

Níveis de proteína degradável para novilhas em crescimento sobre a concentração de protozoários ciliados e outros parâmetros ruminais

José Carlos Machado Nogueira Filho^{1*}, Susana Maria Martin-Orúe², Joaquim Balcells², Manuel Fondevila² e Denise de Souza Ablas¹

¹Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Av. Duque de Caxias - Norte, C.P. 23, 13.630-000, Pirassununga, São Paulo, Brasil. ²Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, M. Servet. 177, 50013, Zaragoza, Espanha. *Author for correspondence. e-mail: jocamano@usp.br

RESUMO. Em um ensaio de controle de parâmetros ruminais (pH, ritmo de trânsito (%h), volume ruminal (l), e concentração de protozoários ciliados), foram utilizadas quatro novilhas Holstein, canuladas no rúmen e duodeno, recebendo dietas com 4 níveis de proteína degradável, sem suplementar ou suplementadas com 25, 50 e 75 gramas de proteína degradável por quilo de concentrado em forma de uréia e caseína (98,2 e 93,2% de matéria orgânica e proteína bruta, respectivamente). As rações experimentais foram compostas por 25% de palha de cevada sem tratar e 75% de concentrado formulado em base a diferentes proporções (25/75 e 75/25) de milho/cevada, com 5% de resíduo de trigo e 5% de suplemento vitamínico mineral. Uma contínua infusão de marcador de fluxo de fase líquida (Cr-EDTA) foi executada. Os oito tratamentos experimentais (2 dietas x 4 níveis de infusão) foram administrados em 8 períodos de balanço em um delineamento cross-over, em esquema fatorial. O nível de infusão de N degradável afetou de forma significativa os valores médios ponderados de pH, que decresceram ao aumentar a suplementação ($p < 0,05$), e o efeito foi mais concreto na dieta de milho. O ritmo de trânsito da fase líquida ruminal, similar entre ambas dietas, foi aparentemente inferior durante o primeiro período experimental (8,65 vs. 10,56%/h) e decresceu com o nível de suplementação (10,16 vs. 9,20%/h). Ciliados encontraram-se mais concentrados para dieta de milho ($79,1 \times 10^3/\text{mL}$) que de cevada ($59,5 \times 10^3/\text{mL}$; $p < 0,1$). O gênero *Entodinium* alcançou 87,8% da população total. O gênero *Epidinium* apresentou menores valores com a dieta de cevada ($3,73$ vs. $1,89 \times 10^3/\text{mL}$, $p < 0,05$) e no segundo período experimental ($4,40$ vs. $1,25 \times 10^3/\text{mL}$, $p < 0,05$). As estimativas de ciliados totais no rúmen foram de 26,6 vs. $22,1 \times 10^5/\text{mL}$, $p < 0,05$, respectivamente para dietas de milho e cevada. As espécies de ciliados detectadas foram típicas de rações com elevados teores de concentrados.

Palavras-chave: protozoários ciliados, novilhas Holstein, parâmetros ruminais, proteína degradável.

ABSTRACT. Levels of degradable protein given to heifers for the ciliate protozoa concentration and other ruminal parameters. In this experiment four Holstein heifers fitted with rumen and duodenum canulae were utilized to evaluate the rumen parameters as pH, passage rate (%/h), volume (L) and ciliated protozoa concentration, when fed diets with four levels of rumen degradable protein. This was achieved supplementing 0, 25, 50 or 75 grams of degradable protein per kg of concentrate as a urea and casein (98.2% OM and 93.2% CP). The diets had 25% of barley straw without treatment and 75% concentrate formulated to contain different proportions (25/75 and 75/25) of corn and barley and also 5% of wheat residue and 5% of mineral and vitamin supplement. A continuous infusion of Cr-EDTA was used as a liquid phase marker. A cross-over design with 8 treatments (2 diets and 4 degradable protein levels) were utilized in 8 balance periods in a factorial arrangement. The level of degradable protein significantly affected the mean pH values that decreased as the supplementation increased ($P < 0.05$) mainly in the corn based diet. The passage rate of the liquid phase, similar for the diets, was lower in the first experimental period (8.65 vs. 10.56%/h) and decreased as the level of degradable protein increased. Ciliated protozoa had higher concentration ($P < 0.01$) in the corn diet ($79.1 \times 10^3/\text{mL}$) than in the barley diet ($59.5 \times 10^3/\text{mL}$). The *Entodinium* genus represented 87.8% of the total population. The genus

Epidinium showed lower values ($P < 0.05$) in the barley diet ($3,73$ vs. $1.89 \times 10^3/\text{mL}$) and in the second experimental period ($4,40$ vs. $1.25 \times 10^3/\text{mL}$). The estimates of total ciliated in the rumen were 26.6 vs. $22.1 \times 10^3/\text{mL}$, respectively for the corn and barley diets ($P < 0.05$). The ciliated species detected were typical of high concentrate diets.

Key words: ciliated protozoa, Holstein heifers, rumen parameters, rumen degradable protein.

Entre os microorganismos que habitam o rúmen, os protozoários constituem uma parte substancial do sistema ecológico daquele compartimento, desempenhando funções bioquímicas e fisiológicas importantes para os ruminantes. Em determinadas circunstâncias de alimentação e localização geográfica, podem representar mais de 75% da massa total de microorganismos presentes no rúmen-retículo (Church, 1974; Harrison e McAllan, 1980). Assim sendo, ajudam a regular a fermentação dos ingredientes dietéticos, especificamente de carboidratos mais solúveis (holotrichas) e material particulado contendo proteína (oligotrichas) (Nolan *et al.*, 1988; Williams, 1988; Hobson, 1989; Prins, 1991), e obtêm a energia necessária para sua manutenção e crescimento a partir da fermentação de carboidratos estruturais (celulose, hemicelulose e pectinas) e solúveis (açúcares e amido).

A presença de quantidades importantes de protozoários ciliados no rúmen melhora consideravelmente a renovação do N ruminal, melhorando significativamente a eficiência de síntese (Ushida *et al.*, 1990). A oferta de quantidades moderadas de concentrado aumenta a presença de ciliados no rúmen (Harrison e McAllan, 1980), ainda que quantidades elevadas aceleram os processos de fermentação propiônica, láctica, o pH e, conseqüentemente, pode ocorrer uma diminuição drástica de ciliados ou mesmo uma defaunação (Mackie, 1987).

A importância quantitativa de protozoários ciliados na biomassa ruminal dependerá do tipo de ração. Sua presença é limitada em rações constituídas por elevadas quantidades de concentrados, pela acidificação do meio ruminal, enquanto alcança níveis máximos com rações mistas de forragens/concentrado. Os protozoários participam da degradação da proteína dietética (Nugent e Morgan, 1981), contribuindo na liberação ao meio ruminal de compostos intermediários como peptídeos, aminoácidos e N-amoniaco, assim como da fermentação de carboidratos (Ushida *et al.*, 1990), por sua alta capacidade de usar amido e açúcares solúveis, evitando sua rápida fermentação a ácido láctico (Jouany e Ushida, 1990). Dessa maneira, a presença de protozoários ciliados estabiliza a fermentação ruminal, dificultando o abaixamento do pH do líquido ruminal.

Dennis *et al.* (1982) estudaram os efeitos dos níveis energéticos (30, 50 e 70% de concentrado) em dietas semi-purificadas e fonte de N (uréia ou farelo de soja) sobre o número e espécies de protozoários de rúmen de novilhas Holstein fistuladas e notaram que o número total de protozoários aumentou quando a porcentagem de concentrado aumentou ($1,5$; $2,5$ e $4,1 \times 10^5/\text{mL}$ para dietas concentradas de 30, 50 e 70%, respectivamente). As concentrações de *Dasytricha* não foram afetadas. Entretanto, o número de *Entodinium*, *Diplodinium*, *Isotricha*, *Epidinium* e *Ophryoscolex* aumentou conforme o teor de concentrado foi elevado. Já a uréia proporcionou concentrações de ciliados mais elevadas do que farelo de soja, contudo, *Isotricha* e *Dasytricha* apresentaram números menores com a dieta de farelo de soja. Os autores concluíram que dietas livres de proteína natural acarretam uma grande e complexa fauna de protozoários, os quais presumivelmente usam bactérias como fonte de N.

Pesquisas conduzidas por Purse e Moir (1966 a,b); Nour *et al.* (1979) e Nogueira Filho *et al.* (1989) conduziram que o número de protozoários ciliados aumentou a medida em que aumentou a adição de uréia.

Apesar de tudo, parece que os protozoários não são essenciais para um funcionamento normal do rúmen-retículo e sua presença tende a reduzir a eficiência energética do metabolismo protéico. Mesmo assim, seriam um fator de estabilidade da fermentação ruminal com indubitáveis vantagens em condições práticas de alimentação.

O objetivo deste trabalho foi determinar as espécies e concentrações de protozoários ciliados; controle de pH; ritmo de trânsito e volume ruminal em líquido de rúmen de novilhas Holstein, quando submetidas a dietas à base de concentrados (milho e cevada) sem suplementar ou suplementada com três níveis de proteína degradável em forma de uréia-caseína.

Material e métodos

Animais

Foram utilizadas 4 novilhas Holstein com idades de 1 ano e com peso corporal ao início do experimento de 302 ± 4 kg, canuladas no rúmen e no duodeno proximal.

Dietas

As dietas experimentais foram constituídas por 25% de palha de cevada e 75% de um dos seguintes concentrados:

- M:** 67,5% de milho, grão
22,5% de cevada, grão
5,0% de resíduo de trigo
5,0% de suplemento vitamínico-mineral
- C:** 22,5% de milho, grão
67,3% de cevada, grão
5,0% de resíduo de trigo
5,0% de suplemento vitamínico-mineral

Cada dieta foi usada com ou sem a suplementação de 25,50 e 75 g de proteína degradável por kg de concentrado, em forma de uréia-caseína (50:50 em termos de N) e sulfato de amônio em solução (Tabela 1), infundidos de forma contínua no rúmen, mediante uma bomba peristáltica (Miniplus-2, Gilson) ajustada para um fluxo de 1,9 mL/minuto.

Tabela 1. Níveis de infusão de caseína, uréia e sulfato de amônio em g/kg de M.S. da ração

Nível de infusão	Caseína	Uréia	Sulfato de Amônio
0	0	0	0
1	15,4	5,0	0,65
2	30,8	10,1	1,31
3	46,2	15,2	1,98

As Tabela 2 e 3 mostram a composição química das dietas e a composição do suplemento vitamínico.

Tabela 2. Composição química das dietas (g/100g de MS)

	Palha de Cevada	Ração M	Ração C
MS	92,7	88,3	89,3
MO	93,1	92,3	92,1
PB	2,91	9,35	10,81
FAD	46,4	4,55	5,52
FDN	77,6	18,6	25,6
Lignina	8,00	3,85	4,65
EE	1,52	2,28	1,76
Amido	ND	66,8	58,1

ND = Não Determinado

Tabela 3. Composição do suplemento vitamínico mineral Maxi-Nutral Novilhos precoces (Nutral S.A.), (g/30 kg, exceto vitamina A e D₃ em Unidades Internacionais)

Vitaminas	Minerais	
Vitamina A	10.000.000	Zinco (óxido de zinco)
D ₃	2.000.000	Magnésio
E	9	Óxido de magnésio
B ₁	2	Ferro (sulfato ferroso heptahidratado)
B ₂	1,7	Cobre (sulfato cúprico pentahidratado)
Ácido Nicotínico	5	Cobalto (sulfato de cobalto heptahidratado)
		Selênio (selenato sódico)
		Iôdo (iodeto potássico)
		Enxofre
		Fósforo
		Sódio
		Cálcio

Os oito tratamentos experimentais (2 dietas x 4 níveis de infusão) foram administrados em 8 períodos de balanço em um delineamento cross-over (cruzado), em esquema fatorial (Cochran e Cox, 1957). Cada ração base foi administrada simultaneamente a dois animais que receberam os 4 níveis de suplementação protéica, de forma crescente ou decrescente, conforme Figura 1.

Períodos	Subperíodos	Períodos de Balanço	Animais			
			A1 Ração Cevada (C)	A2 Ração Cevada (C)	A3 Ração Milho (M)	A4 Ração Milho (M)
P1	SP1	Pb1	3	0	3	0
		Pb2	2	1	2	1
	SP2	Pb3	1	2	1	2
		Pb4	0	3	0	3
P2	SP3	Pb5	3	0	3	0
		Pb6	2	1	2	1
	SP4	Pb7	1	2	1	2
		Pb8	0	3	0	3

Figura 1. Administração das rações basais (M e C) e dos níveis de infusão (0-4) durante os 8 períodos de balanço (Pb)

O período de adaptação à ração basal foi de 30 dias, iniciado com uma substituição paulatina de ração por 7 dias. A adaptação às mudanças no nível de suplementação protéica foi de 6 dias. Desta forma, exceto nos casos de substituição da ração basal, a duração de cada período experimental foi de 17 dias e iniciou com a mudança de infusão de proteína degradável via cânula ruminal, de acordo com a Figura 2.

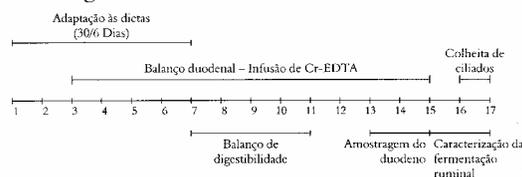


Figura 2. Desenvolvimento experimental

Infusão de Cr-EDTA

Uma contínua infusão de marcador de fluxo, (Cr-EDTA), como marcador da fase líquida, a uma dose de 120 mg de Cr/kg de MSI (matéria seca ingerida) foi executada da mesma maneira que para a solução de uréia-caseína e a um mesmo ritmo de infusão (1,9 mL/min). Dez dias depois do início da infusão do marcador, foram tomadas amostras do quimo duodenal (250 mL) a cada 6 horas, em um período do 48 horas (dia 13-14). As preparações de Cr-EDTA foram executadas de acordo com a técnica descrita por Downes e McDonald (1964). O ritmo de diluição do Cr no líquido ruminal foi determinado utilizando o modelo proposto por

Shiple e Clark (1972) que estabelece a regressão linear entre o logaritmo neperiano da concentração do marcador e o tempo, aceitando que a inclinação da regressão representa o ritmo de saída do marcador e da fase que representa (fase líquida).

Amostragens de Líquido Ruminal

Uma vez finalizada a infusão de marcador, foram tomadas amostras de líquido ruminal às 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas seguintes, para determinação de pH e ritmo de trânsito da fase líquida a partir da diluição do Cr-EDTA, para o qual foram tomadas amostras também às 24 e 36 horas.

O conteúdo ruminal colhido 4 horas após alimentação, por meio de bomba de vácuo (30-40 mL), foi depositado em um balão kitasato, e uma parcela de 10 mL transferida para um tubo de ensaio com 20 mL de formaldeído diluído em água destilada a 1:2. O material obtido ficou em repouso por uma noite, antes de ser submetido a uma diluição 1:20 em solução de glicerol a 50% em água destilada. O verde-brilhante foi o corante utilizado e as técnicas de contagens e identificação utilizadas foram as de Dehority (1977).

Métodos Analíticos

As amostras das rações foram analisadas para matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e extrato etéreo pelo método da Association of Official Analytical Chemists (1980). As determinações de fibra detergente neutro, fibra detergente ácido e lignina nos alimentos se realizaram seguindo as técnicas propostas por Goering e Van Soest (1975). A determinação do amido foi executada segundo técnica de Theander (1991).

Análise Estatística

Os animais (A) receberam as duas rações basais (O) em dois períodos experimentais (P) com uma suplementação protéica administrada de forma crescente ou decrescente (efeito tendência, T), em um delineamento cross-over 2x2 segundo o modelo:

$$Y = \mu + D_i + P_j + A_k + T_{l(k)} + \varepsilon_{ijkl}$$

Dentro de cada período e dieta, os animais foram suplementados com quatro níveis diferentes de proteína degradável (N) e por sua vez cada período foi subdividido em dois subperíodos (SP) (4 no total) coincidentes com o ajuste da oferta de alimento ao peso corporal dos animais. Para tanto, os dados foram analisados em um modelo de parcelas divididas ou "split-plot" seguindo o modelo:

$$y = \mu + D_i + P_j + A_k + T_{l(k)} + \varepsilon_{ijkl} + N_m + SP_{n(j)} + DXN_{im} + TXN_{l(k)m} + (\varepsilon_{ijklmn} - \varepsilon_{ijkl})$$

O efeito dieta (D_i), período (P_j), e animal (A_k) foram contrastados contra o erro residual 1 (ε_{ijkl}), o efeito tendência ($T_{l(k)}$) contra o efeito animal (A_k), enquanto o resto dos efeitos (N_m , $SP_{n(j)}$, DXN_{im} e $TXN_{l(k)m}$) foram contrastados contra o erro residual 2 ($\varepsilon_{ijklmn} - \varepsilon_{ijkl}$), segundo o procedimento descrito por Steel e Torrie (1980).

Para diferenciar o efeito dos distintos níveis de suplementação sobre os diferentes parâmetros em estudo, a soma de quadrados foi decomposta em contrastes ortogonais.

Todos os procedimentos estatísticos estão descritos em Steel e Torrie (1980) e as análises foram realizadas através do programa computacional Statistical Analysis System Institute (1991).

Resultados e discussão

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de pH ponderados aos tempos de amostragens para cada dieta, período e nível de infusão, valores máximos e mínimos de pH, ritmo de trânsito da fase líquida ruminal e volume ruminal.

O tipo de concentrado utilizado modificou as médias ponderadas de pH. Assim, os animais ao receberem milho apresentaram um pH mais alcalino do que os que receberam a cevada (6,37 vs. 6,29, $p < 0.05$) e este também se alcalinizou com o período experimental (6,28 vs. 6,37, $p < 0.05$).

O nível de infusão de N degradável afetou de forma significativa os valores médios ponderados de pH, que decresceram ao aumentar a suplementação, ainda que as diferenças tenham alcançado unicamente significância estatística entre a ração basal e os 3 níveis de suplementação (C1 $p < 0.05$). Este efeito foi mais concreto quando os animais ingeriram a dieta M, enquanto o equilíbrio iônico foi mais irregular com a ingestão da dieta C. Os valores de pH variaram ao longo do dia. Os máximos valores médios observados (6,79 e 6,88 para milho e cevada, respectivamente) coincidiram na maioria dos casos com o período imediatamente anterior à administração da ração (0 h) com um destaque situado entre às 7 e 9 h, de forma prévia, também, a segunda distribuição do alimento. Os valores médios mínimos (5,89 e 5,71 para milho e cevada, respectivamente) foram apreciados em torno das 6 e 12 h ainda que as mudanças registradas na dieta de cevada tenham sido mais abruptas.

A Tabela 4 apresenta também os valores máximos e mínimos de pH registrados com as distintas dietas, períodos experimentais e com o

nível de suplementação de proteína. Os valores de pH mínimo apresentaram uma variação em relação aos fatores principais do estudo, similar à descrita para as médias ponderadas, mesmo que neste caso as diferenças entre dietas tenham alcançado só uma tendência à diferença significativa (5,89 vs. 5,71 nas dietas de milho e cevada, respectivamente, $p = 0.07$). O mínimo valor de pH registrado foi de 5,4, ainda que a média dos valores mínimos (5,8) tenha se situado só ligeiramente abaixo de 5,6 – 6,0, valor a partir do qual é considerado que a população protozoária ciliada diminui de forma significativa.

Os valores máximos de pH não apresentaram diferenças significativas entre os dois tipos de concentrados oferecidos e em todo caso foram superiores com a dieta de cevada do que com a de milho (6,88 vs. 6,79) ao contrário do que ocorria com os valores mínimos. Tampouco, não foram observadas diferenças significativas relacionadas com o período experimental ou com a infusão de uréia-caseína.

Em geral, os níveis de pH (máximos, médios e mínimos) foram superiores durante o segundo

período experimental, ainda que unicamente os valores médios tenham alcançado diferença estatística significativa. Provavelmente, os animais se adaptaram paulatinamente às dietas e isso refletiu também em um incremento nas vantagens de protozoários ciliados (75,56 vs. 66,04 x 10³/mL, $p < 0,1$).

O ritmo de trânsito da fase líquida ruminal, similar em ambas as dietas, foi aparentemente inferior durante o primeiro período experimental (8,65 vs. 10,56%/h) e decresceu com o nível de suplementação protéica (10,16 vs. 9,20%/h). Não obstante, as diferenças alcançaram uma tendência estatística unicamente com o nível de suplementação.

O volume ruminal não apresentou diferenças significativas com nenhum dos parâmetros estudados, nem sequer com o período experimental.

A Tabela 5 apresenta as contagens de protozoários ciliados totais e dos diferentes gêneros, assim como a porcentagem relativa de cada um deles.

Tabela 4. pH, ritmo de trânsito (%h) e volume da fase líquida ruminal (l) estimados a partir da diluição de Cr-EDTA em quatro novilhas alimentadas com duas dietas baseadas em concentrados (dieta de milho e dieta de cevada) sem suplementar ou suplementada com três níveis de proteína degradável em forma de uréia-caseína

	Dieta		Período		DER ₁	D	P	Nível de infusão				DER ₂	N		
	Milho	Cevada	1	2				0	1	2	3		Lin	C ₁	C ₂
pH mínimo	5.89	5.71	5.75	5.85	0.140	T	NS	5.97	5.70	5.83	5.71	0.322	NS	NS	NS
pH máximo	6.79	6.88	6.80	6.87	0.190	NS	NS	6.88	6.79	6.80	6.86	0.130	NS	NS	NS
pH médio	6.37	6.29	6.28	6.37	0.038	*	*	6.46	6.21	6.35	6.29	0.150	NS	*	NS
Ritmo trânsito (%h)	9.44	9.78	8.65	10.56	2.348	NS	NS	10.16	9.66	9.41	9.20	0.944	T	T	T
Volume ruminal (l)	33.62	37.25	35.98	34.89	12.414	NS	NS	33.28	35.69	37.92	34.86	5.544	NS	NS	NS

DER= desvio estandar residual ou raiz do quadrado médio do erro contra o que se compararam o efeito dieta e período (DER₁), ou nível de infusão (DER₂); D, P, N= significação estatística do efeito dieta, período experimental e nível de infusão, respectivamente. No caso do nível de infusão, se analisou a significação da tendência linear de sua evolução e se compararam nível 0 vs. nível 1, 2 e 3 (C₁) e o nível 3 vs. nível 0, 1 e 2 (C₂) mediante uma análise de contrastes ortogonais; NS= não significativo; T= $p < 0.1$; * = $p < 0.5$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$

Tabela 5. Concentração (x 10³/mL) e porcentagem relativa dos distintos gêneros de protozoários ciliados determinados em 4 novilhas alimentadas com duas dietas baseadas em concentrados (dieta de milho e dieta de cevada), sem suplementar ou suplementada, com três níveis de proteína degradável em forma de uréia-caseína

	Dieta		Período		DER ₁	D	P	Nível de infusão				DER ₂	N		
	Milho	Cevada	1	2				0	1	2	3		Lin	C ₁	C ₂
Concentração (10 ³ /mL)															
<i>Entodinium</i>	69.90	54.14	57.40	66.64	24.592	NS	NS	51.00	57.95	73.35	65.78	37.540	NS	NS	NS
<i>Epidinium</i>	3.76	1.89	4.40	1.25	0.404	**	**	3.40	3.60	2.25	2.05	1.659	T	NS	NS
<i>Isotricha</i>	3.36	1.96	2.59	2.74	1.808	NS	NS	2.25	2.43	3.48	2.50	1.799	NS	NS	NS
<i>Dasytricha</i>	2.10	1.49	1.65	1.94	0.462	NS	NS	1.63	1.60	2.45	1.50	1.040	NS	NS	NS
Prot. Totais	79.13	59.48	66.04	72.56	24.548	NS	NS	58.28	65.58	81.53	71.83	38.836	NS	NS	NS
Porcentagem relativa															
<i>Entodinium</i>	86.40	89.20	85.16	90.44	8.848	NS	NS	86.14	86.95	89.94	88.17	6.509	NS	NS	NS
<i>Epidinium</i>	5.58	3.48	7.00	2.06	2.782	NS	T	5.80	5.52	2.89	3.90	2.225	*	NS	NS
<i>Isotricha</i>	5.07	4.02	4.72	4.36	2.760	NS	NS	4.73	4.50	4.15	4.78	3.384	NS	NS	NS
<i>Dasytricha</i>	2.96	3.30	3.12	3.14	4.208	NS	NS	3.33	3.02	3.02	3.16	2.061	NS	NS	NS
Estimativa de Prot. totais no rúmen (vol. ruminal x 10 ³ /mL)	26,6x10 ² 22,1x10 ³														

DER= desvio estandar residual ou raiz do quadrado médio do erro contra o que se compararam o efeito dieta e período (DER₁), ou nível de infusão (DER₂); D, P, N= significação estatística do efeito dieta, período experimental e nível de infusão, respectivamente. No caso do nível de infusão, se analisou a significação da tendência linear de sua evolução e se compararam nível 0 vs. nível 1, 2 e 3 (C₁) e o nível 3 vs. nível 0, 1 e 2 (C₂) mediante uma análise de contrastes ortogonais; NS= não significativo; T= $p < 0.1$; * = $p < 0.5$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

Em relação à análise estatística dos efeitos principais, foi observado que a variabilidade residual foi muito elevada, alcançando o coeficiente de variação residual valores de 56,0%. Desta forma, não foram encontradas diferenças significativas nas contagens individuais ainda que numericamente as variações tenham sido consideráveis (5,3; 85,0; 78,9 e 62,0 x 10³/mL para A₁, A₂, A₃ e A₄, respectivamente). A contagem total foi de 79,1 e 59,5 x 10³/mL para as dietas de milho e cevada, respectivamente (p<0,1). Tampouco não foram observadas diferenças com o período experimental, nem com o nível de suplementação, ainda que tenha sido observado um ligeiro incremento durante o segundo período (72,56 vs. 66,04 x 10³/mL) e com o nível de suplementação (52,28 vs. 72,98 x 10³/mL).

O gênero majoritário foi *Entodinium*, que alcançou 87,8% da população total. Os protozoários do gênero *Epidinium* representaram 4,53% da população e seu número foi modificado pelo tratamento experimental apresentando menores contagens com a dieta de cevada (3,76 vs. 1,89 x 10³/mL, p<0,05) e no segundo período experimental (4,40 vs. 1,25 x 10³/mL, p<0,05). A concentração de amônia também provocou um decréscimo linear nas contagens, sendo este descenso mais evidente a partir do nível 2 (p<0,10). Porém, decréscimos em valores absolutos e também em sua porcentagem relativa foram verificados, ainda que neste caso não tenham alcançado diferença estatística significativa.

Em rações com uma elevada proporção de concentrados, provavelmente devido à fragilidade do equilíbrio ruminal, existe uma elevada variabilidade na concentração de protozoários ciliados entre animais sob as mesmas condições de alimentação e inclusive entre dias de amostragem (Kreikemeier *et al.*, 1990; Franzolin e Dehority, 1996). Na Tabela 5, ainda que o coeficiente de variação tenha sido elevado (56%), não foram verificadas diferenças entre animais. Todas as novilhas apresentaram o mesmo tipo de população protozoária, com os mesmos gêneros e porcentagens. A proximidade dos animais em sua estabulação permitiu uma refaunação que homogeneizaria o tipo de fauna ruminal. Em relação à bibliografia consultada, a variação descrita é similar à obtida em outros trabalhos para condições de alimentação e níveis de pH médios similares (80,3 x 10³/mL) com 70% de concentrado e pH 5,9, Stokes *et al.* (1991); 81,0 x 10³/mL, com 75% de concentrado e pH 5,7, (Franzolin e Dehority, 1996).

Fatores como nível de ingestão, forma de preparação do alimento ou o ritmo de trânsito, poderiam determinar, junto com o pH, a maior ou

menor persistência dos protozoários no rúmen. Kreikemeier *et al.* (1990) em novilhos de engorda recebendo dietas com 0; 10 ou 15% de concentrados e oferecida a dois níveis de ingestão obtiveram concentrações de protozoários de 502 e 83 x 10³/mL para os dois níveis, sem detectar mudanças em relação ao pH do líquido ruminal.

As espécies de protozoários identificados (Tabela 6) são características de dietas com um elevado nível de concentrados, especialmente a elevada proporção de ciliados do gênero *Entodinium* capazes de tolerar baixo pH (Nogueira Filho, 1981; Nogueira Filho *et al.*, 1989; Franzolin e Dehority, 1996). As espécies de protozoários do gênero *Epidinium* mostraram-se mais sensíveis às mudanças do tipo de dieta com um menor número e porcentagem com a dieta de cevada do que com a de milho, provavelmente pelos menores valores de pH registrados. Também foi verificado (Tabela 5) que decresceram de forma significativa a partir do segundo nível de suplementação, quiza por uma intolância de concentrações de amônia, ainda que variações no pH ruminal não possam ser descartadas. Em relação às espécies de *Entodinium*, Nour *et al.* (1979) e Nogueira Filho *et al.* (1989) descreveram incrementos na concentração ou porcentagem com a suplementação com uréia, que não puderam ser constatados no presente trabalho, ainda que se tenha apreciado um incremento numérico que alcançou significação estatística.

Tabela 6. Espécies de protozoários ciliados identificados

Holotricha	<i>Dasytricha ruminantium</i> <i>Isotricha intestinalis</i> <i>Isotricha prostoma</i>
Entodiniomorfos	<i>Entodinium bursa</i> <i>Entodinium dilobum</i> <i>Entodinium longinucleatum</i> <i>Entodinium exiguum</i> <i>Entodinium minimum</i> <i>Entodinium simplex</i> <i>Epidinium ecaudatum</i> <i>Entodinium ecaudatum</i> forma caudatum

Referências

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. A.O.A.C. *Official methods of analysis*. 13. ed. Wisconsin: George Banta Co. 1980.
- CHURCH, D.C. *Fisiologia digestiva y nutrición de los rumiantes*. Zaragoza: Ed. Acribia, v.1, 1974.
- COCHRAN, W.G.; COX, G.M. *Experimental designs*. New York: Wiley e Sons, Inc., 1957.
- DEHORITY, B.A. *Classification and morphology of rumen protozoa*. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1977.

- DENNIS, S.M. *et al.* Effect of energy concentrations and source of nitrogen on numbers and types of rumen protozoa. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 66, p. 1248-1254, 1982.
- DOWNES, A.M.; MCDONALD, I.W. The chromium-51 complex of ethylenediaminetetraacetic acid as a soluble rumen marker. *Br. J. Nutr.*, Cambridge, v. 18, p. 153-162, 1964.
- FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B.A. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 74, p. 2803-2809, 1996.
- GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. *Forage fiber analysis*. Agricultural Research Service. Agricultural Handbook nº 379. US Department of Agriculture, 1979.
- HARRISSON, D.G.; MCALLAN, A.B. Factors affecting microbial growth yields in the reticulo-rumen. In: RUCKEBUSH, Y.; THIVEND, P. (Ed.). *Digestive Physiology and metabolism in ruminants*, Lancaster: Ed. MTP Press, 1980. p. 205-226.
- HOBSON, P.N. (Ed.) *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Applied Sci, 1989.
- JOUANY, J.P.; USHIDA, K. Protozoa and fibre digestion in the rumen. In: MOSHINO, S. *et al.* (Ed.). *The rumen ecosystem*. Tokyo: Japan Scientific Societies Press. Springer-Verlag, 1990. p. 139-150.
- KREIKEMEIER, K.K. *et al.* Steam-rolled wheat diets for finishing cattle: effects of dietary roughage and feed intake on finishing steer performance and ruminal metabolism. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 68, p. 2130-2141, 1990.
- MACKIE, R.J. Microbial digestion of forages in herbivores. In: Hacker, J.B.; Ternouth, J.H. (Eds.). *The nutrition of herbivores*. 1987. p. 233-265,
- NOGUEIRA FILHO, J.C.M. *Contribuição ao estudo sobre protozoários em rúmens de bezerras de rebanhos leiteiros*. 1981. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Botucatu, 1981.
- NOGUEIRA FILHO, J.C.M. *et al.* Efeitos da administração de uréia protegida sobre a população de protozoários ciliados em rúmen de ovinos (*Ovis aries*) da raça Hampshire Down. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 26, 1989, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: SBZ, 1989, p.182.
- NOLAN, J.V. *et al.* *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Armindale: Penambul Books, 1988.
- NOUR, A.M. *et al.* Effect of increased levels of urea in the diet on ruminal protozoal counts in four ruminants species. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 49, p. 1300,1305, 1979.
- NUGENT, J.H.A.; MORGAN, J.L. Characteristics of the rumen proteolysis of fraction 1 (18S) leaf protein from lucerne (*Medicago sativa*). *Br. J. Nutr.*, Cambridge, v. 37, p. 333-343, 1981.
- PRINS, R.A. The rumen ciliates and their functions. In: *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. Paris: Ed. J.P. Jouany, pp.39-52, INRA Editions, 1991.
- PURSE, D.B.; MOIR, R.J. Variation in rumen volume and associated effects as factors influencing metabolism and protozoa concentrations in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 25, p. 516-520, 1966 (a).
- PURSE, D.B.; MOIR, R.J. Dietary effects upon concentrations of protozoa in the rumen. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v. 25, p. 668,674, 1966(b).
- SAS. *Users guide, Statistics*, version 5. SAS Inst., Cary, NC.
- SHIPLEY, R.A.; CLARK, R.E. *Tracer methods for in vivo kinetics: theory and applications*. New York: Academic Press, 1972.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. *Principles and procedures of statistic*. McGraw-Hill Inc., 1980.
- STOKES, J.R. *et al.* Ruminal digestion and microbial utilization of diets varying in type of carbohydrate and protein. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 64, p. 871-881, 1991.
- THEANDER, O. Chemical analysis of lignocellulose material. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Amsterdam, v. 32, p. 35-44, 1991.
- USHIDA, K. *et al.* Effect of defaunation on protein and fibre digestion in sheep fed on ammonia-treated straw-based diets with or without maize. *Br. J. Nutr.*, Cambridge, v. 64, p. 765-775, 1990.
- WILLIAMS, A.G. Metabolic activities of rumen protozoa. In: NOLAN, J.V. *et al.* (Ed.). *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Armindale: Penambul Books, pp.-97-126, 1988.

Received on September 26, 2000.

Accepted on January 24, 2001.