

# ALTERAÇÕES NA FERMENTAÇÃO RUMINAL EM BOVINOS FISTULADOS ALIMENTADOS COM CANA-DE-AÇÚCAR COMO SUBSTITUTO DA SILAGEM DE MILHO<sup>1</sup>

EDISON VALVASORI<sup>2</sup>, WAGNER LAVEZZO<sup>3</sup>, CARLOS DE SOUSA LUCCI<sup>4</sup>, LAÉRCIO MELOTTI<sup>4</sup>, FRANCISCO STEFANO WECHSLER<sup>3</sup>, ARI LUÍS DE CASTRO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Parte da tese apresentada à FMVZ, UNESP, pelo primeiro autor, para obtenção do título de Doutor em Zootecnia (Pesquisa financiada pela FAPESP - Processo no. 1995/03027-7)

<sup>2</sup>Centro de Nutrição e Alimentação Animal, Instituto de Zootecnia, Caixa Postal 60, 13.460-000, Nova Odessa, SP. E-mail: valvasori@izsp.br

<sup>3</sup>Departamento de Nutrição e Produção Animal, FMVZ, UNESP, Caixa Postal 502, 18.618-000, Botucatu, SP

<sup>4</sup>Departamento de Nutrição e Produção Animal, FMVZ, USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, 13.630-000, Pirassununga, SP.

RESUMO: Quatro vacas da raça Holandesa, fistuladas no rúmen, foram utilizadas em delineamento de quadrado latino 4x4 para avaliação de características ruminais. Os animais receberam alimento volumoso (59,4% em base seca) constituído de silagem de milho e/ou cana-de-açúcar nas proporções: A) 1:0, B) 1/3:2/3, C) 2/3:1/3 e D) 0:1. O concentrado participou com 40,6% nas diferentes rações, elevando o teor de proteína bruta da dieta para 15%. O volume, a taxa de reciclagem ruminal, o pH e concentrações de N-NH<sub>3</sub> e de AGV totais do líquido ruminal foram semelhantes entre dietas (48 l; 11,85%/h; 6,32; 8,82 mg/100ml e 88,01 mM/l, respectivamente). Houve queda no pH e aumento nas concentrações de N-NH<sub>3</sub> e AGV totais até as 3:00 horas após o fornecimento das dietas. A maior população de protozoários totais (P<0,10) foi observada no rúmen dos animais recebendo dieta com cana exclusiva, tendo sido 40,85% superior daqueles sob silagem de milho exclusiva. Com a inclusão de maiores quantidades de cana nas dietas, maiores populações dos ciliados *Dasytrichas* se fizeram presentes.

Palavras-chave: nutrição, rúmen, pH, nitrogênio amoniacal, ácidos graxos voláteis, protozoários ciliados.

## CHANGES IN RUMINAL FERMENTATION OF FISTULATED CATTLE FED WITH SUGAR CANE AS A SUBSTITUTE FOR CORN SILAGE.

ABSTRACT: Four Holstein cows with rumen cannulae were used in a 4 x 4 latin square to evaluate ruminal alterations. The animals received roughage (59.4% in DM basis) composed of corn silage and/or sugar cane on the following proportions: A)1:0; B) 1/3:2/3; C) 2/3:1/3; and D) 0:1. The concentrate participated with 40.6% in the different rations, raising the crude protein level to 15%. Ruminal volume, turn-over rate, pH and concentrations of NH<sub>3</sub>-N and of total VFA of the ruminal liquid in all treatments were similar (48 l; 11.85%/h; 6.32; 8.82mg/100ml and 88.01mM/l respectively). The pH decreased and an increase in N-NH<sub>3</sub>

concentrations and total VFA concentrations were observed until 3h after presenting the diets. The largest ciliate protozoa population ( $P<0,10$ ) was observed in rumen of animals receiving only sugar cane, as a sole forage in diet, being 40,85% higher than those receiving just corn silage. Inclusion of higher quantities of sugar cane in diets, led to higher population of ciliate *Dasytricha*.

Key words: nutrition, rumen, pH, ammonia nitrogen, volatile fatty acids, ciliate protozoa

## INTRODUÇÃO

A utilização dos alimentos pelos ruminantes está na dependência dos microorganismos que habitam os proventrículos, uma vez que podem ter profundo efeito sobre os produtos finais da fermentação. A adição de carboidratos prontamente fermentescíveis como a sacarose, causa um grande número de mudanças no metabolismo destes animais: decresce a concentração da amônia ruminal devido à maior utilização desses carboidratos pelos microorganismos (KENNEDY, 1980, KENNEDY *et al.*, 1981; ROOKE *et al.*, 1987) e aumenta a quantidade e disponibilidade dos ácidos graxos voláteis, principal fonte de energia disponível para o metabolismo dos ruminantes, com acréscimo nas concentrações dos ácidos propiônico e butírico (SEAL e PARKER, 1994). Ainda, o fornecimento de dietas contendo sacarose, conforme SUTOH *et al.* (1996), diminui o volume e aumenta a taxa de reciclagem ruminal, além de elevar as taxas de digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e energia. Com referência aos alimentos contendo grande quantidade de amido, como é o caso da silagem de milho, decréscimo dos coeficientes de digestibilidade da MS, MO e fibra pode ocorrer devido às bactérias celulolíticas aderirem às fibras e desenvolverem colônias antes que a degradação dos polissacarídeos estruturais venha a ocorrer (COSTERTON *et al.*, 1987; FIRKINS *et al.*, 1991).

Dentro da população microbiana do rúmen, composta de bactérias, fungos e protozoários, estes últimos divergem bastante, estando na dependência do animal hospedeiro e natureza do alimento (JOUANY *et al.*, 1988). Embora o ruminante possa sobreviver sem estes microorganismos, resultados de trabalhos

mostraram que os protozoários exercem efeito sobre a estabilização do pH ruminal devido à rápida ingestão e estocagem pelos mesmos de grãos de amido e sacarose (VEIRA *et al.* 1983; VALVASORI *et al.*, 1996); aumentam a concentração de ácidos graxos voláteis (ABOU AKKADA e EL SHAZLY, 1964; EADIE e GILL, 1971) e melhoram a digestibilidade da fibra (PUNIA e LEIBHOLZ, 1987).

O objetivo do presente estudo foi avaliar alguns parâmetros de fermentação ruminal de bovinos alimentados com cana-de-açúcar (fonte de sacarose) em substituição à silagem de milho (fonte de amido).

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental foi desenvolvido no Departamento de Criação de Ruminantes e Alimentação Animal da Faculdade de Zootecnia e Veterinária da Universidade de São Paulo, localizado no Campus de Pirassununga.

Quatro vacas secas da raça Holandesa possuindo cânulas ruminais permanentes, com idade média de três anos e 500 kg de peso vivo, foram submetidas a um quadrado latino 4 x 4 (COCHRAN e COX, 1957) em esquema de parcelas subdivididas. Os tratamentos principais foram as dietas isoprotéicas, formuladas para o nível de 15% de proteína bruta (NRC, 1988), fornecidas à base de 2% do peso vivo e constituídas de 59,4:40,6 (volumosos e concentrado). O volumoso teve como base a cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho, estando os tratamentos testados dispostos no Quadro 1. As sub-parcelas foram os tempos de coleta de amostras do líquido ruminal, a saber: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 24 horas pós-alimentação. O

**Quadro 1. Ingredientes e nutrientes que constituíram as dietas experimentais.**

	Dietas <sup>1</sup>			
	A	B	C	D
	(% em base seca)			
<b>Ingredientes</b>				
Silagem de milho	59,40	39,60	19,80	0
cana-de-açúcar	0	19,80	39,60	59,40
Farelo de soja	10,68	13,52	16,43	19,17
Milho (fubá)	27,32	24,48	21,66	18,83
Uréia	0,60	0,60	0,60	0,60
Mistura mineral <sup>2</sup>	2,00	2,00	2,00	2,00
<b>Nutrientes</b>				
PB	15,09	15,78	15,73	15,87
EE	2,65	2,27	2,10	1,42
Cinzas	4,49	4,52	4,55	4,42
FDN	39,39	37,62	36,06	34,32
FDA	21,62	20,93	20,23	19,53
Celulose	16,43	15,79	15,06	14,32
Hemicelulose	17,77	16,69	15,83	14,79

<sup>1</sup>Dietas: Proporção de silagem de milho e cana de açúcar no volumoso: A) 1:0, B) 2/3:1/3, C) 1/3:2/3 e D) 0:1.

<sup>2</sup>Composição (g/kg): P = 90; Ca = 180; Mg = 20; S = 20; Na = 100; Cl = 155; Zn = 3,000; Cu = 1,000; Mn = 1,250; Fe = 2,000; Co = 0,100; I = 0,090; Se = 0,020.

experimento, com duração de 84 dias, foi dividido em 4 períodos de 21 dias cada, sendo os primeiros 19 dias para adaptação dos animais às diferentes dietas.

Os animais permaneceram em baias individuais de piso cimentado e coberto com tapete de borracha. Estas baias, além de bebedouros automáticos e comedouros, dispunham de ventiladores suspensos no teto que eram ligados nas horas mais quentes do dia e auxiliavam na prevenção de abelhas. As dietas experimentais foram fornecidas em duas refeições, sendo a primeira às 7:00 horas e a segunda às 14:00 horas. Com referência aos alimentos volumosos, a silagem de milho utilizada no experimento foi confeccionada nos meses de fevereiro e março do mesmo ano e ficou armazenada em silo tipo trincheira. O material foi ensilado quando os grãos encontravam-se no ponto farináceo. A cana-de-açúcar (var. industrial) foi cortada de um mesmo talhão, apresentando, nesta oportunidade, estágio vegetativo médio de 20 meses. Seu corte foi manual e diário, seguido de picagem em picadeira estacionária regulada para obtenção de pedaços

com 0,5 a 3,0 cm de tamanho.

No 20º dia de cada período experimental, antes do fornecimento das dietas a cada bovino, homogeneizou-se, manualmente, através da cânula, o material no interior do rúmen, coletando-se em becker provido de peneira de polietileno com malhas de 3 mm de diâmetro aproximadamente 100 ml do líquido ruminal (zero hora). Semelhante ao tempo zero, as demais coletas foram feitas às 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 24 horas de cada período, após o fornecimento do alimento para os animais.

Imediatamente após a coleta das amostras dos primeiros sete tempos determinou-se o pH com o auxílio de potenciômetro digital portátil (Corning, modelo PS-30) calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 e transferiram-se, em seguida, diferentes quantidades desta amostra para vidros identificados que após arrolhagem, foram estocados para posteriores análises para determinação das concentrações de N-amoniaco, ácidos graxos voláteis e para contagem diferencial

de protozoários. Para a determinação da concentração do N-amoniaco 6 ml de cada amostra foram colocados em recipiente contendo 3 ml de ácido sulfúrico 1 N, ficando estocados em congelador a  $-20^{\circ}$  C e, por ocasião das determinações, seguiu-se a marcha analítica proposta por Kulasek (1972) e, adaptada por FOLDAGER (1977). Para a mensuração da concentração de ácidos graxos voláteis, 3 ml de cada amostra foram colocados em recipiente contendo 3 ml de ácido metafosfórico (6%) que, após centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos, teve o sobrenadante colocado em recipiente de vidro, permanecendo em geladeira para posterior análise, segundo método preconizado por ERWIN *et al.* (1961), com auxílio de um cromatógrafo a gás (CG, Modelo 370), equipado com coluna Chromosorb 101 e 15% Tween 80 e 1,5 g de ácido fosfórico. Para a contagem diferencial dos protozoários, alíquotas de 10 ml de cada amostra foram transferidas para frascos de vidro contendo 20 ml de formaldeído a 37% (diluição em água destilada 1:2). Após imediata agitação para fixação dos protozoários ciliados, o material foi levado à geladeira ficando aí estocado até a análise, para a qual foi utilizado glicerol a 30% e verde brilhante como corante. Adotou-se o método preconizado por DEHORITY (1987) com a utilização da câmara de Sedgwick-Rafter e microscópio óptico com ocular provida de retículo com área de  $0,4323 \text{ mm}^2$ , aferida por lâmina micrométrica. Foram percorridos 100 campos diferentes e calculou-se o fator de correção para 1,0 ml de líquido ruminal. As operações foram executadas em duplicata e foi levada em consideração a média obtida.

Para determinação do volume do líquido e da taxa de reciclagem ruminal adotou-se a metodologia de HUNGATE (1966) e HUNGATE *et al.* (1971). Para tal, às 7:00 horas do 20º dia de cada período, foram introduzidos, através da cânula ruminal, 300 g de Polietilenoglicol de peso molecular 4000 (PEG - Carbowax 4000, Synth), previamente diluídos em aproximadamente 500 ml de água destilada. Alíquotas de aproximadamente 50 ml do líquido ruminal recém-coletadas em beakers nos tempos: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 24 horas pós-alimentação, depois de arrolhados ficaram estocadas em geladeira para análise. A amostra referente ao tempo zero foi coletada

imediatamente antes da introdução do PEG no rúmen, sendo a água e a refeição da manhã fornecidas imediatamente após a referida coleta. Para evitar perda do PEG, no momento de introduzi-lo no rúmen, quatro horas antes de seu fornecimento, os animais foram privados de água. Para a determinação do volume de líquido e da taxa de reciclagem ruminal, adotou-se o método de HYDEN (1956). A taxa de passagem de líquidos ou taxa eferente de fluxo (%/h) foi calculada através da regressão linear do logaritmo natural da concentração do PEG 4000, em função do tempo. O volume ruminal, em litros, foi estimado através da extrapolação da concentração inicial (zero hora) e da dosagem do marcador (300g/animal). Estes dados foram ainda utilizados para calcular o fluxo líquido (l/h) e o fluxo líquido por kg de MS consumida por hora.

Os dados do experimento foram submetidos às análises de variância utilizando-se o "General Linear Model" (GLM) do SAS (1988).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 2, estão apresentadas as médias dos valores observados para o pH, para os ácidos graxos voláteis totais e individuais, mensurados no líquido ruminal dos bovinos sob as diferentes dietas testadas. Para melhor visualização dos resultados, estão apresentados na Figura 1 os valores de pH, na Figura 2 a concentração do nitrogênio amoniaco e na Figura 3 a concentração dos ácidos graxos voláteis totais e individuais do líquido ruminal nos diferentes tempos (horários).

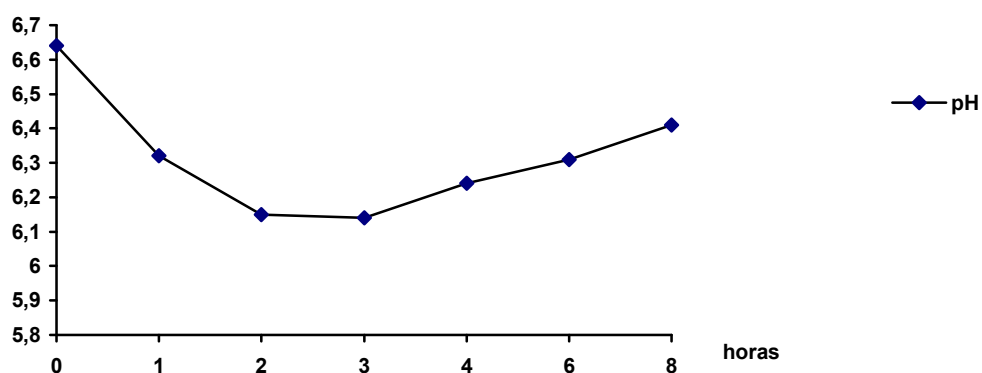
Os valores de pH do líquido ruminal dos bovinos, sob as diferentes dietas experimentais e independentemente dos horários de coleta, apresentaram-se semelhantes ( $P > 0,05$ ), conforme Quadro 2. Houve uma queda no pH até três horas após o fornecimento do alimento (Figura 1) com subsequente aumento, descrito por um modelo quadrático. O pH manteve-se sempre acima de 6 (Quadro 2), revelando que a inclusão de cana-de-açúcar nas dietas balanceadas para teor de 15% de proteína bruta, provavelmente não diminuiu o pH a ponto de afetar a flora ruminal, principalmente em termos de protozoários. LENG e PRESTON

**Quadro 2. pH e concentrações de N-amoniaco e de ácidos graxos voláteis nas amostras do líquido de rúmen dos bovinos amostrados em diversos horários pós-alimentação.**

	<i>Dietas</i> <sup>1</sup>				<i>CV</i>	<i>Probabilidade</i> <sup>2</sup>		<i>CV</i>
	A	B	C	D	(%) Dieta	Dieta	Tempo	(%) Tempo
pH	6,26	6,33	6,31	6,36	2,45	NS	**	1,94
N-NH <sub>3</sub> (mg/100ml)	8,84	9,76	8,70	7,98	55,21	NS	**	27,82
AGV Totais(mM/l)	80,01	95,39	82,77	93,87	32,16	NS	**	15,81
Ácido acético (mM/l)	50,27	61,67	50,66	56,33	58,68	NS	NS	18,42
Ácido propiônico (mM/l)	19,14	20,59	17,47	22,70	32,66	NS	**	22,88
Ácido butírico (mM/l)	12,71	15,50	11,11	14,98	42,78	NS	NS	26,27

<sup>1</sup>Dietas: Proporções de silagem de milho e cana-de-açúcar no volumoso. A) 1:0, B) 2/3:1/3, C) 1/3:2/3 e D) 0:1.

<sup>2</sup>Efeito Quadrático: NS P>0,05; \* P<0,05; \*\* P<0,01

**Figura 1. Valores médios do pH no fluido ruminal de bovinos, nos diferentes horários pós-alimentação.**

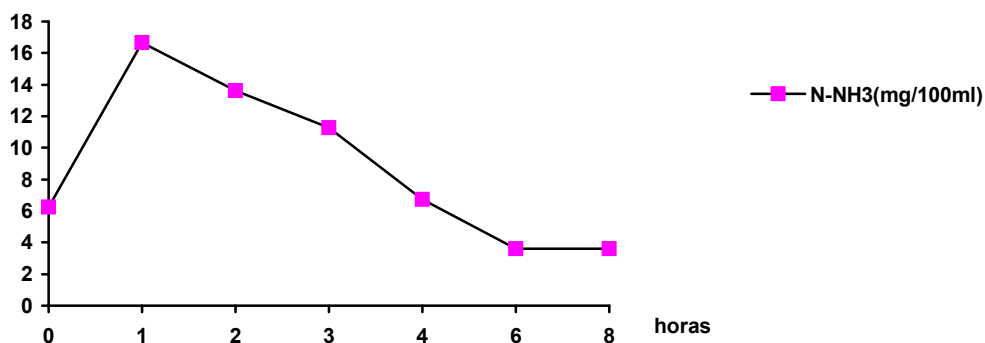


Figura 2. Valores médios das concentrações de nitrogênio amoniacal no fluido ruminal de bovinos, nos diferentes horários pós-alimentação.

(1976) afirmam que o pH do líquido ruminal de animais consumindo dietas à base de cana-de-açúcar é alto e estável sendo resultado da alta taxa de fluxo salivar decorrente do tempo considerável gasto, nos atos de consumo e ruminação sob tais dietas. VEIRA *et al.* (1983) observaram, em dietas com elevada concentração energética e constituídas de silagem de milho, uréia e milho, fornecidas a ovinos, que os protozoários ciliados exerceram o efeito de estabilização do pH devido à rápida ingestão e estocagem de amido pelos mesmos. Pode-se afirmar, inclusive, que nestes valores de pH não há redução na degradação dos constituintes da parede celular conforme constataram ORSKOV (1982) e HOOVER (1986).

Com referência às concentrações de N-NH<sub>3</sub> (mg/100ml) do líquido ruminal coletado em diferentes horários pós-alimentação, tal como o verificado para o pH, os valores médios obtidos foram semelhantes ( $P > 0,05$ ), independente das dietas experimentais (Quadro 2 e Figura 2). Houve apenas aumento acentuado (efeito quadrático) após a primeira hora de ingestão das diferentes dietas, seguido de queda nas horas subsequentes.

Os valores de N-amoniaco no líquido ruminal nas primeiras quatro horas após a alimentação,

situaram-se sempre acima de 5 mg/100 ml de líquido ruminal, evidenciando maior atividade microbiana no rúmen neste período. No penúltimo e último tempos de coleta, os níveis de N-amoniaco apresentaram-se menores com concentrações médias nos diferentes tratamentos, de 3,62 mg/100ml de líquido ruminal, valores estes ainda considerados adequados para o crescimento microbiano (SATTER e SLYTER, 1974 e SCHAEFER *et al.*, 1980) e para a síntese de proteína (SATTER e SLYTER, 1972). Segundo PETERSEN (1987), os níveis de 1 a 2 mg/100ml de N-amoniaco seriam considerados suficientes para a digestão da fibra.

Quanto aos ácidos graxos voláteis totais e individuais, observa-se, na Figura 3, que estes foram quantitativamente maiores (efeito quadrático) na segunda e terceira horas pós-fornecimento das dietas com decréscimo gradual subsequente. Embora as diferenças entre as médias dos AGV totais e individuais nas dietas (Quadro 2) não tenham sido significativas ( $P > 0,0$ ). Quando as concentrações médias destes ácidos foram multiplicados pelos respectivos valores energéticos, os resultados de energia bruta para os tratamentos A, B, C e D foram respectivamente: 24,191; 28,568; 22,821 e 27,995 Mcal/mol. Os

maiores valores energéticos observados foram para as dietas B e D, onde a cana representava, respectivamente, 1/3 e 100% dos volumosos. Estes dados confirmam a hipótese de que a inclusão da sacarose nas dietas aumenta a energia bruta no rúmen, podendo aumentar a digestibilidade da matéria orgânica, da proteína e da energia, conforme foi observado por SUTOH *et al.* (1996). Assim, como para os ácidos graxos voláteis totais, para os ácidos acético, propiônico e butírico, não se verificaram diferenças ( $P>0,05$ ) entre dietas (Quadro 2). Os horários de coleta influenciaram as concentrações ruminais dos ácidos graxos voláteis totais e do ácido propiônico (efeito quadrático),

sendo que o pico de produção ocorreu entre a segunda e quarta hora pós-alimentação (Figura 3).

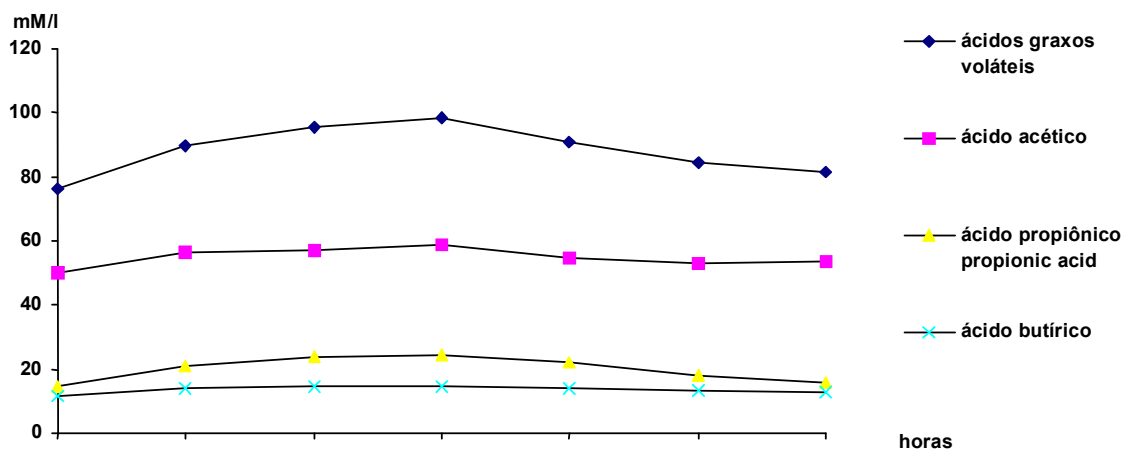
O volume de líquido ruminal e a taxa de renovação ruminal dos bovinos sob as diferentes dietas, conforme pode ser observado na Quadro 3, não mostraram diferença estatística significativa ( $P>0,05$ ) entre dietas. FRANZOLIN (1988) também observou semelhança para o volume de líquido e taxa de renovação ruminal em ovinos submetidos a dietas contendo cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho. Em tendência, no (presente estudo, os animais que receberam dieta exclusiva de cana (dieta D) apresentaram menor volume de

**Quadro 3. Volume de líquido e taxa de reciclagem ruminal de bovinos alimentados com diferentes dietas.**

	Dietas <sup>1</sup>				CV (%)	Probabilidade
	A	B	C	D		
Volume (l)	52,47	49,19	45,25	45,10	12,67	NS <sup>1</sup>
Taxa de reciclagem (%/h)	11,41	11,40	12,25	12,35	20,85	NS
Taxa de reciclagem (l/h)	2,74	2,74	2,94	2,96	21,02	NS
Fluxo de passagem (l/dia)	143,52	134,26	127,55	132,18	14,99	NS

<sup>1</sup>Dietas: Proporções de silagem de milho e cana-de-açúcar no volumoso. A) 1:0, B) 2/3:1/3, C) 1/3:2/3 e D) 0:1.

<sup>1</sup>NS  $P>0,05$



**Figura 3. Concentrações dos ácidos graxos voláteis totais e individuais no fluido ruminal dos bovinos, nos diferentes horários pós-alimentação.**

líquido ruminal e aumento na taxa de reciclagem ruminal, o que é esperado, devido à maior quantidade de sacarose (SUTOH, *et al.*, 1996) e aumento de protozoários encontrados no rúmen destes animais, conforme afirmam JOUANY *et al.* (1988).

Os valores médios do número de protozoários observados nas amostras do líquido ruminal das vacas sob dietas com diferentes proporções de silagem de milho e cana-de-açúcar e amostradas

em diferentes horários pós-arraçoamento, encontram-se no Quadro 4 e são ilustradas pela Figura 4.

Observou-se que, tanto para a família *Diplodiniinae*, quanto para o gênero *Epidinium*, não ocorreram diferenças entre as contagens realizadas nas amostras de fluido ruminal provenientes das vacas sob as quatro dietas, nem tampouco entre as amostras coletadas nos diferentes horários pós - alimentação. O gênero

**Quadro 4. Alteração da população de protozoários ciliados no rúmen dos bovinos alimentados com diferentes dietas e amostrados em diversos horários pós-alimentação.**

	Dietas <sup>1</sup>				CV <sup>2</sup> (%)	Probabilidade			CV <sup>3</sup> (%)	
	A	B	C	D		Dieta	Tempo	DxT		
	(10 <sup>3</sup> /ml)									
<i>Isotricha</i>	2,31	5,89	7,44	6,19	130,17	NS	***	NS	56,42	
<i>Dasytricha</i>	1,90	15,10	20,39	44,16	85,94	***	***	***	32,75	
<i>Entodinium</i>	80,34	79,60	73,23	86,87	45,22	NS	**	NS	23,71	
<i>Diplodiniinae</i>	1,71	2,17	1,34	1,41	97,13	NS	NS	NS	63,93	
<i>Epidinium</i>	22,11	17,06	17,23	14,67	118,66	NS	NS	NS	30,77	
Total	108,55	119,97	118,89	152,89	41,00	*	**	NS	21,84	

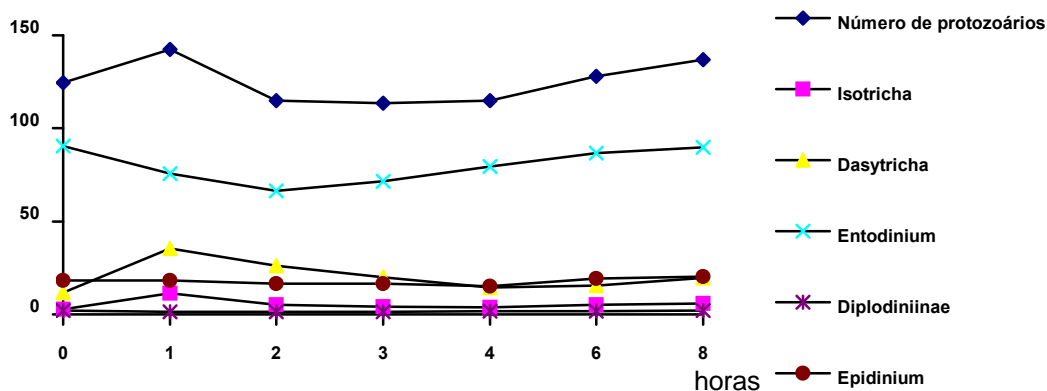
<sup>1</sup>Dietas: Proporções de silagem de milho e cana-de-açúcar no volumoso. A) 1:0, B) 2/3:1/3, C) 1/3:2/3 e D) 0:1.

NS P>0,05

\*P<0,10

\*\* P<0,05

\*\*\* P<0,01



**Figura 4. População de protozoários ciliados no rúmen dos bovinos sob diferentes dietas, nos diversos horários pós-alimentação.**



*Entodinium* mostrou populações semelhantes ( $P>0,05$ ) e predominou nos bovinos sob as diferentes dietas estudadas (Quadro 4). FRANZOLIN (1988) e VALVASORI *et al.* (1996) também observaram maiores populações deste gênero em dietas com cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho. No entanto, FRANZOLIN (1988) registrou diminuição linear com o aumento da proporção de cana nas dietas e VALVASORI *et al.* (1996) evidenciaram maiores populações destes ciliados em dieta contendo cana-de-açúcar exclusiva. No presente experimento, provavelmente, a suplementação adequada de concentrado, proporcionou melhor meio ao gênero *Entodinium*, o que, provavelmente, justifique população semelhante destes ciliados para os bovinos sob as diferentes dietas em estudo. Coleman (1980), citado por JOUANY *et al.* (1988), reportou que este gênero metaboliza açúcares solúveis como o amido e a sacarose, os constituintes básicos das dietas experimentais sob teste. Para os horários de coleta houve efeito quadrático ( $P<0,05$ ) com queda no número de ciliados deste gênero até duas horas pós-prandial e aumento subsequente (Figura 4). Ao que tudo indica, o efeito se deve ao fato deste gênero ser mais sensível às mudanças bruscas do meio, como aquelas registradas para o pH que apresentou queda de 0,49 pontos (pH passou de 6,64 às zero horas, para 6,15 às duas horas pós-prandial), conforme Figura 1.

Com relação ao grupo holotricha, deparou-se para o gênero *Isotricha* semelhança ( $P>0,05$ ), nas contagens realizadas nas amostras de fluido ruminal provenientes das vacas sob as diferentes dietas (Quadro 4), não houve diferença significativa devido ao coeficiente de variação ter sido muito alto. Quanto aos horários pós-prandial, observou-se efeito quadrático ( $P<0,01$ ) para este gênero, com aumento acentuado na primeira hora (Figura 4).

Verificou-se que as dietas e os horários de coleta interferiram significativamente ( $P<0,01$ ) sobre o número de *Dasytricha*, mensurado no líquido de rúmen dos animais (Quadro 4). Houve, no geral, para cada momento de amostragem pós

arraçoamento um aumento destes protozoários, à medida que a cana passou a substituir progressivamente a silagem de milho. Estes efeitos também foram constatados por FRANZOLIN (1988) e VALVASORI *et al.* (1996). Por outro lado, pôde-se constatar que, nas dietas onde a cana-de-açúcar substituiu progressivamente a silagem de milho, ocorreram aumentos quadráticos no número desses protozoários durante o transcorrer das observações (horários), com elevação acentuada, na primeira hora pós-alimentação, tal como ocorreu para o *Isotricha*. Este efeito está relacionado com a rápida assimilação dos carboidratos solúveis por este gênero, garantindo a integridade funcional do rúmen (OXFORD, 1951),

Quando se analisou a contagem de protozoários totais nas amostras de líquido ruminal, constatou-se efeito significativo ( $P<0,10$ ) do tipo de dieta sobre este parâmetro. O valor registrado para a dieta D, com cana-de-açúcar exclusiva, foi 40,85% maior em relação à dieta A, com silagem de milho exclusivo. Quando se comparou o referido tratamento D, com aqueles, onde os níveis de silagem de milho e cana foram de 2/3:1/3 (B) e 1/3:2/3 (C), verificou-se que o mesmo propiciou uma população de protozoários totais, 27,44 e 28,60% maior, respectivamente. VALVASORI *et al.* (1996) encontraram também maiores populações de protozoários quando forneceram para bovinos dietas com cana-de-açúcar exclusiva em relação a dietas com silagem de milho ou silagem de milho mais cana. A contagem de protozoários totais, segundo os horários de coleta (Quadro 4), revelou variação quadrática ( $P<0,05$ ) para os valores, podendo-se afirmar que os picos da população de protozoários se deram uma e oito horas após a alimentação dos animais (Figura 4). O maior valor obtido para a população de protozoários aconteceu uma hora após o fornecimento do alimento sendo, este efeito atribuído, provavelmente, à rápida ingestão e estocagem de amido e sacarose pelos ciliados, o que veio a contribuir para a estabilização do pH ruminal (VEIRA, *et al.*, 1983; VALVASORI *et al.*, 1996). De acordo com JOUANY *et al.* (1988), os protozoários estocam amido e açúcares dos alimentos e são importantes reguladores do mecanismo de

fermentação ruminal. Além disso, as maiores populações de protozoários ciliados no rúmen beneficiam a digestibilidade da matéria orgânica e da fração fibra em animais recebendo dietas ricas em forragens.

Deve-se ressaltar que os protozoários ciliados dos gêneros *Entodinium*, *Epidinium* e família *Diplodiniinae*, que fazem parte do grupo entodinomorfo, perfizeram cerca de 79,50% da população de ciliado total ruminal. Tal constatação tem sua relevância, uma vez que estes protozoários estão mais diretamente envolvidos com a "partição" dos fragmentos de volumosos (HUNGATE, 1966, RUCKEBUSH e TRIVEND, 1980, VEIRA, 1989).

### CONCLUSÃO

Nas condições do presente trabalho as seguintes conclusões podem ser omitidas:

1. As concentrações de nitrogênio amoniacal, ácidos graxos totais e individuais e o pH do rúmen apresentaram-se semelhantes com a inclusão de maiores quantidades de cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho nas dietas.

2. O pH no líquido ruminal, manteve-se sempre acima de 6 e apresentou queda até três horas após fornecimento do alimento, enquanto que os ácidos graxos totais foram quantitativamente maiores até três horas após fornecimento do alimento.

3. A maior concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen ocorreu uma hora após o fornecimento do alimento e a menor concentração observada foi as 6 e 8 horas após o fornecimento do alimento.

4. A substituição progressiva da silagem de milho pela cana-de-açúcar nas dietas propiciou aumento no número de protozoários ciliados totais e na população de protozoários do gênero *Dasytricha*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU AKKADA, A R., EL-SHAZLY, K. Effect of absent of ciliate protozoa from the rumen on microbial activity and growth of lambs. *Appl. Microbiol.*, Washington, v.12, n.4, p.384-390, 1964.
- COCHRAN, W.G., COX, G.M. *Experimental designs*. 2. ed.. New York: John Wiley & Sons, 1957. 611 p.
- COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Ver. Microbiol.*, v.41, n.3, p.435- 464, 1987.
- DEHORITY, B.A. *Rumen microbiology*. Wooster: Ohio Agricultural Reserch and Development Center, 1987. 239 p.
- EADIE, J.M. , GILL, J.C. The effect of the absence of rumen ciliate protozoa on growing lambs fed *Brit.* on a roughage-concentrate diet. *J. Nutr.*, Bethesda, v.26, n.2 p.155-167, 1971.
- ERWIN, E.S., MARCO, G.J., EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.44, n.9, p.1768-1771, 1961.
- FIRKINS, F.L., BOWMAN, J.G.P., WEISS, W.P. et. al. Effects of protein, carbohydrate, and fat sources on bacterial colonization and degradation of fiber in vitro. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.74, n.12, p.4273-4283, 1991.
- FOLDAGER, J. Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation: Michigan: Michigan State University, 1977. Thesis PhD.
- FRANZOLIN, M.H.T. Efeitos da cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) sobre os protozoários ciliados, número de revoluções ruminais e volume do rúmen, em ovinos. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 1988, 48 f. Dissertação de Mestrado.
- HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.*, v.69, n.10, p.2755-2766, 1986
- HUNGATE, R.E. *The rumen and its microbes*. New York: Academic Press, 1966. 533 p.

- HUNGATE, R.E., REICHI, J., PRINS, R. Parameters of rumen fermentation in a continuously fed sheep: Evidence of a microbial rumination pool. *Appl. Microbiol., Washington*, v.22, n.6, p.1104-1113, 1971.
- HYDEN, S. A turbidometric method for the determination of higher polyethylene glycos in biological materials. *K. Lantbr. Hogsk. Arb.*, v.22, n. 1, p.139-145, 1956.
- JOUANY, J.P., DEMEYER, D.I., GRAIN, J. Effect of defaunating the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Amsterdam, v.21, n.2-4, p.229-265, 1988.
- KENNEDY, P.M. The effects of dietary sucrose and the concentrations of plasma urea and rumen ammonia on the degradation of urea in the gastrointestinal tract of cattle. *Br. J. Nutr., Bethesda*, v.43, n.1, p.125-140, 1980.
- KENNEDY, P.M., CLARKE, R.T.J., MILLIGAN, L.P. Influences of dietary sucrose and bacteria. *Br. J. Nutr., Bethesda*, v.46, n.3, p.533-541, 1981.
- LENG, R.A., PRESTON, T.R. Sugar cane for cattle production; present constraints, perspectives and research priorities. *Trop. Anim. Prod., Edinburgh*, v.1, n.1, p.1-26, 1976.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 6th. ed. rev., Washington: National Academy Press, 1988. 158 p.
- ORSKOV, E.R. Protein Nutrition in Ruminants. San Diego: Academic Press, 1982. 160 p.
- OXFORD, A.E. The conversion of certain soluble sugars to a glucosan by *Holotrich* ciliates in the rumen of sheep. *J. Gen. Microbiol., Reading*, v.5, n.1, p.83-90, 1951.
- PETERSEN, M.K. Nitrogen supplementation of grazing livestock. In: *Proc. Grazing Livestock Nutr. Conf.*, Univ. Wyoming, Jackson p.115-122, 1987
- PUNIA, B.S., LEIBHOLZ, J. The role of rumen protozoa in the utilization of paspalum (*Paspalum dilatatum*) hay by cattle. *Brit. J. Nutr., Bethesda*, v.57, n.1, p.395-406, 1987
- ROOKE, J.A., LEE, N.H., ARMSTRONG, D.G. The effects of intraruminal infusions of urea, casein, glucose syrup and a mixture of casein and glucose syrup on nitrogen digestion in the rumen of cattle receiving grass-silage diets. *Brit. J. Nutr., Bethesda*, v.57, n.1, p. 89-98, 1987.
- RUCKEBUSCH, Y., TRIVEND, P. Digestive physiology and metabolism in ruminants. Westport: Conn. AVI, 1980. 854 p.
- SAS. Institute Inc. SAS User's guide: statistics. Ver. R. ed.. SAS Inst., Cary, NC, 1988.
- SATTER, L.D., SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr., Bethesda*, v.32, n.2, p. 199-208, 1974.
- SATTER, L.D., SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentrations on ruminal microbes in vitro. *J. Anim. Sci., New York*, v.35, n.1, p.273, 1972.
- SCHAEFER, D.M., DAVIS, C.L., BRYANT, M.P. Ammonia saturation concentration for predominant species of rumen bacteria. *J. Dairy Sci., Champaign*, v.63, n.8, p.1248-1259, 1980.
- SEAL, C.J., PARKER, D.S. Effect of intraruminal propionic acid infusion on metabolism of mesenteric- and portal-drained viscera in growing steers fed a forage diet. I. Volatile fatty acids, glucose, and lactate. *J. Anim. Sci., Champaign*, v.72, n.5, p.1325-1334, 1994.
- SUTOH, M., OBARA, Y., MIYAMOTO, S. The effect of sucrose supplementation on kinetics of nitrogen, ruminal propionate and plasma glucose in sheep. *J. Agr. Sci., Cambridge*, v.126, n.1, p.99-105, 1996.
- VALVASORI, E., LUCCI, C.S., NOGUEIRA FILHO, J.C.M. *et al.* Ensaio de digestibilidade aparente da silagem de milho e cana-de-açúcar com ovinos: e efeitos na população de protozoários ciliados no rúmen. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo*, v.33, n.2, p.97-101, 1996.
- VEIRA, D.M. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. *J. Anim. Sci., Champaign*, v.63, n.5, p.1547-1560, 1989.
- VEIRA, D.M., IVAN, M., JUI, P.Y.J. Rumen ciliate protozoa: effects on digestion in the stomach of sheep. *J. Dairy Sci., Champaign*, v.66, n.5, p.1015-1022, 1983.