

Alterações na população de protozoários ruminais, quantificados a partir da adaptação da técnica de Dehority, de ovinos submetidos a uma dieta de confinamento

Alterations in Population of Ruminal Protozoa, Quantified from the Adaptation Technique Dehority, of Sheep Submitted to Confinement Diet

Márcio Erpen Lima¹, Lúcio Vendramin², Dustin André Chaves Hoffmann², Fernando Paixão Lisboa², Tiago Gallina³, Viviane Rohrig Rabassa¹, Elizabeth Schwegler¹ & Marcio Nunes Corrêa¹

ABSTRACT

Background: The search for productivity increase in finish ruminants is related with the intensification of production. The use of concentrated feed in finish lambs can determine a profitable product and quality, which reaches ideal weight in a short time. However, the addition of concentrated feed can cause a shift in the whole rumen ecosystem, and as a result, having animals more susceptible to metabolic disorders. As protozoa have their growth stimulated or inhibited by dietary factors, it becomes important to quantify and evaluate its activity in response to diets for ruminants. Thus, using measurements of the number of protozoa in the rumen fluid, we are able to make early diagnosis of possible metabolic disorders, as well as adjustments in ration formulations. The objective of this study was to evaluate the concentration and activity of protozoa in rumen of sheep in a feedlot diet, and validate an adaptation of the technique Dehority for counting of protozoa in the rumen fluid.

Materials, Methods & Results: It were utilized 5 crossbred Texel x Corriedale ewes not pregnant, not lactating, with approximately 18 months old and with average weight of 50.73 ± 4.38 kg. The females were kept confined, receiving water and ration *ad libitum* in individual feeders. Ewes were fed twice (8:30 and 16:30) daily with a diet aiming to provide the DM intake equivalent to 3.5% of body weight. The roughage supply was 60% of DM, divided into Alfalfa hay (*Medicago sativa*) and Tifton 85 (*Cynodon dactylon*), plus supplementation with commercial concentrate of 40%. Before the experimental period, we conducted a pre-trial adaptation period (21 days in length). Pre-prandial ruminal fluid collections were performed before the AM feeding, at intervals of seven days, during 35 days (Day 0 to Day 35 of the experiment), in a total of six collections. The rumen fluid was collected through oro-ruminal probe and the contents stored in sterile containers for immediate realization of sedimentation and flotation tests, methylene blue reduction test and ruminal pH. The values found in the rumen evaluations are in agreement physiological parameters for sheep. The average number of protozoa in rumen fluid in the range of 35 days was similar to other studies.

Discussion: In this study, supplementation of concentrate at 1.4% of BW did not induce ruminal acidosis, as well as other changes in the analysis of rumen fluid, demonstrating an appropriate relation concentrate/roughage in the diet. Furthermore, the supply of forages (Alfalfa hay and Tifton) at 60% of the diet (DM basis), or 2.1% of BW, was crucial to maintaining stable rumen pH. However, we observed an increase ($P \leq 0.05$) in the number of protozoa associated with the course of the experimental period. Moreover, this study we observed that even after a adaptation period of 21 days, the average number of protozoa in rumen fluid continued with a significant gradual increase. Using an alternative methodology was possible to validate a technical adaptation to the counting of protozoa in rumen fluid proposed by Dehority. In conclusion, diets based on alfalfa hay and Tifton, plus supplementation with concentrated promote a gradual increase in the number of ruminal protozoa in confined ewes, without any interference in other markers of rumen activity.

Keywords: ruminants, feed, concentrated, rumen, protozoa.

Descritores: ruminantes, alimentação, concentrado, rúmen, protozoários.

INTRODUÇÃO

Visando maximizar o desempenho de ruminantes em fase de recria e engorda, tem se observado um incremento na utilização de alimentos concentrados em dietas de confinamento [1]. No entanto, o uso indiscriminado dessa prática pode causar alterações no ecossistema ruminal, tornando o animal mais susceptível a desordens metabólicas [24].

A natureza da dieta fornecida aos ruminantes desencadeia variações sobre a microbiota ruminal. Dentre a população de protozoários ruminais sabe-se que podem contribuir com 40% a 50% da biomassa e da atividade enzimática total no rúmen [30]. O maior número de protozoários é relacionado com dietas mais digestíveis [28], onde possuem papel fundamental na modulação da taxa de fermentação ruminal, favorecendo o equilíbrio no ecossistema ruminal e evitando disfunções metabólicas [16]. Porém, estudos têm demonstrado uma redução no número de protozoários a partir de uso excessivo de concentrado na dieta [7].

À medida que os protozoários têm seu crescimento estimulado ou inibido por fatores dietéticos [13], torna-se importante a quantificação e avaliação de sua atividade em resposta a dietas fornecidas aos ruminantes. Desta forma, possibilita-se a realização de diagnósticos precoces de eventuais distúrbios de ordem metabólica [12] e ajustes criteriosos nas formulações de rações. O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração e atividade de protozoários ruminais de ovinos submetidos a uma dieta de confinamento, como também, validar uma adaptação da técnica de Dehority [8] para contagem de protozoários do líquido ruminal.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Setor de Ovinos do Hospital de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas/RS. Foram utilizadas cinco fêmeas ovinas, não prenhes, provenientes do cruzamento entre as raças Corriedale e Texel, com aproximadamente 18 meses de idade e peso médio de $50,73 \pm 4,38$ kg. As fêmeas foram mantidas em sistema de confinamento, recebendo água *ad libitum* e ração em cochos individuais, sendo essa fornecida às 8:30 e 16:30 h. A dieta fornecida aos ovinos era calculada buscando o fornecimento de MS equivalente a 3,5% do PV. Essa dieta foi estratificada em feno de Alfafa (*Medicago sativa*) e Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) a base de 60% da MS (ou 2,1% PV), acrescidos de alimento concentrado a base 40 % da MS (ou 1,4% PV), conforme a Tabela 1. Antecedente ao período experimental foi realizado uma adaptação prévia à dieta, compreendendo 21 dias [8].

As fêmeas foram selecionadas uniformemente de acordo com o peso corporal e o escore de condição corporal, conforme escala de 1 a 5 [23].

As coletas de líquido ruminal foram realizadas antecedentes a alimentação dos animais no turno da manhã, em intervalos de sete dias, por um período total de 35 dias (Dia 0 ao Dia 35 do experimento), totalizando seis coletas. O líquido ruminal foi coletado através de sonda oro-ruminal e o conteúdo armazenado em frascos estéreis para realização imediata dos testes de sedimentação e flutuação, redução do azul de metileno e pH ruminal [10]. Para a realização da prova de sedimentação e flutuação, colocou-se 10 mL de fluido ruminal em tubos cônicos tipo Falcon1, deixando

Tabela 1. Análise bromatológica da dieta, compreendida de 40% da MS de concentrado e 60% da MS de volumoso, fornecida às ovelhas durante os 35 dias de coletas do líquido ruminal.

Análise	Concentrado	Feno de Alfafa	Feno de Tifton 85
Matéria Seca (%)	87,56	87,64	88,62
Proteína Bruta (%)	17,62	14,32	6,08
Cinzas (%)	11,51	8,49	4,36
Extrato Etéreo (%)	4,20	1,32	0,86
Fibra Bruta (%)	11,76	36,28	31,46
Cálcio (%)	1,91	2,42	0,88
Fósforo (%)	0,95	0,36	0,13

as amostras em repouso até a formação de camadas estratificadas bem definidas no líquido ruminal [3]. A determinação do tempo de redução do azul de metileno foi realizada utilizando-se tubos cônicos tipo Falcon1, nos quais se adicionaram 9,5 mL de fluido ruminal e 0,5 mL de azul de metileno (solução 0,02%) [22]. O pH ruminal foi determinado com um potenciômetro portátil [21].

A técnica de quantificação dos protozoários ruminais foi baseada na metodologia descrita por Dehority [8], tendo como princípio a conservação do material em solução de formol e glicerina para manutenção das estruturas morfológicas e diluições que facilitam a estimativa do número de protozoários. O material obtido das coletas de líquido ruminal foi filtrado em gaze dobrada quatro vezes, sendo que 5 mL do produto obtido era conservado em tubos plásticos, acrescidos de 10 mL de formalina a 37%. Após a homogeneização do conteúdo, mantinha-se por 12 h sobre refrigeração. Posterior a este período, retirava-se 0,5 mL da amostra e adicionava-se 9,5 mL de glicerol a 30%, obtendo-se uma solução de 1:20 do produto inicial. Duas gotas de verde brilhante a 2% eram adicionadas para melhor visualização das estruturas dos protozoários. Uma câmara de vidro medindo 1 x 20 x 50 mm foi confeccionada sobre uma lâmina de vidro, onde era adicionado 1 mL da amostra previamente homogeneizada. A câmara era recoberta por uma lamínula de vidro 30 x 60 mm e sobre ela uma lâmina plástica impressa com 100 quadros de 0,01 mm². Vinte quadros, nas duas linhas diagonais, foram contados e o valor obtido foi multiplicado por cinco, para ajustar ao volume total da câmara. Obtinha-se assim a estimativa total dos protozoários em 1 ml da diluição, que posteriormente foi multiplicado pelo valor correspondente as diluições. As amostras eram sempre contadas em duplicata.

As análises dos parâmetros ruminais envolvendo medidas repetidas sobre o tempo (testes de sedimentação/flutuação, teste de redução do azul de metileno, avaliação da concentração dos protozoários e pH ruminal), foram comparadas entre as semanas através do Mixed Procedure no programa estatístico Statistix [25] para medidas repetidas, sendo considerados significativos valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Os valores encontrados na avaliação do fluido ruminal podem ser considerados dentro dos padrões fisiológicos para a espécie ovina [10], conforme a Tabela 2. Neste estudo a suplementação de concentrado equivalente a 1,4% do PV não induziu a uma acidose ruminal, bem como demais alterações na análise do fluido ruminal, demonstrando uma adequada relação concentrado/volumoso na respectiva dieta.

O número médio de protozoário no líquido ruminal no intervalo de 35 dias experimentais foi semelhante a demais estudos [3,15]. No entanto, foi observado um incremento significativo ($P \leq 0,05$) no número de protozoários de acordo com o decorrer do período experimental (Figura 1).

DISCUSSÃO

São comuns reduções no pH ruminal em animais submetidos a dietas com elevados níveis de concentrado [11]. O pH do fluido ruminal varia entre 5,5 e 6,2 em dietas com maior teor de concentrado, enquanto que dietas com maior participação de volumosos os valores situam-se entre 6,2 e 7,0 [20]. Neste estudo, não foram observados efeitos da suplementação de concentrado equivalente a 1,4% do PV sobre os parâmetros avaliados no fluido ruminal, demonstrando uma adequada relação concentrado/volumoso na respectiva dieta. Neste contexto, o for-

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros ruminais obtidos de ovelhas confinadas durante os 35 dias de submissão a dieta compreendida da 40% MS de concentrado e 60% MS de volumoso.

Análise	Valor médio
pH	7,03
Sedimentação/Flutuação (min)	3,09
Tempo de redução (min)	2,0
N de protozoários/mL	1.113.610 ou 1,1 x 10 ⁶

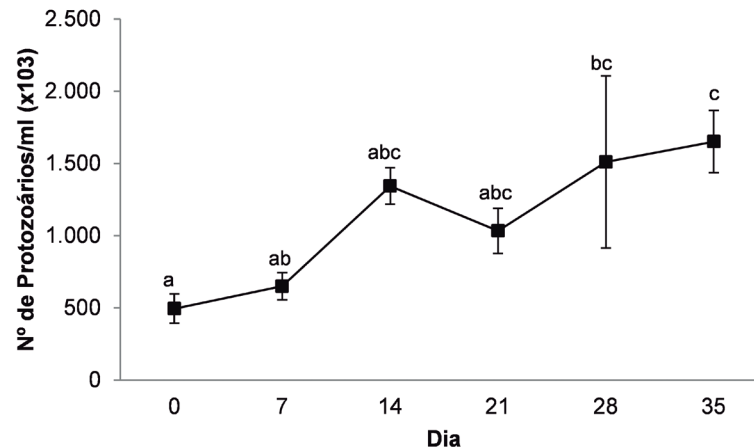


Figura 1. Média no número de protozoários/mL de líquido ruminal de ovinos mantidos em sistema de confinamento, recebendo uma dieta compreendida por 40% de concentrado e 60% de volumoso, de acordo com os 35 dias experimentais. ^{a-c}Letras diferentes em cada ponto indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

necimento de alimentos volumosos (feno de alfafa e tifton) equivalente a 60% da MS da dieta, ou 2,1% do PV, foi determinante para manutenção da estabilidade do pH ruminal. Sabe-se que a utilização de volumosos é fundamental em dietas de animais confinados devido ao estímulo da fibra para mastigação e ruminação [28]. Além disso, a alimentação com feno de alfafa também pode auxiliar na elevação do pH ruminal devido ao alto teor de proteína bruta [17]. Dietas que não estimulam adequadamente a mastigação reduzem a produção de saliva, resultando em diminuição do pH ruminal [26], podendo acarretar em distúrbios metabólicos [1].

O pH do rúmen é um dos fatores fisiológicos mais variáveis que podem influir diretamente na população microbiana, afetando os protozoários quando há redução do pH [7]. Todavia, os protozoários desempenham um papel de suma importância no controle do pH do fluido ruminal, pois estes são capazes de engolfar facilmente grânulos de amido em suspensão no conteúdo ruminal, sendo responsáveis por até 45% da atividade amilolítica no rúmen, e sua população aumenta significativamente em animais suplementados com dietas que possuem um aumento progressivo da fração concentrada [4]. Entretanto, sabe-se que em dietas ricas em forragens, as bactérias constituem sítios de aderência e dificultam o engolfamento pelos protozoários, provocando assim uma redução no seu desenvolvimento [16].

O incremento no número de protozoários com o decorrer do período experimental pode ser explicado devido à interação entre dieta e adaptação ruminal, onde estudos demonstraram que dietas com maiores

níveis de concentrado [2] e proteína bruta [27] resultam na elevação da população de protozoários ruminais. Desta forma, a elevação na população de protozoários ocorre de forma gradativa devido ao período de adaptação ruminal a dieta, podendo ser estipulado em aproximadamente 21 dias [9,29]. Porém, neste estudo foi observado que mesmo após um período de 21 dias de adaptação a dieta, o número médio de protozoários no líquido ruminal prosseguiu com uma elevação gradativa.

O aumento na população de protozoários foi constatado a partir de um período de adaptação a dieta com 40% da MS compreendida por concentrado [7]. No entanto, os resultados com a adição de concentrado são variáveis, pois em alguns trabalhos não foi observado nenhuma diferença significativa na população de protozoários entre dietas que variavam quanto à adição de 20 e 40 % de concentrado [18]. Contudo, demais estudos demonstraram um efeito linear decrescente para os níveis de 30, 45, 60, 75 e 90% de concentrado sobre o número de protozoários [5]. Neste contexto, os efeitos da adição de concentrado na dieta sobre os protozoários dependem principalmente de alterações no pH ruminal [19], as quais não foram constatadas no presente estudo.

Os valores obtidos através da quantificação do número de protozoários no líquido ruminal se mostraram dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie ovina [3], bem como mantiveram uma variação semelhante a outros estudos [6,14]. Desta forma, a metodologia proposta para contagem de protozoários utilizada neste estudo, a partir da adaptação da téc-

nica de Dehority [8], pode ser validada como eficaz, contribuindo-se para a realização de novos estudos que visem avaliar a população de protozoários ruminais.

CONCLUSÃO

Dietas a base de feno de alfafa e tifton, acrescida de suplementação com concentrado promovem uma elevação gradativa no número de protozoários ruminais de fêmeas ovinas confinadas, sem provocar interferência sobre os demais marcadores da flora ruminal.

NOTAS INFORMATIVAS

¹Falcon, Becton Dickinson Laboware, NJ, USA.

²Phmetro pH100, Phtek, São Paulo, Brasil.

Ethical approval. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel, em 27 de março de 2007 (protocolo nº 010/2006), em acordo com as leis Brasileiras e os princípios éticos publicados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERÊNCIAS

- 1 **Alves K.S., Carvalho F.F.R. & Vêras A.S.C. 2003.** Níveis de energia em dietas para ovinos Santa Inês: digestibilidade Apararente. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 32(6): 1962-1968.
- 2 **Antunes R.C. & Rodriguez N.M. 2006.** Metabolismo de carboidratos não estruturais. In: Berchielli T.T., Pires A.V. & Oliveira S.G. (Eds). *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Funep, pp.237-238.
- 3 **Arcuri P.B., Lopes F.C.F. & Carneiro J.C. 2006.** Microbiologia do rúmen. In: Berchielli T. T., Pires A.V. & Oliveira S.G. (Eds). *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Funep, pp.183-228.
- 4 **Borges N.C., Silva L.A.F., Fioravante M.C.S., Cunha P.H.J., Moraes R.R., Guimarães P.L. & Martins M.E.P. 2002.** Avaliação de suco ruminal de bovinos "a fresco" e após 12 horas. *Ciência Animal Brasileira*. 3(2): 57-63.
- 5 **Bürger P.J., Pereira J.C., Valadares Filho S.C., Silva J.F.C., Queiroz A.C., Cecon P.R. & Magiero D.2000.** Fermentação ruminal e eficiência microbiana em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 29(1): 215-224.
- 6 **Church D.C. 1993.** *Fisiologia digestiva y nutrición de los ruminantes*. Zaragoza: Acríbia, 641p.
- 7 **Dayani O., Ghorbani G.R. & Alikhani M. 2007.** Effects of dietary whole cottonseed and crude protein level on rumen protozoal population and fermentation parameters. *Small Ruminant Research*. (69): 36-45.
- 8 **Dehority B.A. 1977.** Classification and Morphology of Rumen Protozoa. *Department of Animal Science*. Columbus: University of Ohio, 82p.
- 9 **Dirksen G. 1981.** *Indigestiones en el bovino*. Konstanz: Schnetztor - VerlagGmbH. (Ranchos, Argentina), 76p.
- 10 **Dirksen G., Grunder H.D. & Stober M. 1993.** *Rosemberger - Exame Clínico de Ruminantes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 419p..
- 11 **Feitosa F.L.F. 2004.** *Semiologia Veterinária: A arte do diagnóstico*. São Paulo:Roca, 804p.
- 12 **Feitosa F.L.F., Feitosa M.M., Almeida C.T., Lopes R.S., Mendes L. C.N., Peiró J.R. & Abujanra, J.O. 2006.** *Veterinária Notícias*. 12(1): 9-14.
- 13 **Guan H., Wittenberg K.M. & Ominski K.H. 2006.** Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science*. (84): 1896-1906.
- 14 **Ivan M., Mir P.S. & Koenng K.M. 2001.** Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Ruminant Reseach*. (41): 215-227.
- 15 **Kamra D.N. 2005.** Rumen microbial ecosystem. *Current Science*. 89(1): 124-134.
- 16 **Kozloski G.V. 2002.** *Bioquímica dos ruminantes*. Santa Maria: UFSM, 140p.
- 17 **Lana R.P. & Russell J.B. 1997.** Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intake. *Journal of Animal Science*. (75): 224-229.
- 18 **Martinele I., Siqueira-Castro I.C.V. & D'agosto M. 2008.** Protozoários ciliados no rúmen de bovinos alimentados com dietas de capim-elefante e com dois níveis de concentrado. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 9(1): 77-81.
- 19 **Nagaraja T.G., Towne G. & Beharka A.A. 1992.** Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoal in cattle fed a high-grain diet. *Applied Environmental Microbiology*. (58): 2410-2414.

- 20 Odenyo A.A., Osuji P.O. & Karanfil O. 1997. Effect of multipurpose tree (MPT) supplements on ruminal ciliate protozoa. *Animal Feed Science Technology*. (67): 169-180.
- 21 Owens F.N. & Goetsch A.L. 1988. Ruminal fermentation. In: Church D.C. (Ed). *The ruminant animal digestive physiology and nutrition*. Englewood cliffs: O & Books Inc, pp.146-171.
- 22 Rosenberger G. 1993. *Exame clínico de bovinos*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 420p.
- 23 Russel A.J.F., Doney J.M. & Gunn R.G. 1969. Subjective assessment of body fat in sheep. *Journal Agricultural Science*. (72): 451-454.
- 24 Russel J.B. & Rychlik J.L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*. (292): 1119-1122.
- 25 Statistix. *Statistix 9 analytical software*. 2008. Tallahassee, USA.
- 26 Santra A., Chaturvedi O.H. & Tripathi M.K. 2003. Effect of dietary sodium bicarbonate supplementation on fermentation characteristics and ciliate protozoal populations in rumen of lambs. *Small Ruminant Research*. (47): 203-212.
- 27 Silva J.F.C. & Leão M. 1979. *Fundamentos da nutrição de ruminantes*. Piracicaba: Livroceres, 380p.
- 28 Van Soest P.J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Ithaca: Comstock Publ. Assoc., 476p.
- 29 Williams A.G. 1986. Rumen holotricha ciliate protozoa. *Microbiological Reviews*. 50(1): 25-49.
- 30 Williams A.G. & Coleman G.S. 1997. The rumen protozoa. In: Hobson P.N. & Stewart C.S. (Eds). *The rumen microbial ecosystem*. 2nd edn. London: Blackie Academic and Professional, pp.73-139.