
Matéria seca	5,7	6,4	6,4	6,8	0,53	0,46	-	-
Matéria orgânica	5,5	6,1	6,1	6,4	0,51	0,54	-	-
Proteína bruta	0,9	1,0	0,9	1,0	0,08	0,52	-	-
FDNcp	3,6	3,8	2,6	1,8	0,28	<0,01	<0,01	-
CNF	3,0	3,7	5,6	5,8	0,30	<0,01	<0,01	-
<i>Digestibilidade aparente total (%)</i>								
Matéria seca	75,8	74,5	76,1	81,4	2,56	0,16	-	-
Matéria orgânica	80,2	81,7	80,4	82,6	1,69	0,62	-	-
Proteína bruta	81,1	76,4	76,1	86,3	3,09	0,04	-	<0,01
FDNcp	76,6	78,0	68,6	65,4	4,64	0,01	<0,01	-
CNF	96,9	97,5	96,7	95,8	0,49	0,18	-	-

¹Dietas: 70:30= 700 g/kg de volumoso e 300 g/kg de concentrado; 60:40= 600 g/kg de volumoso e 400 g/kg de concentrado; 40:60= 400 g/kg de volumoso e 600 g/kg de concentrado; 20:80= 200 g/kg de volumosos e 800 g/kg de concentrado. EPM= erro padrão da média; L=efeito linear; Q= efeito quadrático; FDNcp = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; CNF = carboidratos não fibrosos.

Não houve interação entre dieta e tempo de coleta para todos os parâmetros ruminiais avaliados (Tabela 5). A concentração de N-NH₃, ácidos graxos de cadeia curta total (acético, butírico, isobutírico, valérico e ácidos isovalérico) e nitrogênio microbiano não diferiram entre as dietas testadas. No entanto, com o aumento da proporção do concentrado na dieta, o pH ruminal apresentou uma redução linear e a concentração de ácido propiônico aumentou, resultando em menor relação C2:C3.

Tabela 5. Médias de pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), iso-ácidos e síntese de proteína microbiana no rumen, em novilhos Nelore alimentados com feno de Tifton 85 e diferentes relações volumoso:concentrado na dieta.

	Dietas ¹				EPM	P-valor		Contraste ²	
	70:30	60:40	40:60	20:80		Dieta	Tempo	Dieta	Tempo
N-NH ₃ , mg/dL	25,24	28,86	24,16	23,00	2,81	0,45	<0,01	-	Q(<0,01)
pH	6,65	6,66	6,41	6,22	0,11	<0,01	<0,01	L(<0,01)	Q(0,01)
<i>Ácido graxo de cadeia curta (AGCC) (mM/L)</i>									
Total AGCC	84,35	89,92	96,31	94,34	7,02	0,63	0,03	-	-
Acetato (C2)	56,54	60,57	62,04	56,15	4,60	0,74	0,14	-	-
Propiônico(C3)	15,40	15,67	18,85	22,06	1,98	0,04	<0,01	L(<0,01)	-
Butírico (C4)	8,34	9,29	10,52	11,30	1,18	0,30	<0,01	L(0,05)	L(0,02)
Valérico	0,94	1,14	1,16	1,40	0,20	0,40	0,53	-	-
Isobutírico	1,17	1,22	1,24	1,20	0,14	0,98	0,03	-	-
Isovalérico	1,94	2,01	2,54	2,20	0,23	0,29	<0,01	-	Q(0,02)
C2:C3	3,75	3,83	3,52	2,87	0,26	0,02	<0,01	L(<0,01)	L(<0,01)
<i>N microbiano</i>									
g/dia	37,20	41,50	59,90	35,30	11,20	0,35	-	-	-
g de N micr/kg de MODR ³	9,30	8,90	13,70	8,80	2,90	0,25	-	-	-

¹Dietas: 70:30= 700 g/kg de volumoso e 300 g/kg de concentrado; 60:40= 600 g/kg de volumoso e 400 g/kg de concentrado; 40:60= 400 g/kg de volumoso e 600 g/kg de concentrado; 20:80= 200 g/kg de volumosos e 800 g/kg de concentrado. EPM = erro padrão da média; ²Contraste: L = linear, Q = quadrático; quando o P-valor não é significativo (P>0,05) os valores dos contrastes não são apresentados; ³g de N microbiano /kg de matéria orgânica degradada no rumen.

Os parâmetros ruminiais variaram em função do tempo, exceto as concentrações de ácidos acético e valérico. Animais alimentados com maior proporção de concentrados na dieta (20:80) alcançaram valores de pH abaixo de 6 somente 14 horas após a alimentação (Figura 1).

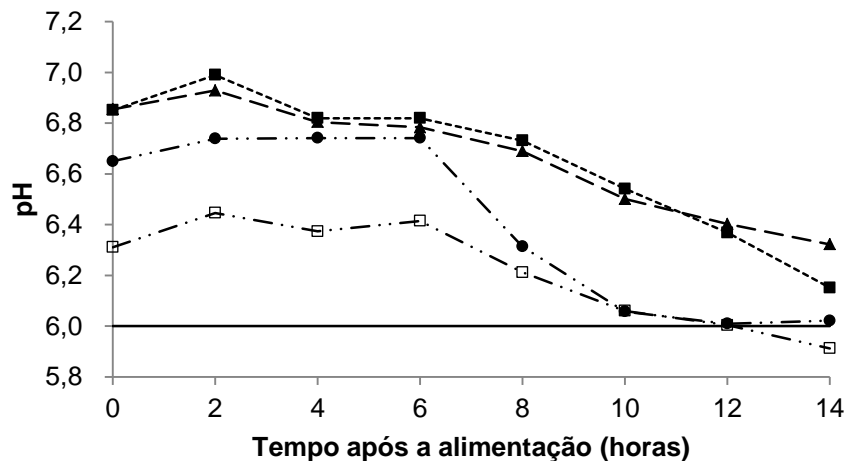


Figura 1. pH ruminal de novilhos alimentados com as dietas: 70:30= 700g/kg de volumoso e 300g/kg de concentrado (■); 60:40= 600g/kg de volumoso e 400g/kg de concentrado (▲); 40:60= 400g/kg de volumoso e 600g/kg de concentrado (●); 20:80= 200g/kg de volumosos e 800g/kg de concentrado (□); ponto crítico do pH (—) segundo Russel e Dombrowski (1980). Erro padrão da média (EPM = 0,036); Interação tratamento x tempo ($P < 0,05$).

A população de bactérias fibrolíticas foram influenciadas ($P < 0,05$) pelo aumento da proporção do concentrado na dieta. O número de cópias das espécies *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* foram menores ($P < 0,01$) nas dietas com maior proporção de concentrado (20:80). As espécies caracterizadas pelo consumo de ácido láctico *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii* e as espécies caracterizadas pela fermentação de carboidratos não-fibrosos *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus bovis* aumentaram quando os animais receberam dietas com maior proporção de concentrado ($P < 0,01$; Tabela 6).

Tabela 6. Número de cópias de diferentes espécies bacterianas no rumen de bovinos Nelore alimentados com feno de Tifton 85 e diferentes relações volumoso:concentrado na dieta

	Dietas ¹		EPM	P-valor
	70:30	20:80		
Bactérias, Log ₁₀ ²				
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	11,48	9,06	0,07	<0,01
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	11,74	8,44	0,08	<0,01
<i>Ruminococcus albus</i>	11,52	8,78	0,12	<0,01
<i>Selenomonas ruminantium</i>	4,40	6,33	0,10	<0,01
<i>Streptococcus bovis</i>	3,47	5,64	0,20	<0,01
<i>Megasphaera elsdenii</i>	4,27	6,16	0,12	<0,01
<i>Lactobacillus</i> sp.	4,12	6,78	0,13	<0,01

¹Dietas: 70:30= 700 g/kg de volumoso e 300 g/kg de concentrado; 20:80= 200 g/kg de volumosos e 800 g/kg de concentrado. EPM= erro padrão da média. ²Log₁₀ do número de cópias do gene 16S rDNA em 25 ng de DNA genômico.

Na população total de protozoários, o gênero predominante foi o *Entodinium*. O gênero *Dasytricha* foi o único influenciado pelas dietas testadas ($P=0,02$). Com o aumento do concentrado, o número de protozoários do gênero *Dasytricha* diminuiu, sendo maior na relação 70:30 (Tabela 7).

Tabela 7. Quantificação de protozoários ciliados no rumen em bovinos Nelore alimentados com feno de Tifton 85 e diferentes relações volumoso:concentrado na dieta.

Protozoários ($n \times 10^{-4}$) ¹	Dietas ²				EPM	P-valor
	70:30	60:40	40:60	20:80		
Protozoários Total	17,06	14,62	15,46	14,2	0,32	0,21
<i>Entodinium</i>	6,78	6,79	7,00	6,95	0,27	0,83
<i>Eudiplodinium</i>	1,87	1,46	2,96	1,91	0,61	0,33
<i>Metadinium</i>	1,89	1,95	1,00	1,00	0,48	0,09
<i>Eremoplastron</i>	2,10	1,51	2,50	1,43	0,94	0,10
<i>Dasytricha</i>	2,99 ^a	1,00 ^b	1,00 ^b	1,00 ^b	0,38	<0,01
<i>Isotricha</i>	1,43	1,91	1,00	1,91	0,52	0,47

¹Log₁₀ do número de protozoários ($n \times 10^{-4}$); P-valor= níveis descritivos de probabilidade. Médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha diferem entre si pelo teste Tukey ($P<0,05$). ²Dietas: 70:30= 700g/kg de volumoso e 300g/kg de concentrado; 60:40= 600g/kg de volumoso e 400g/kg de concentrado; 40:60= 400g/kg de volumoso e 600g/kg de concentrado; 20:80= 200g/kg de volumosos e 800g/kg de concentrado.

4. Discussão

Neste estudo, avaliou-se o efeito de dietas com quatro diferentes relações volumoso (feno de Tifton 85):concentrado sobre consumo, digestibilidade, fermentação e microbiota ruminal de novilhos Nelore em confinamento. Observou-se que o aumento da proporção de concentrado na dieta modificou a população bacteriana ruminal, embora o pH não tenha sido mantido abaixo de 6,0 por um longo período.

De acordo com Allen (2000) e Kozloski et al. (2007) a ingestão de nutrientes pode ser reduzida com o aumento da relação volumoso:concentrado na dieta devido a associação negativa entre FDN da forragem e a densidade energética da dieta. Por outro lado, o preenchimento físico raramente limita a ingestão de animais alimentados com altas proporções de concentrado na dieta, logo que o volumoso dilui estas dietas fazendo com que o animal aumente a ingestão com o intuito de satisfazer as suas necessidades energéticas (GALYEAN; DEFOOR, 2003). No entanto, os resultados do presente estudo não demonstraram efeito do aumento da proporção de concentrado na dieta sobre o consumo de matéria seca e orgânica.

Esses resultados estão de acordo com pesquisas anteriores, realizadas com outras raças bovinas (HRISTOV et al., 2005, AGUERRE et al., 2011). Embora, a ingestão voluntária possa ser limitada pela distensão ruminal quando a máxima capacidade de ingestão de FDN é atingida (MERTENS, 1993), a falta de diferenças observadas no consumo pode ser explicado pelo fato de que as dietas com maior proporção de volumoso (70:30 e 60:40) não apresentaram efeito de enchimento. Também é possível inferir que o aumento observado na concentração de AGCC não foi suficiente para ativar o centro de saciedade do hipotálamo (ALLEN, 2000).

O aumento da proporção de concentrado na dieta de ruminante tem sido geralmente associado com maior digestibilidade da MS e MO, porém, a digestibilidade da fibra pode ser reduzida, principalmente quando os animais são alimentados com concentrados à base de grãos (ARCHIMEDE et al., 1997). Desta forma, embora as proporções crescentes de concentrado na dieta não tenham efeito na digestibilidade da matéria orgânica, a digestibilidade da fibra foi reduzida, como relatado por outros autores (MOORBY et al., 2006). Ao aumentar a proporção de concentrado na dieta, o pH ruminal foi reduzido, provavelmente devido a uma menor ingestão de FDN, devido os grãos serem geralmente mais digestíveis do que as forragens, acarretando, portanto, em acúmulo de AGCC ruminal (LECHARTIER; PEYRAUD, 2010). A diminuição do pH ruminal resultou na redução da população de bactérias fibrolíticas entre as quais *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*, as quais são conhecidas como mais importantes na degradação da fibra (KOBAYASHI et al., 2008). Assim, a digestão da fibra pode ter sido reduzida, devido à redução do pH ruminal que ocorreu pela maior fermentação dos CNF (CERRATO - SÁNCHEZ et al., 2007).

Embora tenha ocorrido a redução do pH, este manteve-se em uma faixa fisiológica normal ($\text{pH} > 6,0$) por longo período (12 h), mesmo em dietas com maior proporção de concentrado (20:80, correspondendo a ingestão de 277g FDN/kg MS), possivelmente isso se deve à composição química do feno de Tifton 85. A concentração dietética da FDN é correlacionada com o tamanho de partícula da dieta e com o tempo de mastigação (MEISSNER; PAULSMEIER, 1995; GALYEAN; DEFOOR, 2003; ELLIS et al., 2005), os quais afetam a capacidade de tamponamento ruminal (ALLEN; MERTENS, 1988; ZEBELI et al., 2012). Estes

resultados apontam que o feno de Tifton 85 utilizado como fonte de fibra promoveu tamponamento ruminal, assim podendo minimizar riscos de distúrbios metabólicos ruminais em novilhos alimentados com dietas ricas em concentrado.

A concentração de AGCC é afetada principalmente pela composição da dieta. O aumento da proporção de concentrado na dieta é uma estratégia utilizada na otimização da fermentação ruminal, devido ao aumento da produção de ácido propiônico (DOREAU et al., 2011). Neste estudo, houve um aumento na produção de ácido propiônico e, conseqüentemente, a relação ácido acético: propiônico foi reduzida, corroborando com resultados anteriores (BAUMAN et al., 1971; SUTTON et al., 2003). A maior concentração de ácido propiônico no rumen pode ser explicada pelo maior consumo de CNF e também pelo aumento na população de *Selenomonas ruminantium*, importante espécie produtora de ácido propiônico através da descarboxilação do succinato (WOLIN; MILLER, 1997) e que utilizam amido e açúcares no seu crescimento.

A concentração de N-NH₃ no rumen depende do balanço entre produção, absorção e incorporação de aminoácidos e nitrogênio na proteína microbiana (RUSSELL et al., 1983). Observou-se que a concentração de N-NH₃ manteve-se acima de 5 mg/dL em todas as dietas testadas, sendo esta uma concentração mínima sugerida para que não se tenha efeito sobre a produção de proteína microbiana (SATTER; ROFFLER, 1975). Corroborando com os resultados, observou-se que a síntese de proteína microbiana e sua eficiência não diferiram entre as dietas. Segundo Agle et al. (2010), a energia da dieta é o principal fator determinante na produção e eficiência de síntese de proteína microbiana no rumen, no entanto no presente estudo todas as dietas foram isoenergéticas, não alterando a síntese de proteína microbiana ruminal.

Animais alimentados com dietas de alto grão espera-se mudanças substanciais no ambiente ruminal e nas populações de microrganismos (GOAD et al., 1998; TAJIMA et al., 2000). Os resultados demonstraram que a população de bactérias fibrolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus*) diminuíram com o aumento da proporção de concentrado na dieta, possivelmente devido ao menor valor de pH ruminal nestes animais (KHAFIPOUR et al., 2009; MAO SY et al., 2013). Os resultados também são

consistentes com estudos anteriores (TAJIMA et al., 2001; KLIEVE et al., 2003) que relatam que a proliferação de bactérias fermentadoras de carboidratos fibrosos está diretamente correlacionada com a quantidade de fibra da dieta, e que a substituição da fibra por carboidratos rapidamente fermentáveis podem afetar a dinâmica do ecossistema ruminal.

Em animais alimentados com dietas com maiores proporções de concentrado observou-se o aumento dos grupo de bactérias consumidoras (*Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*) e produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus* sp, e *Streptococcus bovis*), provavelmente devido ao aumento do substrato fermentável presente na dieta que favoreceu o crescimento das bactérias amilolíticas (FERNANDO et al., 2010).

Normalmente o aumento da adição de concentrado na dieta eleva a concentração total de protozoários no ambiente ruminal (FRANZOLIN; DEHORITY, 1996; BROSSARD et al., 2003), porém, elevados teores de concentrado na dieta podem reduzir ou até mesmo defaunar o rumen devido a redução acentuada do pH ruminal (< 5,6) (HRISTOV et al., 2001; DEHORITY, 2005). No entanto, neste estudo a população total de protozoários permaneceu constante, devido ao fato do pH ruminal manter-se acima de 5,8. A composição de protozoários no rumen permaneceu quase inalterada, com exceção do gênero *Dasytricha*. Já o gênero *Entodinium* foi responsável por manter a população de protozoários estável, uma vez que representou acima de 30% a de protozoários no rumen em todas as dietas testadas. As dietas com uma proporção mais elevada de volumoso (70:30) beneficiaram da população de *Dasytricha*, possivelmente devido à sua capacidade para utilizar celulose (HUNGATE, 1996).

Em resumo, este estudo sugere que, em dietas à base de feno de Tifton 85, o aumento na proporção de concentrado não afeta o consumo e a digestibilidade da matéria seca e orgânica. Esta fonte de volumoso possibilitou a manutenção do pH ruminal em valores acima de 6,0 por até 12 horas após a alimentação. Estes resultados sugerem que o feno de Tifton 85 é uma fonte adequada de fibra que pode minimizar o risco de distúrbios ruminais em novilhos Nelore confinados.

5. CONCLUSÃO

Dietas com maior proporção de concentrado com feno de Tifton 85, como fonte de volumoso, inibem o crescimento de algumas espécies de bactérias celulolíticas e reduzem a digestibilidade da fibra, sem prejudicar o consumo e a digestibilidade da matéria seca e orgânica. Os resultados também indicam que o feno de Tifton 85 é uma possível fonte de fibra com potencial de minimizar o risco de distúrbios ruminais em novilhos Nelore confinados.

6. REFERÊNCIAS

- AGLE, M.; HRISTOV, A. N.; ZAMAN, S.; SCHNEIDER, C.; NDEGWA, P. M.; VADDELLA, V. K. Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 93, n. 9, p. 4211 - 4222, 2010.
- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC. **Energy and protein requirements of ruminants**. Oxon: CAB International, 1993, p. 159.
- AGUERRE, M. J.; WATTIAUX, M. A.; POWELL, J. M.; BRODERICK, G. A.; ARNDT, C. Effect of forage-to-concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion. **Journal Dairy Science**, New York, v. 94, n. 6, p. 3081 - 3093, 2011.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal Dairy Science**, New York, v. 83, n. 7, p. 1598 - 1612, 2000.
- ALLEN, M. S.; MERTENS, D.R. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 118, n. 2, p. 261 - 270, 1988.
- ARCHIMÈDE, H.; SAUVANT, D.; SCHMIDELY, P. Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. **Reproduction Nutrition Development**, Cambridge, v. 37, n. 2, p. 173 - 189, 1997.
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official Methods of Analysis**. 15. ed. Washington: 1990.
- BAUMAN, D. E.; DAVIS, C. L.; BUCHOLTZ, H. F. Propionate production in the rumen of cows fed either a control or high grain, low-fiber diet. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 54, p. 1282 - 1287, 1971.
- BLANCH, M.; CALSAMIGLIA, S.; DiLORENZO, N.; DiCONSTANZO, A.; MUETZEL, S.; WALLACE, R. C. Physiological change in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 87, p. 1722 - 1730, 2009.

BROSSARD, L.; MARTIN, C.; MICHALET-DOREAU, B. Ruminal fermentative parameters and blood acid-basic balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. **Animal Research**, Cambridge, v. 52, n. 6, p. 513 - 530, 2003.

CERRATO-SÁNCHEZ, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effects of time at suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. **Journal Dairy Science**, New York, v. 90, n. 3, p. 1486 - 1492, 2007.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of technical details. Aberdeen: **Rowett Research Institute/International Feed Research Unit**, 1992, p. 21.

D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M. E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 16, n. 3, p. 725 - 729, 1999.

DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 182 - 185, 1984.

DEHORITY, B.A. Effect of pH on viability of *Entodinium caudatum*, *Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum*, and *Ophryoscolex purkynjei* in vitro. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Hoboken, v. 52, n. 4, p. 339 - 342, 2005.

DOREAU, M.; VAN DER WERF, H. M. G.; MICOL, D.; DUBROEUCQ, H.; AGABRIEL, J.; ROCHETTE, Y.; MARTIN, C. Enteric methane production and greenhouse gases balance of diets differing in concentrate in the fattening phase of a beef production system. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 89, n. 8, p. 2518 - 2528, 2011.

ELLIS, W. C.; MAHLOOJI, M.; LASCANO, C. E.; MATIS, J. H. Effects of size of ingestively masticated fragments of plant tissues on kinetics of digestion of NDF. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.83, n. 7, p. 1602 - 1615, 2005.

FENNER, H. Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 48, n. 2, p. 249 - 251, 1965.

FERNANDO, S. C.; PURVIS II, H. T.; NAJAR, F. Z.; SUKHARNIKOV, L. O.; KREHBIEL, C. R.; NAGARAJA, T. G.; ROE, .A.; DeSILVA, U. Rumen microbial populations dynamics during adaptation to high-grain diet. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 22, p. 7482 - 7490, 2010.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B. A. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 74, n.11, p. 2803 - 2809, 1996.

FUJIHARA, T.; ØRSKOV, E. R.; REEDSA, P. J.; KYLEA, D. J. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by

intra-gastric nutrition. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v. 109, n. 1, p. 7 - 12, 1987.

GALYEAN, M. L.; DEFOOR, P. J. Effects of roughage source and level on intake by feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 81, n. 14, p. 8 - 16, 2003.

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

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analysis: apparatus reagents, procedures and some applications**. Agricultural Handbook, Washington, p. 379, 1970.

HILL, G. M.; GATES, R. N.; BURTON, G. W. Forage quality and grazing steer performance from Tifton 85 and Tifton 78 bermudagrass pastures. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 71, n. 12, p. 3219 - 3225, 1993.

HRISTOV, A. N.; IVAN, M.; RODE, L. M.; MCALLISTER T. A. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 79, n. 2, p. 515 - 524, 2001.

HRISTOV, A. N.; ROPP, J. K.; GRANDEEN, K. L.; ABEDI, S.; ETTER, R. P.; MELGAR, A.; FOLEY, A. E. Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, New York, v. 83, n. 2, p. 408 - 421, 2005.

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

KHAFIPOUR, E.; LI, S.; PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O.; Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 22, p. 7115 - 7124, 2009.

KLIEVE, A. V.; HENNESSY, D.; OUWERKERK, D.; FORSTER, R. J.; MACKIE, R. I.; ATTWOOD, G. T. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 3, p. 621 - 630, 2003.

KOBAYASHI, Y.; SHINKAI, T.; KOIKE, S. Ecological and physiological shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion-review. **Folia Microbiology**, Dordrecht, v. 53, n. 3, p. 195 - 200, 2008.

KOZLOSKI, G. V.; REFFATTI, M. V.; BONNECARRÈRE SANCHEZ, L. M.; LIMA, L. D.; CADORIN JR., R. L.; HÄRTER, C. J.; FIORENTINI, G. Intake and digestion by lambs fed a low-quality grass hay supplemented or not with urea, casein or cassava meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 136, n. 3 - 4, p. 191 - 202, 2007.

LECHARTIER, C.; PEYRAUD, J. L. The effects of forage proportion and rapidly degradable dry matter from concentrate on ruminal digestion in dairy cows fed corn silage-based diets with fixed neutral detergent fiber and starch contents. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 93, n. 2, p. 666 - 681, 2010.

MAO, S. Y.; ZHANG, R. Y.; WANG, D. S.; ZHU, W. Y. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. **Anaerobe**, London, v. 24, p. 2 - 19, 2013.

MEISSNER, H. H.; PAULSMEIER, D. V. Plant compositional constituents affecting between-plant and animals species prediction of forage intake. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 73, n. 8, p. 2447 - 2457, 1995.

MERTENS, D.R. Rate and extent of digestion. In: FORBES, J. M., FRANCE, J. (Eds.) **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. Cambridge, England: Commonwealth Agricultural Bureaux, Cambridge University Press, 1993, p.13 - 51.

MOORBY, J. M.; DEWHURST, R. J.; EVANS, R. T.; DANELÓN, J. L. Effects of dairy cow diet forage proportion on duodenal nutrient supply and urinary purine derivative excretion. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 89, n. 9, p. 3552 - 3562, 2006.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 2. Chewing activities. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 83, n. 6, p. 1342 - 1349, 2000.

PALMIQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high fat diets. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 74, n. 7, p. 1025 - 1033, 1971.

PETRI, R. M.; FORSTER, R. J.; YANG, W.; MCKINNON, J. J.; MCALLISTER, T.A. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 112, n. 6, p. 1152 - 1162, 2012.

PINA, D. S.; VALADARES FILHO, S. C.; TEDESCHI, L. O.; BARBOSA, A. M.; VALADARES, R.F.D. Influence of different levels of concentrate and ruminally undegraded protein on the digestive parameters in beef heifers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 87, n. 3, p. 1058 - 1067, 2009.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. In: Ithaca: Cornell University, Ithaca, NY. 2002.

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

RUSSELL, J. B.; SNIFFEN, C. J.; VAN SOEST, P. J. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 66, n. 4, p. 763 - 775, 1983.

SATTER, L. D.; ROFFLER, R. E. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 58, n. 8, p. 1219 - 1237, 1975.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J.; FOX, D. J.; RUSSELL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 70, n. 11, p. 3562 - 3577, 1992.

SUTTON, J. D.; DHANOA, M. S.; MORANT, S. V.; FRANCE, J.; NAPPER, D. J.; SCHULLER, E. Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 86, n. 11, p. 3620 - 3633, 2003.

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 86, n. 11, p. 2766 - 2774, 2001.

TAJIMA, K.; ARAI, S.; OGATA, K.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; AMINOV, R. I.; BENNO, Y. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. **Anaerobe**, London, v. 6, n. 5, p. 273 - 284, 2000.

TAYLOR, C. C.; ALLEN, M. S. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: Site of digestion and ruminal digestion kinetics in lactating cows. **Journal Dairy Science**, New York, v. 88, n. 4, p. 1413 - 1424, 2005.

TEMPELMAN, R. J. Experimental design and statistical methods for classical and bioequivalence hypothesis testing with an application to dairy nutrition studies. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 82, n. 13, p. 162 - 172, 2004.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. **Analysis of Forages and Fibrous Foods**. New York: Cornell University Press, 1985. p. 202.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 74, n. 10, p. 3583 - 3597, 1991.

WOLIN, M. J.; MILLER, T. L. **Microbe-microbe interactions**. In: HOBSON, P.N. STEWART, C.S. (Ed). The rumen microbial ecosystem. New York: Chapman e Hall, 1997.

YANG, W. Z., BEAUCHEMIN, K. A. Physically effective fiber: method of determination and effects on chewing, ruminal acidosis, and digestion by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 89, n. 6, p. 2618 - 2633, 2006.

ZEBELI, Q.; ASCHENBACH, J. R.; TAJAJ, M.; BOGUHN, J.; AMETAJ, B. N.; DROCHNER, W. Invited review: role of physically effective fiber an estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 95, n. 3, p. 1041 - 1056, 2012.

ZEBELI, Q.; MANSMANN, D.; STEINGASS, H.; AMETAJ, B. N. Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: A key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 1 - 10, 2010.

ZEBELI, Q.; TAJAJ, M.; STEINGASS, H.; METZLER, B.; DROCHNER, W. Effects of physically effective fiber on digestive processes and milk fat content in early lactating dairy cows fed total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 89, n. 2, p. 651 - 668, 2006.

ZHU, W.; FU, Y.; WANG, B.; WANG, C.; YE J. A.; WU, Y. M.; LIU, J. X. Effects of dietary forage sources on rumen microbial protein synthesis and milk performance in early lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 96, n. 3, p. 1727 - 1734, 2013.