

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**QUANTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS RUMINAIS,
PARÂMETROS RUMINAIS E DIGESTIBILIDADE DAS DIETAS
DE NOVILHOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES
RELAÇÕES DE VOLUMOSO: CONCENTRADO NA DIETA**

Yury Tatiana Granja Salcedo

Medica Veterinária e Zootecnista

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**QUANTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS RUMINAIS,
PARÂMETROS RUMINAIS E DIGESTIBILIDADE DAS DIETAS
DE NOVILHOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES
RELAÇÕES DE VOLUMOSO: CONCENTRADO NA DIETA**

Yury Tatiana Granja Salcedo

Orientadora: Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli

Co-orientadora: Dra. Roberta Carrilho Canesin

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

Granja Salcedo, Yury Tatiana
G759q Quantificação molecular de bactérias ruminais, parâmetros ruminais e digestibilidade das dietas de novilhos alimentados com diferentes relações de volumoso: concentrado na dieta / Yury Tatiana Granja Salcedo. – – Jaboticabal, 2013
x, 45 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Telma Teresinha Berchielli
Banca examinadora: Juliana Duarte Messana, Carla Maris Machado Bittar
Bibliografia

1. Bactérias celulolíticas 2. *Selenomonas ruminantium*. 3. PCR em tempo real. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.087

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: yurygranja@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: QUANTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS RUMINAIS, PARÂMETROS RUMINAIS E DIGESTIBILIDADE DAS DIETAS DE NOVILHOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES RELAÇÕES DE VOLUMOSO: CONCENTRADO NA DIETA

AUTORA: YURY TATIANA GRANJA SALCEDO

ORIENTADORA: Profa. Dra. TELMA TERESINHA BERCHIELLI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ROBERTA CARRILHO CANESIN

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

Profa. Dra. TELMA TERESINHA BERCHIELLI

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. JULIANA DUARTE MESSANA

Pós-Doutoranda / Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. CARLA MARIS MACHADO BITTAR

Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Data da realização: 25 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

YURY TATIANA GRANJA SALCEDO – nascida na cidade de San Vicente Del Caguán – Colômbia, no dia 01 de Janeiro de 1990, filha de Vicente Granja Diaz e Carmenza Salcedo Vidal. Em fevereiro de 2006 ingressou no curso de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidad de La Amazonia – Florencia, graduando-se em dezembro de 2010. Em março de 2011, ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, na área de Nutrição e alimentação animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – Câmpus de Jaboticabal, sob a orientação do Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli.

DEDICO

À Deus.

À minha família, principalmente minha mãe, pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À Deus pela vida e saúde.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Jaboticabal, ao programa de Pós-graduação e ao Departamento de Zootecnia.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq pelo financiamento do experimento.

À minha orientadora Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli pela confiança, oportunidade oferecida, orientação, ensinamentos e paciência.

À minha co-orientadora Dra. Roberta Carrilho Canesin pela dedicação, orientação, ensinamentos, paciência, e amizade em todos os momentos.

Às doutoras Izabelle A.M.A e Marcia Helena Machado da Rocha Fernandes pelas valiosas contribuições na qualificação.

À meu amigo Carlos Stefenson Ribeiro Junior que muito se dedicou à execução deste trabalho, pela paciência, ensinamentos e amizade.

À minha amiga Astrid Rivera Rivera pela colaboração, ensinamento, conselhos e amizade.

À meu amigo Raphael Barbeta pela colaboração, ensinamentos e amizade.

À minha amiga Isabela Pena Carvalho de Carvalho pela colaboração e amizade.

À meu amigo Luis Gabriel Gonzales pelo incentivo, confiança e ajuda.

Aos amigos Mirela, Hellen, Lutti, Giovani, Josiane, Zeca, Nizio pela ajuda e convivência nos meses de experimento.

Aos funcionários do laboratório, Ana Paula e Sr. Orlando pela ajuda proporcionada.

À minhas amigas Colombianas e irmãs de coração Diana, Edna e Astrid, pela grande amizade e apoio e por me guiar e fazer mais leve minha estadia longe de nossas amadas famílias.

Aos meus amigos Colombianos Luisga, Orlando, Ricardo, Luga, Andrés, Helena e Julian pela amizade e companhia nesta etapa da minha vida.

As minhas amigas Chris (Michelle), Franciely (Pamela), Mayra (Titanic) e Monique (Priscila) pela amizade e apoio e por fazer meu dia a dia mais divertido.

Aos meus amigos Carlos Renato e Taly pela amizade e apoio.

Ao meus amigos na Colômbia Alvaro, Jeffer, Marcela, Daniela, Natalia, Soley, Marlion, Camilo, Caliche, Edna, Maryi, Cristina e Lizeth pelo apoio e amizade.

À minha adorada mãe pelo amor incondicional, apoio, paciência e por acreditar sempre em meu potencial.

À minha família pelo amor e apoio, principalmente ao meu pai e meu irmão Gerson, por despertar em mim ao campo e à bovinocultura.

Aos meus sobrinhos Amelie Samara, Joseph e Thiago por serem fonte de inspiração para minha vida.

À meu irmão Anderson pela companhia incondicional, mesmo na distância.

À meu irmão Haider pelo apoio e por cuidar de meus pais durante o tempo que eu estarei longe deles.

À todos meus amigos e todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMARIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
CAPITULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	
Introdução.....	6
Relação volumoso: concentrado.....	7
Utilização de qPCR para estudo dos microrganismos ruminais.....	12
Objetivos.....	15
Referências.....	16
CAPITULO 2 – MICRORGANISMOS RUMINAS E PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO EM FUNÇÃO DA RELAÇÃO VOLUMOSO:CONCENTRADO DA DIETA EM NOVILHOS NELORE	
Resumo.....	25
Introdução.....	26
Material e métodos.....	27
Resultados	34
Discussão.....	41
Conclusão.....	45
Referências	46

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

	Página
Tabela 1. Composição bromatológica dos ingredientes dietéticos utilizados nas rações experimentais com base na matéria seca.....	28
Tabela 2. Porcentagem dos ingredientes e composição químico-bromatológica das dietas experimentais em função das relações V:C	29
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores usados neste estudo para quantificação de bactérias ruminais.....	33
Tabela 4. Consumo de nutrientes (kg/dia) e consumo de MS, PB e FDNcp em g/kg de peso, digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, erro padrão da média (EPM) e níveis descritivos de probabilidade (p-valor), em bovinos Nelore, em função da relação V:C na dieta.....	35
Tabela 5. Médias de pH, nitrogênio amoniacal (N-NH ₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no rúmen, síntese de proteína microbiana (P _{mic}) e eficiência de síntese de P _{mic} , erro padrão da média (EPM) e níveis descritivos de probabilidade (p-valor), em novilhos Nelores alimentados com diferentes relações V:C na dieta.....	36
Tabela 6. Proporção relativa (%) de bactérias ruminais em função das bactérias totais obtidas por PCR em tempo real, níveis descritivos de probabilidade (p-valor) em novilhos Nelore alimentados com diferentes relações V:C na dieta.....	39
Tabela 7. Quantificação dos protozoários ciliados no rúmen e níveis descritivos de probabilidade (p-valor), em novilhos Nelore alimentados com diferentes V:C na dieta.....	40

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

	Página
Figura 1. pH do fluido ruminal de novilhos em relação de tempo após a alimentação com diferentes relações V:C na dieta.....	37
Figura 2. Concentrações de N-NH ₃ do fluido ruminal de novilhos em relação de tempo após a alimentação com diferentes relações V:C na dieta.....	38
Figura 3. Concentrações de AGGC totais no fluido ruminal de novilhos em relação de tempo após a alimentação com diferentes relações V:C na dieta.....	39

QUANTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS RUMINAIS, PARÂMETROS RUMINAIS E DIGESTIBILIDADE DAS DIETAS DE NOVILHOS ALIMENTADOS COM DIFERENTES RELAÇÕES DE VOLUMOSO: CONCENTRADO NA DIETA

RESUMO – Este experimento teve como objetivo caracterizar o efeito de quatro relações V:C sobre a microbiologia do rúmen, os parâmetros de fermentação ruminal, consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes em novilhos Nelore. Foram utilizados oito novilhos Nelore (280±8 kg PV), canulados no rúmen, distribuídos em um duplo quadrado latino 4x4 balanceados para o controle do efeito residual. O experimento foi dividido em 4 períodos de 21 dias cada. A diminuição da relação V:C 70:30 para 20:80 reduziu ($P<0,05$) a proporção relativa de *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens* no ambiente ruminal, mas não comprometeu a população de *Fibrobacter succinogenes* ($P<0,05$) e aumentou a proporção de *Selenomonas ruminantium* ($P<0,05$), e de *Streptococcus bovis* ($P<0,10$). A população total de protozoários foi semelhante (206.33 x10⁴/mL) em todas as relações V:C ($P>0,05$), em que o gênero *Entodinium* foi mais representativo (99,28%). Relações com até 60% de inclusão de concentrado não influenciaram o pH médio do rúmen (6,28) ($P>0,05$). A concentração ruminal total de AGCC, assim como a relação acetato: propionato não foram influenciados pelas relações V:C ($P>0,05$), mas na relação V20:C80 observou-se maior concentração de ácido propiônico ($P>0,05$). O consumo de FDNcp diminuiu com o aumento de concentrado e diminuição de volumoso nas dietas ($P<0,05$) e a relação 20:80 permitiu maior consumo de NDT ($P<0,05$). A digestibilidade da MS, MO e PB foi menor na relação 70:30 ($P<0,05$). Dietas com maior proporção de concentrado, geram um pHruminal baixo, e inibem o crescimento das bactérias celulolíticas *R. Albus* e *R. Flavefaciens*, aumentam a concentração de ácido propiônico e a proporção de *S. Ruminantium* no rúmen.

Palavras-Chave: bactérias celulolíticas, *Selenomonas ruminantium*, PCR em tempo real, pH, proteína microbiana.

**MEASUREMENT OF MOLECULAR RUMINAL BACTERIA, AND PARAMETERS
RUMINAL DIGESTIBILITY OF DIETS OF STEERS FED WITH DIFFERENT
RELATIONSHIPS FORAGE: CONCENTRATE ON DIET**

ABSTRACT - This experiment aimed to characterize the effect of four forage:concentrate (F:C) ratios on the microbiology of the rumen, ruminal fermentation parameters, consumption and nutrient digestibility in Nellore steers. Eight Nellore steers (280 ± 8 kg BW), cannulated in the rumen, were distributed in a double 4x4 Latin Square balanced for control of residual effect. The experiment was divided into 4 periods of 21 days each. The decrease of the ratio F:C 70:30 to 20:80 decreased ($P < 0.05$) the relative proportion of *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* in the rumen, but did not affect population of *Fibrobacter succinogenes* ($P < 0.05$) and increased the proportion of *Selenomonas ruminantium* ($P < 0.05$), and *Streptococcus bovis* ($P < 0.10$). The total protozoa population were similar ($206.33 \times 10^4/\text{mL}$) in all ratios F:C ($P > 0.05$), with the most representative genus being *Entodinium* (99.28%). With up to 60% of concentrate did not influence the average rumen pH (6.28) ($P > 0.05$). The total rumen SCFA concentration, and the acetate: propionate ratio were not influenced by the ratio F:C ($P > 0.05$), however the F20: C80 ratio resulted in higher concentration of propionic acid ($P > 0.05$). NDFap consumption decreased with decreasing F:C ratio ($P < 0.05$) and the ratio 20:80 allowed dietary TDN intake ($P < 0.05$). The digestibility of DM, OM and CP was lower in the 70:30 ($P < 0.05$). Diets with more concentrate, generate a low ruminal pH and inhibit the growth of cellulolytic bacteria *R. Albus* and *R. Flavefaciens*, increases the propionic acid concentration and the proportion of *S. Ruminantium* in the rumen.

Keywords: cellulolytic bacteria, *Selenomonas ruminantium*, real-time PCR, pH, microbial protein.

CAPITULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A pecuária é uma destacada atividade no setor econômico brasileiro com potencial para a geração de empregos, renda e alimento nobre para a população. No cenário mundial, o Brasil se destaca como o maior possuidor do rebanho comercial de bovinos com cerca de 212,8 milhões de cabeças (IBGE, 2011). A pecuária de corte intensiva pode contribuir de maneira significativa na promoção do desenvolvimento do setor de produção de carne bovina no país, uma vez que favorece a utilização racional dos fatores de produção, do potencial e da diversidade genética animal e vegetal (ALENCAR; POTT, 2003).

As dietas no sistema de bovinos confinados incluem basicamente alimentos volumosos e concentrados, sendo que o principal volumoso utilizado é a silagem, principalmente de milho. O balanceamento e a relação volumoso:concentrado (V:C) da dieta para bovinos de corte depende da qualidade do volumoso e da ração concentrada, como também da necessidade de ganho de peso diário para os animais (CARDOSO, 2000).

As mudanças na relação V:C nas dietas podem 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). Tem sido documentados efeitos das mudanças do pH e da concentração de AGCC no rúmen sobre a atividade dos microrganismos ruminais (GOAD et al., 1998; PALMONARI et al., 2010). Dietas baixas em fibra e que tendem a ter altas taxas de digestão e produção de AGCC geram um pH ruminal baixo (<6,0), que exerce efeitos negativos nos microrganismos celulolíticos do rúmen, podendo inclusive diminuir a população de bactérias amilolíticas (MARTIN et al., 2002; NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). Assim, dietas com alta proporção de concentrado além de influenciar a população de microrganismos ruminais, podem também diminuir a digestibilidade da dieta (OWENS et al., 1998) e o consumo de alimento (STOCK et al., 1995).

A pesquisa da microbiologia ruminal associada à produção animal, busca a maximização do uso dos alimentos por meio da geração de conhecimentos sobre a

biodiversidade e as interrelações das diferentes populações microbianas do rúmen que permitam fornecer condições essenciais para o seu funcionamento, resultando na otimização da fermentação e da digestão da dieta.

Poucos estudos têm caracterizado o ambiente ruminal em bovinos de corte alimentados com dietas com diferentes relações de V:C, principalmente referentes à silagem de milho. Estudos de como essa relação pode influenciar a ingestão de nutrientes, bem como a utilização dos alimentos e o perfil da microbiota do rúmen são fundamentais para formular e manipular as dietas utilizadas, visando a máxima eficiência da mesma. O uso da biologia molecular na identificação das bactérias ruminais é uma ferramenta inovadora e eficiente, caracterizando de forma mais precisa e rápida o perfil da microbiota ruminal presente.

Relação volumoso: concentrado no metabolismo ruminal

A alimentação, fator prioritário do sistema de confinamento de bovinos, é geralmente composta por dietas que compreendem a utilização de alimentos volumosos associados a alimentos concentrados. O balanceamento e a proporção de volumoso e concentrado (V:C) das dietas para bovinos de corte depende da qualidade do volumoso e da ração concentrada, como também da necessidade de ganho de peso diário para os animais (CARDOSO, 2000).

A relação V:C da dieta pode influenciar o consumo dos nutrientes. O consumo de alimentos é função do animal, do alimento, das condições de alimentação, bem como dos fatores do meio ambiente que envolve temperatura e duração do dia (MERTENS, 1994). Assim, a saciedade pode ser um fator fisiológico limitante do consumo para dietas com alto teor de concentrados e elevada densidade energética. Por outro lado, os fatores físicos predominam no controle do consumo de dietas com alta proporção de volumoso, podendo limitar o consumo pelo volume ocupado pela dieta e pela capacidade anatômica do rúmen-retículo, restringindo a ingestão de energia e proteína, fatores nutricionais que mais limitam o crescimento microbiano (CLARK et al., 1992).

Diversos estudos tem avaliado o efeito da relação V:C sobre o consumo dos nutrientes. Bürger et al. (2000a), Ítavo et al. (2002) e Agle et al. (2010) ao testarem

diferentes relações V:C para bovinos, utilizando feno de capim como fonte de volumoso, não encontraram mudanças nos consumos de matéria seca (MS) e matéria orgânica (MO) das dietas. Já Putrino et al. (2007) ao trabalharem com novilhos Nelore alimentados com as relações V:C de 20:80, 40:60, 60:40 e 20;80, utilizando a silagem de milho como fonte de volumoso, observaram um comportamento quadrático com consumo de MS máximo (%PV) estimado com a relação V:C de 60:40.

Estudos realizados por Carvalho et al. (1997a), Tibo et al. (2000a), Araujo et al. (1998), Lechartier e Peyraud (2010) mostraram que com o aumento nas proporções de concentrado das rações, ocorre uma redução linear no consumo da fibra em detergente neutro (FDN). Por outro lado, Lechartier e Peyraud (2010) observaram aumento no consumo de MS, MO e proteína bruta (PB) em bovinos, quando a relação V:C diminuiu de 50:50 para 35:65. Dias et al. (2000a) observaram um comportamento linear crescente no consumo de PB (kg/d e % PV) em bovinos alimentados com as relações 25:75; 37,5:62,5; 50:50; 62,5:37,5 e 75:25.

Segundo Valadares Filho et al. (1987), carboidratos não-estruturais possuem coeficiente de digestibilidade aparente total acima de 90% e carboidratos estruturais próximos de 50%, o que reflete na menor digestão da MS nas dietas com maiores teores de carboidratos estruturais. 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. 2000a). Por outro lado, Putrino et al. (2007) observaram que a diminuição na relação 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) (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003). A diminuição do pH ruminal ocorre, principalmente, após a ingestão de alimentos, especialmente amido, devido à sua rápida taxa de degradação, em dietas com alta proporção de concentrados, e esta diminuição do pH ruminal pode ser muito

rápido e manter-se durante longos períodos de tempo (ØRSKOV, 1986). Franzolin et al. (2010) mencionaram que essas condições ruminais podem mudar o padrão de fermentação ruminal, já que pH inferior a 5,5 é nocivo para a sobrevivência dos protozoários ciliados e pode ocasionar o crescimento de bactérias produtoras de lactato, desencadeantes de acidose ruminal. 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 (NAGAJARA; TOWNE; BEHARKA, 1992).

As bactérias ruminais são vitais para a saúde e a produtividade do ruminante (RUSSELL, 2002; WELKIE et al., 2010). A microflora ruminal é altamente sensível às alterações na idade, dieta e saúde do animal hospedeiro (KOCHERGINSKAYA et al., 2001; LI et al., 2009). Embora muitas espécies de microrganismos estejam presentes no rúmen durante todo o tempo, a taxa de crescimento e a ação digestiva de cada espécie podem variar com as condições ruminais. Mudanças que ocorrem no tipo de microrganismos após a alimentação, 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; MENDONÇA, 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 estes microrganismos e alterar a dinâmica do ecossistema ruminal (TAJIMA et al., 2001; KLIEVE et al., 2003). Diversos estudos em ruminantes tem demonstrado que em condições ruminais ácidas (<6,0) podem reduzir a atividade das bactérias *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*, fundamentais na degradação da fibra, e aumentar a atividade das bactérias amilolíticas (RUSSELL, 2002; KLIEVE et al., 2003; NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007).

Os AGCC produzidos, juntamente com pequenas quantidades de outros compostos orgânicos (metano, dióxido de carbono, lactato e álcool) durante o processo de fermentação ruminal, são responsáveis pela a maior fonte de energia para ruminantes (65 a 75% da energia metabolizável ingerida) (BERGMAN, 1990). Os

ácidos acético, propiônico e butírico são os AGCC predominantes e são produzidos principalmente na degradação da celulose, hemicelulose, pectina, amidos e açúcares provenientes da dieta. A proporção de AGCC é influenciada pela dieta e população microbiana do rúmen, e comumente, a relação molar de acetato, propionato e butirato, varia de 75:15:10 a 40:40:20 (VALDARES FILHO; PINA, 2011).

Segundo Pereira e Armentano (2000), quando o conteúdo de fibra diminui em relação ao concentrado em dietas para vacas leiteiras, a proporção acetato:propionato produzidos no rúmen também diminui. Backes, Sanchez e Gonçalves (2001) também demonstraram que quando os níveis de celulose e hemicelulose aumentam em relação aos níveis de carboidratos solúveis e amido nos alimentos, a relação acetato:propionato produzida no rúmen tende a aumentar.

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-estruturais estiverem em alta proporção na ração e o pH for mantido, os microrganismos fermentadores deste substrato vão crescer rapidamente, resultando em aumento da produção microbiana. Por outro lado, se houver acúmulo de ácido láctico, ocorrerá diminuição do pH e alteração na ecologia microbiana e no consumo de matéria seca (SNIFFEN; ROBINSON, 1987).

Gonçalves et al. (2001) avaliaram o efeito da relação V:C sobre a variação do pH ruminal em cabras leiteiras e observaram um decréscimo linear do pH concomitante com o aumento do nível de concentrado na dieta. Bürger et al. (2000b) observaram o mesmo comportamento em bovinos confinados mestiços alimentados com feno de capim como fonte de volumoso e relações V:C de 70:30, 55:45, 40:60, 25:75 e 10:90. Resultados similares foram encontrados por Ladeira et al. (1999), que testaram as relações V:C de 75:25; 62,5:37,5; 50:50; 37,5:62,5 e 25:75 em novilhos confinados, utilizando fenos de capim braquiária e coast-cross, em proporções iguais como fonte de volumoso.

A concentração de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) no rúmen é indispensável para o crescimento microbiano, desde que associada a fontes de energia (COELHO DA SILVA; LEÃO, 1979). 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 rúmen e/ou baixa concentração de carboidratos degradados no rúmen. Segundo Stern e Hoover (1979), 40 a 100% do nitrogênio microbiano podem ser derivados do N amoniacal. Morrison e Mackie (1996) relataram que 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 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 et al., 1977); 9 mg/dL e 29 mg/dL (HUME et al., 1970 e MILLER, 1973, citados, respectivamente por STERN e HOOVER, 1979); 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, uma vez que a capacidade de síntese de proteína e captação de amônia pelas bactérias depende da taxa de fermentação dos carboidratos.

Estudos com diferentes relações V:C na dieta relatam maiores concentrações de N-NH₃ no rúmen, quando bovinos foram alimentados com dietas com maiores relações V:C (CARVALHO, 1997b; SOITA et al., 2003; AGLE et al., 2010). Entretanto, Ladeira et al. (1999) e Lechartier e Peyraud (2010) reportaram aumento linear das concentrações máximas de amônia ruminal quando os animais receberam dietas com menor relação V:C.

A eficiência da utilização de N-NH₃ pelos microrganismos para a síntese microbiana depende, entre outros fatores, da disponibilidade de energia no rúmen (SANTOS; MENDONÇA, 2011). De acordo com o NRC (1996), 50 a 100% da proteína metabolizável exigida pelo bovino de corte pode ser atendida pela proteína de origem microbiana. Segundo Kozloski (2011), o suprimento de proteína para o duodeno consiste da proteína microbiana sintetizada no rúmen, proteína dietética não-degradada e proteína endógena.

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 digerível no rúmen (MODR), para os 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. Porém, Tibo et al. (2000b) encontraram efeito linear do nível de concentrado sobre a eficiência microbiana, novilhos confinados alimentados com dietas com as relações V:C de 75:25; 62,5:37,5; 50:50; 37,5:62,5 e 25:75 ao utilizarem feno de capim como fonte de volumoso.

Utilização de qPCR para estudo dos microrganismos ruminais

O ruminante é dotado de um sistema digestivo característico que permite a digestão de alimentos fibrosos, transformando-os em produtos nutritivos úteis, possibilitando a conversão de celulose e outros polissacarídeos presentes na parede celular de vegetais em energia para a produção de carne, leite, lã e/ou trabalho motor (SAMPAIO et al., 2000).

Segundo a classificação proposta por Woese et al. (1990), o rúmen é um ambiente colonizado por três domínios, sendo estes: *Bacteria* (Bactérias), *Archaea* (Aquéias) e *Eucarya* (Fungos e Protozoários). Estes diferentes microrganismos compõem uma complexa comunidade onde interage um com outro, desempenhando papéis importantes na digestão de substratos e no fornecimento de nutrientes para o hospedeiro na forma de ácidos graxos de cadeia curta e proteína microbiana (VAN SOEST, 1994).

Historicamente, a maior parte dos conhecimentos da composição microbiana do rúmen surgiu pelo uso de métodos tradicionais como a técnica “roll tube” (HUNGATE, 1969). No entanto, alguns microrganismos não podem ser cultivados com técnicas correntes, enquanto os microrganismos em culturas representam apenas uma pequena fração de comunidades microbianas naturais e, portanto, a diversidade microbiana é grosseiramente subestimada (AMANN et al., 1995; WINTZINGERODE et al., 1997).

O estudo dos microrganismos ruminais, principalmente das bactérias, vem se tornando alvo de várias pesquisas, principalmente após o advento da biologia molecular, com possibilidade de identificar e quantificar microrganismos independente de técnicas de cultivo.

Como foi sugerido por Kobayashi (2006), os métodos moleculares permitiram a geração de conhecimentos básicos sobre a ecologia microbiana ruminal e do restante do trato digestório, cuja utilidade para a produção animal começou a ser explorada. O fundamento das técnicas moleculares para estudo da ecologia microbiana é a análise de seqüências do 16S/18S rDNA, a qual possibilita a classificação em bases filogenéticas que por sua vez permite o contagem e a identificação de membros de uma determinada microbiota (WHITFORD et al., 1998; TAJIMA et al., 1999)

Diferentes técnicas em biologia molecular podem ser usadas na caracterização de amostras ambientais, dependendo do objetivo e da abordagem que pode ser quantitativa ou qualitativa. Técnicas de biologia molecular baseadas na análise dos ácidos nucleicos são cada vez mais usadas para a caracterização de comunidades microbianas complexas, sem etapa de cultivo *in vitro*.

A técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) combina a amplificação de um alvo específico com métodos de quantificação, por intermédio de medidas da fluorescência associada à síntese de um “amplicon” ao longo dos ciclos da PCR. O limiar de detecção de fluorescência da qPCR é denominado o ThresholdCycle (CT), que é o ponto onde a curva de amplificação ultrapassa a linha de limiar e entra em uma fase exponencial. Como resultado, qPCR pode medir a densidade relativa de moléculas alvo, comparando o valor CT com uma referência, ou medir a quantidade absoluta dos fragmentos tendo como referência um padrão externo (ZHOU et al., 2011). Desta forma, na qPCR é detectada uma fluorescência referente a quantidade de amplicons acumulados a cada ciclo, que é proporcional à quantidade inicial do DNA alvo. Esta técnica constitui o principal método para a quantificação de bactérias ruminais, requer pouco tempo e apresenta altas sensibilidade e confiabilidade (KOBAYASHI et al., 2000; TAJIMA et al., 2001).

Dentre as diversas técnicas moleculares que nos permite acessar a microbiota ruminal, a qPCR é a técnica que mais vem sendo utilizada por diversos autores (MAO

et al., 2010; KONGMUN et al., 2011; MARTINON, CRONIN e WILKINSON, 2012; JAMI e MIZRAHI, 2012; LIU et al., 2012; TORAL et al., 2012) devido a sua alta sensibilidade em quantificar de forma mais acurada as sequências de DNA específicas para cada espécie, e a possibilidade de uma rápida avaliação da resposta dos microrganismos às dietas oferecidas.

A extração e a purificação de ácidos nucléicos a partir de diversas amostras experimentais é uma etapa crucial para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a reação em cadeia da polimerase (PCR) (EMBRAPA, 2007). Vários métodos de extração de DNA, incluindo kits comerciais, têm sido desenvolvidos para utilização em amostras de conteúdo ruminal no mundo todo (TAJIMA et al., 2001; SHARMA, et al., 2003; YU e MORRISON, 2004; CHAUDHERY, SIROHI e KUMAR, 2011; PERS-KAMCZYC et al., 2011).

O estudo da microbiota ruminal deve ser encarado como importante área de pesquisa estratégica (RUSSELL, 2002), pois há um potencial de desenvolvimento da produtividade da pecuária tropical baseado no conhecimento detalhado da microbiota ruminal e dos parâmetros que a afetam diretamente.

2. OBJETIVOS

Objetivou-se com este estudo caracterizar as alterações na microbiologia ruminal, parâmetros ruminais, consumo, digestibilidade das dietas e a eficiência de síntese microbiana, em novilhos confinados alimentados com diferentes relações volumoso:concentrado, utilizando como fonte de volumoso a silagem de milho.

3. 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.
- ALENCAR, M. M.; POTT, E. B. Introdução. In:_____ Criação de bovinos de corte na Região Sudeste. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/BovinoCorte/BovinoCorteRegiaoSudeste/index.htm>>. Acesso em: Maio. 2012.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington D.C, v.59, n.2 p.143–169, 1995.
- 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.
- 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 alfafa 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.
- BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiology Review**, Philadelphia, v.10, n.2, p.567-589, 1990.
- 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, 2000a.
- CARDOSO, G. E. Os alimentos. In:_____ **Confinamento de bovinos**. Campo Grande: Embrapa Gado De Corte, 2000. Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/naoseriadas/cursosuplementacao/confinamento/#4 OS>> Acesso em: 12 maio. 2012
- CARVALHO, A. U., VALADARES FILHO, S. C., COELHO DA SILVA, J. F. Níveis de concentrados em dietas de zebuínos. 4. Concentrações ruminiais de amônia e pH, taxa de passagem de digesta ruminal e degradação in situ dos alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.26, n.5, p.1016-1024. 1997b.

CARVALHO, A. U.; VALADARES FILHO, S. C.; COELHO DA SILVA, J. F. Níveis de concentrado em dietas de zebuínos. 2. Coeficientes de digestibilidades aparentes parciais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.26, n.5, p.996-1006, 1997a.

CHAUDHERY, P. P.; SIROHI, S. K.; KUMAR, S. Improved extraction of quality DNA from methanogenic archaea present in rumen liquor for PCR application. **Asian Journal of Animal Science**, Paquistão, v. 5, n. 3, p. 166-174, 2011.

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: Livroceres. 380p.1979.

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.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos, 2007. 38 p.

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.

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.

GONÇALVES, A. L.; LANA, R. P.; RODRIGUES, M. T.; VIEIRA, R. M.; QUEIROZ, A. C.; HENRIQUE, S. Padrão nictemeral do ph ruminal e comportamento alimentar de cabras leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes relações volumoso: concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, n.6, p. 1886-1892 2001.

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. p.31-48, 1981.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2241&id_pagina=1>. Acesso em: novembro 30 de 2012.

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).

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. 1-8, 2012.

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.

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. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology. Need for basic and applied science. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v.77, n.2, p.375-386, 2006.

KOBAYASHI, Y.; FORSTER, R. J.; TEATHER, R. M. Development of a competitive polymerase chain reaction assay for the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* OB156 and its use for tracking an OB156-derived recombinant. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.188, n.2, p.185–190, 2000.

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

KONGMUN, P.; WANAPAT, M.; PAKDEE, P.; NAVANUKRAW, C.; YU, Z. Manipulation of rumen fermentation and ecology of swamp buffalo by coconut oil and garlic powder supplementation. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 135, n. 1, p. 84-92, 2011.

KOZLOSKI, V.G. **Bioquímica dos ruminantes**. 3 ed. UFSM, Santa Maria, RS. 2011.

LADEIRA, M. M.; VALADARES FILHO, S. C.; LEÃO, M. I.; SILVA, J. F. C. Eficiência Microbiana, Concentração de Amônia e pH Ruminal e Perdas Nitrogenadas Endógenas, em Novilhos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.28, n.2, p.404-411, 1999.

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.

LI, M.; PENNER, G. B.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; OBA, M.; GUAN, L. L. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v,107, n.6, p.1924–1934, 2009.

LIU, S. J.; BU, D. P.; WANG, J. Q.; LIU, L.; LIANG, S.; WEI, H. Y.; ZHOU, L. Y.; LI, D.; LOOR, J. J. Effect of incremental levels of fish oil supplementation on specific bacterial populations in bovine ruminal fluid. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 29, n. 1, p. 9-16, 2012.

MAO, H.; WANG, J. K.; ZHOU, Y.; LIU, J.X. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 129, n.1-3, p. 56-62, 2010.

MARTIN, C.; FONTY, G.; MICHALET-DOREAU, B. Factors affecting the fibrolytic activity of the digestive microbial ecosystems in ruminants, p. 1–17. In S. A. Martin (ed.), **Gastrointestinal microbiology in animals**. Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India. 2002.

MARTINON, A.; CRONIN, U. P.; WILKINSON, M. G. Development of defined microbial population standards using fluorescence activated cell sorting for the absolute quantification of *S. aureus* using real-time PCR. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 50, n. 1, p. 62-71, 2012.

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.

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

PERS-KAMCZYC, E., ZMORA, P.; CIESLAK, A.; SZUMACHER-STRABEL, M. Development of nucleic acid based techniques and possibilities of their application to rumen microbial ecology research. **Journal of Animal and Feed Science**, Amsterdam, v. 20, n.1, p. 315-337, 2011.

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, D.C, v.58, n.8, p.2410-2414, 1992.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrients requirements of beef cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.

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. Ácidos 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.

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.

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

SAMPAIO, A. A. M.; VIEIRA, P. F.; BRITO, R. M. Produção de amônia na fermentação in vitro de rações com levedura, uréia ou farelo de algodão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 598-602, 2000.

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.

SHARMA, R.; JOHN, S. J.; McALLISTER. Extraction of PCR-quality plant and microbial DNA from total rumen contents. **BioTechniques**, London, v. 34, n. 1, p. 92-97, 2003.

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.

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.

- 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 D.C, v.67, n.6 p.2766–2774, 2001.
- TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; OGATA, K.; NAKAMURA, M.; MATSUI, H.; BENNO, Y. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v.29, n. 2, p.159–169, 1999.
- TIBO, G. C.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; SILVA, J. F. C.; CECON, P. R.; LEAO, M. I.; DA SILVA, B. R. Níveis de concentrado em dietas de novilhos F1 Simental x Nelore: 1- Consumo e digestibilidades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.5, p.921-929.2000a.
- TIBO, G.C.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R. F. D.; SILVA, J.F.C.; CECON, P.R.; LEAO, 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, 2000b.
- 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 D.C, 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 edn. Cornell University Press, Ithaca, New York, 1994.
- 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.
- WHITFORD MF, FORSTER RJ, BEARD CE, GONG J, TEATHER RM. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. **Anaerobe**, London, v.4, n.3, p.153–163, 1998.
- WINTZINGERODE, F.V.; GOBEL, U.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.21, n.3, p. 213–229, 1997.
- 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.
- YU, Z.; MORRISON, M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. **BioTechniques**, London, v. 36, n. 5, p. 808-812, 2004.

ZHOU, X. ; FERGUSON, S. A. ; MATTHEWS, R. W. ; SARGENT, C. ; DARWENT, D. ; KENNAWAY, D. J. ; ROACH, G. Mismatch between subjective alertness and objective performance under sleep restriction is greatest during the biological night. **Journal of Sleep Research**, Oxford, v.21, n. 1, p.40–49. 2011.

CAPÍTULO 2 – MICRORGANISMOS RUMINAS E PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO EM FUNÇÃO DA RELAÇÃO VOLUMOSO:CONCENTRADO DA DIETA EM NOVILHOS NELORE

RESUMO – Este experimento teve como objetivo caracterizar o efeito de quatro relações V:C sobre a microbiologia do rúmen, os parâmetros de fermentação ruminal, consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes em novilhos Nelore. Foram utilizados oito novilhos Nelore (280±8 kg PV), canulados no rúmen, distribuídos em um duplo quadrado latino 4x4 balanceados para o controle do efeito residual. O

experimento foi dividido em 4 períodos de 21 dias cada. A diminuição da relação V:C 70:30 para 20:80 reduziu ($P<0,05$) a proporção relativa de *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens* no ambiente ruminal, mas não comprometeu a população de *Fibrobacter succinogenes* ($P<0,05$) e aumentou a proporção de *Selenomonas ruminantium* ($P<0,05$), e de *Streptococcus bovis* ($P<0,10$). A população total de protozoários foi semelhante ($206.33 \times 10^4/\text{mL}$) em todas as relações V:C ($P>0,05$), em que o gênero *Entodinium* foi mais representativo (99,28%). Relações com até 60% de inclusão de concentrado não influenciaram o pH médio do rúmen (6,28) ($P>0,05$). A concentração ruminal total de AGCC, assim como a relação acetato: propionato não foram influenciados pelas relações V:C ($P>0,05$), mas na relação V20:C80 observou-se maior concentração de ácido propiônico ($P>0,05$). O consumo de FDNcp diminuiu com o aumento de concentrado e diminuição de volumoso nas dietas ($P<0,05$) e a relação 20:80 permitiu maior consumo de NDT ($P<0,05$). A digestibilidade da MS, MO e PB foi menor na relação 70:30 ($P<0,05$). Dietas com maior proporção de concentrado, geram um pH ruminal baixo, e inibem o crescimento das bactérias celulolíticas *R. Albus* e *R. Flavefaciens*, aumentam a concentração de ácido propiônico e a proporção de *S. Ruminantium* no rúmen.

Palavras-Chave: bactérias celulolíticas, *Selenomonas ruminantium*, PCR em tempo real, pH, proteína microbiana.

1. INTRODUÇÃO

A simbiose existente entre o hospedeiro e a microbiota ruminal é responsável pela capacidade do ruminante de degradar celulose e obter produtos nutritivos úteis. Os microrganismos que conformam esta microbiota são altamente sensíveis às alterações na idade, dieta e saúde do animal hospedeiro. Assim, em bovinos saudáveis, a composição da dieta é um importante fator responsável pelas mudanças na estrutura das populações microbianas do rúmen (WELKIE et al. 2010).

Com o aumento da demanda de carne no mercado mundial, o uso de sistemas em confinamento é uma opção para intensificar o sistema produtivo, sendo imprescindível o uso de concentrado nas dietas. E nessa condição, a escolha da melhor relação volumoso:concentrado (V:C) da dieta a ser utilizada para ruminantes, deve atender às exigências nutricionais e minimizar as perdas energéticas.

Em ruminantes, vários parâmetros nutricionais podem ser influenciados pela relação V:C das dietas, principalmente as características de fermentação ruminal, tais como o pH e a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003). Tem sido documentados efeitos dessas mudanças no rúmen sobre a atividade dos microrganismos ruminais (PALMONARI et al., 2010), por exemplo, dietas com uma menor relação V:C, podem estimular o crescimento microbiano ao aumentar a disponibilidade de carboidratos fermentáveis na dieta. Entretanto, essas dietas são baixas em fibra e tendem a ter rápidas taxas de digestão e produção de AGCC, o que pode gerar pH ruminal baixo (<6,0) (YANG; BEAUCHEMIN, 2009). Essas condições no rúmen 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), 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).

Por sua vez, dietas com maior relação V:C, contém alto conteúdo de fibra e podem limitar o consumo e a digestibilidade dos nutrientes (MERTENS, 1994), restringindo a disponibilidade de energia e amônia no rúmen, fatores nutricionais que mais limitam o crescimento microbiano (CLARK et al., 1992). A alimentação de ruminantes com altos níveis de celulose e hemicelulose tende a aumentar a relação acetato: propionato produzidos no rúmen (PEREIRA; ARMENTANO, 2000), acrescentando as perdas energéticas durante a fermentação dos alimentos.

Apesar de ser conhecido como a relação V:C na dieta afeta a fermentação ruminal, poucos estudos têm caracterizado os efeitos no perfil da microbiota ruminal de bovinos, utilizando técnicas moleculares para identificar e quantificar os microrganismos do rúmen.

O objetivo deste estudo foi caracterizar as alterações na microbiologia ruminal, pelo método da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), correlacionando os parâmetros de fermentação ruminal, assim como, avaliar o consumo e a digestibilidade das dietas, de bovinos Nelore alimentados com diferentes relações volumoso:concentrado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local e animais

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista nas instalações do Setor de Avaliação de Alimentos e Digestibilidade pertencente ao Departamento de Zootecnia.

O período experimental teve duração de 84 dias e foi composto de quatro períodos de 21 dias, sendo os 14 primeiros dias para adaptação dos animais às dietas e os últimos sete dias para coleta de dados.

Foram utilizados oito novilhos Nelore, canulados no rúmen, com peso corporal médio inicial de 280 ± 8 kg e de aproximadamente 24 meses de vida. Os animais ficaram alojados em baias individuais de 12 m², que continham bebedouro e comedouro individual, piso de concreto e coberto de telhas, durante os primeiros 16 dias de cada período. Os últimos 5 dias de cada período os animais permaneceram em gaiolas para estudos de metabolismo para as coletas dos dados referentes digestibilidade e produção de proteína microbiana.

2.2. Tratamentos

Os tratamentos foram constituídos de quatro dietas experimentais com diferentes relações de V:C (70:30, 60:40, 40:60 e 20:80). Essas dietas foram formuladas de acordo com o AFRC (1993) e calculadas para maximizar a síntese de proteína microbiana. O concentrado foi composto de milho moído, farelo de soja, ureia, e como fonte de volumoso foi utilizada a silagem de milho. A composição bromatológica dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição bromatológica dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais com base na matéria seca

Composição Bromatológica	Ingredientes			
	Silagem de milho	Milho moído	Farelo de soja	Ureia
Matéria seca,%	32,3	88,5	86,6	99,0
Matéria orgânica,% MS	95,2	96,6	92,3	-
Proteína bruta,% MS	7,7	9,1	51,8	289,0
Energia bruta (Mcal/kg)	5,2	4,7	4,7	-
FDNcp,%MS	59,1	12,5	15,8	-
FDA, %MS	33,76	4,94	7,36	-
Lignina, %MS	3,73	0,84	0,29	-
CT, % MS*	84,5	83,6	39,1	-
CNF,%MS*	25,3	71,5	23,4	-
Extrato etéreo, %MS	3,0	3,9	1,4	-
Matéria mineral, %MS	4,8	3,5	7,3	-
NDT,%MS**	58,1	84,8	78,6	-

FDNcp = fibra insolúvel em detergente neutro corrigido pra cinzas e proteína, FDA = fibra insolúvel em detergente ácido, CT= carboidratos totais, CNF = carboidratos não estruturais, NDT= nutrientes digestíveis totais. * estimadas com as equações propostas por Sniffen et al. (1992). ** calculado de acordo com Weiss et al. (1992).

A dieta foi fornecida às 6 h diariamente junto com 100 g/animal de mistura mineral BELLNUTRI[®], e as 16 h foi misturada novamente para estimular o consumo. A composição percentual e bromatológica das dietas em função das relações V:C é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem dos ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais em função das relações V:C

Ingrediente	Relação V:C (% da MS)			
	70:30	60:40	40:60	20:80
Silagem de Milho	70	60	40	20
Milho moído	23,1	32,3	48,5	69,4
Farelo de Soja	5,5	6,3	9,5	9,0
Ureia	1,2	1,2	1,4	1,6
Composição bromatológica				

Materia seca,%	49,01	54,62	65,16	72,20
Matéria orgânica, %MS	94,06	94,10	94,62	86,61
Proteína bruta, % MS	13,78	14,42	16,27	17,15
PDR, % MS*	8,02	8,12	8,79	8,57
PNDR, % MS*	2,57	3,99	4,91	5,65
PIDN, %MS	3,36	3,08	2,62	1,99
PIDA,% MS	1,55	1,44	1,24	0,98
FDNcp, % MS	45,04	40,37	32,07	21,65
FDA, % MS	25,18	22,31	17,21	10,83
Hemicelulose, % MS	20,84	18,99	15,72	11,59
Lignina, % MS	2,82	2,53	2,00	1,35
CNF,% MS**	35,61	39,82	47,08	56,84
CT, % MS**	80,64	80,16	79,12	78,44
EB (Mcal/kg)	5,01	4,96	4,89	4,76
EM (Mcal/kg)	3,44	3,32	3,44	3,30
Extrato etéreo, % MS	3,06	3,13	3,24	3,41
NDT, % MS***	64,63	67,18	72,15	77,57

PDR = Proteína degradável no rúmen, PNDR= Proteína não degradável no rúmen, PIDN = proteína insolúvel em detergente neutro, PIDA = proteína insolúvel em detergente ácido, FDNcp = fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína, CT = carboidratos totais, CNF = Carboidratos não estruturais, EB= energia bruta, EM= energia metabolizável, NDT= nutrientes digestíveis totais. * estimados pelas tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos Valadares Filho et al. (2010). ** estimadas com as equações propostas por Sniffen et al. (1992). *** calculado de acordo com Weiss et al. (1992).

2.3. Consumo e digestibilidade dos nutrientes

Os alimentos foram amostrados no início de cada período experimental. As dietas foram fornecidas para que as sobras não ultrapassassem 10% do oferecido, sendo as sobras recolhidas e pesadas diariamente. As amostras das sobras foram colhidas do 15^o ao 20^o dia do período experimental. Após o término de cada período foi feita amostra composta das sobras e congelada a -15 °C.

Na determinação da produção fecal as amostras de fezes foram recolhidas nas bandejas metálicas adaptadas às gaiolas para estudo de metabolismo. O total de fezes produzido por dia por cada animal foi pesado, homogeneizado e retirada uma amostra (aproximadamente 200g) do total defecado e congelada a -15 °C. Após a secagem e moagem foi formada amostra composta por animal em cada período experimental, para posterior determinação dos nutrientes.

As amostras de alimentos, sobras e fezes foram secas em estufa de circulação forçada de ar em temperatura de 55°C por 72 horas, e moídas individualmente em moinho de martelo com peneira com molha de 1mm.

Nas amostras de fezes, sobras e alimentos foram analisados os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MN) e extrato etéreo (EE) de acordo com AOAC (1990).

A energia bruta foi determinada em calorímetro IKA® modelo 2000 Basic, automatizado. A determinação da PB foi pelo método de DUMAS (ETHERIDGE et al. 1998) baseada na liberação do N por combustão em alta temperatura em oxigênio puro no analisador de nitrogênio LECO (FP-258).

A determinação da fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) e lignina (Lig) foi realizada seguindo as recomendações de Mertens (2002), utilizando o método sequencial proposto pela ANKOM Fiber Analyser (ANKOM® 2000 Technology Corporation, Fairport, NY).

2.4. Parâmetros ruminiais

As coletas de líquido ruminal para a determinação do pH, concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e concentrações de AGCC foram realizadas antes (0h) e 02, 04, 06, 08, 10, 12, 14h após a alimentação matinal dos animais. Aproximadamente 50 mL de líquido ruminal foram recolhidos após filtragem em tecido duplo de algodão e destinados à imediata determinação do pH em potenciômetro digital (ORION 710A, Boston, MA). Em seguida, 20 mL de líquido ruminal foram acidificados com 0,1 ml de ácido sulfúrico e armazenados a -15°C para posterior determinação das concentrações de N-NH₃. Outra alíquota de 20 mL de líquido ruminal foi armazenada a -15°C para determinação da concentração dos AGCC. O conteúdo seco da amostra de conteúdo ruminal retirada foi devolvido ao rúmen imediatamente após as coletas.

A concentração de N-NH₃ foi obtida após a destilação com KOH 2N, de acordo com a técnica descrita por Fenner (1965), a qual foi adaptada para uso na destilação *Kjeldahl*. Na determinação da concentração de AGCC, as amostras foram centrifugadas a 13, 000 x g (4° C) durante 30 min, e quantificados por cromatografia gasosa (GC Shimatzu modelo 20-10, com injeção automática), usando coluna

capilares SP-2560 (100 m × 0,25 mm de diâmetro com 0,02 mm de espessura, Supelco, Bellefonte, PA) (PALMIQUIST; CONRAD, 1971).

2.5. Produção de proteína microbiana

Durante os últimos cinco dias de cada período experimental foram realizadas as coletas totais (24 horas) de urina, utilizando-se sistema coletor de borracha adaptado ao prepúcio dos animais. Os recipientes que receberam a urina continham 200 mL de ácido sulfúrico a 20%. Ao término da coleta, após medição, homogeneização e filtragem, foram retiradas alíquotas de 10 mL, diluídas em 40 mL de ácido sulfúrico 0,0036 N. Estas amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos e armazenadas a -15 °C, para posteriores análises de alantoína e ácido úrico.

As análises dos derivados de purinas (alantoína e ácido úrico) foram realizadas pelo método colorimétrico, conforme técnica de Fujihara et al. (1987), descrita por Chen e Gomes (1992). A eficiência de síntese de proteína microbiana (EMPS) foi expressa em g de proteína microbiana /100 g de matéria orgânica degradada no rúmen (MODR).

2.6. Microbiologia ruminal

2.6.1. Bactérias ruminais

Os procedimentos para a quantificação de bactérias celulolíticas (*Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens*), *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium* foram realizadas pela técnica de qPCR, das amostras do conteúdo ruminal dos animais alimentados com a relação com maior proporção de volumoso V70:C30 e com maior proporção de concentrado V20:C80. Foram escolhidos esses tratamentos devido ao alto custo das análises.

2.6.1.1. Extração do DNA metagenômico

Amostras do conteúdo ruminal foram coletadas manualmente, através da cânula, antes da alimentação matinal dos animais. Cinquenta gramas do conteúdo ruminal foram pesados e adicionou-se imediatamente 50 mL de tampão fosfato-salino (pH

7,4), agitou-se vigorosamente por 3 minutos e posteriormente o conteúdo foi filtrado em tecido com malha de 100 micras. O filtrado foi submetido à centrifugação de 16000 x g por 10 minutos a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado restante foi ressuspenso em 4 mL de tampão Tris-EDTA (10X, pH 8,0). O conteúdo ressuspenso, foi centrifugado à 16000 x g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi armazenado sob refrigeração (-20 °C).

A extração do DNA metagenômico foi realizada em 250 µL de amostra utilizando o Kit de extração AxyPrep™ Bacterial Genomic DNA Miniprep (Axygen-Biosciences). A integridade e quantidade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (5 mg/mL) e seu tamanho estimado por comparação com marcador 1 kb *plusDNA ladder* (Invitrogen), complementarmente o DNA foi avaliado por espectrofotometria (Thermo Scientific, NanoDrop™ 1000) para avaliação de sua qualidade e quantidade.

2.6.1.2. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

Na quantificação da composição da microbiota ruminal foi realizada qPCR das Bactérias Totais, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium*, conforme apresentado na Tabela 3.

As qPCRs (reações de 25 µL volumen final) continham 7,5 µL de SYBR®Green PCR Master Mix (Bio-Rad, Hercules, California, USA), 10 pmol do par dos oligonucleotídeos iniciadores, água ultra pura (Milli-Q, Millipore Corporation) e 20 ng do DNA metagenômico. As reações foram conduzidas no aparelho 7500 Real Time PCR System. Controles negativos foram executados no ensaio, omitindo o DNA metagenômico.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores usados neste estudo para quantificação de bactérias ruminais

Primer	Seqüencia (5' para 3')	Tamanho do Amplicon (bp)
Bactérias Totais ¹	F: CGG CAA CGA CAA CCC R: CCA TTG TAG CAC CTG TGT AGC C	130
<i>Fibrobacter succinogenes</i> ¹	F: GTT CGG AAT TAC TGG GCG TAA A R: CGC CTG CCC CTG AAC TAT C	121

<i>Ruminococcus flavefaciens</i> ¹	F: CGA ACG GAG ATA ATT TGA GTT TAC TTA GG R: CGG TCT CTG TAT GTT ATG AGG TAT TAC C	132
<i>Ruminococcus albus</i> ²	F: CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCCG R: CCTCCTTGCGGTTAGAACA	175
<i>Streptococcus bovis</i> ³	F: TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG R: ATGATGGCAACTAACAATAGGGGT	127
<i>Selenomonas ruminantium</i> ³	F: GGCGGGAAGGCAAGTCAGTC R: CCTCTCCTGCACTCAAGAAAGACAG	83

F = "forward"; R = "reverse"; ¹ Denman e McSweeney (2006); ² Mosoni et al. (2007); ³ Khafipour et al. (2009).

6.2. Protozoários ruminais

Amostras de líquido ruminal para quantificação da população de protozoários foram colhidas 3 horas após a alimentação dos animais, e diluídas em solução de formalina 50 % para o congelamento. A identificação e a quantificação dos gêneros de protozoários ciliados foram realizadas em câmara Sedgewick-Rafter, segundo Dehority (1984), adaptado por D'agosto e Carneiro (1999).

2.7. 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, derivados de purinas e população de protozoários 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 procedimento MIXED do SAS (versão 9.2).

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), de tempo (7 GL), e sua interação (21 GL), e efeitos aleatórios de período (7 GL), animal (7 GL) e do erro. Foi utilizada a estrutura de erros AR (1) escolhida como a que melhor se ajustava aos dados de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC).

Para a quantificação das bactérias ruminais foi utilizado um delineamento em blocos casualizados, com efeitos fixos dos tratamentos (1 grau de liberdade (GL)) e dos blocos (7 GL) e efeitos aleatórios de período (7 GL), animal (7 GL) e do erro.

Em todas as análises, as médias foram comparadas usando a opção DIFF do PROC MIXED pelo teste de Tukey, e a significância foi declarada a $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Consumo e digestibilidade das dietas

As relações V:C estudadas não influenciaram o consumo de MS, MO e EE ($P > 0,05$). Entretanto, os animais alimentados com a relação V60:C40 apresentaram menor ingestão de PB ($P < 0,05$) (Tabela 4). A ingestão de FDNcp foi influenciada pelas mudanças na relação V:C, diminuindo gradualmente com o aumento da proporção do concentrado nas dietas ($P < 0,05$), em todos os tratamentos o consumo deste nutriente foi menor ao 1,2% do peso vivo. Animais que receberam a relação V20:C80 apresentaram maior ingestão de NDT ($P < 0,05$).

Houve efeito das relações V:C sobre os coeficientes de digestibilidade aparente total da matéria seca (CDMS), matéria orgânica (CDMO) e proteína bruta (CDPB) (Tabela 4). O CDMS e CDMO foi menor ($P < 0,05$) na relação V70:C30. O CDPB foi menor ($P < 0,05$) nos tratamentos com maior proporção de volumoso (V70:C30 e V60:C40) confrontados com os tratamentos com alta proporção de concentrado na dieta (V40:C60 e V20:C80). Entretanto, não foi observada diferença ($P < 0,05$) no coeficiente de digestibilidade da FDNcp (CDFDNcp) e energia bruta (CDEB) (Tabela 4).

Tabela 4. Consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, erro padrão da média (EPM) e níveis descritivos de probabilidade (p-valor), em bovinos Nelore alimentados com diferentes relações V:C na dieta.

	Relação V:C (%MS)				EPM	P-valor
	70:30	60:40	40:60	20:80		
PCM (Kg)	338,67	354,88	351,88	355,71	-	-

<i>Consumo kg/dia</i>						
CMS	5,63	5,32	6,05	5,77	0,421	0,4425
CMO	5,14	4,75	5,77	4,37	0,462	0,1946
CPB	0,82 ^{ab}	0,79 ^b	0,99 ^a	0,96 ^{ab}	0,078	0,0022
CEE	0,20	0,18	0,22	0,20	0,014	0,2989
CFDNcp	2,40 ^a	2,05 ^b	1,89 ^b	1,40 ^c	0,159	0,0003
CCNF	2,64 ^b	2,59 ^b	3,43 ^a	3,35 ^a	0,537	0,0401
CNDT	2,35 ^b	2,20 ^b	2,53 ^b	3,32 ^a	0,296	0,0273
<i>Digestibilidade aparente total</i>						
CDMS	69,72 ^b	77,22 ^a	79,96 ^a	76,28 ^a	1,600	0,0135
CDMO	69,00 ^b	77,98 ^a	77,57 ^a	76,73 ^a	1,483	0,0018
CDPB	61,33 ^c	69,77 ^b	73,91 ^{ab}	79,88 ^a	2,829	0,0026
CDFDNcp	66,24	62,96	63,53	64,07	2,256	0,7525
CDEB	83,78	81,87	85,82	84,64	2,947	0,7731

PCM=peso corporal médio; CMS = consumo de matéria seca; CMO = consumo de matéria orgânica; CPB = consumo de proteína bruta; CEE = consumo de extrato etéreo; CFDNcp = consumo de fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; CCNF= consumo de carboidratos não fibrosos; CNDT = consumo de nutrientes digestíveis totais; CDMS =coeficiente de digestibilidade da matéria seca; CDMO = coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica; CDPB = coeficiente de digestibilidade da proteína bruta; CDFDNcp = coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; CDEB = coeficiente de digestibilidade da energia bruta. Valores seguidos com letras diferentes na mesma linha diferem (P<0,05) pelo teste de Tukey.

3.2. Parâmetros ruminais e eficiência de síntese de proteína microbiana

Não houve interação do tempo x tratamento nos valores de pH e N-NH₃ (P<0,05) (Figuras 1 e 2). Os valores médios de pH ruminal mais baixos foram observados nos animais alimentados com a relação V80:C20 (P<0,05), permanecendo abaixo de 6,0 depois das 4 horas após alimentação, nos outros tratamentos isso aconteceu 10 horas após alimentação (Figura 1).

Tabela 5. Médias de pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no rúmen, síntese de proteína microbiana (Pmic) e eficiência de síntese de Pmic (EMPS), erro padrão da média (EPM) e níveis descritivos de probabilidade (p-valor), em novilhos Nelores alimentados com diferentes relações V:C na dieta.

	Relação V:C (%)					EPM	P-valor		
	70:30	60:40	40:60	20:80	Dieta		Tempo	Dieta*Tempo	
pH	6,33 ^a	6,23 ^a	6,27 ^a	6,00 ^b	0,062	0,0052	<0,0001	0,6047	
N-NH ₃ , mg/dL	22,91 ^b	21,08 ^{bc}	18,38 ^c	31,86 ^a	4,482	<0,0001	<0,0001	0,1290	
AGCC total, mmol/L	98,74	101,57	96,84	104,87	5,993	0,2824	0,0013	0,2720	
Ácido Acético	67,47	68,29	64,56	64,99	3,310	0,2138	0,0019	0,5285	
Ácido Propiônico	16,07 ^b	17,23 ^b	18,09 ^b	23,59 ^a	2,341	0,0006	0,0308	0,8484	
Ácido /so-Butírico	0,93	0,95	0,97	1,01	0,058	0,3891	0,0196	0,2493	
Ácido Butírico	9,93 ^{ab}	11,03 ^a	9,07 ^b	11,75 ^a	1,292	0,0284	0,0288	0,2285	
Ácido /so- Valérico	2,89	3,40	3,03	3,09	0,227	0,1046	0,0902	0,1686	
Ácido Valérico	1,79	1,49	1,46	1,63	0,249	0,2071	0,0222	0,0688	
Relação A:P	4,26	4,16	3,82	3,61	0,552	0,3084	0,9268	0,4710	
Pmic (g/dia)	350,66 ^c	449,11 ^b	444,67 ^b	536,84 ^a	20,044	<,0001	-	-	
EMPS (g de Pmic/100 g MODR)	10,89	11,39	12,78	13,60	1,736	0,2559	-	-	

A:P = acetato: propionato, Pmic = síntese de proteína microbiana, EMPS= Eficiência de síntese de Pmic, MODR = matéria orgânica degradada no rúmen. Valores seguidos com letras sobrescritas diferentes na mesma linha diferem (P<0,05) pelo teste de Tukey.

As concentrações de N-NH₃ nas relações V70:C30 e V60:C40 não diferiram ($P>0,05$). Os valores de concentração máxima de N-NH₃ obtidos foram de 28,88; 35,30; 24,29 e 45,35 mg/100 mL, nas relações 70:30, 60:40, 40:60 e 20:80, respectivamente (Figura 2).

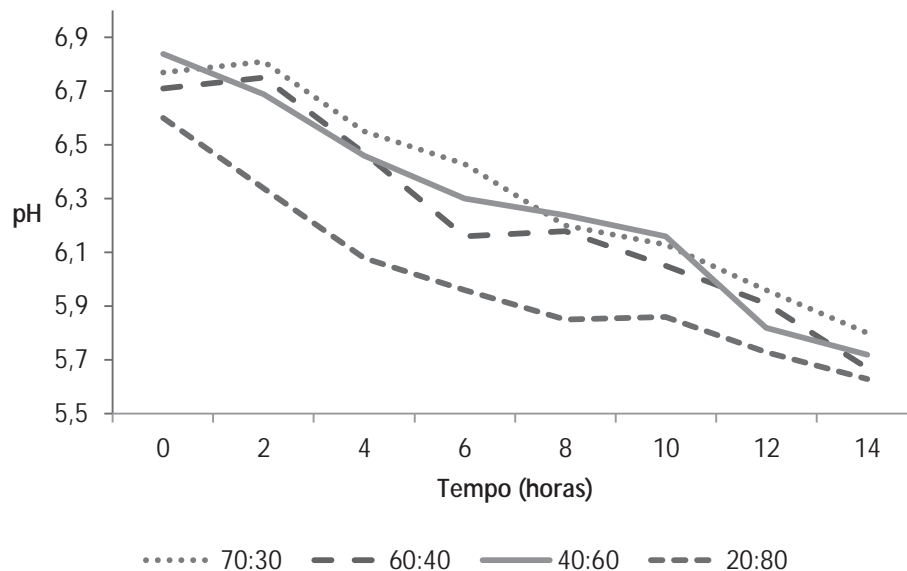


Figura 1. pH do fluido ruminal de novilhos em relação de tempo após a alimentação com diferentes relações V:C na dieta.

Nas relações V60:C40 e V40:C60 a concentração máxima de foi N-NH₃ obtida 2h após alimentação, sendo maior na relação V60:C40 ($P<0,05$), enquanto na relação 20:80 o pico de produção de amônia ocorreu 4h após alimentação (45,35 mg N-NH₃/dL). A relação V80:C20 apresentou maior concentração média de N-NH₃ ruminal (31,86 mg/dL) quando comparada com as demais relações V:C ($P<0,001$).

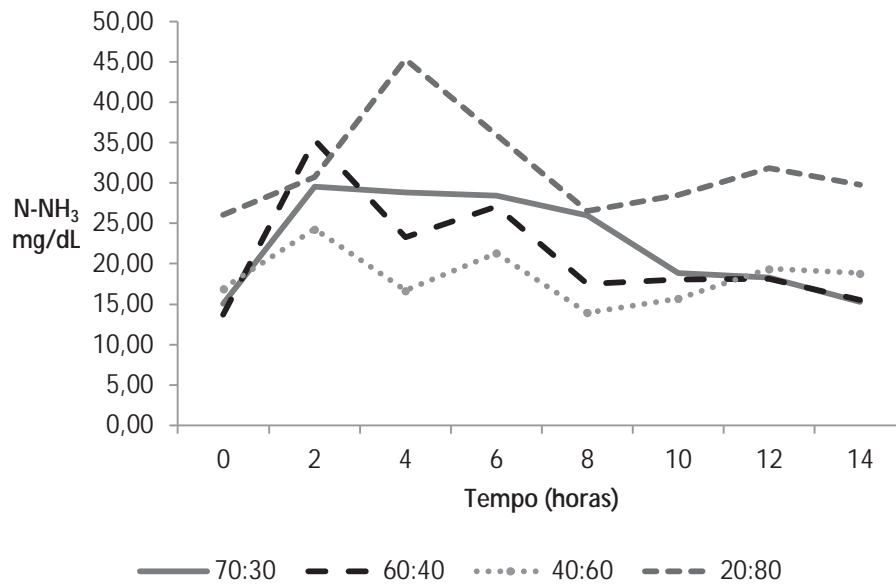


Figura 2. Concentrações de N-NH₃ do fluido ruminal de novilhos em relação de tempo após a alimentação com diferentes relações V:C na dieta.

A concentração média dos AGCC total, ácido acético, iso-butírico, iso-valérico e valérico, assim como a relação acetato: propionato não foram influenciados pelas relações V:C, no entanto na relação V20:C80 observou-se maior concentração de ácido propiônico ($P>0,05$), conforme observado na Tabela 5.

Houve interação tratamento x tempo na concentração do ácido valérico ($P<0,05$). A maior concentração de AGCC total foi observada na relação V20:C80 às quatro horas após alimentação, com média de 123,00 mmol/L ($P<0,05$), e nas relações V70:C30, V60:C40 e V40:C60 foram observadas as 14 horas após alimentação, com médias de 113,8; 114,8 e 116,8 mmol/L, respectivamente (Figura 3).

A maior síntese de proteína microbiana (Pmic) foi observada na relação V20:C80, menor na relação V70:C30, e as relações V60:C40 e V40:C60 não diferiram entre si ($P>0,05$). Quando observa-se a eficiência de síntese microbiana, todas as relações V:C testadas apresentaram valores similares ($P>0,05$) (Tabela 5).

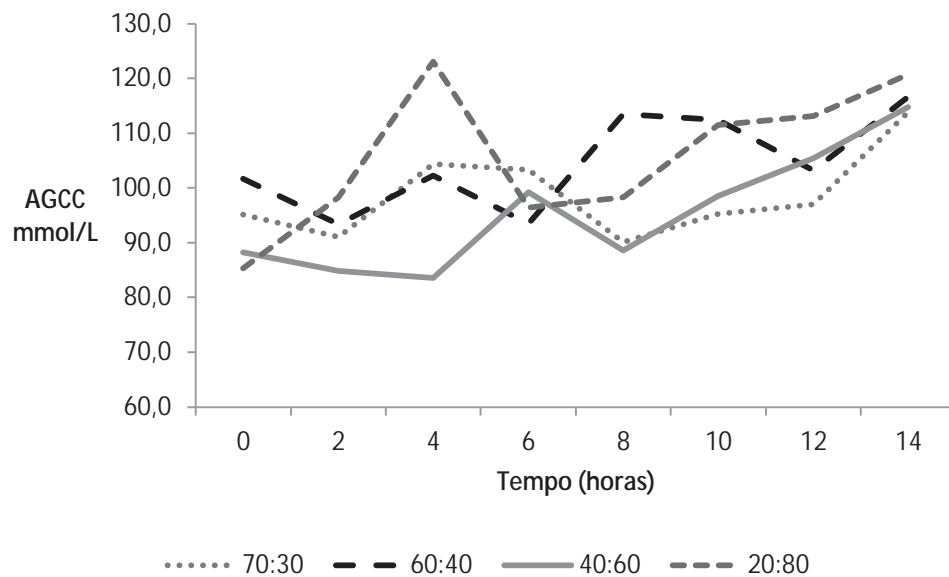


Figura 3. Concentrações de AGCC totais no fluido ruminal de novilhos em relação de tempo após a alimentação com diferentes relações V:C na dieta.

3.3. Microbiologia ruminal

Na quantificação das espécies de bactérias celulolíticas não foram observados efeitos ($P > 0,05$) nas populações de *Fibrobacter succinogenes* (Tabela 6), entretanto, a diminuição de volumoso da relação V70:C30 para V20:C80 reduziu ($P < 0,05$) a proporção relativa de *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens* no ambiente ruminal.

Tabela 6. Proporção relativa (%) de bactérias ruminiais em função das bactérias totais obtidas por PCR em tempo real, erro padrão da média (EPM) e níveis descritivos de probabilidade (p-valor) em novilhos Nelore alimentados com diferentes relações V:C na dieta.

	Relação V:C (%MS)		EPM	P-valor
	70:30	20:80		
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	0,008	0,007	0,0023	0,5454
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	0,134 ^a	0,015 ^b	0,0570	0,0498
<i>Ruminococcus albus</i>	0,561 ^a	0,045 ^b	0,1920	0,0284
<i>Selenomonas ruminantium</i>	0,030 ^b	0,079 ^a	0,0370	0,0252
<i>Streptococcus bovis</i>	0,0013	0,0031	0,0010	0,0656

Valores seguidos com letras sobrescritas diferentes na mesma linha diferem ($P < 0,05$).

A relação V20:C80 aumentou ($P < 0,05$) a amplificação do gene 16S das *Selenomonas ruminantium*, e a população de *Streptococcus bovis* tendeu a aumentar ($P < 0,10$) no ambiente ruminal dos animais alimentados com essa relação V:C.

A concentração total de protozoários ruminais foi semelhante ($P > 0,05$) nas diferentes relações V:C, com média de $206,33 \times 10^4$ ciliados por mL de líquido ruminal, com identificação de sete gêneros de protozoários ruminais (Tabela 6).

Na relação V60:C40 foram identificados os sete gêneros de protozoários, os gêneros *Polyplastron* e *Isotricha* apenas estiveram presentes nesta relação. Já os gêneros *Entodinium* e *Eudiplodinium* foram verificados em todos os tratamentos. O gênero *Entodinium* foi mais representativo em todas as relações, com média de 99,28%.

Tabela 7. Quantificação dos protozoários ciliados no rúmen, erro padrão da média (EPM) e níveis descritivos de probabilidade (p-valor), em novilhos Nelore alimentados com diferentes V:C na dieta.

Protozoários	Relação V:C (MS%)				EPM	P-valor
	70:30	60:40	40:60	20:80		
<i>Entodinium</i> ($n^{\circ} \times 10^6/\text{mL}$)	2,30	1,66	2,11	2,13	0,1095	0,3102
<i>Eudiplodinium</i> ($n^{\circ} \times 10^4/\text{mL}$)	0,28 ^b	0,64 ^a	0,04 ^c	0,08 ^c	0,0914	<,0231
<i>Metadinium</i> ($n^{\circ} \times 10^4/\text{mL}$)	0,44 ^a	0,20 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,0032	<,0010
<i>Eremoplastron</i> ($n^{\circ} \times 10^4/\text{mL}$)	0,00 ^c	1,84 ^a	0,08 ^b	0,16 ^b	0,1081	<,0314
<i>Diploplastron</i> ($n^{\circ} \times 10^4/\text{mL}$)	0,00 ^c	0,88 ^a	0,32 ^b	0,00 ^c	0,0019	<,0010
<i>Elytroplastron</i> ($n^{\circ} \times 10^4/\text{mL}$)	0,04 ^b	0,16 ^a	0,00 ^c	0,00 ^c	0,0008	<,0010
<i>Polyplastron</i> ($n^{\circ} \times 10^4/\text{mL}$)	0,00 ^b	0,02 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,0001	<,0010
<i>Isotricha</i> ($n^{\circ} \times 10^4/\text{mL}$)	0,00 ^b	0,04 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,0002	<,0010
Protozoários Totais ($n^{\circ} \times 10^6/\text{mL}$)	2,31	1,69	2,11	2,14	0,1284	0,3084
Protozoários Totais (\log_{10})	2,36	2,23	2,33	2,33	0,1102	0,3329

Valores seguidos com letras sobrescritas diferentes na mesma linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Nas relações com maior proporção de volumoso (V70:C30 e V60:C40) foram verificados os gêneros *Metadinium* e *Elytroplastron*, entretanto a presença dos gêneros *Eremoplastron* e *Diploplastron*, apenas foi confirmada nas relações com maior inclusão de concentrado (V60:C40, V40:C60 e V20:C80).

4. DISCUSSÃO

O maior tempo de pH ruminal abaixo de 6,0, na relação V20:C80, possivelmente foi o fator determinante da significativa diminuição na proporção relativa das principais espécies de bactérias celulolíticas *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens* (Tabela 6). Esses resultados são consistentes com as observações feitas por RUSSELL e DOMBROWSKI, (1980) que reportam alta sensibilidade desses microrganismos ao baixo pH, quando o pH do meio permanece abaixo de 6,0 sua atividade é reduzida.

A diminuição significativa do pH ruminal dos animais alimentados com a relação V20:C80, pode ser decorrente do menor consumo de FDNcp, controlado pela concentração desse nutriente na dieta, e do maior consumo de CNF (Tabela 4) que permitiu o acúmulo de AGCC no ambiente ruminal (Figura 3) pela rápida taxa de degradação desse nutriente no rúmen.

Estudos apontam que a espécie *Fibrobacter succinogenes* é altamente sensível ao ambiente ruminal ácido (RUSSELL e DOMBROWSKI, 1980 ; WEIMER, 1993). No entanto, isso não foi observado nos resultados encontrados, uma vez que apesar de o pH ruminal na relação V20:C80 permanecer em média mais baixo que na relação V70:C30, a proporção deste microrganismo se manteve semelhante em ambos tratamentos. Comparado com outras espécies celulolíticas, como as *R. albus* e *R. flavefaciens*, esta espécie digere a fibra mais rapidamente e em maior extensão (KOBAYASHI; SHINKAI e KOIKE, 2008). Deve-se destacar, que apesar dessas três espécies de bactérias serem as mais importantes na degradação da fibra no rúmen, existem outras populações bacterianas não avaliadas neste estudo, que participam na degradação ruminal da fibra, e que a digestibilidade depende de vários fatores como a taxa de passagem e o consumo. Esses fatores, possivelmente foram determinantes para que a digestibilidade da fibra não fosse influenciada nesse tratamento.

Apesar da diminuição do pH ruminal pelo aumento da proporção de concentrado nas dietas, a população de protozoários totais se manteve igual em todas as relações. A concentração média está dentro da faixa de 10^4 e 10^6 protozoários/mL de conteúdo ruminal (ARCURI et al., 2011). Dehority (2005) demonstrou que protozoários do gênero *Entodinium* podem manter suas concentrações normais no rúmen com pH 5,8, e que o número de protozoários deste gênero só diminuiu com

valores de pH abaixo de 5,6. Conforme observado na Figura 1, os valores de pH ruminal estiveram acima de 5,6, e o gênero *Entodinium* representou 99,28% dos protozoários mensurados (Tabela 7), permitindo assim manter as concentrações similares de protozoários ciliados em todas as relações V:C. Resultados similares foram reportados por Hook et al. (2011) ao avaliarem a população de protozoários ruminais em gado leiteiro durante a adaptação a dietas de alto grão.

O decréscimo da concentração de protozoários do gênero *Eudiplodinium* nas relações V40:C60 e V20:C80 está relacionado ao menor consumo de FDNcp (Tabela 4) nesses tratamentos. A preferência desse gênero de protozoários por engolir partículas de celulose e utilizar esse substrato no seu metabolismo (NAGA e EL-SHAZLY, 1968) pode ter limitado a atividade desses microrganismos.

A identificação dos gêneros *Metadinium*, *Elytroplastron* e *Polyplastron* nas relações V60:40 e V40:C60 é consistente com o maior consumo de FDNcp nessas dietas (Tabela 4). Esses gêneros de protozoários da sub família *Diplodiniinae* são considerados principalmente microrganismos celulolíticos, e aparecem normalmente associados com dietas de composição mista, em que o componente da fibra é importante (MARINHO, 1998). A presença do gênero *Diploplastron* nas relações V60:C40, V40:C60 e V20:C80, pode ser decorrente da particularidade desse gênero em participar como microorganismo fibrolítico e amilolítico na fermentação ruminal. A capacidade de digerir e utilizar amido foram reportados por Wereszka e Michałowski (2012).

O consumo similar de MS nas dietas foi possivelmente controlado pela demanda de energia, já que os níveis de consumo de FDN foram inferiores ao valor de 1,2% PV sugerido por MERTENS (1994). O maior consumo de NDT da relação V20:C80 pode estar relacionado à maior concentração desses nutrientes na dieta. No entanto, não foi observado diferenças significativas no consumo de NDT nas relações V70:C30, V60:C40 e V40:C60, sugerindo que a silagem de milho utilizada proporcionou alta quantidade de nutrientes digestíveis.

O aumento da digestibilidade aparente total da PB pela diminuição da relação V:C é possivelmente devido a qualidade da proteína da dieta, quando a participação de volumoso nas dietas decresceu, a frações indigestíveis desse nutriente na dieta também diminuíram (Tabela 2).

O aumento significativo na concentração de N-NH₃ no rúmen dos animais alimentados com a relação V20:C80, pode ser decorrente do aumento na concentração de proteína, do maior conteúdo de ureia em sua formulação (Tabela 2) e da maior degradação protéica ocorrida no rúmen. Em todas as relações V:C a concentração média de N-NH₃ permaneceu de maneira geral, acima do nível ótimo 10 mg/dL (Figura 2) recomendado por Satter e Roffler (1975) e Sampaio et al. (2010) necessário para permitir que o crescimento microbiano no rúmen.

A relação V20:C80 permitiu maior consumo de CNF e NDT, efeito que pode ser explicado pela maior concentração desses nutrientes na dieta. Isso, estimulou a síntese de proteína microbiana (Pmic) no rúmen. O efeito estimulador de dietas com alta proporção de concentrado sobre a microflora ruminal é resultado da maior digestibilidade dos concentrados que permite a disponibilidade de energia e compostos nitrogenados para os microrganismos ruminais. Embora algumas espécies fibrolíticas possam ser inibidas por dietas ricas em concentrado, como aconteceu neste estudo (Tabela 6), o resto da microflora ruminal aumenta em números (OSHIO et al., 1987). A similaridade na produção de Pmic nas relações V60:C40 e V40:C60, possivelmente, é reflexo do consumo e digestibilidade semelhante dos nutrientes, e dos valores similares de pH, AGCC e N-NH₃ desses tratamentos, que permitiram substratos, ambiente ruminal e características de fermentação similares para o crescimento microbiano.

A EMPS se manteve semelhante em todas as relações V:C da dieta (Tabela 5), portanto, deve notar-se que outros fatores além da proporção de nutrientes na dieta e o aumento das fontes de carboidratos rapidamente fermentáveis, estão relacionados à eficiência de síntese microbiana, como a sincronização da degradação dos alimentos que a compõem.

A concentração total de AGCC, ácido acético, iso-butírico, iso-valérico e valérico não foi influenciada pelas relações V:C, porém a relação 20:80 aumentou a concentração média de ácido propiônico (Tabela 5). Resultados similares foram reportados por Agle et al. (2010) em vacas leiteiras alimentadas com as relações 48:52 e 28:72.

A relação A:P diminuiu numericamente nos animais alimentados com a relação V20:C80 (Tabela 5), isso ocorreu pela maior produção de ácido propiônico nesse

tratamento, mas a grande variabilidade entre os animais não permitiu que essas diferenças alcançassem significância estatística. A maior concentração de ácido propiônico no rúmen de animais alimentados com a relação V20:C80 pode ser explicado pela maior inclusão de milho nessa dieta (Tabela 2) que se refletiu no maior consumo de CNF (Tabela 4). Estes resultados são consistentes com o aumento na proporção relativa de *Selenomonas ruminantium* no ambiente ruminal (Tabela 6), efeito explicado pela habilidade desse microrganismo em utilizar amido e açúcares da dieta para seu crescimento. A *S. ruminantium* é uma importante espécie produtora de ácido propiônico mediante descarboxilação do succinato (WOLIN e MILLER, 1997). Semelhante à experiência atual, o aumento da concentração de ácido propiônico no rúmen de bovinos alimentados com dietas de alto grão tem sido relatado por diversos autores (BAUMAN et al, 1971; SUTTON et al. , 2003)

Quando há maior consumo de CNF a rápida digestão do amido permite o acúmulo de glicose no líquido ruminal, a presença de glicose pode favorecer o crescimento de *Streptococcus bovis*, microrganismos anaeróbios facultativos, que promove a conversão de glicose ou piruvato em ácido láctico. *S. ruminantium* tem a capacidade de utilizar ácido láctico, favorecendo ao controle do pH ruminal (RUSSELL e BALDWIN, 1978). Assim, o aumento de sua população no ambiente ruminal pode ajudar ao aproveitamento da quantidade crescente de substratos fermentáveis e do ácido láctico produzido no rúmen em dietas com alta proporção de concentrado. O aumento significativo na população de *S. ruminantium*, na relação V20:C80, junto com a tendência de crescimento na população de *S. bovis* neste estudo, evidenciam a possível interação entre essas duas populações ruminais. O aumento nas populações de *S. ruminantium* e *S. bovis* no rúmen de bovinos alimentados com alta proporção de concentrado também foi reportado por Fernando et al., (2010).

5. CONCLUSÃO

Dietas com maior proporção de concentrado, geram um pH ruminal baixo, e inibem o crescimento das bactérias celulolíticas *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*, aumentam a concentração de ácido propiônico e a proporção de *Selenomonas ruminantium* no rúmen, melhoram a digestibilidade da proteína bruta da dieta e permitem maior síntese de proteína microbiana.

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, p.4211-4222, 2010.
- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC. **Energy and protein requirements of ruminants**. Oxon: CAB International, 1993. 159p.
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 15. ed. Washington: 1990.
- ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S.G de. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2011. P.111-140.
- 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.
- 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,
- 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.
- D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M. E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, Sao Paulo, v.16, p.725-729, 1999.
- DEHORITY, B. A. Effect of pH on viability of *Entodinium caudatum*, *Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum*, and *Ophryoscolex purkynjei* in vitro. **Journal Eukaryot Microbiology**, Hoboken, v.52, p.339-342, 2005.
- DEHORITY, B. A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, D.C, v.48, p. 182-185, 1984.
- DENMAN S. E.; MCSWENEY C. S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial population within the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v.58, p.572-582, 2006.
- ETHERIDGE, R. D.; PESTI, G. M.; FOSTER, E. H. Comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on sample typical of animal nutrition analytical laboratory. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.73, p.21-28, 1998.
- FENNER, H. Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, New York, v.48, 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 Environment Microbiology**, Washington D.C, v.72, n.22, p. 7482-7490. 2010.

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.

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.

HOOK, E. S.; STEELE, A. M.; NORTHWOOD, S. K.; WRIGHT, G. A. D.; McBRIDE, W. B. Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows. **Microbiology of Ecology**, Sacawas, v.62, p.94-105, 2011.

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 D.C, v.75, p. 7115-7124, 2009.

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

MARINHO, A. A. Protozoários ciliados do retículo-rúmen - Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.43, n.2, p.173-185, 1998.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.85, p.1212-1240, 2002.

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

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, p.3552–3562, 2006.

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, p.2676-2685, 2007.

NAGA, M. A.; EL-SHAZLY, K. The metabolic characterization of the ciliate protozoan *Eudiplodilzium medium* from the rumen of buffalo. **Journal of General Microbiology**, Berks, v.53, p.305-315, 1968.

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.

OSHIO, S.; TAHATA, I.; MINATO, H. Effect of diets differing in ratios of roughage to concentrate on microflora in the rumen of heifers. **The Journal of general and applied microbiology**, Tokyo, v.33, p.99–111, 1987.

PALMIQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high fat diets. **Journal of Dairy Science**, New York, v.74, p.3152, 1971.

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, 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, p. 2876-2887, 2000.

RUSSELL, J. B.; R. L. BALDWIN. Substrate preferences in rumen bacteria: evidence of catabolite regulatory mechanisms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.36, n.3, p. 319–329, 1978.

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, p. 763-775, 1983.

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.

SAMPAIO, C.B.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; SOUZA, M.A.; LAZZARINI, I.; PAULINO, P.V.R.; QUEIROZ, A.C. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Tropical Animal Health Production**, v. 42, p. 1471–1479, 2010.

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.E149–E158, 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, Nov. 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, p.3620–3633, 2003.

VALADARES FILHO, S.C.; MACHADO, S.P.; CHIZZOTTI, M.L.; AMARAL, H.F.; ROCHA JR, V.R.; CAPPELLE, E.R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010. p.502.

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

WEISS, W.P.; CONRAD, H.R.; ST. PIERRE, N.R. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.39, p.95-110, 1992.

WELKIE, D.G.; STEVENSON, D.M.; WEIMER, P.J. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. **Anaerobe**, London, v.16, n.1, 94-100, 2010.

WERESZKA, K.; MICHAŁOWSKI, T. The ability of the rumen ciliate protozoan *Diploplastron* affine to digest and ferment starch. **Folia Microbiology**, Doidreeht, v.57, n.5, p.375–377, 2012.

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

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.