

WILLIAM LIMA SANTIAGO DOS REIS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO PROTEICA EM BOVINOS
CONSUMINDO FORRAGENS TROPICAIS SOBRE A DEGRADAÇÃO DA
FIBRA INSOLÚVEL, ATIVIDADE DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS E
PERFIL DA COMUNIDADE MICROBIANA RUMINAL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

R375e
2014

Reis, William Lima Santiago dos, 1987-

Efeito da suplementação proteica em bovinos consumindo forragens tropicais sobre a degradação da fibra insolúvel, atividade de enzimas fibrolíticas e perfil da comunidade microbiana ruminal / William Lima Santiago dos Reis. – Viçosa, MG, 2014.

x, 55f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Edênio Detmann.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.49-55.

1. Bovino - Alimentação e rações. 2. Bovino - Nutrição animal. 3. Suplementação proteica. 4. Microbiologia ruminal. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.2

WILLIAM LIMA SANTIAGO DOS REIS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO PROTEICA EM BOVINOS
CONSUMINDO FORRAGENS TROPICAIS SOBRE A DEGRADAÇÃO DA
FIBRA INSOLÚVEL, ATIVIDADE DE ENZIMAS FIBROLÍTICAS E
PERFIL DA COMUNIDADE MICROBIANA RUMINAL**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do
título de Magister Scientiae

APROVADA: 26 de fevereiro de 2014.

Edenio Detmann
(Orientador)

Hilário Cuquetto Mantovani
(Coorientador)

Cláudia Batista Sampaio

Cláudia Braga P. Bento

Ao Criador pela vida, pela oportunidade de questionar, de mudar e de evoluir.

Aos meus pais Otávio e Marluce, pelos valores a mim transmitidos e pelo apoio, preocupação e carinho.

Aos meus irmãos Otávia, Thais, Renata, Meredites e Paula, pelas palavras de incentivo, pelas alegrias, histórias e ensinamentos compartilhados e, sobretudo, pela certeza que por mais que nossos caminhos tenham tomado estradas tão distintas sei que vocês sempre estarão presentes.

Às minhas sobrinhas, que enchem de alegria e renovam nossa família.

À Janaina, que presenciou de perto todos os percalços que apareceram na trilha que destinava a esta conquista e esteve sempre presente com uma palavra de incentivo, carinho e pronta para ajudar-me.

A todos os mestres e professores que passaram por minha vida, dentre esses, a Vó Glicéria, que na minha infância foi uma espécie de “Google” antes mesmo da internet.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e aos Departamentos de Zootecnia e de Microbiologia, por tornarem possível a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do experimento.

À FAPEMIG e ao INCT Ciência Animal, pelo apoio para a realização deste trabalho.

Ao professor Edenio Detmann, pelo ensinamentos e orientação desde o início da graduação e pela ajuda inestimável na elaboração desta dissertação.

Ao professor Hilário Mantovani, pelos conselhos e por ter colocado à disposição o Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios.

À Cláudia, pelas sugestões e pelo apoio técnico sem o qual teria sido impossível a realização deste trabalho.

Aos demais colegas do Laboratório de Anaeróbios: Analice, pela ajuda e pela atenção e esmero nas explicações. Elsa, Deborah, Wemerson, Bianca, Isabela, Sophia e Felipe, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

A todos colegas do Grupo de Pesquisa de Nutrição de Bovinos em Pastejo, em especial ao Érick e a Luana, pela inestimável ajuda na obtenção dos dados e pela prontidão com que me atenderam e me ajudaram sempre que necessitei.

À Daiany, por todo trabalho conduzido e, sobretudo, por incentivar o grupo a explorar novas áreas, muito obrigado. Você já está colhendo frutos, outros ainda virão.

A todos meus familiares e aos amigos de Sericita, pelas palavras de incentivo.

A todo esquadrão da ZOO7: “Tony Ramos”, Luiz, “Leandrão”, “Chu”, “Cesinha”, Victor e demais colegas de pós que estão sempre de prontidão para ajudar.

Aos membros da banca, por aceitarem contribuir com este trabalho.

Por fim, a todos que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho e em minha formação profissional. Muito Obrigado!

BIOGRAFIA

William Lima Santiago dos Reis, filho de Otávio dos Reis Filho e Marluce Lima Santiago dos Reis, nasceu no dia 7 de setembro de 1987 em Ponte Nova, Minas Gerais.

Em março de 2007 iniciou o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, concluindo em setembro de 2012. Neste mesmo período iniciou o curso de mestrado em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nutrição de Ruminantes, submetendo-se à defesa de dissertação em 26 de fevereiro de 2014.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
Introdução	1
Material e Métodos	8
Resultados.....	23
Discussão.....	38
Conclusão.....	48
Referências Bibliográficas.....	49

RESUMO

REIS, William Lima Santiago dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Efeito da suplementação proteica em bovinos consumindo forragens tropicais sobre a degradação da fibra insolúvel, atividade de enzimas fibrolíticas e perfil da comunidade microbiana ruminal.** Orientador: Edenio Detmann. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Sebastião de Campos Valadares Filho.

Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação proteica ruminal e/ou abomasal em bovinos consumindo forragens tropicais sobre as características nutricionais, a atividade enzimática fibrolítica, a degradação in vitro da fibra insolúvel e o perfil da comunidade bacteriana ruminal. Dois experimentos foram realizados sequencialmente diferindo apenas na qualidade do feno ofertado, sendo de média qualidade (78,4 g de proteína bruta/kg de matéria seca) e alta qualidade (98,6 g de proteína bruta/kg de matéria seca), respectivamente. Os procedimentos experimentais foram os mesmos para ambas as forragens. Foram utilizados quatro novilhos Nelore, não castrados, com peso corporal médio de 227 ± 11 kg, fistulados no rúmen e no abomaso. Foram avaliados os seguintes esquemas de suplementação: controle (somente forragem); suplementação nitrogenada ruminal (fornecimento diário de 230 g de proteína suplementar no rúmen); suplementação nitrogenada abomasal (fornecimento diário de 230 g de proteína suplementar no abomaso) e suplementação nitrogenada ruminal e abomasal (fornecimento diário de 230 g de proteína suplementar, sendo 115 g no rúmen e 115 g no abomaso). A alimentação volumosa basal foi constituída por feno de tifton 85 (*Cynodon spp*) e como fonte de compostos nitrogenados suplementares foi utilizada a caseína (caseína pura, Labsynth). O experimento foi conduzido segundo delineamento em quadrado latino 4 x 4 balanceado para efeitos residuais, sendo dois quadrados sequenciais, um para cada forragem, com quatro esquemas de suplementação, quatro animais e quatro períodos experimentais com 29 dias em cada quadrado. Não foram observados efeitos ($P > 0,05$) da qualidade da forragem ou do esquema de suplementação sobre o consumo de matéria orgânica (MO). Por outro lado, o consumo de fibra em detergente neutro (FDN) foi superior ($P < 0,05$) quando forragem de alta qualidade foi ofertada aos animais. O coeficiente de digestibilidade total da MO foi incrementado ($P > 0,05$) pela suplementação e pela melhoria na qualidade da forragem. O coeficiente de digestibilidade da FDN não foi afetado pelo esquema de suplementação ($P > 0,05$), mas foi superior quando os animais receberam forragem de alta qualidade ($P < 0,05$). O

balanço aparente de compostos nitrogenados no rúmen (BNR) foi ampliado ($P < 0,05$) pela suplementação no rúmen e no rúmen-abomaso. Ressalta-se que a ausência de suplementação ou a suplementação exclusiva no abomaso proporcionam valores negativos de BNR. O balanço aparente de compostos nitrogenados no organismo animal foi ampliado ($P < 0,05$) pelo fornecimento de suplemento, independentemente do local de suplementação, e pelo fornecimento de forragem de melhor qualidade. A suplementação no rúmen incrementou ($P < 0,05$) a concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR). Por outro lado, animais recebendo suplementação no rúmen e abomaso ou exclusivamente no abomaso apresentaram concentrações de NAR similares ($P > 0,05$) a animais não suplementados. A riqueza e a diversidade microbiana da fase sólida da digesta ruminal não foram afetadas ($P > 0,05$). Entretanto, a riqueza e a diversidade bacteriana associada à fase líquida da digesta ruminal foram incrementadas ($P < 0,05$) pela melhoria na qualidade da forragem. A taxa de degradação da FDN foi ampliada ($P < 0,05$) pela suplementação no rúmen. A atividade da carboximetilcelulase foi reduzida ($P < 0,05$) pela suplementação no abomaso e rúmen-abomaso. A atividade da xilanase foi deprimida ($P < 0,05$) pela suplementação pós-ruminal somente quando forragem de alta qualidade foi fornecida aos animais. Não foi observada correlação ($P > 0,05$) entre as variáveis associadas à atividade enzimática e diversidade microbiana e as características ligadas ao desempenho nutricional, exceção feita à correlação positiva ($P < 0,05$) entre a taxa de degradação da FDN e o BNR. A avaliação multivariada da diversidade permitiu evidenciar que comunidades bacterianas distintas estão associadas às frações líquida e sólida, independente da qualidade da forragem ofertada. Percebeu-se que a variação na qualidade da forragem influencia a diversidade microbiana associada à fração líquida do fluido ruminal, embora não tenha exercido tal efeito sobre a fração sólida. Em nenhuma avaliação percebeu-se efeito claro do esquema de suplementação sobre o perfil da comunidade microbiana ruminal. A melhoria da qualidade da forragem amplia a digestibilidade da fibra e a retenção de nitrogênio e é capaz de modificar a comunidade bacteriana associada à fração líquida do conteúdo ruminal. A suplementação proteica, por sua vez, independentemente do local de suplementação, amplia a retenção de nitrogênio no organismo animal.

ABSTRACT

REIS, William Lima Santiago dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2014. **Effect of protein supplementation in cattle fed tropical forages on the degradation of insoluble fiber, activity of fibrolytic enzymes, and rumen microbial communities profile.** Adviser: Edenio Detmann. Co-Advisers: Hilário Cuquetto Mantovani and Sebastião de Campos Valadares Filho.

This work aimed to evaluate the effects of ruminal and/or abomasal protein supplementation in cattle fed tropical forages on nutritional variables, degradation of insoluble fiber, activity of fibrolytic enzymes and rumen bacterial communities profile. Two experiments were carried out sequentially, and in the same way, differing only on the forage quality that was defined based on crude protein content: medium quality (784 g of crude protein/ kg of dry matter) and high quality (986 g of crude protein/ kg of dry matter). Four Nelore young bulls, averaging 227 ± 11 kg body weight and fitted with ruminal and abomasal cannulas, were used. The following treatments were evaluated: control (only forage), ruminal nitrogenous compounds supplementation (daily supply of 230 g of crude protein in the rumen), abomasal nitrogenous compounds supplementation (daily supply of 230 g of crude protein in the abomasum), and ruminal and abomasal nitrogenous compounds supplementation (daily supply of 230 g of protein, being 115 g in the rumen and 115 g in the abomasum). Casein was used as protein source for supplementation and basal diet consisted of Tifton 85 (*Cynodon* spp) hay. Two 4 x 4 Latin squares experimental trials, balanced for residual effects, with four treatments, four animals and four experimental periods lasting 29 days each, were implemented sequentially, one for each forage as stated above. There were no effects ($P > 0.05$) of supplementation scheme or forage quality on organic matter (OM) intake. On the other hand, neutral detergent fiber (NDF) intake was higher ($P < 0.05$) when animals were fed high quality forage. The total digestibility of OM was increased ($P < 0.05$) by supplementation and by increasing forage quality. The digestibility coefficient of NDF was not affected by supplementation scheme ($P > 0.05$), but was increased by the enhancing in forage quality. The apparent ruminal nitrogen balance (RNB) was increased ($P < 0.05$) when animals were supplemented in rumen or in both rumen and abomasum cannula. It is worth highlighting that no supplementation or exclusively abomasal supplementation led to negative values of RNB. The apparent nitrogen balance (NB) was increased ($P > 0.05$) when high quality forage was fed to the animals and by supplementation, no matter if the supplement was infused into rumen,

abomasum or both. Ruminal supplementation enhanced ($P < 0.05$) the concentration of rumen ammonia nitrogen (RAN). Although, animals supplemented in rumen and abomasum or exclusively in abomasum did not exhibit increase in RAN concentrations ($P > 0.05$) when compared to no supplemented animals. The bacterial richness and diversity (Shannon-Wiener index) associated with the solid phase of rumen digesta were not affected ($P > 0.05$). However, richness and diversity associated with the liquid phase were increased ($P < 0.05$) by the improvement in forage quality. NDF degradation rate (kp) was enhanced ($P < 0.05$) by ruminal supplementation. Carboxymethylcellulase activity was decreased ($P < 0.05$) by the abomasal and ruminal/abomasal supplementation. Xylanase activity was decreased ($P < 0.05$) by both post-ruminal supplementation schemes, when high quality forage was fed to the animals. It was not detected correlations among variables associated with bacterial diversity and activity and variables associated with nutritional performance, excepted for the positive correlation between kp and RNB Clustering analyses based on the Unweighted Pair Group Method (UPGMA) evidenced that distinct bacterial communities are associated with liquid and solid fraction, independently of the forage quality. Clustering analyses also showed that forage quality affects the diversity of liquid phase associated bacteria, even though, effects on solid phase was not clear. None of the evaluations related to the microbial community were able to detect clear effects of supplementation on the microbial community diversity. Improving forage quality enhances fiber digestibility, nitrogen balance and modifies the bacterial community associated with liquid phase. On the other hand, protein supplementation enhances the nitrogen retention in animal body.

Introdução

O pasto é o principal constituinte da dieta de bovinos no Brasil, haja vista que, apesar de crescente, o percentual do rebanho bovino confinado no Brasil é baixo. Deste modo, o pasto fornece a maioria da energia e dos nutrientes necessários à produção da carne bovina brasileira. Apesar disto, devido ao alto teor de fibra nos pastos tropicais, era comum atribuir a este ao menos parte da responsabilidade pelos baixos índices produtivos da agropecuária nacional. Entretanto, as gramíneas tropicais possuem grande vantagem competitiva que é o alto potencial de produção de energia digestível a partir da parede celular (Detmann et al., 2008).

Todavia, deve-se ressaltar que o coeficiente de digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN) é altamente dependente da relação com os demais nutrientes dietéticos (Detmann et al., 2008); assim a extração e transformação da energia oriunda da FDN em produtos de origem animal pelos ruminantes depende de estratégias de suplementação que visem contornar as deficiências nutricionais às quais os animais em pastejo são submetidos (Paulino et al., 2008). Apesar do caráter múltiplo dessas deficiências, superadas as deficiências minerais, a proteína constitui o primeiro limitante para a produção de bovinos em pastejo nos trópicos (Detmann et al., 2010).

Quando associada à forragem de baixa qualidade, a adição de proteína à dieta amplia a capacidade ruminal de fermentação da fibra insolúvel. O aumento da taxa de degradação da fibra reduz o efeito de repleção ruminal e, desta maneira, propicia maior consumo de fibra digerida e, conseqüentemente, maior consumo de energia proveniente do pasto (Detmann et al., 2010).

No Brasil estas condições são comumente encontradas nas pastagens no período seco do ano. Neste período o teor de proteína bruta (PB) da forragem é baixo (40 a 70 g

PB/kg de matéria seca) e o teor de compostos fibrosos recalcitrantes à degradação é maior. Todavia, a ocorrência desses fenômenos no período chuvoso não seria de tudo inesperada, pois, apesar das gramíneas apresentarem em geral melhor qualidade, expressa principalmente através do maior teor proteico (80-110 g PB/kg de matéria seca), as grandes variações climáticas inerentes ao verão tornam a qualidade da gramínea bastante variável.

De qualquer forma, mesmo no período de melhor qualidade das gramíneas, a proteína continua exercendo papel chave na suplementação de bovinos, sendo responsável pelo aumento do balanço de nitrogênio ou do ganho de peso, como evidenciado em diversos trabalhos de pesquisa conduzidos no Brasil (Zervoudakis, 2003; Zervoudakis et al., 2008; Porto, 2009; Costa et al., 2011a; Bastista, 2012). Entretanto, a melhoria das características relacionadas à dinâmica ruminal da fibra parece ter menos importância nessas condições (Detmann et al., 2010). O que ocorre nessas situações são modificações no metabolismo animal que ampliam a retenção do nitrogênio através da redução da proporção do nitrogênio reciclado ao rúmen ou da redução de condições metabólicas negativas como, por exemplo, catabolismo de tecido muscular e utilização de aminoácidos do pool sanguíneo para o atendimento das exigências do ambiente ruminal (Rufino, 2011; Batista, 2012).

A concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) tem se mostrado uma importante variável para se avaliar a resposta animal à suplementação. Relações funcionais têm sido traçadas entre os níveis de NAR, seus efeitos sobre o aproveitamento da dieta e sobre o status nutricional de animais pastejando gramíneas de baixa ou alta qualidade (Detmann et al., 2009; Rufino, 2011; Detmann et al., 2013). Assim, se estabeleceu para animais consumindo forragem de baixa qualidade a necessidade mínima de 8 mg NAR/dL para maximização da extração de energia oriunda

da fibra do pasto e 15 mg NAR/dL para maximização do consumo de pasto e do fluxo de proteína microbiana para o intestino (Detmann et al., 2009). Para animais consumindo forragem de alta qualidade observou-se serem necessários 13 mg NAR/dL para ampliar o balanço ruminal de compostos nitrogenados e reduzir a proporção de nitrogênio reciclado como ureia para o rúmen (Detmann et al., 2010).

Entre os principais fatores que influenciam a estrutura da comunidade microbiana ruminal estão a dieta e o animal. Os efeitos da dieta sobre a comunidade microbiana têm sido demonstrados por intermédio do cultivo de micro-organismos ruminais desde o estabelecimento destas técnicas na década de 1950 (Dehority & Orpin, 1997) e recentemente através das técnicas de biologia molecular como eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), análise de espaçador intergênico ribossomal automático (ARISA), reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) e pirosequenciamento (Kocherginskaya et al., 2001; Regensbogenova et al., 2004; Duval et al., 2007; Sadet et al., 2007; Freitas et al., 2008; Kim et al., 2011; Wu et al., 2012).

Os efeitos do animal sobre a comunidade microbiana também têm sido demonstrados (Brulc et al., 2009; Hernandez-Sanabria et al., 2010; Weimer et al., 2010). Em alguns estudos sugeriu-se que existe até mesmo uma relação entre animais mais eficientes na utilização dos nutrientes e a capacidade desses em manter uma microbiota específica (Guan et al., 2008; Hernandez-Sanabria et al., 2010; 2012). A confirmação dessas hipóteses e a criação de ferramentas para identificação destes animais pode abrir caminho para uma nova forma de selecionar animais mais eficientes na utilização de nutrientes. Neste contexto e diante da alta variabilidade dos ganhos de peso de animais em recria pastejando gramíneas de baixa qualidade, Martínez et al. (2012) avaliaram por intermédio da técnica de DGGE a estrutura da comunidade microbiana de dois grupos

de animais com alta taxa de ganho e com baixa taxa de ganho, mas diferenças entre os grupos não foram detectadas.

Apesar dos avanços, os esforços recentes para o melhor entendimento da estrutura da microbiota ruminal contemplam poucos estudos envolvendo dietas baseadas em forragens e contrastando-se a presença ou a ausência de suplementação. Os estudos têm sido concentrados no entendimento do impacto de aditivos em dietas com alto concentrado e das disfunções ruminais a estas associadas, assim como das diferenças extremas entre dietas de alta foragem e alto concentrado.

A otimização da utilização da fibra insolúvel por animais recebendo suplementos é dependente da constituição do suplemento, principalmente da relação entre carboidratos e proteína degradáveis, assim como da natureza química destes dois; desta forma, efeitos diferenciados são atribuídos à suplementação com fibra solúvel, amido, nitrogênio não proteico e proteína, seja de maneira exclusiva ou em suas mais diferentes combinações (Detmann et al., 2010)

O aporte de proteína suplementar, além de ampliar os níveis de NAR, fonte preferencial de compostos nitrogenados metabolizada pelas principais bactérias fibrolíticas, como *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes* (Russell, 2002), é essencial para atender à demanda ruminal de ácidos graxos de cadeia ramificada.

Contudo, ao menos *in vitro*, o excesso de fontes nitrogenadas suplementares constituídas de proteína verdadeira pode acarretar efeitos deletérios sobre a degradação da fibra (Costa et al., 2009; Carvalho et al., 2011). Segundo esses autores, as bactérias fibrolíticas seriam prejudicadas na competição por substratos com grupos não-fibrolíticos quando há excesso relativo de proteína verdadeira no rúmen.

Como discutido por Detmann et al. (2010), os 15 mg de NAR/dL associados à ampliação do consumo podem sofrer variações em função da estrutura química do suplemento, pois este nível amoniacal está associado à maximização da produção de proteína microbiana ruminal; deste modo, alterações no suplemento (e.g., adição de carboidratos) poderiam alterar a participação relativa das diferentes populações microbianas no ambiente ruminal. Considerando-se que as exigências de NAR podem variar em função da espécie microbiana e do substrato utilizado, níveis diferentes de NAR seriam demandados em função de situações alimentares específicas. Afirmações como a anterior evidenciam a necessidade de entender melhor como a suplementação afeta a comunidade microbiana.

Como previamente discutido, a exploração correta da fração fibrosa do alimento é de suma importância para a bovinocultura tropical. A degradação dos compostos fibrosos é função da ação fibrolítica conjunta dos sistemas enzimáticos de fungos e bactérias que habitam o rúmen.

A constituição da parede celular vegetal é complexa. Os diferentes polissacarídeos (celulose, hemicelulose e pectina) sofrem variações em sua estrutura química entre diferentes plantas, tecidos da mesma planta e entre estádios distintos do crescimento fenológico. Não bastasse a falta de homogeneidade dentro das classes de polissacarídeos fibrosos, a forma como estes polissacarídeos se organizam entre si também é bastante variável e sofre influência dos mesmos três fatores citados anteriormente. Desta forma, a degradação da parede celular exige um grande espectro de enzimas (Wang & Mcallister, 2002).

Aproximadamente 75% das bactérias estão associadas às partículas alimentares (Fosberg & Lam, 1977; Craig et al., 1987; Martin & Michalet-Doreau, 1995) o que vai ao encontro da reconhecida importância da adesão no processo de degradação. A adesão

coloca a enzima em contato direto com o substrato (Wang & Mcallister, 2002). A necessidade de adesão e a grande diversidade de enzimas necessárias à degradação dos compostos fibrosos parecem corroborar o papel central das três espécies fibrolíticas previamente mencionadas como principais responsáveis pelo processo de degradação da fibra insolúvel, uma vez que há evidências tanto da presença de proteínas necessárias à adesão entre as bactérias e as partículas de parede celular vegetal (cellulose-binding protein - CBP), quanto de complexos multienzimáticos embebidos na membrana celular dessas bactérias (Wang & Mcallister, 2002). Estes complexos multienzimáticos responsáveis pela degradação dos carboidratos fibrosos são chamados celulosomas e estudos mais aprofundados da estrutura e modo de ação do celulosoma foram realizados utilizando-se a bactéria anaeróbia *Clostridium thermocellum* (Bayer et al., 1994).

Estudos recentes utilizando técnicas de biologia molecular têm apontado que *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavifaciens* e *Fibrobacter succinogenes* constituem de 1 a 4% do pool ruminal de micro-organismos (Krause et al., 1999; Weimer et al., 1999; Steveson & Weimer, 2007), enquanto que, segundo cálculos baseados na taxa de liberação de glicose a partir da degradação de carboidratos fibrosos, estima-se que a população fibrolítica deveria compor cerca de 12% da microbiota (Russell et al., 2009). Valores próximos ao sugerido por Russell et al. (2009) foram reportados por Michalet-Doreau et al. (2001) utilizando a técnica de hibridização dot-blot em estudos realizados em ovinos. Situações contrastantes como estas ratificam a complexidade da comunidade microbiana envolvida na degradação da fibra e a necessidade de entendimento mais apurado in vivo dos fatores condicionantes da degradação da parede celular.

Apesar da importância do nitrogênio no ambiente ruminal demonstrada pela reciclagem deste nutriente ao rúmen em diferentes situações dietéticas, medidas diretas

do efeito da suplementação com compostos nitrogenados sobre os micro-organismos e seu metabolismo (e.g., atividade enzimática) são raramente efetuadas.

Afirmações a respeito do crescimento microbiano sobre a fibra, assim como no tocante à atividade enzimática desses micro-organismos, têm sido baseadas na interpretação direta ou conjunta de variáveis como as taxas de degradação e passagem dos compostos fibrosos e medidas gravimétricas de degradação (Stewart, 1977; Costa et al., 2008; 2009; Zorzi et al., 2009).

Diante dessa conjuntura, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação proteica ruminal e/ou abomasal em novilhos consumindo forragens tropicais sobre características nutricionais, a atividade enzimática fibrolítica no rúmen, a degradação in vitro da fibra e o perfil da comunidade bacteriana ruminal.

Material e Métodos

Dois experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Animais e de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia e no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia, ambos ligados à Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados quatro novilhos Nelore, não castrados, com peso corporal (PC) médio inicial de 227 ± 11 kg, fistulados no rúmen e no abomaso. Os animais foram mantidos em baias individuais cobertas, com piso de concreto, dispostas com comedouro e com acesso irrestrito a água e mistura mineral completa.

Os dois experimentos foram realizados sequencialmente diferindo apenas na qualidade do feno ofertado, sendo de média qualidade (78,4 g PB/kg de matéria seca) e alta qualidade (98,6 g PB/kg de matéria seca), respectivamente. Assim, a partir deste ponto os procedimentos descritos são válidos para os dois experimentos.

A alimentação volumosa basal foi constituída por feno de Tifton 85 (*Cynodon* sp.) fornecido diariamente ad libitum, às 6h00 e 18h00, permitindo-se sobras de aproximadamente 100 g por kg do material ofertado.

Foram avaliados os seguintes esquemas de suplementação: controle (apenas forragem); suplementação proteica ruminal, com fornecimento diário de 230 g de PB suplementar no rúmen; suplementação proteica pós-ruminal, com fornecimento diário de 230 g de PB suplementar no abomaso; e suplementação proteica ruminal e pós-ruminal, com fornecimento diário de 115 g no rúmen e 115 g no abomaso de PB suplementar.

A massa de PB suplementar (230 g PB/dia) correspondeu a aproximadamente 35% das exigências dietéticas de PB, 55% das exigências de proteína degradável no rúmen ou 100% das exigências de proteína não degradável no rúmen, considerando-se

um novilho zebuino, não castrado, com 250 kg de PC e ganho esperado de 0,5 kg/dia (Marcondes et al., 2010).

Utilizou-se como fonte proteica suplementar a caseína (caseína pura; Labsynth). A escolha desta deveu-se à ausência de quantidades significativas de componentes energéticos não proteicos, os quais poderiam influenciar na avaliação isolada do efeito da suplementação nitrogenada. Além disto, a caseína é considerada fonte de compostos nitrogenados degradáveis no rúmen e digeríveis no intestino delgado. Assim evitou-se o confundimento que poderia advir do uso de diferentes fontes de compostos nitrogenados nos diferentes locais de suplementação.

Cada experimento foi constituído de quatro períodos experimentais com 29 dias de duração. A suplementação foi iniciada no sexto dia de cada período experimental. O suplemento total foi fracionado em duas porções de mesmo peso e fornecido aos animais simultaneamente ao fornecimento da forragem (6h00 e 18h00).

No caso de suplementação ruminal, o suplemento foi acondicionado em sacos de papel e introduzido diretamente no rúmen dos animais. Para o caso de suplementação abomasal, a caseína foi diluída em solução salina (NaCl; 9 g/L). As tampas das cânulas abomasais foram adaptadas com tubos de polietileno com cerca de 15 cm e providos de válvulas externas. O suplemento foi infundido no abomaso por intermédio dessas válvulas.

As avaliações de consumo, digestibilidade, balanço aparente de compostos nitrogenados (BN), atividade enzimática e degradação in vitro foram efetuadas entre o 20º e 25º dia de cada período experimental. Neste sentido, computou-se o consumo voluntário do 20º ao 23º dias e as sobras obtidas do 21º ao 24º dias. As amostras de forragem e sobras deste período foram compostas proporcionalmente, com base no peso

seco ao ar, por animal e período experimental, sendo posteriormente processadas em moinho de facas (1 e 2 mm).

A excreção fecal foi avaliada por intermédio de coletas pontuais de fezes, realizadas do 21º ao 24º dias de cada período experimental, seguindo-se a distribuição: 21º dia – 6h00 e 14h00; 22º dia – 8h00 e 16h00; 23º dia – 10h00 e 18h00; e 24º dia – 12h00 e 20h00. Simultaneamente às coletas fecais foram obtidas amostras de digesta abomasal. As amostras foram secas sob ventilação forçada (60°C) e processadas em moinho de facas (1 e 2 mm).

No 24º dia de cada período experimental foram realizados os procedimentos de obtenção de amostras para avaliação das atividades das enzimas carboximetilcelulase (CMCase) e xilanase. Amostras do feno fornecido foram previamente processadas em moinho de facas (2 mm) e submetidas à extração do conteúdo celular com detergente neutro a fim de se isolar a fração fibrosa insolúvel (método ICNT-CA F-002/1; Detmann et al., 2012). Após secagem em estufa com ventilação forçada (60°C) a fibra foi acondicionada em sacos de nylon (porosidade de 40 a 50 µm), com dimensões 4 x 5 cm, na proporção de 20 mg/cm² de superfície. Estas amostras foram incubadas in situ, em duplicata, empregando-se os seguintes tempos de incubação: 3, 6, 9 e 12 horas após a suplementação matinal. Ao final do período de incubação os sacos foram retirados do rúmen, lavados rapidamente em água corrente, para retirar o excesso de conteúdo ruminal e congelados (-80°C) para posterior análise das atividades das referidas enzimas.

Ainda no 24º dia de cada período experimental, concomitantemente ao primeiro horário de incubação in situ do feno, foi retirada uma alíquota de líquido ruminal para os procedimentos de avaliação in vitro da dinâmica de degradação da FDN. O líquido

ruminal foi filtrado por uma camada tripla de gaze, acondicionado em recipiente térmico e imediatamente transportado à sala de incubação.

No 25º dia de cada período experimental foi realizada coleta total de urina. Foram acoplados funis coletores nos animais, os quais direcionaram a urina a reservatórios de polietileno que foram mantidos em caixas de isopor com gelo. As coletas foram iniciadas às 6h00 e tiveram a duração de 24 horas. Ao final do período de coleta, o total de urina foi mensurado e uma alíquota de 50 mL foi obtida e utilizada para avaliação do teor de nitrogênio total (método INCT-CA N-001/1; Detmann et al., 2012).

No 26º dia de cada período experimental foram tomadas amostras de conteúdo ruminal às 6h00, 12h00, 18h00 e 24h00 para o isolamento de micro-organismos segundo técnica descrita por Cecava et al. (1990). Simultaneamente ao isolamento microbiano foram retiradas alíquotas de líquido ruminal para avaliação do pH, da concentração de NAR, da concentração de ácidos graxos voláteis (AGV; acetato, propionato e butirato) e para caracterização da comunidade microbiana associada às frações sólida e líquida do conteúdo ruminal. As amostras foram coletadas manualmente na interface líquido:sólido do ambiente ruminal, filtradas por camada tripla de gaze e submetidas à avaliação do pH por intermédio de potenciômetro digital. Em seguida, foi separada uma alíquota de 40 mL, a qual foi fixada com 1 mL de H₂SO₄ (1:1) e congelada (-20°C) para posterior análise da concentração de NAR. Uma segunda alíquota de 20 mL foi fixada com 5 mL de solução de ácido metafosfórico (250 g/L) e mantida a -20°C para avaliação da concentração de AGV. Para caracterização da comunidade microbiana associada à fase líquida uma terceira alíquota de 12,5 mL foi retirada e acondicionada em pote de polietileno. Para a caracterização da comunidade microbiana associada à fração sólida retiraram-se amostras de 12,5 g do material retido

na gaze, os quais foram acondicionados em potes de polietileno. As amostras referentes à avaliação da comunidade microbiana foram mantidas a -80°C até o momento da extração do DNA.

Para a mensuração da massa ruminal e da taxa de passagem ruminal dos compostos fibrosos no 27º e 29º dias procedeu-se ao esvaziamento ruminal. O conteúdo ruminal foi retirado às 10h00 (4 horas após a alimentação matinal) e às 6h00 (antes da alimentação matinal), para os dias supracitados, respectivamente. O material coletado foi acondicionado em recipiente de polietileno e pesado. Após homogeneização, alíquota de aproximadamente 50 g/kg do material foi retirada, sendo o restante retornado ao rúmen dos animais. As amostras foram submetidas à secagem sob ventilação forçada (60°C) e processadas em moinho de facas (1 e 2 mm).

Posteriormente, as amostras de feno, sobras, fezes, digesta abomasal e conteúdo ruminal (amostras oriundas do esvaziamento) foram compostas, com base no peso seco ao ar, por animal e período experimental. As amostras processadas em peneira de 1 mm foram então avaliadas quanto aos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), FDN, PB e extrato etéreo (EE) como descrito, respectivamente, nos métodos INCT-CA G-003/1, INCT-CA M-001/1, INCT-CA F-002/1, INCT-CA N-001/1 e INCT-CA G-004/1 (Detmann et al., 2012). Os teores de lignina na forragem foram obtidos por intermédio do método da hidrólise em ácido sulfúrico após extração com detergente ácido (método INCT-CA F-005/1). As correções da FDN quanto aos teores de proteína e cinzas contaminantes foram conduzidas conforme descrito nos métodos INCT-CA N-004/1 e M-002/1, respectivamente. A caseína foi analisada quanto aos teores de MS, MO, PB e EE conforme os métodos descritos anteriormente (Tabela 1).

As amostras de feno, sobras, fezes, digesta abomasal e de conteúdo ruminal (amostra oriundas do esvaziamento), processadas em peneira de 2 mm, foram avaliadas

quanto ao teor de FDN indigestível (FDNi), utilizando-se sacos F57 (Ankom®) em procedimento de incubação in situ por 288 horas, segundo recomendações de Valente et al. (2011).

Tabela 1 - Teores médios de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), lignina e FDN indigestível (FDNi) nos fenos e na caseína

Item	Feno Média Qualidade. ³	Feno Alta Qualidade ³ .	Caseína ⁴
MS ¹	907±8,2	884±5,9	893
MO ²	933±0,6	940±3,6	976
PB ²	78,4±0,3	98,6±2,0	897
EE ²	10,9±0,5	16,4±1,4	2,1
FDN ²	767±6,0	766±5,9	-
FDNcp ²	730±7,8	715±3,9	-
Lignina ²	58,2±0,7	42,2±1,8	-
FDNi ²	391±5,2	263±2,8	-

¹g/kg de matéria natural. ² g/kg de matéria seca. ³ Média ± erro padrão. ⁴ Média dos dois experimentos.

A excreção fecal e o fluxo abomasal de MS foram estimados pela razão entre consumo diário e concentração de FDNi.

A massa de suplemento infundida no abomaso não foi considerada para o cálculo do balanço de compostos nitrogenados no rúmen.

A massa ruminal de FDN e a taxa de passagem da FDN foram calculadas, respectivamente, pelas equações:

$$\text{MRF} = \text{MRMS} \times [\text{FR}] \quad (1);$$

$$\text{kp} = \frac{\text{FAF}}{\text{MRF}} \div 24 \quad (2);$$

em que: MRF = massa ruminal de FDN (g), MRMS = massa ruminal de MS (g), [FR] = concentração ruminal de FDN (g/g de MS), FAF = fluxo abomasal de FDN (g/dia), e k_p = taxa de passagem ruminal da FDN (h^{-1}).

A concentração de NAR foi quantificada pela técnica colorimétrica proposta por Chaney & Marbach (1962). As concentrações obtidas nos diferentes tempos de amostragem foram combinadas por animal e período, produzindo-se, ao final, valor único representativo da média diária de concentração de NAR. Combinação similar foi conduzida sobre os valores de pH ruminal.

As amostras de líquido ruminal relativas à avaliação da concentração de AGV, depois de descongeladas, foram compostas (volumes iguais para cada coleta) por animal e período e avaliadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC; cromatógrafo Shimadzu, modelo SPD-10A VP), utilizando-se coluna de fase reversa (fase móvel de ácido ortofosfórico em água, 10 mL/L) e detector ultra-violeta em comprimento de onda de 210 nm.

As amostras de micro-organismos ruminais foram avaliadas quanto aos teores de PB (método INCT-CA N-001/1) e bases púricas (Ushida et al., 1985). As bases púricas foram utilizadas como indicador para avaliação da concentração microbiana na digesta abomasal, tomando-se como base a relação $N_{RNA}:N_{total}$ nos micro-organismos ruminais. A produção ruminal de compostos nitrogenados microbianos foi quantificada por intermédio do produto entre concentração na digesta abomasal e fluxo diário de MS abomasal.

As estimativas do balanço aparente de compostos nitrogenados foram obtidas pela subtração das excreções fecais e urinárias do consumo de nitrogênio.

Para avaliação das atividades das enzimas envolvidas no processo de degradação da fibra insolúvel, os sacos de nylon com as amostras da fibra colonizada foram

descongelados e 1 g do resíduo fibroso foi transferido para recipiente tipo becker e outra alíquota acondicionada em pesa-filtro e levada à estufa não-ventilada (105°C/16 horas) para obtenção da concentração de MS. Ao resíduo úmido foram acrescentados 10 mL de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 6,8), 25 µL de mercaptoetanol e 125 µL de lisozima 0,4% (Farenzena, 2010), sendo mantido em banho maria a 37°C por 3 horas. O conteúdo foi então centrifugado (1000 × g/15 min; 4°C), sendo a porção fibrosa removida por filtração em camada tripla de gaze. A fração líquida foi utilizada para estimar a atividade de CMCase e xilanase.

Para quantificação da atividade da CMCase foi usado o método descrito por Miller et al. (1960). Para tal, 1 mL do extrato enzimático obtido foi incubado a 50°C por 20 min com 1 mL do substrato de carboximetilcelulose (contendo, por litro: 11,2 g de carboximetilcelulose; 7 g de ácido cítrico; 19,6 g de citrato de sódio dihidratado; 400 mg de merthiolate e 400 mg de glicose). Após o período de incubação, os tubos foram resfriados em água corrente e 3 mL do reagente DNS (10 g de ácido dinitrossalicílico, 300 g de tartarato duplo de Na e K, 500 mL de água destilada e 300 mL de NaOH 2 M) foram adicionados. Para cada 20 mL do reagente DNS, adicionou-se 28 µL de solução de fenol (50 g/L) e 80 µL de solução de metabisulfito de sódio (350 g/L). Os tubos foram incubados em água fervente por 15 min, resfriados e procedeu-se à leitura em espectrofotômetro (540 nm).

A atividade da CMC foi obtida pela avaliação da quantidade de açúcares redutores liberados após o período de incubação da enzima com o substrato. Foi gerada curva padrão com soluções contendo 0,3; 0,6; 1,2; 3,0; 4,2; 5,4 e 6,0 mM de glicose.

O ensaio para enzima xilanase foi realizado conforme descrito por Barley et al. (1992), com algumas modificações, baseadas no método do DNS, utilizando como substrato solução de xilana (10 g/L). A reação enzimática para um volume final de 1,6

mL foi composta por 400 µL da solução de xilana preparada em tampão citrato fosfato (0,1 M; pH 6,2), 800 µL de tampão citrato fosfato (0,1 M; pH 6,2) e 400 µL de extrato enzimático. Esta mistura foi incubada em banho-maria a 50°C por 30 min. Após agitação, foram adicionados 400 µL do reagente DNS e a mistura foi colocada em água em ebulição por 5 minutos, adicionando-se, em seguida, 1,6 mL de água destilada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (540 nm). Para o cálculo da atividade de xilanase foi utilizado a equação da curva de DNS com padrão de D-xilose e os valores expressos em nmol de açúcares redutores liberados/g MS/min.

Para avaliação da dinâmica de degradação da FDN, alíquotas de forragem (350 mg de MS) previamente processadas a 1 mm foram acondicionadas em frascos de vidro tipo “penicilina” com 50 mL de volume total. Posteriormente, foram adicionados 28 mL de solução tampão (McDougall, 1949), com pH previamente ajustado para 6,8 com CO₂.

Os frascos foram mantidos em sala climatizada (39°C) para prévia hidratação das amostras. Durante o processo de hidratação foi coletado líquido ruminal proveniente dos quatro animais submetidos a cada tratamento conforme descrito anteriormente. Foram adicionados 7 mL de inóculo ruminal por frasco, preservando-se os tratamentos avaliados, procedendo-se imediatamente à saturação do ambiente de incubação com CO₂ e à vedação dos frascos. Para o procedimento de incubação manteve-se as relações de 100 mg de MS de amostra/10 mL de solução final e 1 mL de inóculo/4 mL de solução tampão. Os frascos foram mantidos a 39°C, sob agitação orbital (40 rpm) A retirada dos gases oriundos da fermentação foi realizada a cada três horas com o auxílio de agulhas.

Foram avaliados os tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas de incubação. Ao final de cada tempo de incubação os frascos foram retirados da sala

climatizada, sendo o conteúdo filtrado sob vácuo em cadinhos filtrantes. Os cadinhos foram então acondicionados em frascos de polietileno (120 mL), aos quais se adicionaram 50 mL de solução de detergente neutro. Os frascos foram então vedados e autoclavados conforme método INCT-CA F-002/1 (Detmann et al., 2012). Após este tratamento, foi executado novamente o procedimento de filtração sob vácuo, com posterior lavagem sequencial do resíduo com água quente e acetona. A FDN residual foi obtida após secagem do material em estufa não ventilada (105°C/16 horas).

Os resíduos de FDN nos diferentes tempos, para cada tratamento, foram submetidos ao ajustamento, por intermédio do algoritmo de Gauss-Newton implementado no procedimento NLIN do SAS (versão 9.2), do modelo logístico não linear descrito por Van Milgen et al. (1991):

$$R_t = B \times (1 + \lambda \times t) \times e^{(-\lambda \times t)} + I \quad (3);$$

em que: R_t = resíduo não-degradado de FDN no tempo “t” (g/100 g), B = fração potencialmente degradável da FDN (g/100 g), I = fração indegradável da FDN (g/100 g), λ = taxa fracional conjunta de latência e degradação (h^{-1}), e t = tempo (h).

Em virtude de o parâmetro λ representar conjuntamente as taxas de latência e degradação, estimou-se a taxa fracional de degradação a partir de λ utilizando-se as propriedades da distribuição gama-2 (Ellis et al., 1994):

$$kd = 0,59635 \times \lambda \quad (4);$$

em que: kd = taxa fracional de degradação da FDN potencialmente degradável (h^{-1}).

A caracterização da comunidade microbiana foi realizada por intermédio da técnica de PCR-DGGE (Muyzer et al., 1993).

Inicialmente, as amostras da fração sólida e líquida do conteúdo ruminal foram descongeladas em temperatura ambiente e compostas por animal e período experimental. Em sequência, procedeu-se à extração do DNA metagenômico

microbiano segundo descrito por Stevenson & Weimer (2007). Para ampliar a pureza do material, as amostras foram submetidas à ação da enzima RNase conforme descrito por Bento (2012). Ao fim do processo as amostras de DNA foram ressuspensas em tampão TE (10 mM de Tris/HCl; 1 mM de EDTA; pH 8,0) e armazenadas a -20°C.

Para avaliar a integridade e a concentração das amostras de DNA, as amostras foram analisadas em gel de agarose (8 g/L) em solução TBE 1X (0,1 M de Tris/HCl; 0,09 M de ácido bórico; 1 mM e EDTA; pH 8,0; Sambrook et al., 1989) e coradas com Gel Red (0,4X). A avaliação qualitativa da concentração foi feita contrastando-se a imagem das amostras e de marcadores DNA de fago λ de concentração conhecida. O gel com as amostras do DNA extraído e dos marcadores foi visualizado e fotodocumentado no sistema de digitalização de imagens Eagle Eye™ (Stratagene, Cedar Creek, USA).

Após comprovada a qualidade e a presença de concentração aceitável de DNA, a concentração exata de DNA em cada amostra foi quantificada espectrofotometricamente em micro placas de leitor de Elisa (Espectofotômetro 1510, Thermo Fischer). Em seguida, alíquotas das amostras foram diluídas para obtenção de amostras de concentração padronizada (20 ng de DNA/ μ L) e mantidas a -20°C. Posteriormente, as amostras foram utilizadas em reações em cadeia da polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos iniciadores 341fGC/518r específicos para amplificação da região V3 do gene rRNA 16S do domínio Bacteria (Muyzer et al., 1993). As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 200 μ L contendo 25 μ L da solução de reagentes e DNA (Tabela 2). O protocolo de execução da PCR foi adaptado de Muhling et al. (2008). Primeiro, as soluções foram submetidas a uma etapa de desnaturação inicial sendo mantidas a 96°C por 4 minutos; em sequência foram realizados 35 ciclos de amplificação, em cada ciclo as soluções eram submetidas a temperaturas de 96°C

durante 1 minuto para desnaturação dos oligonucleotídeos, sendo posteriormente mantidas a 56°C durante 1 minuto para anelamento dos oligonucleotídeos e, por fim, mantidas a 72°C durante 30 segundos para a extensão dos oligonucleotídeos. Após os ciclos de amplificação, as soluções foram submetidas a uma etapa de extensão final sendo mantidas a 72°C por 5 minutos.

Em todas as reações foi utilizado controle negativo (solução de reação, Tabela 2) sem DNA molde; As reações de PCR foram realizadas em termociclador Biocycler, modelo MG96G.

Tabela 2 - Mistura da reação de PCR utilizada nas reações de amplificação

Reagentes	Volume (µL)
Tampão GoTaq® Reaction Buffer (5X)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,0
dNTPs (2 mM)	2,0
Oligonucleotídeo Forward (10 µM)	0,3
Oligonucleotídeo Reverse (10 µM)	0,3
GoTaq® DNA polimerase (5 un./µL)	0,5
BSA (2 mg/mL)	2,0
DNA (20 ng/µL)	1,0
Água MilliQ (q.s.p.)	25,0

Os amplicons resultantes das amplificações por PCR foram analisados em gel de agarose 18 g/L em tampão TBE 1X (0,1 M de Tris/HCl; 0,09 M de ácido bórico; 1 mM EDTA; pH 8,0; Sambrook et al., 1989), utilizando-se marcador Ladder de tamanho 100 pb DNA (Promega, Madison, USA) para estimar o tamanho da região copiada.

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) foi realizada utilizando-se o equipamento DGGE-2401 (C.B.S. Scientific Company, USA). Foram

aplicados 8 μ L dos produtos da reação de PCR juntamente com 8 μ L do tampão de amostra (azul de bromofenol 0,5 g/L; xileno cianol 0,5 g/L; glicerol 70% e TAE 1 X) em gel de poliacrilamida (acrilamida:N,N'-metilenobisacrilamida 37,5:1) vertical a 80 g/L em tampão TAE 1X para fragmentos de tamanhos variando de 200 pb a 400 pb. O gradiente desnaturante variou linearmente de 40% a 60%

O gradiente foi formado a partir da mistura de duas soluções (40% e 60%) dispensadas por mini bomba peristáltica formadora de gradiente (MPP-100-220: Mini-Peristaltic Pump for Gradient Gel Casting, C.B.S. Scientific Company, USA). As soluções 40% e 60% foram preparadas misturando-se duas soluções estoque de poliacrilamida: solução com 100% de agentes desnaturantes (que corresponde a ureia 7 M e formamida deionizada 400 mL/L) e outra solução sem esses agentes.

A cada uma das soluções foram adicionados 3,6 mL/L de persulfato de amônio (100 g/L) [polimerizador] e 0,43 mL/L de TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletileno diamino) [catalisador]. À solução 60% foram adicionados 20 μ L de corante (azul de bromofenol 5 g/L; xileno cianol 5 g/L e TAE 1X) para visualização do gradiente. O tempo de polimerização do gel antes da aplicação das amostras foi de 3 horas.

Uma mistura de fragmentos de rRNA 16S das seguintes espécies bacterianas foi utilizada como marcador nas canaletas das extremidades do gel: *Escherichia coli* ATCC 29214 (γ -Proteobacteria), *Salmonella enterica typhimurium* ATCC 14028 (γ -Proteobacteria), *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Firmicutes) e *Lactococcus lactis* ATCC 19435 (Firmicutes).

A eletroforese foi realizada a temperatura de 60°C e voltagem constante de 90 V, durante 15 horas. O gel foi corado por 20 minutos com solução de SYBR® Gold (Invitrogen). A imagem do gel foi visualizada e foto-documentada por meio do sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene).

O índice Shannon-Weiner de diversidade e a riqueza microbiana foram calculados com base na matriz binária de presença ou ausência de bandas gerada por meio da análise da imagem digitalizada do gel no software Bionumerics 5.1

Para o cálculo de ambos utilizou-se o programa Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis (PAST). A riqueza constitui a soma do número de bandas presentes em uma determinada amostra, o índice Shannon-Wiener de diversidade (H'), por sua vez, pode ser calculado com base na equação:

$$H' = -\sum_{i=1}^S [P_i \times \log(P_i)] \quad (5);$$

em que: S é o número de bandas na amostra, $P_i = n_i/N$, n_i = número de bandas i , e N = número total de bandas.

O experimento foi conduzido segundo delineamento em quadrado latino 4 x 4 balanceado para efeitos residuais (Cochran & Cox, 1957), sendo dois quadrados sequenciais. Para avaliação das características de produção e atividade enzimática utilizou-se o modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + Q_i + S_j + QS_{ij} + A_{(i)k} + P_{(i)l} + \varepsilon_{ijkl} \quad (6);$$

em que: μ = constante geral, Q_i = efeito do quadrado latino i confundido com efeito da qualidade de forragem (efeito fixo), S_j = efeito do esquema de suplementação j (efeito fixo), QS_{ij} = interação entre qualidade de forragem e esquema de suplementação (efeito fixo), $A_{(i)k}$ = efeito do animal k aninhado ao quadro latino i (efeito aleatório), $P_{(i)l}$ = efeito do período l aninhado ao quadrado latino i (efeito aleatório), e ε_{ijkl} = erro aleatório não observável.

Para o caso das avaliações das atividades de CMCase e xilanase, os diferentes tempos foram considerados como medidas repetidas. A escolha da melhor estrutura de

matriz de (co)variâncias foi realizada com base no critério de Akaike corrigido, optando-se por estruturas com simetria composta.

Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos por intermédio do procedimento MIXED implementado no programa SAS (versão 9.2) adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I. Quando necessário, as médias de tratamentos foram comparadas por intermédio da Diferença Mínima Significativa de Fischer.

Adicionalmente, a estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente Dice de similaridade e dendogramas foram estabelecidos de acordo com método UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) para agrupamentos, com base na matriz binária de presença e ausência de bandas.

Resultados

Não foram observados efeitos ($P>0,05$) da qualidade da forragem, do esquema de suplementação ou sua interação sobre o consumo de MO. Por outro lado, a despeito da ausência de efeito do esquema de suplementação e de interação entre esquema de suplementação e qualidade da forragem ($P>0,05$), o consumo de FDN foi superior ($P<0,05$) quando forragem de alta qualidade foi ofertada aos animais (Tabela 3). O consumo de nitrogênio foi ampliado ($P<0,05$) com o fornecimento de suplementos e pela melhoria da qualidade da forragem (Tabela 3).

Não foram verificados efeitos de interação entre qualidade da forragem e esquema de suplementação sobre as medidas de digestibilidade, de balanço de compostos nitrogenados e produção microbiana ($P>0,05$; Tabela 3).

O coeficiente de digestibilidade total da MO foi incrementado ($P>0,05$) pela suplementação e pela melhoria na qualidade da forragem. O coeficiente de digestibilidade da FDN não foi afetado pelo esquema de suplementação ($P>0,05$), mas foi superior quando os animais receberam forragem de alta qualidade ($P<0,05$; Tabela 3).

O balanço aparente de compostos nitrogenados no rúmen (BNR), não foi afetado pela qualidade da forragem ($P>0,05$). Contudo, este foi ampliado ($P<0,05$) pela suplementação no rúmen e no rúmen-abomaso. Ressalta-se que a ausência de suplementação e a suplementação exclusiva no abomaso proporcionam valores negativos de BNR (Tabela 3).

O BN foi ampliado ($P<0,05$) pelo fornecimento de suplemento, independentemente do local de suplementação, e pelo fornecimento de forragem de melhor qualidade (Tabela 3).

Tabela 3 - Consumo voluntário de matéria orgânica (CMO; kg/dia), de fibra em detergente neutro (CFDN; kg/dia) e de nitrogênio (CN; g/dia); coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica (DMO; g/g) e da fibra em detergente neutro (DFDN; g/g); balanço de nitrogênio no rúmen (BNR; g/dia) e no organismo animal (BN; g/dia); fluxo abomasal de nitrogênio microbiano (NMIC; g/dia) e eficiência de síntese de proteína microbiana (EFM; g/kg de matéria orgânica digerida) em função da qualidade da forragem e do esquema de suplementação

Item	Qualidade da forragem								EPM	Valor-P ²		
	Média ¹				Alta ¹					Q	S	Q × S
	C	R	R+A	A	C	R	R+A	A				
CMO	4,72	5,25	4,80	4,81	6,78	7,17	6,68	6,77	0,473	0,095	0,141	0,978
CFDN	3,65	3,87	3,54	3,54	5,09	5,20	4,81	4,89	0,361	0,017	0,169	0,967
CN	64b	104a	98a	98a	114b	153a	144a	145a	7,2	<0,001	<0,001	0,916
DMO	0,468b	0,495a	0,502a	0,485a	0,555b	0,567a	0,567a	0,570a	0,017	0,005	0,025	0,357
DFDN	0,531	0,519	0,532	0,523	0,603	0,612	0,608	0,602	0,018	0,004	0,950	0,872
BNR ³	-14,4b	12,2a	-1,9a	-23,2b	-15,6b	20,5a	9,0a	-14,6b	10,83	0,437	<0,001	0,566
BN ⁴	4,1b	19,3a	18,3a	22,0a	26,7b	34,7a	35,9a	43,8a	5,72	0,032	0,003	0,758
NMIC	48,8	61,2	58,8	60,0	82,6	87,8	72,5	76,2	11,13	0,122	0,676	0,648
EFM	137	149	147	155	137	134	108	123	16,4	0,137	0,872	0,693

¹ C = controle; R = suplementação no rúmen; A = suplementação no abomaso. ² Q, S e Q × S = efeitos relativos à qualidade da forragem, ao esquema de suplementação e sua interação, respectivamente. ³ BNR = consumo de nitrogênio menos fluxo duodenal de nitrogênio. ⁴ BN = consumo de nitrogênio menos as excreções fecal e urinária de nitrogênio.

a, b: médias seguidas por letras diferentes, dentro de cada nível do fator qualidade de forragem, diferem (P<0,05).

A qualidade da forragem e o esquema de suplementação não afetaram ($P>0,05$) a produção de compostos nitrogenados no rúmen (NMIC) e a eficiência de síntese de proteína microbiana (EFM). O valor médio de EFM foi de 136 g PB microbiana/kg de MO digerida (MOD) (Tabela 3).

A concentração de NAR foi afetada ($P<0,05$) somente pelo esquema de suplementação (Tabela 4). A suplementação no rúmen incrementou ($P<0,05$) a concentração de NAR. Por outro lado, animais recebendo suplementação no rúmen e abomaso ou exclusivamente no abomaso não apresentaram diferenças ($P>0,05$) quando comparados a animais não suplementados.

A melhoria da qualidade da forragem ampliou ($P<0,05$) a concentração de AGV no fluido ruminal. Contudo, efeitos de esquema de suplementação e sua interação com a qualidade da forragem não foram verificados ($P>0,05$; Tabela 4).

O esquema de suplementação não afetou a taxa de passagem da FDN ($P>0,05$). Contudo, quando os animais receberam forragem de melhor qualidade a taxa de passagem da FDN foi reduzida ($P<0,05$; Tabela 4).

A massa residual de FDN e o pH não foram afetados ($P>0,05$) pela qualidade da forragem, esquema de suplementação ou sua interação (Tabela 4).

A riqueza e a diversidade microbiana das frações líquida e sólida não foram afetadas ($P>0,05$) pelo esquema de suplementação ou pela interação entre qualidade de forragem e esquema de suplementação. Entretanto, a riqueza e a diversidade (Índice Shannon-Weiner) bacteriana associada à fase líquida da digesta ruminal foram incrementadas ($P<0,05$) pela melhoria na qualidade da forragem (Tabela 5). Nenhum efeito foi verificado ($P>0,05$) sobre as características de diversidade da fase sólida da digesta ruminal.

Tabela 4 - Concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR; mg/dL), concentração de ácidos graxos voláteis no fluido ruminal (AGV; mmol/dL), pH ruminal, taxa de passagem da FDN (TPFDN; h⁻¹) e massa ruminal de FDN (MRFDN; kg) em função da qualidade da forragem e do esquema de suplementação

Item	Qualidade da forragem								EPM	Valor-P ²		
	Média ¹				Alta ¹					Q	S	Q × S
	C	R	R+A	A	C	R	R+A	A				
NAR	4,4b	13,7a	8,2b	5,6b	7,1b	14,8a	9,7b	7,8b	1,95	0,283	<0,001	0,942
AGV	5,28	5,40	6,05	5,55	9,23	9,00	9,31	9,11	0,484	<0,001	0,550	0,802
pH	6,83	6,74	6,72	6,79	6,73	6,75	6,71	6,72	0,100	0,622	0,935	0,926
TPFDN	0,030	0,034	0,030	0,024	0,018	0,019	0,016	0,016	0,0025	<0,001	0,107	0,478
MRFDN	2,62	2,55	2,41	2,91	1,67	1,83	1,70	1,78	0,363	0,083	0,573	0,700

¹C = controle; R = suplementação no rúmen; A = suplementação no abomaso. ²Q, S e Q × S = efeitos relativos à qualidade da forragem, ao esquema de suplementação e sua interação, respectivamente.

a, b: médias seguidas por letras diferentes, dentro de cada nível do fator qualidade de forragem, diferem (P<0,05).

Tabela 5 - Taxa de degradação da FDN (kd; h⁻¹), riqueza bacteriana associada à fração líquida (RFL) e sólida (RFS) do conteúdo ruminal, índice Shannon-Weiner de diversidade bacteriana referente às bactérias associadas à fração líquida (SFL) e sólida (SFS) do conteúdo ruminal em função da qualidade da forragem e do esquema de suplementação

Item	Qualidade da forragem								EPM	Valor-P ²		
	Média ¹				Alta ¹					Q	S	Q × S
	C	R	R+A	A	C	R	R+A	A				
kd	0,034b	0,047a	0,039b	0,039b	0,053b	0,056a	0,050b	0,046b	0,0048	0,083	0,029	0,244
RFL	22,0	22,3	24,3	24,3	29,8	30,8	28,8	27,8	1,53	0,002	0,958	0,281
RFS	28,3	32,5	29,5	32,5	29,3	30,0	27,8	27,5	1,80	0,185	0,420	0,417
SFL	3,08	3,10	3,18	3,19	3,39	3,42	3,35	3,32	0,056	0,001	0,947	0,298
SFS	3,34	3,48	3,37	3,48	3,37	3,40	3,32	3,30	0,064	0,217	0,463	0,428

¹C = controle; R = suplementação no rúmen; A = suplementação no abomaso. ²Q, S e Q × S = efeitos relativos à qualidade da forragem, ao esquema de suplementação e sua interação, respectivamente.

a, b: médias seguidas por letras diferentes, dentro de cada nível do fator qualidade de forragem, diferem (P<0,05).

A taxa de degradação da FDN (kd; h^{-1}) foi afetada ($P < 0,05$) pelo esquema de suplementação, mas não sofreu influência ($P > 0,05$) da qualidade da forragem ou da interação entre esquema de suplementação e qualidade de forragem. A suplementação no rúmen ampliou ($P < 0,05$) a kd da FDN, ao passo que os demais esquemas de suplementação não diferiram entre si ($P > 0,05$; Tabela 5).

A atividade da CMCase não foi afetada ($P > 0,05$) pela qualidade da forragem, tempo amostral, e pelas interações entre qualidade, esquema de suplementação e tempo. Todavia, a atividade da CMCase foi reduzida pela suplementação no abomaso e rúmen-abomaso ($P < 0,05$), não diferindo entre os demais tratamentos (Tabela 6; Figura 1).

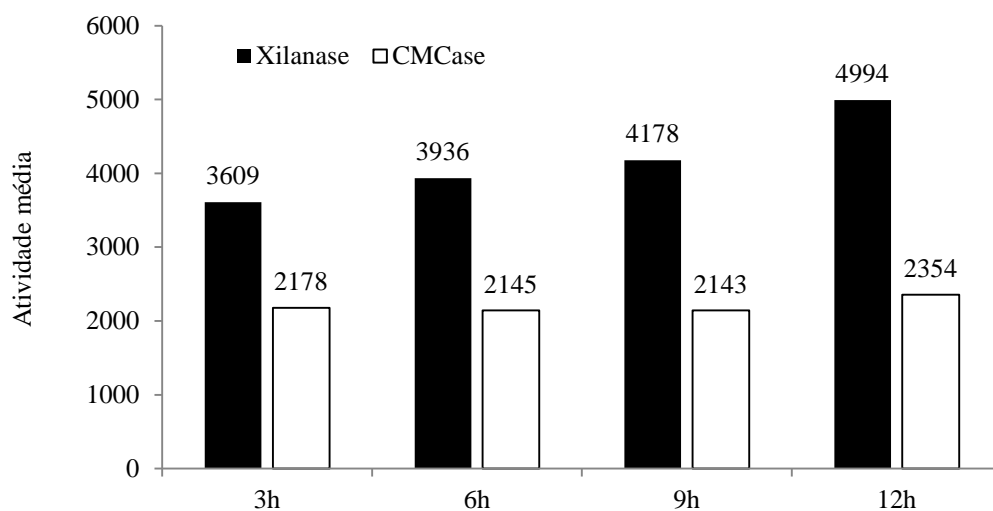


Figura 1 – Atividade média das enzimas xilanase e carboximetilcelulase (nmol de açúcar redutor liberado/g de MS/minuto) ao longo do período pós-prandial.

Tabela 6 - Atividades das enzimas carboximetilcelulose (CMCase) e xilanase (nmol de açúcar redutor liberado/g MS/min) em função da qualidade da forragem e do esquema de suplementação

Item	Qualidade da forragem								EPM	Valor-P ²			
	Média ¹				Alta ¹					Q	S	Q × S	T ³
	C	R	R+A	A	C	R	R+A	A					
CMCase	2019a	2088a	1670b	1932b	2921a	2600a	2231b	2154b	283,5	0,152	0,044	0,337	0,219
Xilanase	4535	5108	4973	4610	4506a	3555ab	2864b	3287b	599,4	0,145	0,233	0,043	<0,001

¹ C = controle; R = suplementação no rúmen; A = suplementação no abomaso. ² Q, S, Q × S e T = efeitos relativos, respectivamente, à qualidade da forragem, ao esquema de suplementação, a interação entre os dois anteriores, e ao tempo. ³ Nenhum efeito de interação envolvendo o tempo de avaliação foi significativo (P>0,05).

a, b: médias seguidas por letras diferentes, dentro de cada nível do fator qualidade de forragem, diferem (P<0,05).

Para a atividade da xilanase observou-se interação entre qualidade de forragem e esquema de suplementação ($P < 0,05$; Tabela 6), assim como efeito do tempo de amostragem (Figura 1). Quando os animais receberam feno de média qualidade a atividade da xilanase não diferiu ($P > 0,05$) entre esquemas de suplementação. No entanto, quando forragem de alta qualidade foi ofertada, a suplementação no abomaso e no rúmen e abomaso proporcionou valores de atividade da xilanase inferiores ($P < 0,05$) ao observado no controle, sendo que valores intermediários foram observados para a suplementação no rúmen (Tabela 6). A atividade da xilanase foi ampliada ($P < 0,05$) em função do tempo de amostragem (Figura 1). Ressalta-se que não foram observadas interações entre tempo e os demais efeitos ($P > 0,05$) sobre as atividades de CMCase e xilanase.

Não foi observada correlação ($P > 0,05$) entre as variáveis associadas à atividade enzimática e diversidade microbiana e as características ligadas ao desempenho nutricional (Tabelas 7 e 8), exceção feita à correlação positiva ($P < 0,05$) entre a kd da FDN e BNR (Tabela 8).

Quando consideradas as associações entre as variáveis ligadas à atividade enzimática e diversidade microbiana verificou-se que as atividades de CMCase e xilanase se correlacionaram positivamente entre si ($P < 0,05$). Correlação positiva ($P < 0,05$) também foi observada entre estas e a taxa de degradação da FDN (Tabela 9). A riqueza e a diversidade microbiana correlacionaram-se ($P < 0,05$) de forma positiva dentro de cada fração, mas não se observou associação ($P > 0,05$) entre frações. Nenhuma correlação ($P > 0,05$) foi observada entre atividade fibrolítica e diversidade microbiana (Tabela 9).

Tabela 7 - Coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis: riqueza de micro-organismos associados à fração líquida (RFL) e à fração sólida (RFS), índice Shannon-Wiener da diversidade microbiana associada à fração líquida (SFL) e à fração sólida (SFS), taxa de degradação da FDN (kd), atividade enzimática da carboximetilcelulase (CMCase) e da xilanase e as variáveis consumo de matéria orgânica (CMO), consumo de fibra em detergente neutro (CFDN), consumo de nitrogênio (CN); coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica (DMO) e da fibra em detergente neutro (DFDN) e balanço aparente de nitrogênio (BN)

Variáveis	Variáveis ^{1 2}						
	RFL	RFS	SFL	SFS	kd	CMCase	XIL
CMO	-0,156 (0,626)	-0,280 (0,377)	-2,17 (0,497)	0,071 (0,824)	0,110 (0,732)	0,002 (0,993)	0,060 (0,851)
CFDN	-0,165 (0,608)	-0,106 (0,741)	-0,215 (0,500)	0,100 (0,756)	0,163 (0,611)	0,238 (0,455)	0,236 (0,458)
CN	-0,001 (0,998)	0,080 (0,803)	-0,042 (0,894)	0,057 (0,858)	-0,080 (0,803)	-0,457 (0,135)	-0,340 (0,278)
DMO	0,491 (0,104)	0,337 (0,283)	0,510 (0,090)	0,331 (0,293)	0,317 (0,315)	-0,111 (0,731)	-0,128 (0,691)
DFDN	0,472 (0,120)	0,262 (0,408)	0,504 (0,094)	0,272 (0,391)	0,270 (0,394)	0,159 (0,731)	-0,049 (0,691)
BN	-0,052 (0,870)	-0,190 (0,552)	-0,085 (0,792)	-0,205 (0,522)	-0,375 (0,229)	-0,379 (0,223)	-0,192 (0,549)

¹ Os coeficientes de correlação foram ajustados para os efeitos de animal e período experimental. ² Os valores entre parênteses indicam o nível descritivo de probabilidade para o erro tipo I associado às hipóteses: $H_0: \rho = 0$, $H_a: \rho \neq 0$.

A avaliação multivariada da diversidade permitiu evidenciar separação entre as frações líquida e sólida quando consideradas as forragens de ambas as qualidades (Figuras 2 e 3). Percebeu-se que a variação na qualidade da forragem influencia a diversidade microbiana associada à fração líquida do fluido ruminal (Figura 4), embora não tenha exercido tal efeito sobre a fração sólida (Figura 5). Em nenhuma avaliação

percebeu-se efeito claro do esquema de suplementação sobre a diversidade microbiana no ambiente ruminal.

Tabela 8 - Coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis: riqueza de micro-organismos associados à fração líquida (RFL) e à fração sólida (RFS), índice Shannon-Wiener da diversidade microbiana associada à fração líquida (SFL) e à fração sólida (SFS), taxa de degradação da FDN (kd), atividade enzimática da carboximetilcelulase (CMCase) e da xilanase e as variáveis pH ruminal, concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR), concentração de ácidos graxos voláteis, (AGV), fluxo de nitrogênio microbiano ao abomaso (NMIC), eficiência de síntese de proteína microbiana (EFM) e balanço de nitrogênio no rúmen (BNR)

Variáveis	Variáveis ^{1 2}						
	RFL	RFS	SFL	SFS	Kd	CMCase	XIL
pH	-0,233 (0,465)	-0,543, (0,067)	-0,246 (0,439)	-0,518 (0,084)	-0,047 (0,882)	0,012 (0,970)	-0,011 (0,972)
NAR	0,126 (0,694)	0,477 (0,116)	0,081 (0,801)	0,469 (0,123)	0,405 (0,190)	0,118 (0,713)	0,040 (0,900)
AGV	0,043 (0,894)	-0,114 (0,723)	0,035 (0,912)	-0,111 (0,730)	-0,419 (0,174)	-0,311 (0,323)	-0,385 (0,216)
NMIC	-0,179 (0,575)	-0,280 (0,377)	-0,264 (0,405)	-0,321 (0,308)	-0,020 (0,950)	0,089 (0,782)	0,385 (0,216)
EFM	-0,249 (0,433)	-0,246 (0,439)	-0,321 (0,307)	-0,284 (0,370)	-0,145 (0,651)	0,063 (0,843)	0,327 (0,299)
BNR	0,036 (0,909)	0,141 (0,660)	-0,099 (0,758)	0,150 (0,641)	0,591 (0,042)	0,304 (0,336)	0,201 (0,530)

¹ Os coeficientes de correlação foram ajustados para os efeitos de animal e período experimental. ² Os valores entre parênteses indicam o nível descritivo de probabilidade para o erro tipo I associado às hipóteses: $H_0: \rho = 0$, $H_a: \rho \neq 0$.

Tabela 9 - Coeficientes de correlação linear de Pearson entre as variáveis: riqueza de micro-organismos associados à fração líquida (RFL) e à fração sólida (RFS), índice Shannon-Wiener da diversidade microbiana associada à fração líquida (SFL) e à fração sólida (SFS), taxa de degradação da FDN (kd), atividade enzimática da cboximetilcelulase (CMCase) e da xilanase

Variáveis	Variáveis ^{1,2}					
	RFS	SFL	SFS	kd	CMCase	XIL
RFL	0,139 (0,665)	0,991 (<0,001)	0,119 (0,711)	0,210 (0,510)	0,024 (0,940)	0,384 (0,217)
RFS		0,125 (0,702)	0,996 (<0,001)	0,448 (0,143)	0,188 (0,556)	0,128 (0,691)
SFL			0,109 (0,735)	0,155 (0,629)	0,012 (0,968)	0,322 (0,305)
SFS				0,451 (0,140)	0,213 (0,504)	0,106 (0,742)
kd					0,588 (0,044)	0,592 (0,042)
CMC						0,721 (0,008)

¹ Os coeficientes de correlação foram ajustados para os efeitos de animal e período experimental. ² Os valores entre parênteses indicam o nível descritivo de probabilidade para o erro tipo I associado às hipóteses: $H_0: \rho = 0$, $H_a: \rho \neq 0$.

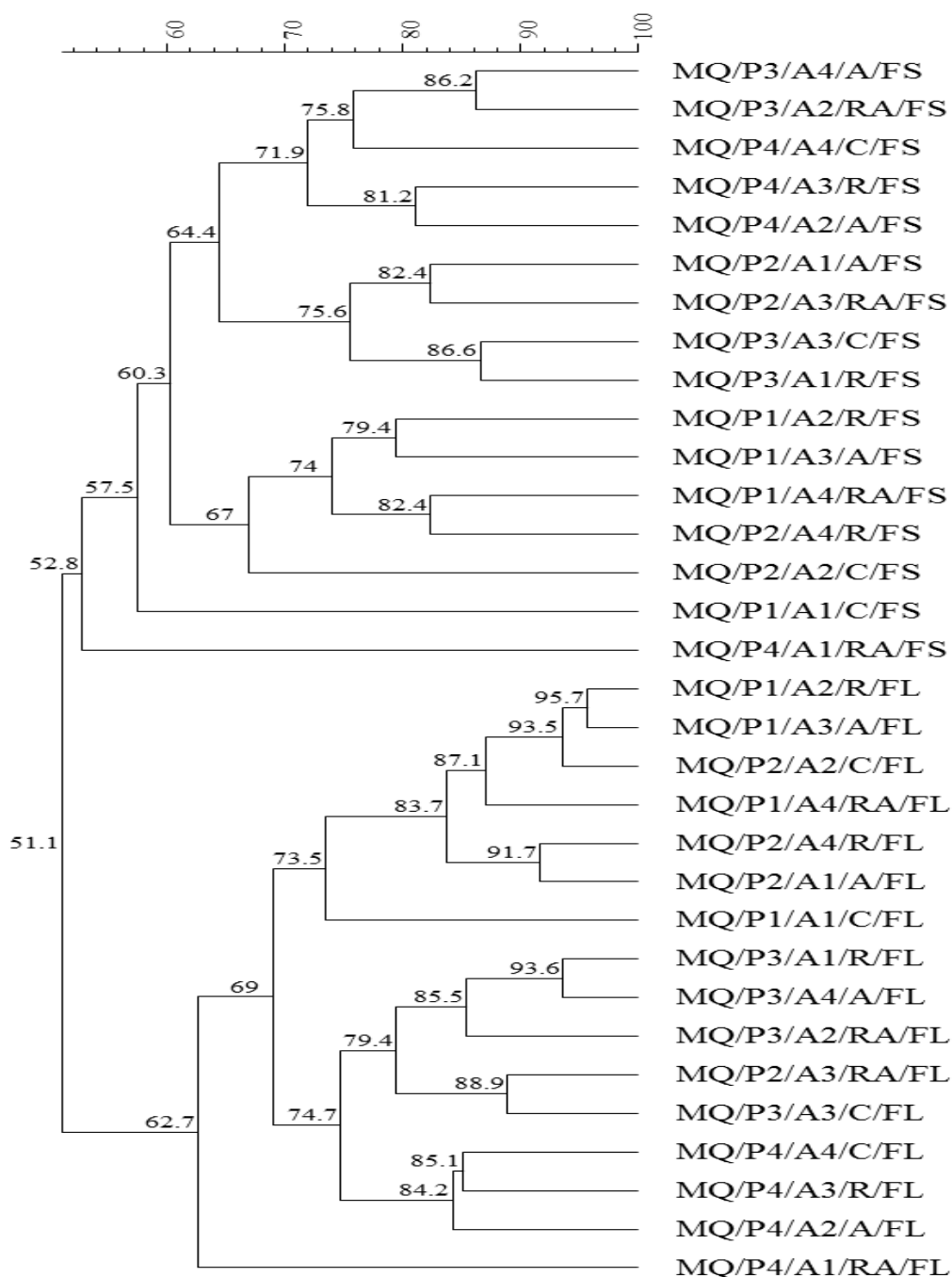


Figura 2 - Dendrograma gerado a partir do perfil eletroforético de seqüências do gene rRNA 16S da comunidade bacteriana associada às frações líquida e sólida do conteúdo ruminal de animais consumindo feno de média qualidade. [Os valores apresentados, assim como a escala acima da figura, representam a similaridade percentual expressa pelo índice Dice entre amostras ou grupos de amostras (MQ = forragem de média qualidade; P1, P2, P3 e P4: períodos experimentais; A1, A2, A3 e A4: animais experimentais; C, R, RA e A: controle sem suplementação, suplementação no rúmen, suplementação no rúmen e abomaso e suplementação no abomaso, respectivamente; FL = fração líquida e FS = fração sólida)].

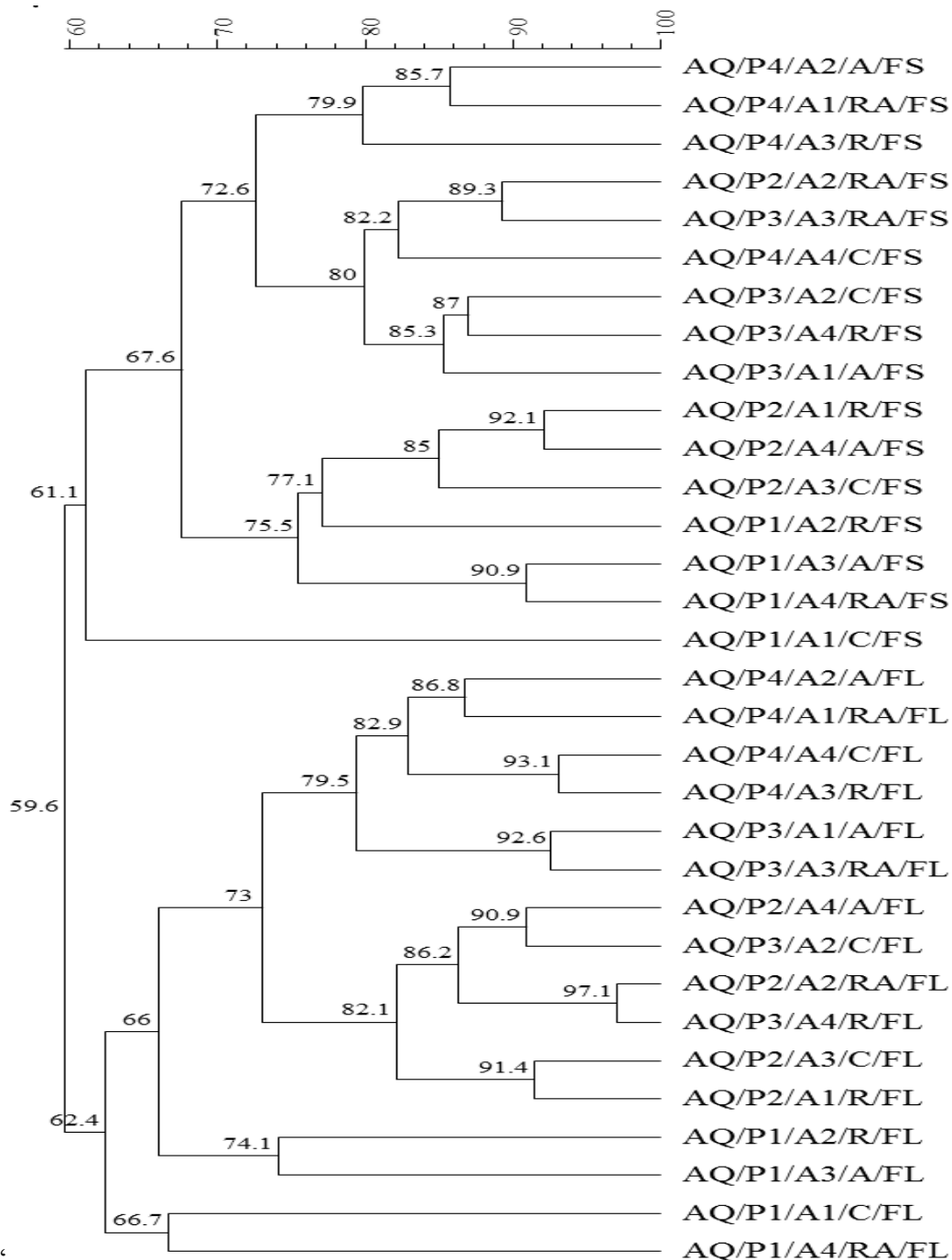


Figura 3 - Dendrograma gerado a partir do perfil eletroforético de seqüências do gene rRNA 16S da comunidade bacteriana associada às frações líquida e sólida do conteúdo ruminal de animais consumindo feno de alta qualidade. [Os valores apresentados, assim como a escala acima da figura, representam a similaridade percentual expressa pelo índice Dice entre amostras ou grupos de amostras (AQ = forragem alta qualidade; P1, P2, P3 e P4: períodos experimentais; A1, A2, A3 e A4: animais experimentais; C, R, RA e A: controle sem suplementação, suplementação no rúmen, suplementação no rúmen e abomaso e suplementação no abomaso, respectivamente; FL = fração líquida e FS = fração sólida)].



Figura 4 - Dendrograma gerado a partir do perfil eletroforético de seqüências do gene rRNA 16S da comunidade bacteriana associada à fração líquida do conteúdo ruminal de animais consumindo feno de média e alta qualidade. [Os valores apresentados, assim como a escala acima da figura, representam a similaridade percentual expressa pelo índice Dice entre amostras ou grupos de amostras (AQ = forragem alta qualidade e MQ = forragem de média qualidade; P1, P2, P3 e P4: períodos experimentais dentro de cada experimento; A1, A2, A3 e A4: animais experimentais; C, R, RA e A: controle sem suplementação, suplementação no rúmen, suplementação no rúmen e abomaso e suplementação no abomaso, respectivamente; FL = fração líquida)].

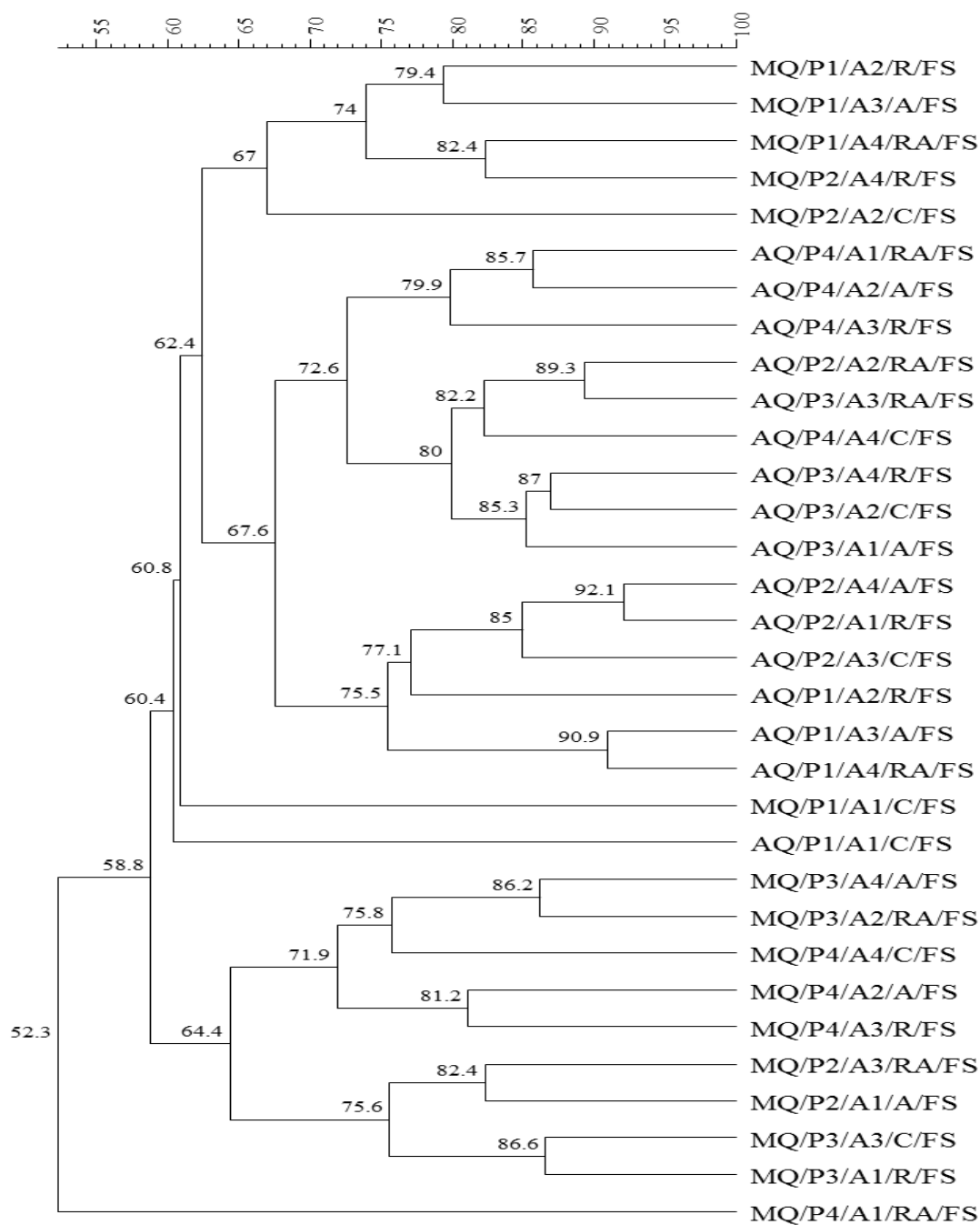


Figura 5 - Dendrograma gerado a partir do perfil eletroforético de seqüências do gene rRNA 16S da comunidade bacteriana associada à fração sólida do conteúdo ruminal de animais consumindo feno de média alta e média qualidade. [Os valores apresentados, assim como a escala acima da figura, representam a similaridade percentual expressa pelo índice Dice entre amostras ou grupos de amostras (AQ = forragem alta qualidade e MQ = forragem de média qualidade; P1, P2, P3 e P4: períodos experimentais dentro de cada experimento; A1, A2, A3 e A4: animais experimentais; C, R, RA e A: controle sem suplementação, suplementação no rúmen, suplementação no rúmen e abomaso e suplementação no abomaso, respectivamente; FS = fração sólida)].

Discussão

As forragens utilizadas neste estudo foram classificadas como de média e alta qualidade. Esta classificação foi inicialmente fundamentada no teor proteico da forragem (Tabela 1), devido ao papel central da proteína na nutrição de bovinos em condições tropicais, haja vista que sua deficiência é comum em diversas condições dietéticas (Detmann et al., 2010; 2014a).

A despeito da concentração similar de FDN, a qualidade dos compostos fibrosos de ambas as forragens foi notadamente distinta, o que é percebido pela avaliação do potencial de degradação da FDN. A relação FDN_i/FDN_{cp} das forragens de média e alta qualidade foi de 0,54 e 0,37, respectivamente, corroborando a melhor qualidade da forragem denominada de alta qualidade (Tabela 1).

A despeito da ausência de significância ($P>0,09$), o consumo de MO foi aproximadamente 40% superior quando forragem de alta qualidade foi oferecida aos animais. Este comportamento é corroborado pelo maior consumo de FDN em animais alimentados com forragem de alta qualidade (Tabela 3). Considerando que os suplementos eram isentos de FDN, a ampliação no consumo de FDN implica necessariamente em ampliação do consumo de forragem.

A ausência de respostas à suplementação sobre o consumo com ambas as forragens corrobora resultados obtidos em condições não tropicais (Van Soest, 1994) e tropicais (Lazzarini et al., 2009; Figueiras et al., 2010; Lazzarini, 2011), em que estímulos sobre o consumo com relação à suplementação proteica deixam de ser evidentes quando os teores de PB da forragem ultrapassam 70-80 g/kg MS.

Ao menos parte da ampliação do consumo com a elevação da qualidade da forragem parece advir da maior digestibilidade da FDN observada com a forragem de

alta qualidade (Tabela 3), o que culminou também em maior concentração de AGV no rúmen (Tabela 4). Contudo, os efeitos da suplementação não se mostraram evidentes, uma vez que não houve alteração da digestibilidade da FDN com o fornecimento de suplementos, o que indica pouca ou nenhuma alteração sobre a digestibilidade da forragem basal (Tabela 3). A elevação da digestibilidade da MO com a suplementação parece indicar efeito direto da alta digestibilidade do suplemento em si.

Segundo Detmann et al. (2013), as deficiências de compostos nitrogenados em bovinos alimentados com forragens tropicais seriam classificadas como primárias e secundárias. As deficiências primárias seriam associadas a limitações de natureza microbiana quanto à capacidade de utilização dos substratos basais no rúmen. Por sua vez, as deficiências secundárias estão associadas a características pós-digestivas ou metabólicas nas quais alguma deficiência de compostos nitrogenados compromete o desempenho dos animais.

Para consideração dos efeitos pós-ingestivos ou metabólicos da proteína sobre o consumo, Detmann et al. (2013; 2014b) sugeriram a utilização de relação entre a proteína e a energia dietética (P:E), devido à possibilidade de visualização da adequação metabólica causada pela utilização de nutrientes suplementares. Associações entre P:E e consumo de forragens têm sido estabelecidas por vários autores em condições tropicais (Egan, 1977; Panjaitan et al., 2010; Costa et al., 2011b; Detmann et al., 2014b).

Utilizando-se a relação entre as concentrações de PB e de MOD como representante da relação P:E, verificou-se comportamento quadrático ($P < 0,01$) do consumo de MO, com ponto de máxima resposta em aproximadamente 216 g PB/kg MOD (Figura 6), valor próximo do sugerido por Poppi & McLennan (1995) para máxima eficiência de uso do nitrogênio suplementar (210 g PB/kg MOD). Com o excesso de nitrogênio em relação à energia dietética ocorre redução do consumo

voluntário pelo estabelecimento de relações de mal estar (Detmann et al., 2007), excesso de catabolismo proteico (Illius & Jessop, 1996) e elevação da produção de calor corporal (Poppi & McLennan, 1995).

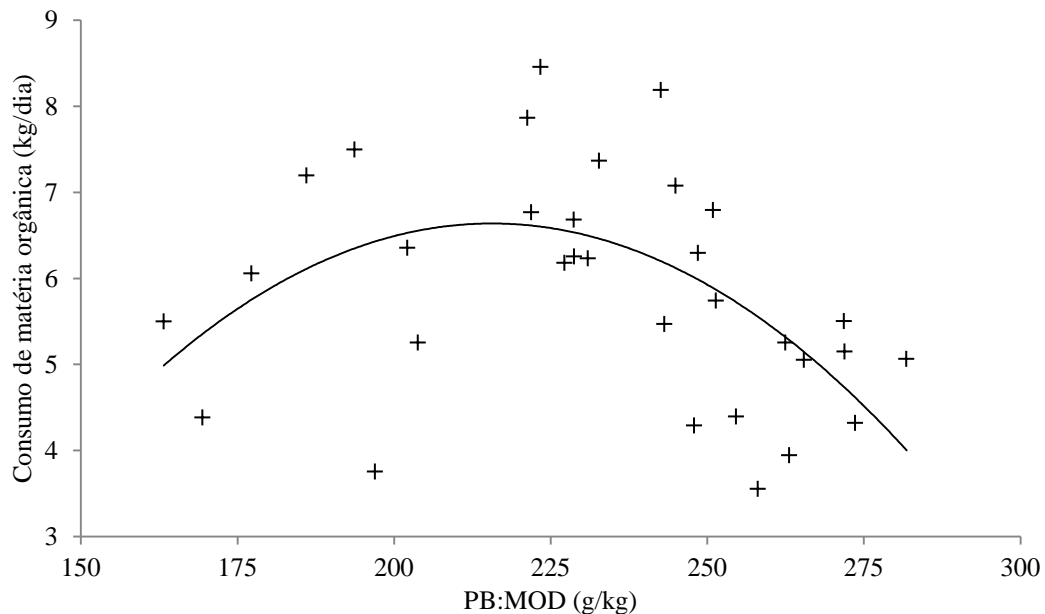


Figura 6 - Relação entre o consumo de matéria orgânica e a relação entre as concentrações dietéticas de proteína bruta e matéria orgânica digerida (PB:MOD; $\hat{Y} = -21,03 + 0,2567X - 0,0005956X^2$; $s_{XY} = 1,14$; $n = 32$).

Considerando-se as condições alimentares aqui avaliadas, não ocorreriam entraves ao consumo atribuídos a restrições na degradação dos compostos fibrosos, pois os níveis de proteína da forragem basal se encontram acima do mínimo necessário para o atendimento das necessidades da microbiota fibrolítica ruminal (Lazzarini et al., 2009; Figueiras et al., 2010; Sampaio et al., 2010; Detmann et al., 2014b).

Contudo, diante da redução da taxa de passagem da FDN observada neste estudo com a utilização de forragem de alta qualidade (Tabela 4), poderia se especular que houvesse ampliação do efeito de repleção ruminal da fibra nos animais consumindo forragem de melhor qualidade, o que acarretaria redução do consumo. Todavia, a relação entre consumo e taxa de passagem não pode ser avaliada isoladamente, pois a

ingestão voluntária de forragem constitui um evento complexo com número elevado de variáveis e interações.

Variações no enchimento ruminal têm sido relatadas como possível ajustamento causado pelo balanço entre exigências nutricionais e qualidade da dieta. Assim animais podem ampliar a capacidade ruminal devido a um decréscimo na qualidade da forragem (Weston, 1996; Schettini et al., 1999) ou a um aumento nas exigências nutricionais (Tulloh, 1966; Forbes, 2007). Assim, considerando que não ocorreu nenhuma alteração significativa no estágio fisiológico dos animais, a maior massa ruminal de FDN observada com o fornecimento de forragem de média qualidade reflete tão somente sua menor qualidade em relação à forragem de alta qualidade (Tabela 4).

Embora sem efeito significativo ($P>0,08$), a taxa de degradação da fibra foi aproximadamente 29% superior para a forragem de alta qualidade (Tabela 5). Associando-se este comportamento à redução no pool ruminal de FDN (Tabela 4), define-se que menor massa de FDN estaria sujeita à passagem ruminal com o fornecimento de forragem de alta qualidade, suportando o comportamento observado para a taxa de passagem ruminal (Tabela 4).

O BNR foi ampliado pela suplementação no rúmen e no rúmen e abomaso (Tabela 3), o que se deve diretamente ao aumento da disponibilidade de proteína degradável no rúmen, reduzindo proporcionalmente a participação do nitrogênio reciclado no pool total de nitrogênio ruminal (Detmann et al., 2013).

A despeito dos efeitos sobre o BNR, somente a suplementação ruminal foi capaz de incrementar a concentração de NAR (Tabela 4), o que refletiu em elevação da taxa de degradação da FDN (Tabela 5). Detmann et al. (2009), utilizando a avaliação de Hanes-Woolf, estabeleceram que existe relação linear positiva entre concentração de

NAR e a taxa de degradação da fibra, o que suporta a elevação dos valores de ambas as características somente com a suplementação ruminal.

A despeito dos efeitos da suplementação ruminal sobre a taxa de degradação da FDN e da melhoria da qualidade da forragem sobre a digestibilidade da FDN, não foram observadas alterações sobre a produção de NMIC (Tabela 4). De acordo com Detmann et al. (2014a), o crescimento microbiano no rúmen de animais alimentados com forragens tropicais não deve ser considerado completamente compreendido. Embora haja melhorias no crescimento microbiano com a suplementação com compostos nitrogenados (Detmann et al., 2009), em diversos experimentos tem sido demonstrado que a suplementação com compostos nitrogenados não está associada a aumentos significativos no fluxo microbiano ao trato gastrintestinal posterior (Lazzarini et al., 2009; Figueiras et al., 2010; Souza et al., 2010; Rufino, 2011).

Considerando as características associadas aos aspectos produtivos, o efeito mais promeniente da suplementação, independentemente da qualidade da forragem, foi verificado sobre o BN. Independentemente do local de fornecimento dos suplementos, verificou-se maior retenção de nitrogênio no organismo animal, o que, em situações práticas, implicaria em maior crescimento e/ou ganho de peso (Tabela 3).

Apesar das rotas absorptivas e metabólicas diferenciadas dos compostos nitrogenados suplementares fornecidos no rúmen ou no pós-rúmen (Rufino, 2011; Batista, 2012), o aumento na retenção de nitrogênio implica em melhorias no status de nitrogênio no metabolismo animal (Detmann et al., 2013).

Em termos teóricos, o termo “status de nitrogênio” define a disponibilidade quantitativa e qualitativa de compostos nitrogenados para todas as funções fisiológicas no metabolismo animal, incluindo-se as funções associadas com o metabolismo de outros compostos (e.g., energia). Portanto, o status de nitrogênio constitui um termo

relativo que dependerá do nível de produção e estágio fisiológico do animal, os quais definirão os requerimentos de compostos nitrogenados (Detmann et al., 2014b). A melhoria no status de nitrogênio reduz a proporção do nitrogênio usado em funções de sobrevivência e manutenção e amplia a disponibilidade de compostos nitrogenados para fins anabólicos (Detmann et al., 2013; 2014b).

A diversidade (SFL) e a riqueza microbiana associada à fase líquida (RFL) foram ampliadas com a melhoria na qualidade da forragem (Tabela 5), mas nenhum efeito foi observado quanto à diversidade (SFS) e à riqueza microbiana associada à fração sólida (RFS). A forragem de alta qualidade apresentou maior potencial de degradação da FDN (Tabela 1), maior coeficiente de digestibilidade da FDN (Tabela 3) e tendeu a apresentar maior taxa de degradação dos compostos fibrosos (Tabela 4). A maior degradação da fibra significa em maior diluição e liberação de substratos (taxa de diluição) a partir dos carboidratos fibrosos e maior liberação de metabólitos por parte dos micro-organismos aderentes. Desta forma, considerando-se dietas baseadas em forragens, haveria maior concentração e maior diversidade de potenciais substratos na fração líquida da digesta ruminal para uso dos micro-organismos não aderentes, o que parece ter elevado a RFL. Ressalta-se que a diferença entre as frações sólida e líquida foi bem estabelecida neste estudo (Figuras 2 e 3).

Segundo Edwards et al. (2008), o aumento da riqueza microbiana seria desejável no ambiente ruminal, pois a maior diversidade poderia favorecer o aparecimento de novas rotas metabólicas fazendo, por exemplo, com que o rúmen superasse distúrbios metabólicos com maior facilidade. Contudo, há de se ressaltar que a proporção total de micro-organismos associados à fase líquida é de aproximadamente 20% (Fosberg & Lam, 1977; Craig et al., 1987, Martin & Michalet-Doreau, 1995; Yang et al., 2001). Assim, a ampliação na riqueza e diversidade microbianas nesta fração teria pouco

impacto sobre o metabolismo ruminal em si, o que parece ser suportado pela ausência de associação entre RFL e SFL e as características produtivas (Tabelas 7 e 8) e atividades fibrolíticas (Tabela 9).

Estudos envolvendo avaliações da estrutura da comunidade microbiana de ruminantes consumindo forragens e com uso de suplementos são escassos na literatura.

Vinh et al. (2011) avaliaram a ecologia microbiana de búfalos consumindo palhada de arroz e suplementados com ureia e observaram modificações na comunidade microbiana. Naquele estudo a técnica de DGGE foi utilizada apenas para estudar a diversidade do domínio Archea, sendo que diferenças não foram encontradas. Todavia, por intermédio das técnicas de PCR quantitativo e de contagem microbiana convencional os autores observaram estímulo ao crescimento de bactérias fibrolíticas, além do aumento na contagem de zoósporos de fungos em resposta à adição de ureia. Apesar deste resultado, a suplementação não exerceu efeitos sobre a riqueza ou sobre a diversidade microbiana (Tabela 5; Figuras 4 e 5), evidenciando que diferenças entre forragens sejam talvez mais relevantes que os efeitos da disponibilidade de nitrogênio no rúmen.

De forma similar aos resultados aqui obtidos, Otero et al. (2010), ao compararem diferentes aditivos em dietas com fontes de energia distintas em bovinos, não observaram efeitos dos tratamentos apesar das distinções entre dietas. Segundo estes autores a ausência de efeito poderia ser atribuída à dificuldade de se separar os efeitos de dieta e animal. Efeitos atribuídos aos animais sobre o perfil da comunidade microbiana foram demonstrados por Weimer et al. (2010).

Os resultados obtidos neste trabalho permitem evidenciar que aspectos da dieta são capazes de alterar, ao menos em parte, a estrutura da comunidade microbiana, corroborando outros estudos conduzidos no Brasil (Freitas et al., 2010; Argôlo, 2012),

nos quais se observaram diferenças na riqueza quando modificações dietéticas foram estabelecidas. A ação da dieta sobre a comunidade microbiana foi também demonstrada e discutida por outros autores em diversas partes do mundo (Kocherginskaya et al., 2001; Rogensbogenova et al., 2004; Duval et., al 2007; Sadet et al., 2007) . Apesar das diferenças observadas na comunidade microbiana quando a qualidade da forragem foi alterada, diferenças para os tratamentos distribuídos dentro de cada qualidade não foram observadas.

A técnica de DGGE permite detectar a presença ou a ausência de determinados grupos bacterianos (sequências distintas do gene 16S rRNA) frente a diferentes condições implementadas no ambiente ruminal. O número de grupos bacterianos detectados constitui a riqueza. Por sua vez, o conceito teórico de diversidade é função da riqueza e da equitatividade (Magurran, 2004). Assim em comunidades onde a equitatividade é máxima, ou seja, todos grupos de micro-organismos estão presentes na mesma proporção, as diferenças na diversidade seriam dadas pela variação da riqueza. Este comportamento pode ser notado neste estudo, ao observar-se a correlação positiva entre a riqueza e a diversidade (Tabela 9). Entretanto, esta suposta distribuição equitativa dos grupos não reflete a realidade mas, dificuldades do método de quantificar a partir da imagem do DGGE as importâncias relativas de cada grupo. Logo, a ausência de efeito da suplementação sobre a riqueza e a diversidade, não impede que a suplementação tenha modificado a participação relativa e a atividade de micro-organismos com papel relevante na fermentação ruminal. Desta maneira, a ausência de efeito da suplementação sobre a riqueza e a diversidade da comunidade microbiana observada neste estudo não deve ser interpretada necessariamente como uma falta de capacidade do suplemento de agir sobre a microbiota. Deste modo, a associação de outras técnicas ao DGGE assim como mudanças no modo matemático de proceder as

avaliações das imagens podem ser interessantes em estudos futuros que visem avaliar os efeitos dietéticos sobre a comunidade microbiana.

Adicionalmente, deve-se ressaltar a eficiência dos métodos empregados neste estudo (coleta de amostras, extração do DNA, conjunto de primers e protocolo de amplificação do gene e execução da DGGE) que permitiu a detecção de um total de 75 bandas ou filotipos, ao passo que em outros estudos realizados no Brasil com diferentes métodos o número total de bandas foi inferior a 10 (Otero et al., 2012; Argôlo, 2007; Teófilo, 2010). O grande número de filotipos pode ser de grande valia em estudos futuros que visem rastrear as possíveis ligações das bandas com as características de fermentação ruminal, uma vez que o maior número de filotipos torna maior a probabilidade de se identificar bandas (grupo de micro-organismos) que possuam papel metabólico relevante no rúmen.

A despeito das atividades das enzimas CMCase e xilanase terem se correlacionado positivamente ($P < 0,05$) com a taxa de degradação da FDN, os estímulos positivos da suplementação ruminal não foram claramente observados na avaliação das atividades enzimáticas (Tabela 6).

Desestímulo à atividade enzimática quando proteína é infundida no rúmen, poderia ser atribuído à ocorrência do efeito proteína (Costa et al., 2009; Carvalho et al., 2011), o qual é definido pelo aumento na competição entre espécies fibrolíticas e não fibrolíticas na presença de proteína suplementar. Contudo, não foi observado esse efeito neste estudo quando considerada a taxa de degradação da FDN como medida indireta da atividade fibrolítica (Tabela 5) ou pela avaliação direta das atividades das enzimas individualmente (Tabela 6). Em geral a atividade das enzimas foi deprimida pela

suplementação pós-ruminal. Contudo, não se obteve embasamento teórico na literatura consultada que justifique tal comportamento.

A atividade enzimática de xilanase apresentou ampliação ao longo do tempo amostral (Figura 1). A ampliação da atividade da atividade fibrolítica em estádios tardios do ciclo pós-prandial foi também demonstrada por Williams et al. (1989) e Martin & Michalet-Doreau (1995).

Conclusão

A melhoria da qualidade da forragem amplia a digestibilidade da fibra, a retenção de nitrogênio e influencia a comunidade microbiana associada à fração líquida do conteúdo ruminal. A suplementação proteica, independentemente do local de suplementação, amplia a retenção de nitrogênio no organismo animal. Não podem ser estabelecidas associações claras entre características produtivas e de atividades enzimática e diversidade microbiana ruminal em bovinos alimentados com forragem tropical e suplementados com compostos nitrogenados.

Referências Bibliográficas

- ARGÔLO, L.S. **Microbiota ruminal de cabras lactantes alimentadas com algaroba (prosopis juliflora (sw) d.c.): análise funcional e molecular**. 106f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2007.
- ARGÔLO, L.S. **Análise molecular e do processo fermentativo da microbiota ruminal utilizando extratos etanólicos de leguminosas arbóreas tropicais**. 165f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012.
- BARLEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v.23, p.257-270, 1992.
- BATISTA, E.D. **Suplementação nitrogenada ruminal e/ou abomasal em bovinos alimentados com forragem tropical de alta qualidade**. 51f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2012.
- BAYER, E.A.; MORAG, E.; LAMED, R. The Cellulosome, a treasure trove for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.12, p.379-386, 1994.
- BENTO, C.B.P. **Avaliação da comunidade microbiana do rúmen e isolamento de bactérias fermentadoras de aminoácidos de bovinos alimentados com forrageiras tropicais e suplementados com caseína**. 133f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 2012.
- BRULC, J.M.; ANTONOPOULOS, D.A.; MILLER, M.E.; WILSON, M.K.; YANNARELL, A.C.; DINSDALE, E.A.; EDWARDS, R.E.; FRANK, E.D.; EMERSON, J.B.; WACKLIN, P.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B.; NELSON, K.E.; WHITE, B.A. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, p.1948-53, 2009.
- CARVALHO, I.P.C.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H.C.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; COSTA, V.A.C.; GOMES D.I. Growth and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from rumen fluid according to energy or nitrogen source. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.1260-1265, 2011.
- CECAVA, J.M.; MERCHEN, N.R.; GAY, L.C.; BERGER, L.L. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2480-2488, 1990.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.
- COCHRAN, W.G.; COX, G.M. **Experimental designs**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1957. 611p.
- COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F.; HENRIQUES, L.T.; MANTOVANI, H.C. Degradação in vitro da fibra em detergente neutro de forragem tropical de baixa qualidade em função de suplementação com proteína e/ou carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.494-503, 2008.

- COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F.; HENRIQUES, L.T.; MANTOVANI, H.C. Degradação in vitro da fibra em detergente neutro de forragem tropical de alta qualidade em função da suplementação com proteína e/ou carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.1803-1811, 2009.
- COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; HENRIQUES, L.T.; CARVALHO, I.P.C. Digestibilidade total e parcial e balanço nitrogenado em bovinos em pastejo no período das águas recebendo suplementos com nitrogênio não protéico e/ou proteína verdadeira. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.2815-2826, 2011a.
- COSTA, V.A.C.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; CARVALHO, I.P.C.; MONTEIRO, L.P. Consumo e digestibilidade em bovinos em pastejo durante o período das águas sob suplementação com fontes de compostos nitrogenados e de carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.1788-1798, 2011b.
- CRAIG, W.M.; BRODERICK, G.A.; RICKER, D.B. Quantification of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal digesta. **Journal Nutrition**, v.117, p.56-62, 1987.
- DEHORITY, B.A.; ORPIN, C.G. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: HOBSON, P.N. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. 2 ed. London: Elsevier Applied Science, 1997. p.151-183.
- DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S.C.; LANA, R.P. Fatores controladores de consumo em suplementos múltiplos fornecidos ad libitum para bovinos manejados a pasto. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.73-93, 2007.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Avaliação nutricional de alimentos ou de dietas? Uma abordagem conceitual. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 6, 2008, Viçosa. **Anais...** Viçosa: DZO-UFV, 2008. p.21-52.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; MANTOVANI, H.C.; VALADARES FILHO, S.C.; SAMPAIO, C.B.; SOUZA, M.A.; LAZZARINI, I.; DETMANN, K.S.C. Parameterization of ruminal fibre degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. **Livestock Science**, v.126, p.136-146, 2009.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. Otimização do uso de recursos forrageiros basais. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 7, 2010, Viçosa. **Anais...** Viçosa: DZO-UFV, 2010. p.191-240.
- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; Azevêdo, J.A.G. (Eds.) **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema. 214p. 2012.
- DETMANN, E.; VALENTE, E.E.L.; BATISTA E.D.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; HUHTANEN, P. Efeitos e eficiência de uso do nitrogênio suplementar em bovinos em pastejo em regiões tropicais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE

- PRODUÇÃO DE RUMINANTES, 2, 2013, Itapetinga. **Anais...** Itapetinga: UESB, 2013. p.137-155.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F.; HUHTANEN, P. Nutritional aspects applied to grazing cattle in tropics: a review based on Brazilian results. **Semina**, 2014a (submitted).
- DETMANN, E.; VALENTE, E.E.L.; BATISTA E.D.; HUHTANEN, P. An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. **Livestock Science**, v.162, p.141-153, 2014b.
- DUVAL, S.M; MCEWAN, N.R; GRAHAM, R.C; WALLACE, R.J; NEWBOLD, C.J. Effect of a blend of essential oil compounds on the colonization of starch-rich substrates by bacteria in the rumen. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.2132-2141, 2007.
- EDWARDS, J.E.; HUWS, S.A.; KIM, E.J.; LEE, M.R.F.; KINGSTON-SMITH A.H.; SCOLLAN, N.D. Advances in microbial ecosystem concepts and their consequences for ruminant agriculture. **Animal**, v.5, p.653-660, 2008.
- EGAN, A.R. Nutritional status and intake regulation in sheep. VIII. Relationships between voluntary intake of herbage by sheep and the protein/energy ratio in the digestion products. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.28, p.907-915, 1977.
- ELLIS, W.C.; MATIS, J.H.; HILL, T.M. Methodology for estimating digestion and passage kinetics of forages. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p.682-756.
- FARENZENA, R. **Aderência e atividade fibrolítica bacteriana ruminal: efeito do pH e da concentração de carboidratos solúveis**. 101f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Santa Maria, 2010.
- FIGUEIRAS, J.F.; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALENTE, T.N.P.; VALADARES FILHO, S.C.; LAZZARINI, I. Intake and digestibility in cattle under grazing supplemented with nitrogenous compounds during dry season. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.1303-1312, 2010.
- FORBES, J.M. Voluntary food intake and diet selection in farm animals. 2 ed. London: CAB International, 2007. 453p.
- FORSBERG, C.W.; LAM, K. The use of adenosine-5'-triphosphate as an indicator of microbiota biomass in rumen contents. **Applied Environment Microbiology**, v.33, p.528-537, 1977.
- FREITAS, K.C.; GABRIEL, J.E.; LEITE, L.C.; ARMAS, R.D.; LANNA, D.P.D; MADEIRA, H.M.F. Molecular characterization of ruminal bacterial diversity in vitro. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.30, p.187-192, 2008.
- GUAN, L.L.; NKRUMAH, J.D.; BASARAB, J.A.; MOORE, S.S. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. **FEMS Microbiology Letters**, v.288, p.85-91, 2008.
- HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GUAN, L.L.; GOONEWARDENE, L.A.; LI, M.; MUJIBI, D.F.; STOTHARD, P.; MOORE, S.S.; LEON-QUINTERO, M.C. Correlation of particular bacterial PCR-denaturing gradient gel electrophoresis patterns with bovine ruminal fermentation parameters and feed efficiency traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.6338-6350, 2010.

- HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GOONEWARDENEL, A.; WANG, Z.; DURUNNA O.N.; MOORE, S.S. Guan LL Impact of feed efficiency and diet on adaptive variations in the bacterial community in the rumen fluid of cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, 1203-1214, 2012.
- ILLIUS, A.W.; JESSOP, N.S. Metabolic constraints on voluntary intake in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.74, p.3052-3062, 1996.
- KIM, M.; MORRISSON, M.; YU, Z. Phylogenetic diversity of bacterial communities in bovine rumen as affected by diets and microenvironments. **Folia Microbiologica**, v.56, p. 453-458, 2011.
- 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**, v.7, p.119-134, 2001.
- KRAUSE, D.O.; DARLYMPLE, B.P.; SMITH, W.J.; MACKIE, R.I.; McSWEENEY, C.S. 16S rDNA sequencing of *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*: design of a signature probe and its application in adult sheep. **Microbiology**, v.145, p.1797-1807, 1999.
- LAZZARINI, I.; DETMANN, E.; SAMPAIO, C.B.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C.; SOUZA, M.A.; OLIVEIRA, F.A. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.2021-2030, 2009.
- LAZZARINI, I. **Desempenho nutricional de bovinos em pastejo durante os períodos de seca e águas suplementados com compostos nitrogenados e/ou amido**. 2011. 62f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2011.
- MAGURRAN, A.E. **Measuring biological diversity**. Carlton: Blackwell, 2004, 215p.
- MARCONDES, M.I.; GIONBELLI, M.P.; VALADARES FILHO, S.C.; CHIZZOTTI, M.L.; PAULINO, M.F. Exigências nutricionais de proteína para bovinos de corte. In: VALADARES FILHO, S.C.; MARCONDES, M.I.; CHIZZOTTI, M.L.; PAULINO, P.V.R. (Eds.) **Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados BR-CORTE**. 2 ed. Viçosa: DZO-UFV, 2010. p.113-133.
- MARTIN, C.; MICHALET-DOREAU, B. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: effect of barley and buffer supplements. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.67, p.409-415, 1995.
- MARTÍNEZ, E.D.; TURNBULL, K.E.; QUIGLEY, S.P.; STREETER S.J.; SWAIN, A.; KLIEVE, A.V.; OUWERKERK D.; POPPI, D.P. Liquid-phase denaturant gradient gel electrophoresis profiles of rumen bacteria from Brahman cross steers selected into two groups on the basis of post-weaning liveweight gain on low crude protein pasture. **Animal Production Science**, v.52, p.647-652, 2012.
- McDOUGALL, E.I. Studies on ruminal saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemistry Journal**, v.43, p.99-109, 1949.
- MICHALET-DOREAU, B.; FERNANDEZ, I.; PEYRON, C.; MILLET, L.; FONTY, G. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. **Reproduction Nutrition Development**, v.41, p.187-194, 2001.

- MILLER, G.L.; BLUM, R.; GLENNON, W.E.; BURTON, A.L. Measurement of carboxymethylcellulase activity. **Analytical Biochemistry**, v.2, p.127-132, 1960.
- MUHLING, M.; WOOLVEN-ALLEN, J.; MURRELL, J.C.; JOINT, I. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. **The ISME Journal**, v.2, p.379-392, 2008.
- MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s ribosomal-RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.695-700, 1993.
- OTERO, W.G.; MARINO, C.T.; BARRETO, C.C. PELLIZARI, V.H.; MILLEN, D.D.; PACHECO, R.D.L.; FERREIRA, F.A.; DICOSTANZO, A.; ARRIGONI, M.B.; RODRIGUES, P.H.M. Rumen microbial diversity under influence of a polyclonal antibody preparation against lactate-producing and proteolytic bacteria in cows fed different energy sources. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, p.491-502, 2012.
- PANJAITAN, T.; QUIGLEY, S.P.; MCLENNAN, S.R.; SWAIN, T.; POPPI, D.P. Intake, retention time in the rumen and microbial protein production of *Bos indicus* steers consuming grasses varying in crude protein content. **Animal Production Science**, v.50, p.444-448, 2010.
- PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; VALENTE, E.E.L.; BARROS, L.V. Nutrição de bovinos em pastejo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 4, 2008, Viçosa. **Anais...** Viçosa: DZO-UFV, 2008. p.131-169.
- POPPI, D.P.; MCLENNAN, S.R. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, v.73, p.278-290, 1995.
- PORTO, M.O. **Suplementação múltipla para bovinos de corte nas fases de cria, recria e terminação em pastagens de *Brachiaria decumbens***. 140f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- REGENSBOGENOVA, M; PRISTAS, P.; JAVORSKY, P; MOON-Van Der STAAY, S.Y.; Van DER STAAY, G.W.; HACKSTEIN, J.H.; NEWBOLD, C.J.; McEWAN, N.R. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, p.144-147, 2004.
- RUFINO, L.M.A. **Suplementação nitrogenada ruminal e/ou abomasal em bovinos alimentados com forragem tropical**. 57f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2011.
- RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, NY: James B. Russell. p.122, 2002.
- RUSSELL, J.B.; MUCK, R.E.; WEIMER, P.J. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, p.183-197, 2009.
- SADET, S.; MARTIN, C.; MEUNIER, B. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. **Animal**, v.1, p.939-944, 2007.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1626p.
- 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 and Production**, v.42, p.1471-1479, 2010.
- SCHETTINI, M.A.; PRIGGE, E.C.; NESTOR, E.L. Influence of mass and volume of ruminal contents on voluntary intake and digesta passage of a forage diet in steers. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1896-1904, 1999.
- SOUZA, M.A. ; DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; SAMPAIO, C.B.; LAZZARINI, I; VALADARES FILHO, S.C. Intake, digestibility and rumen dynamics of neutral detergent fibre in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and/or starch. **Tropical Animal Health and Production**, v.42, p.1299-1310, 2010.
- STEVENSON D.M.; WEIMER, P.J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.165-174, 2007.
- STEWART, C.S. Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. **Applied Environment Microbiology**, v.33, p.497-502, 1977.
- TEÓFILO, T.S. **Morfofisiologia ruminal de vacas leiteiras alimentadas no pre-parto com dietas de diferentes teores energéticos**. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Lavras, 2010.
- TULLOH, N.M. Physical studies of the alimentary tract of grazing cattle. IV. Dimensions of the tract in lactating and non-lactating cows. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.9, p.999-1008, 1966.
- USHIDA, K.; LASSALAS, B.; JOUANY, J.P. Determination of assay parameters for RNA analysis in bacterial and duodenal sample by spectrophotometry: Influence of treatment and preservation. **Reproduction Nutrition Development**, v.25, p.1037-1046, 1985.
- VALENTE, T.N.P.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A.C.; VALDARES FILHO, S.C.; GOMES, D.I.; FIGUEIRAS, J.F. Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from different textiles. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.2565-2573, 2011.
- Van MILGEN, J.; MURPHY, L.L.; BERGER, L.L. A compartmental model to analyze ruminal digestion. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.2515-2529, 1991.
- Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VINH, N.T.; WANAPAT, M.; KHEJORNART, P.; KONGMUM, P. Studies of diversity of rumen microorganisms and fermentation in swamp buffalo fed diferente diets. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.10, p.406-414, 2011.
- WANG, Y.; MCALLISTER, T.A. Rumen microbes, enzymes and feed digestion - a review. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v.15, p.1659-76, 2002.

- WEIMER, P.J.; WAGHORN, G.C.; ODT, C.L.; MERTENS, D.R. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.122-134, 1999.
- WEIMER, P.J.; STEVENSON, D.M.; MANTOVANI, H.C.; MAN, S.L.C. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.5902-12, 2010.
- WESTON, R.H. Some aspects of constraint to forage consumption by ruminants. **Australian Journal of agricultural Research**, v.47, p.175-197, 1996.
- WILLIAMS, A.G.; WITHERS, S.E.; STRACHAN, N.H. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes in microbial populations from the digesta solids and liquor fractions of rumen contents. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.15-26, 1989.
- WU, S.; BALDIM 6th, R.L.; LI, W.; LI, C.; CONNOR, E.; LI, R. The bacterial composition of the bovine rumen detected using pirosequencing of 16s rRNA genes. **Metagenomics**, v.1, p.1-11, 2012.
- YANG, W.Z.; BEAUCHEMIN, K.A.; RODE, L.M. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2736-2746, 2001.
- ZERVOUDAKIS, J.T. **Suplementos múltiplos de autocontrole de consumo e frequência de suplementação, na recria de novilhos durante os períodos das águas e transição águas-seca**. 78f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- ZERVOUDAKIS, J.T.; PAULINO, M.F.; CABRAL, L.S.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; MORAES, E.H.B.K. Suplementos múltiplos de autocontrole de consumo na recria de novilhos no período das águas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1968-1973, 2008.
- ZORZI, K.; DETMANN, E.; QUEIROZ, A.C; PAULINO, M.F; MANTOVANI, H.C; BAYÃO, G.F. In vitro degradation of neutral detergent fiber of high-quality tropical forage according to supplementation with different nitrogenous compounds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.964-971, 2009.