

EFEITOS DE DIETAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEÍNA SOBRE OS PROTOZOÁRIOS CILIADOS NO RÚMEN DE BÚFALOS (*BUBALUS BUBALIS* L.)¹

RAUL FRANZOLIN NETO, JOSÉ CARLOS MACHADO NOGUEIRA FILHO²
e MARIA ELY MISEROCHI DE OLIVEIRA³

RESUMO - Quatro búfalos adultos, canulados no rúmen, foram submetidos a um experimento em quadrado latino (4x4), com quatro rações contendo níveis crescentes de proteína bruta na matéria seca: A) 8,7%; B) 10,5%; C) 12,3% e D) 14,3% PB, para estudar os efeitos do nível de proteína na ração sobre o número total e diferencial da fauna ruminal. As rações consistiram de 70% de capim-sempre-verde (*Panicum maximum* Jacq. var. *gongyloides*) e 30% de milho em grãos, e soja em grãos tostada e moída. Foram identificados e contados oito gêneros de protozoários ciliados no rúmen. Somente a ração com 12,3% de PB promoveu aumentos no número total de *Entodinium* spp., *Diplodinium* spp. e *Elytroplastron bubali* por ml de líquido ruminal. A concentração média total encontrada foi de $8,48 \times 10^4$ protozoários por ml de líquido ruminal, tendo predominado o *Entodinium* spp. (67,2%) e *Diplodinium* spp. (16,0%). Houve marcada variação diurna na concentração total e nos principais gêneros estudados.

Termos para indexação: fauna ruminal, *Panicum maximum*, ruminantes.

EFFECTS OF DIETS WITH VARYING PROTEIN LEVELS ON RUMEN CILIATE PROTOZOA IN BUFFALOES (*BUBALUS BUBALIS* L.)

ABSTRACT - Four rumen canulated buffaloes in a latin square design were used to investigate the effect of protein levels upon the concentration of ciliate protozoa in the rumen. The buffaloes were fed twice daily with four rations of increasing crude protein levels: 8.7%, 10.5%, 12.3% and 14.3% CP. The rations were composed of 70% roughage (*Panicum maximum* Jcq. var. *gongyloides* grass) and 30% concentrate (corn grain and toasted soybean grain). Eight genus of ciliate protozoa were identified and counted. A significant increase in the total protozoal numbers, *Entodinium* spp., *Diplodinium* spp. and *Elytroplastron bubali* was observed in the 12.3% CP ration. The mean of total protozoal concentration was 8.48×10^4 ml of rumen liquid and the percentage of *Entodinium* spp. was 67.2% following by *Diplodinium* spp. at 16.0%.

Index terms: ruminal fauna, *Panicum maximum*, ruminants.

INTRODUÇÃO

O rebanho bubalino no Brasil vem crescendo vertiginosamente, e atualmente, o búfalo já se encontra em posição de destaque na pecuá-

ria nacional, como produtor de carne, leite e trabalho.

Os estudos de microbiologia no rúmen em búfalos ainda estão em fase inicial e há uma falta muito acentuada de dados sobre os microrganismos e suas interrelações com o ambiente ruminal nos diversos tipos de alimentação, principalmente nas nossas condições tropicais.

A classificação dos protozoários do rúmen é baseada primariamente na morfologia celu-

¹ Aceito para publicação em 14 de novembro de 1990

² Zoot., Dep. de Criação de Ruminantes e Alimentação Animal, FMVZ/USP, Campus de Pirassununga, Caixa Postal 23, CEP 13630 Pirassununga, SP.

³ Méd. - Vet., Dep. de Parasitol., Inst. de Ciências Bioméd. Univ. de São Paulo, Cidade Universitária, São Paulo, SP.

lar, uma vez que os organismos são grandes o bastante para distinguir microscopicamente muitas características celulares em baixa magnitude. A maioria dos protozoários no rúmen são ciliados, embora possam existir espécies de flagelados. A classificação dos protozoários ciliados do rúmen é complexa. O grupo dos Entodiniomorfos compreende os principais gêneros: *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Ophryoscolex*. A família Isotrichidae possui dois gêneros mais comuns no rúmen: *Isotricha* e *Dasytricha*, que são chamados de Holotrichas. Os gêneros *Ostracodinium*, *Eudiplodinium* e *Elytroplastron* pertencem à subfamília Diplodiniinae, e o gênero *Elytroplastron* é representado por uma única espécie, *Elytroplastron bubali*, que comumente ocorre em búfalos e zebuínos (Dehority 1987).

A espécie bubalina parece abrigar no rúmen uma fauna diferente da de outros ruminantes. Dehority (1979) identificou 49 espécies diferentes de protozoários ciliados no rúmen de búfalos no Brasil, sendo que oito delas foram descritas pela primeira vez.

Segundo Marinho (1982), a distribuição e o desenvolvimento dos protozoários ciliados no rúmen é influenciada pela dieta ingerida pelo animal, pelo pH do conteúdo ruminal e pelas relações que eles estabelecem entre si e com a comunidade bacteriana. Orskov (1982) afirmou que os protozoários do rúmen são altamente proteolíticos e que a fonte de N dos protozoários geralmente deriva do processo de engolfamento de bactérias ruminais. Segundo Van Soest (1983), a proteína ou de origem da planta ou bacteriana é a maior fonte de energia para os protozoários no rúmen. Outras fontes de energia incluem os açúcares (holotrichas), o amido, e, provavelmente, a celulose e a hemicelulose (entodineomorfos).

Há controvérsia, na literatura, entre os pesquisadores, a respeito do teor de proteína na ração em relação ao número e composição das espécies de protozoários no rúmen. Hungate (1966) cita que algumas pesquisas evidenciaram que a concentração de protozoários no rúmen aumentou com a adição de proteína na dieta dos animais. Ciliados no rúmen foram di-

ferentemente afetadas pelo tipo de dieta, e o autor não encontrou correlação entre o nível de proteína na ração e o número de *Entodinium* spp. e Holotrichas no rúmen, mas a quantidade das espécies de *Anoploplodium denticulatum* e *Eudiplodinium maggii* aumentou com a elevação do nível de proteína dieta. Entretanto, Bird et al. (1979) encontraram populações de protozoários no rúmen de ovinos na ordem de $5,0 \times 10^5$ /ml de fluido ruminal, e ficou evidente que o nível de proteína na dieta não afetou a composição ou o número de protozoários no rúmen. Também Franzolin Neto et al. (1988) não verificaram diferenças significativas no número total de protozoários por ml de líquido ruminal entre ovinos alimentados com feno de capim-de-rhodes e de leucaena, em três rações contendo níveis crescentes de proteína bruta na matéria seca (5,6%, 9,8% e 14,0%).

Os objetivos do presente trabalho foram: (1) determinar a concentração dos principais protozoários ciliados no rúmen, através de contagens total e diferencial dos gêneros: *Entodinium* spp., *Diplodinium* spp., *Ostracodinium* spp., *Eudiplodinium* spp., *Elytroplastron bubali*, *Epidinium* spp., *Isotricha* spp. e *Dasytricha* spp., por ml de líquido ruminal, em búfalos submetidos à alimentação de rações contendo diferentes níveis de proteína bruta; (2) determinar a variação diurna da concentração de protozoários no rúmen.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no "Campus" de Pirassununga da USP, utilizando quatro búfalos (*Bubalus bubalis* L.) adultos, machos, canulados no rúmen, com peso médio de 430 kg em um delineamento em quadrado latino (4x4). Os animais foram mantidos em galpão fechado e alimentados com capim-sempr-verde (*Panicum maximum* Jacq. var. *gongyloides*) como volumoso, e milho em grãos moídos, e soja tostada em grãos e moída como concentrado, mantendo a relação volumoso:concentrado de 70:30 com base na matéria seca. Os tratamentos consistiram de quatro rações contendo níveis crescentes de proteína bruta na matéria seca, a saber: A)

8,7%; B) 10,5%; C) 12,3% e D) 14,3% PB. Diariamente fornecia-se cerca de 50 g de uma mistura completa de sal mineral por animal. A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, em quantidades iguais, às 9:00 e às 17 horas. As rações foram isoenergéticas, calculadas com 8,8 Mcal de energia metabolizável/kg MS.

O período experimental foi de 84 dias, sendo dividido em quatro subperíodos de 21 dias. Nos últimos dois dias de cada subperíodo foram coletadas amostras do líquido ruminal através da fistula, com o uso de uma bomba de sucção manual adaptada para tal. As amostras foram coletadas ao longo do dia, ou seja, 1, 3, 6, 12 e 18 horas antes da primeira alimentação (TO), e 24 horas após. Cerca de 100 ml de líquido ruminal eram retirados em cada coleta, e imediatamente determinava-se o pH com peagâmetro digital portátil; em seguida, 10 ml eram colocados em frascos contendo igual volume de solução formol-deído 1:2, para posterior identificação e contagem dos gêneros de protozoários ciliados, conforme técnica descrita por Dehority (1977) e Ogimoto & Imai (1982). Para análise estatística dos dados, utilizou-se a média das contagens dos dois dias de coletas para cada tempo de amostragem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeitos da dieta

As contagens total e diferencial dos principais gêneros de protozoários e o pH no rúmen dos búfalos submetidos aos quatro tratamentos podem ser vistas na Tabela 1. Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos nos valores de pH no rúmen dos animais, que apresentaram pH médio de 6,62. Houve diferenças significativas ($P < 0,05$) entre o tratamento C (12,3% PB) e os outros, para a contagem total e para os gêneros *Entodinium* spp. e *Diplodinium* spp. Com o *Elytroplastron* houve semelhanças entre os tratamentos B e C, e entre A e D. Nos demais gêneros de protozoários estudados não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Esses resultados não concordam com a citação de Hungate (1966), de que a adição de proteína à dieta promove aumento no número de protozoários no rúmen, pois não houve diferenças significativas entre os níveis de 8,7%

de PB (A), 10,5% de PB (B) e 14,3% de PB (D) na ração para o número total de protozoários e cinco gêneros estudados, e estão parcialmente de acordo com Bird et al. (1979), Michalowski (1975), Michalowski (1977) e Franzolin Neto et al. (1988), pois o nível de 12,3% de PB na ração promoveu aumento no número total e nos gêneros *Entodinium* spp., *Diplodinium* spp. e *Elytroplastron bubali*.

A concentração média dos protozoários ciliados no rúmen ($8,48 \times 10^4$ /ml L.R.) foi ligeiramente inferior à referida por Michalowski (1975), com búfalos alimentados com feno, a qual variou de 9,7 a $16,4 \times 10^4$ /ml, e menor que a encontrada por Dehority (1979) em búfalos sob pastejo ($16,6$ e $35,8 \times 10^4$ /ml). A quantidade média de protozoários no rúmen obtida no presente trabalho pode ser considerada baixa, de acordo com Dehority & Orpin (1988). Os autores, após várias referências consultadas, citaram que a concentração de protozoários nos ruminantes domésticos sob dietas com volumoso ou sob pastejo varia de 10 a 50×10^4 /ml e para animais alimentados com rações à base de concentrados os valores comumente encontram-se entre 50 e 150×10^4 /ml; contudo, concentrações de até 300×10^4 /ml são ocasionalmente reportadas.

A distribuição percentual dos diferentes gêneros foi semelhante entre os tratamentos e o número de *Entodinium* spp. foi marcadamente mais alto (67,2%) que os demais, seguido pelo *Diplodinium* spp. (16,0%). Estes achados concordam com Ffoulkes & Leng (1988), que verificaram, em bovinos alimentados com alto nível de forragem, a predominância de *Entodinium* spp., com o *Epidinium* spp. variando de 3 a 17% do número total de protozoários no rúmen. Franzolin Neto et al. (1988) também verificaram predominância dos protozoários *Entodinium* spp. no rúmen de ovinos alimentados com feno de capim-de-rhodes (61,78%); com feno de leucaena a predominância foi maior, 90% do total de protozoários. Bird et al. (1979) observaram que os pequenos protozoários do gênero *Entodinium* spp. constituíram 96% do total da população protozoária no rúmen de ovinos; e ainda, es-

tão de acordo com Dehoriy (1979) sobre a predominância de *Entodinium* spp. observada em búfalos alimentados com feno de capim-de-rhodes e sob pastejo de gramíneas nativas no Brasil.

No presente trabalho não foram encontrados protozoários dos gêneros *Ophryoscolex* spp. e *Polyplastron* spp. que são comuns em

ruminantes domésticos, o que está de acordo com Dehoriy (1979).

Ciclo diário

A concentração diária dos diferentes gêneros de protozoários ciliados no rúmen de búfalos pode ser observada na Tabela 2. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, e a

TABELA 1. Número de protozoários ($\times 10^4$ /ml de líquido ruminal) e pH no rúmen de búfalos alimentados com quatro níveis de proteína bruta na ração; A (8,7%), B (10,5%), C (12,3%) e D (14,3%).

Protozoários	A	B	C	D	Total	Total (%)	C.V. (%)
Total	7,86 a	7,80 a	10,49 b	7,76 a	8,48	100,0	23,86
<i>Entodinium</i> spp.	5,30 a	4,94 a	7,23 b	5,32 a	5,70	67,2	31,36
<i>Diplodinium</i> spp.	1,23 a	1,29 a	1,80 b	1,11 a	1,36	16,0	22,91
<i>Ostracodinium</i> spp.	0,09	0,09	0,11	0,08	0,09	1,1	29,75
<i>Elytroplastron</i> sp.	0,12 a	0,21 b	0,20 b	0,06 a	0,15	1,8	30,87
<i>Eudiplodinium</i> spp.	0,15	0,14	0,15	0,14	0,15	1,8	21,00
<i>Epidinium</i> spp.	0,45	0,50	0,55	0,50	0,50	5,9	22,02
<i>Isotricha</i> spp.	0,25	0,28	0,26	0,18	0,25	2,9	18,03
<i>Dasytricha</i> spp.	0,17	0,24	0,20	0,25	0,22	2,6	20,72
pH	6,64	6,59	6,59	6,65	6,62	-	0,88

C.V. - Coeficiente de variação.

TABELA 2. Concentração diária dos protozoários ciliados no rúmen de búfalos (protozoários $\times 10^4$ /ml de líquido ruminal).

Protozoários	Tempo no rúmen*						
	0	1	3	6	12	18	24
Total	10,3	9,2	8,5	7,2	6,4	6,8	10,7
<i>Entodinium</i> spp.	7,5	6,2	5,7	4,7	4,3	4,6	7,0
<i>Diplodinium</i> spp.	1,5	1,4	1,5	1,2	1,1	1,2	1,6
<i>Ostracodinium</i> spp.	0,074	0,066	0,055	0,048	0,047	0,044	0,11
<i>Elytroplastron</i> sp.	0,15	0,10	0,08	0,09	0,08	0,08	0,12
<i>Eudiplodinium</i> spp.	0,10	0,11	0,09	0,14	0,08	0,11	0,16
<i>Epidinium</i> spp.	0,42	0,42	0,39	0,29	0,28	0,33	0,61
<i>Isotricha</i> spp.	0,10	0,33	0,25	0,17	0,13	0,06	0,21
<i>Dasytricha</i> spp.	0,09	0,12	0,13	0,16	0,10	0,07	0,13
pH	6,84	6,69	6,61	6,56	6,41	6,54	6,69

* Tempo após a primeira alimentação (horas).

concentração total de protozoários por ml de líquido ruminal diminuiu até 12 horas após a primeira alimentação, aumentando em seguida até o momento imediatamente anterior à primeira alimentação. Marcada variação diurna na concentração de protozoários no rúmen tem sido observada por vários pesquisadores (Warner 1966, Purser & Moir 1966, Coleman 1979, Potter & Dehority 1973). Estes resultados também concordam com Michalowski (1975) e Michalowski (1977) que observou, em todos os grupos de protozoários estudados em búfalos, que a mais alta concentração ocorreu imediatamente antes da alimentação, seguindo de queda na densidade e novo aumento até à realimentação. Entretanto, Kurar et al. (1988) obtiveram contagem de protozoários mais baixa antes da alimentação (TO) e aumentos até seis horas após a alimentação de búfalos.

O nível de proteína bruta na ração parece ter influenciado de alguma forma na variação diurna dos protozoários, conforme pode-se verificar pelo tipo de equação polinomial e os respectivos coeficientes de determinação obtidos com as diferentes dietas (Tabela 3). O tratamento C (12,3% PB) apresentou maior regularidade nas equações que os outros tra-

tamentos. O ciclo diário geralmente desenvolveu-se numa curva quadrática, que pode ser vista para a equação geral do número total de protozoários por ml de líquido ruminal, *Entodinium* spp. e *Diplodinium* spp. (Fig. 1).

O pH no rúmen também seguiu o mesmo padrão diário, porém as análises das correlações entre o pH e os protozoários no rúmen, nos diversos tempos de coleta, mostraram poucas correlações significativas e com baixos coeficientes de correlação.

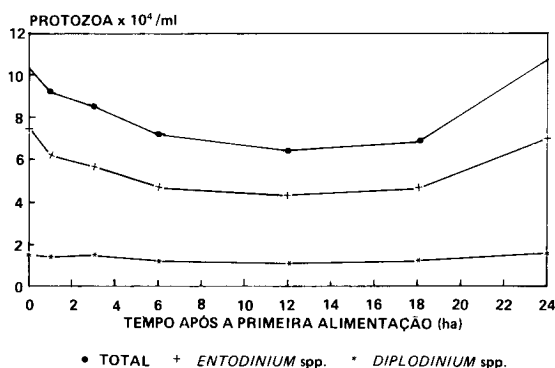


FIG. 1. Concentração de protozoários no líquido ruminal.

TABELA 3. Tipos de equações polinomiais e coeficientes de determinação (r^2 = valores entre parênteses) do número de protozoários/ml de líquido ruminal em função do ciclo diário.

Protozoários	A	B	C	D	Total
Total	X ² (0,94)	X ² (0,83)	X ² (0,91)	X ² (0,86)	X ² (0,97)
<i>Entodinium</i> spp.	X ² (0,96)	NS	X ² (0,84)	X ² (0,74)	X ² (0,95)
<i>Diplodinium</i> spp.	NS	X ² (0,58)	X ² (0,86)	NS	X ² (0,88)
<i>Ostracodinium</i> spp.	NS	X ² (0,85)	X ² (0,47)	NS	X ² (0,92)
<i>Elytroplastron</i> sp.	NS	X ² (0,91)	X ² (0,82)	NS	X ² (0,88)
<i>Eudiplodinium</i> spp.	NS	X ² (0,87)	X (0,42)	NS	NS
<i>Epidinium</i> spp.	NS	X ² (0,76)	X ² (0,82)	X ² (0,58)	X ² (0,91)
<i>Isotricha</i> spp.	X ³ (0,61)	X ³ (0,26)	X ³ (0,51)	NS	X ³ (0,59)
<i>Dasytricha</i> spp.	NS	NS	NS	NS	X ³ (0,95)
pH	X ² (0,86)	X ² (0,87)	X ² (0,86)	X ² (0,84)	X ² (0,92)

X - Regressão linear (P < 0,05)

X² - Regressão quadrática (P < 0,05)

X³ - Regressão cúbica (P < 0,05)

NS - Não-significativa

CONCLUSÕES

1. O teor de 12,3% de proteína bruta na ração promoveu aumento no número total de protozoários ciliados no rúmen e nos gêneros *Entodinium* spp. e *Diplodinium* spp. em relação aos níveis de 8,7%, 10,5% e 14,3% PB na ração, e com a espécie *Elytroplastron bubali* em relação aos níveis de 8,7% e 14,3% PB na ração.

2. A concentração média total de protozoários ciliados no rúmen de búfalos foi de $8,48 \times 10^4$ /ml de líquido ruminal, predominando o gênero *Entodinium* spp. (67,2%), seguido do *Diplodinium* spp. (16,0%).

3. O nível de proteína bruta na ração parece ter influenciado de alguma forma as concentrações diárias dos protozoários no rúmen, mostrando, no geral, marcada variação diurna definida por uma curva quadrática positiva, com diminuição até doze horas após a primeira alimentação, aumentando em seguida até o momento imediatamente anterior à primeira alimentação do dia subsequente.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. César Gonçalves de Lima, pela colaboração na análise estatística dos dados, e aos funcionários Laércio Viotto, José Bonvehio Neto e Estevão Beloni.

REFERÊNCIAS

BIRD, S.H.; HILL, M.K.; LENG, R.A. The effects of defaunation of the rumen on the growth of lambs on low-protein-high-energy diets. **British Journal Nutrition**, 1979, v.42, p.81-87, 1979.

COLEMAN, G.S. The role of rumen protozoa in the metabolism of ruminants given tropical feeds. **Tropical Animal Production**, v.4, p.199-213, 1979.

DEHORITY, B.A. Ciliate protozoa in the rumen of Brazilian water buffalo, *Bubalus bubalis* Linnaeus. **Journal Protozoology**, v.26, p.536-544, 1979.

DEHORITY, B.A. **Classification and morphology of rumen protozoa**. Wooter, USA: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1977. 82p.

DEHORITY, B.A. **Rumen microbiology**. Wooter, USA: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1987. 239p.

DEHORITY, B.A.; ORPIN, C.G. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: HOBSON, P.N. **The rumen microbial ecosystem**. London, England: Elsevier Applied Science, 1988. p.151-183.

FFOULKES, D.; LENG, R.A. Dynamics of protozoa in the rumen of cattle. **British Journal of Nutrition**, v.59, p.429-436, 1988.

FRANZOLIN NETO, R.; FRANZOLIN, M.H.T.; VELLOSO, L.; LIMA, C.G. Efeitos da *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. sobre a concentração de protozoários ciliados no rúmen de ovinos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.25, p.267-273, 1988.

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

KURAR, C.K.; GUPTA, B.N.; MOHINI, M. Protozoal status in strained rumen liquor of cattle and buffaloes. **Indian Journal of Animal Science**, v.58, p.112-115, 1988.

MARINHO, A.A.M. Ciliados do rúmen - sua dinâmica e importância no metabolismo digestivo dos ruminantes. Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.77, p.241-259, 1982.

MICHALOWSKI, T. Diurnal changes in concentration of rumen ciliates and in occurrence of dividing forms in water buffalo (*Bubalus bubalis*) fed once daily. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, p.802-804, 1977.

MICHALOWSKI, T. Effect of different diets on the diurnal concentrations of ciliate protozoa in the rumen of water buffalo. **Journal Agricultural Science**, Camb., v.85, p.145-150, 1975.

OGIMOTO, K.; IMAI, S. **Atlas of rumen microbiology**. Tokyo, Japan: Japan Scientific Societies Press, 1982. 231p.

ORSKOV, O.R. **Protein nutrition in ruminants**. London, England: Academic Press Inc., 1982. 160p.

- POTTER, E.L.; DEHORITY, B.A. Effects of changes in feed level, starvation, and level of feed after starvation upon the concentration of rumen protozoa in the ovine. **Applied Microbiology**, v.26, p.692-698, 1973.
- PURSER, D.B.; MOIR, R.J. Dietary effects upon concentrations of protozoa in the rumen. **Journal Animal Science**, v.26, p.668-674, 1966.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Corvallis, USA: O & B Books Inc., 1983, 374p.
- WARNER, A.C.I. Diurnal changes in the concentrations of micro-organisms in the rumens of rumens of sheep fed to appetite in pens or at pasture. **Journal General Microbiology**, v.45, p.243-251, 1966.