



**EFEITO DE DOSES DIFERENTES DE ENXOFRE
NO CONSUMO VOLUNTÁRIO DE CAPIM-
ELEFANTE DE BAIXA QUALIDADE E NAS
ESTIMATIVAS DE POPULAÇÕES DE
MICROORGANISMOS E PARÂMETROS RUMINAIS
EM NOVILHAS MESTIÇAS**

JULIANA MIACCI VIDAL

2005

JULIANA MIACCI VIDAL

**EFEITO DE DOSES DIFERENTES DE ENXOFRE NO CONSUMO
VOLUNTÁRIO DE CAPIM - ELEFANTE DE BAIXA
QUALIDADE E NAS ESTIMATIVAS DE POPULAÇÕES DE
MICRORGANISMOS E PARÂMETROS RUMINAIS EM
NOVILHAS MISTIÇAS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras como parte das
exigências do Curso de Mestrado em
Zootecnia, área de concentração em
Nutrição de Ruminantes, para obtenção
do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Paulo César de Aguiar Paiva

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005**

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos
Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Vidal, Juliana Miacci

Efeito de doses diferentes de enxofre no consumo voluntário de capim elefante de baixa qualidade e nas estimativas de populações de microrganismos e parâmetros ruminais em novilhas mestiças / Juliana Miacci Vidal. -- Lavras : UFLA, 2005.

55 p. : il.

Orientador: Paulo César de Aguiar Paiva

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Microrganismo ruminal. 2. Enxofre. 3. Consumo voluntário. 4. Parâmetro ruminal. 5. Novilha mestiça. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-636.2084

JULIANA MIACCI VIDAL

**EFEITO DE DOSES DIFERENTES DE ENXOFRE NO CONSUMO
VOLUNTÁRIO DE CAPIM - ELEFANTE DE BAIXA
QUALIDADE E NAS ESTIMATIVAS DE POPULAÇÕES DE
MICROORGANISMOS E PARÂMETROS RUMINAIS EM
NOVILHAS MESTIÇAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 04 de março de 2005.

Dr. Pedro Braga Arcuri – CNPGL-EMBRAPA

Dr. Fernando César Ferraz Lopes – CNPGL-EMBRAPA

Prof. Dra. Vera Lúcia Banys - UFG

Prof. Paulo César de Aguiar Paiva
UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

Ofereço

A minha mãe, Dinorá, pelo amor, amizade, confiança e apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.
Em especial, para o meu filho Enzo, que chegou para alegrar e dar mais sentido à minha vida.

Dedico

Para toda a minha família que, mesmo de longe, sempre torceu por mim.

Para minhas grandes amigas, Ana Luisa e Juliana Santos, pela amizade, pelas risadas, pela paciência e total apoio nas horas alegres e tristes, mesmo à distância.

Para Sílvia e toda a sua família, que me acolheram com muito carinho e dedicação.

Para o Michael, pelo apoio, paciência, amizade e por ser uma pessoa tão especial para mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Dinorá e Luis e à minha irmã, Mariana, que sempre disseram o quanto o meu trabalho era importante e muito especial.

A toda minha família que, mesmo sem entender direito o que eu faço, sempre me apoiou.

À Universidade Federal de Lavras, principalmente ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite – EMBRAPA, pela oportunidade e confiança.

Ao Professor Paulo César de Aguiar Paiva, pela orientação, amizade, paciência, respeito, apoio e confiança durante todo esse trabalho.

Ao Pesquisador Pedro Braga Arcuri, pela incansável orientação, amizade, paciência, respeito, apoio e confiança durante todas as etapas deste trabalho.

À Professora Vera Lúcia Banys, pela amizade, pela confiança e as palavras certas em muitas horas de minha vida.

Ao Pesquisador Fernando César Ferraz Lopes, pelos ensinamentos e sugestões apresentadas.

Aos Pesquisadores Heloísa Carneiro e Jailton Carneiro, pelos ensinamentos e sugestões apresentadas.

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia do Rúmen, Lívia Lorençato, Sarah Brum e Leonardo Zaquini, pela colaboração, apoio e amizade nas contagens das bactérias e dos protozoários.

Aos funcionários dos laboratórios Nilva Guadereto Martins, Clébio Avelar Fonseca, Mário Baesso Tristão, Edmar Barros de Almeida, pela colaboração e apoio nas análises e em especial ao Hernani Guilherme Barbosa

Filho que me apoiou e me ensinou muito, principalmente no desenvolvimento da técnica de extração do enxofre.

Aos funcionários do Biogás José Luiz do Nascimento, José Moreira de Castilho e Rosimeire Aparecida Carvalho Dornelas, por tudo que fizeram por mim e em especial ao José Placidino Sousa Filho, que acompanhou todo o meu experimento com dedicação e amizade. Ao estagiário Gildásio de Sousa Barbosa, pela dedicação e empenho. Aos funcionários de Departamento de Zootecnia, Carlos Henrique Souza, Pedro Adão Pereira e Keila Cristina de Oliveira, pela prontidão e disposição.

Aos amigos Paula Perez Ribeiro, Kamilla Ribas Soares, Ana Cristina Wyllie, Mirton José Morenz, Edgar Collao Allain Saenz, Danilo Lozado, Euclides Reuter de Oliveira e Jocélio S. Araújo, pela amizade, ensinamentos, apoio e torcida.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos.

À NUTRIPLAN Ltda, na pessoa do Dr. Milton S. Dayrell, pelo fornecimento da mistura mineralizada para os animais.

Aos colegas de Pós-Graduação, pelo companheirismo.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, por tudo.

MUITO OBRIGADA !!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Enxofre	3
2.2 Fungos.....	4
2.2.1 Estabelecimento inicial de fungos no rúmen.....	5
2.2.2 Taxonomia e características dos fungos.....	6
2.2.3 Influência da dieta na população de fungos.	7
2.2.4 Influência do enxofre na população de fungos.....	8
2.2.5 Interação dos fungos com os outros microrganismos ruminais.....	9
2.3 Bactérias.....	10
2.4 Protozoários.....	10
2.5 Fermentação de carboidratos.....	11
2.6 Método do número mais provável.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Animais e instalações experimentais.....	17
3.2 Tratamentos e delineamento experimental.....	17
3.2.1 Tratamentos	17
3.2.2 Fornecimento aos animais.....	19

3.2.3	Delineamento, modelos estatísticos e análise estatística.....	19
3.3	Preparo das soluções e dos meios de cultivo.....	21
3.3.1	Solução mineral.....	21
3.3.2	Solução de diluição anaeróbica (ADS).....	21
3.3.3	Solução de ácidos graxos voláteis (AGV), resarzurina e heme.....	22
3.3.4	Meio de cultivo.....	22
3.3.5	Solução de antibióticos.....	23
3.4	Amostragem de conteúdo ruminal.....	24
3.5	Inoculação para as contagens dos fungos e das bactérias.....	24
3.6	Estimativa das populações de fungos e bactérias.....	25
3.7	Coleta, contagem e identificação de protozoários.....	25
3.8	Composição química dos alimetos, da digesta e das fezes.....	27
3.8.1	Determinação de enxofre.....	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	Análise bromatológica.....	29
4.2	Conteúdo de enxofre na dieta, digesta e fezes.....	30
4.3	Consumo de matéria seca.....	32
4.4	Contagens das populações de microrganismos do rúmen.....	35
4.4.1	Contagem da população de fungos.....	35
4.4.2	Contagem da população de bactérias.....	38
4.4.3	Contagem da população de protozoários totais.....	40
4.5	Parâmetros ruminais.....	41
4.5.1	pH.....	41
4.5.2	Nitrogênio amoniacal.....	43
4.6	Digestibilidade aparente.....	45
5	CONCLUSÕES.....	46
6	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Composição da mistura mineral fornecida, em percentagem	18
2	Esquema dos tratamentos e dos animais em quadrado latino	20
3	Composição da solução de diluição anaeróbica (ADS).....	22
4	Composição do meio de cultura para fungos.....	23
5	Efeito dos períodos experimentais nos componentes nutritivos do capim-elefante, em base de matéria seca.....	30
7	Teores médios respectivos e desvio padrão de enxofre no volumoso oferecido, digesta, fezes (g/Kg MS) e sangue (mg/L).....	32
8	Consumo de matéria seca e FDN nos tratamentos.....	35
9	Estimativa da população de fungos ruminais em relação às coletas, aos tratamentos, para cada período de coleta (repetição).....	37
10	Estimativa da população de bactérias.....	38
11	Digestibilidade capim-elefante 120 dias.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Médias dos tratamentos do consumo de MS e FDN pelo peso vivo.....	33
2	Gráfico de médias de contagem, por tratamentos, da população de fungos anaeróbios totais.....	37
3	Médias das estimativas da população de bactérias anaeróbias totais, obtidas pelo método NMP, de quatro períodos experimentais.....	39
4	Gráfico de médias de contagem de população de protozoários anaeróbios totais.....	40
5	Médias de pH para cada tratamento.....	42
6	Médias de N-NH ₃ para cada tratamento.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

S	Enxofre
NMP	número mais provável
ADS	solução de diluição anaeróbica
AGV	ácidos graxos voláteis
MS	matéria seca
PB	proteína bruta
FDN	fibra em detergente neutro
FDA	fibra em detergente ácido
MSi	matéria seca indigestível
FDNi	fibra em detergente neutro indigestível
$P>0,05$	probabilidade não significativa a 5%
$P<0,05$	probabilidade significativa a 5%
DP	desvio padrão
PC	peso corporal

RESUMO

VIDAL, Juliana. Miacci. **Efeito de doses diferentes de enxofre no consumo voluntário de capim-elefante de baixa qualidade e nas estimativas de populações de microrganismos e parâmetros ruminais em novilhas mestiças.** 2005. 55p. Dissertação (Mestrado em Nutrição de Ruminantes) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

Com o objetivo de avaliar o consumo voluntário, populações de microrganismos e parâmetros ruminais em novilhas mestiças recebendo capim de baixa qualidade e doses diferentes doses de enxofre conduziu-se o experimento no Campo Experimental de Coronel Pacheco pertencente à EMBRAPA Gado de Leite, Minas Gerais. O efeito de doses de enxofre (sulfato de amônio, 0,15; 0,31; 0,46 e 0,92% S matéria verde / dia) na população de microrganismos ruminais, foi avaliado utilizando-se quatro novilhas 7/8 Holandês X Zebu, não gestantes, não lactantes, canuladas no rúmen, arranjadas em quadrado latino 4x4. Fornecem-se diariamente capim - elefante de baixa qualidade (76,1% FDN na MS), picado, com correção do teor de PB para 7% com uréia, mais mistura mineral sem enxofre fornecida diretamente no rúmen. Durante cada período experimental, que eram de 21 dias sendo 7 dias de adaptação e 15 dias de coleta. Foram feitas quatro amostragens do conteúdo ruminal, duas na primeira e duas na segunda semana de coleta nos quatro animais, uma hora após a alimentação. Foram analisadas estimativas de populações de microrganismos ruminais, parâmetros ruminais e digestibilidade. A estimativa das populações microbianas ruminais foi feita através do método do Número Mais Provável e microscópica direta. Os resultados foram transformados para logaritmos decimais e avaliados estatisticamente. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para microrganismos. O tratamento 0,92%S apresentou o menor consumo de matéria seca e ainda, causou início de intoxicação em dois animais. Observou-se até 34 ± 11 mg N-NH₃/100 mL na dose 0,92% S. O pH manteve-se entre 6,41 e 6,86 em todos os tratamentos. Os dados de digestibilidade foram considerados baixos em média 39%. De acordo com esses resultados, doses de 0,31% de enxofre adicionada a dieta promoveram o incremento das populações de microrganismos ruminais e com isso um maior consumo voluntário .

Comitê Orientador: Paulo César de Aguiar Paiva - UFLA (Orientador), Pedro Braga Arcuri – EMBRAPA GADO DE LEITE, Fernando César Ferraz Lopes – EMBRAPA GADO DE LEITE e Vera Lúcia Banys – UFV

ABSTRACT

VIDAL, Juliana. Miacci. **Effect of different doses of sulfur on voluntary intake of low-quality elephant grass and estimates of microorganism populations and ruminal parameters in crossbred heifers.** 2005. 55p. Dissertation (Master in Ruminant Nutrition) - Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

With the purpose of evaluating voluntary intake, microorganism populations and ruminal parameters in crossbred heifers feeding low quality grass and different doses of sulfur, the experiment was carried out in the Experimental Field of Coronel Pacheco belonging to EMBRAPA Dairy Cattle, Minas Gerais. The effects of the doses of sulfur (ammonium sulfate, 0.15%, 0.31%, 0.46% and 0.92% S fresh matter/day) on the ruminal microorganism population was evaluated by utilizing four 7/8 Holstein x Zebu, non-pregnant, non-lactating rumen-fistulated heifers arranged in 4 x 4 Latin square. Low quality elephant grass (76.1% NDF in DM) , chopped with correction of the CP content to 7% with urea plus a mineral mixture without sulfur given directly into the rumen during each experimental period, which was of 21 days, 7 days being of adaptation and 15 days of collection. Four samplings of the ruminal content were done, two in the first and two in the second week of collection in the four animals, one hour after feeding. The estimate of the ruminal microorganism populations, ruminal and digestibility parameters were surveyed. The estimate of the ruminal microbial populations was done by means of the most likely number and direct microscopy. The results were transformed to decimal logarithm and evaluated statistically. There were no significant differences among the treatments for microorganisms. The 0.92% S treatment presented the least dry matter intake and, in addition, caused start of intoxication in two animals. Up to 34 + - 11 mg N-NH₃/100ml was found in the 0.92 S dose. pH maintained between 6.41 and 6.86 in all the treatments. The digestibility data were considered low, on the average, 39%. According to those results, doses of 0.31% of sulfur added to the diet promoted the increase of the ruminal microorganism populations and hence a greater voluntary intake.

Guidance committee: Paulo César de Aguiar Paiva – UFLA (Adviser), Pedro Braga Arcuri – EMBRAPA GADO DE LEITE, Fernando Ferraz Lopes - EMBRAPA GADO DE LEITE and Vera Lúcia Banys –UFV.

1 INTRODUÇÃO

A microbiota ruminal é composta, principalmente, por três grupos de microrganismos anaeróbios, as bactérias, os protozoários e os fungos. As populações de cada grupo e as espécies componentes destas são influenciadas diretamente pelo tipo de alimento fornecido ao hospedeiro. Em animais submetidos a dietas de baixo valor nutritivo e ricas em fibras, observa-se o aumento no número de protozoários ciliados e de fungos.

Fungos ruminais são classificados como quitridiomicetos e sua característica ecológica mais importante é a capacidade de degradação de fibras, que é iniciada pelo rompimento físico da estrutura cristalina da celulose, pela penetração das hifas ou rizóides. A atividade fibrolítica de fungos isolados do rúmen é, em geral, semelhante, ou mesmo maior do que a atividade fibrolítica de culturas puras de bactérias. Além disso, fungos ruminais podem degradar paredes celulares lignificadas, o que não ocorre com as bactérias. Em consequência, alguns autores sugerem que a presença, em números significativos, de fungos no rúmen, pode aumentar o consumo voluntário de forragens de baixa qualidade em decorrência do aumento da degradabilidade da mesma.

Trabalhos com carneiros mostraram que teores mais elevados da concentração de enxofre (S) na dieta, seja por meio da adubação da pastagem ou da suplementação por mistura mineralizada, podem favorecer o aumento da população fúngica ruminal e apresentar relação variável, porém, positiva e direta de 6% a 75% com o aumento do consumo voluntário de matéria orgânica.

Objetivou-se, com este trabalho, verificar o efeito de diferentes níveis de enxofre na dieta de bovinos leiteiros canulados, submetidos à dieta de baixo valor nutritivo e elevado teor de fibras, relacionando o consumo voluntário com

a observação dos parâmetros ruminais e com as populações microbianas ruminais, com ênfase em fungos ruminais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Enxofre

O organismo animal contém cerca de 0,2% de enxofre, encontrando-se este metalóide tanto na forma mineral quanto componente de compostos orgânicos. Os compostos orgânicos compreendem, principalmente, os aminoácidos sulfurados, cistina, cisteína e metionina, as vitaminas, tiamina e biotina e hormônios (Andriquetto et al., 1993).

O enxofre é nutricionalmente importante para plantas e animais, sendo essencial para os ruminantes (NRC,2001). Interage com cobre, molibdênio e selênio (Spears, 1991), sendo a predição das exigências em S susceptíveis de confundimento devido a essas interações e tanto a deficiência quanto a toxidez podem ocorrer NRC (2001).

O enxofre é parte da predição das exigências de componentes orgânicos específicos e das exigências da microbiota ruminal (Andriquetto et al., 1993). A quantidade inadequada deste nas dietas pode prejudicar o metabolismo da microbiota ruminal, conduzindo à diminuição na digestão ruminal de carboidratos dietéticos e à diminuição no suprimento de aminoácidos para o metabolismo dos tecidos do hospedeiro. Tais mudanças causam a redução no consumo voluntário, no suprimento de energia e na taxa de síntese da proteína corporal (Weston et al., 1988).

O suprimento protéico dietético depende, inicialmente, da quantidade de proteína ingerida e do seu potencial para resistir ao ataque microbiano no rúmen. A quantidade de proteína e a proporção de aminoácidos sulfurados necessários para o metabolismo do ruminante devem corresponder à soma das proteínas dietéticas que escapam da fermentação ruminal e das proteínas microbianas

sintetizadas no rúmen. Porém, apesar de ser dependente da quantidade de energia produzida no rúmen, o suprimento protéico também pode ser limitado pelo fornecimento, ausência, presença ou excesso de outros nutrientes necessários para o crescimento microbiano (NRC, 2001). Níveis acima do recomendado podem conduzir à geração de grandes quantidades do gás sulfeto de hidrogênio que, quando eructado, entra no pulmão e causa severo estresse nervoso e respiratório (Dougherty et al., 1965). Outra consequência do consumo em excesso de enxofre é o aparecimento de poliencefalomalacia que coincide com a produção excessiva de sulfeto ruminal (Gould, 1998).

2.2 Fungos

Acreditava-se, até recentemente, que a população microbiana do rúmen era composta exclusivamente por bactérias e protozoários. Entretanto, microrganismos anaeróbios, originalmente identificados como protozoários flagelados, foram, mais tarde, classificados como zoósporos multiflagelados de fungos (Orpin, 1975). Eles são encontrados em ovinos, bovinos, cervídeos, caprinos e no intestino grosso de eqüinos, elefantes e rinocerontes (Orpin, 1977a).

Os fungos são os primeiros a colonizarem as partículas vegetais no rúmen (Orpin, 1989), priorizando os tecidos lignocelulósicos das plantas que são retidos por períodos mais longos no rúmen (Bauchop, 1989), indicando que os mesmos possuem a habilidade de degradar esses componentes.

Grenet et al. (1988) demonstraram que os fungos anaeróbios podem ser encontrados em grande número nas frações ricas em lignina e celulose no rúmen de bovinos e ovinos alimentados com forragens. Apesar do ataque preferencial ocorrer na parede celular e naquelas altamente lignificadas, esses tecidos são particularmente resistentes à digestão no rúmen (Van Soest, 1994).

Existem evidências de que esses fungos participam ativamente no rompimento físico da fibra por meio de rizóides, ou hifas (Akin, 1988; Akin & Benner, 1988; Theodorou et al., 1996), durante o processo de degradação das forragens. A importância do rompimento físico no incremento da degradação da parede celular foi demonstrado *in vivo* por Lee et al. (Lee et al., 2000).

Trabalho realizado indicou, para fungos ruminais, que a adição de microrganismos vivos, com capacidade fibrolítica elevada, pode aumentar a utilização de nutrientes por ruminantes (Lee et al., 2000)

2.2.1 Estabelecimento inicial de fungos no rúmen

Fonty et al. (1987) observaram em cordeiros com dez dias de nascimento, que os fungos anaeróbicos são os primeiros colonizadores do rúmen, apresentando populações grandes, mas instáveis. Uma vez que animais pré-ruminantes utilizam como principal alimento o leite materno, algumas espécies de fungos anaeróbicos podem utilizar a lactose como fonte do carbono (Gordon & Phillips, 1989) tendo, com isso, grande vantagem competitiva para colonizarem o trato digestivo. Embora a maioria das espécies de fungos anaeróbios degradem fibras, a presença desta não é essencial para seu estabelecimento. Desde que os fungos anaeróbios foram isolados na cavidade oral dos ruminantes (Lowe et al., 1987; Milne et al., 1989), supõe-se que a transferência dos fungos da mãe para a cria ocorra pelo contato direto deste com a saliva da materna, através de zoósporos nas fezes depositadas nas pastagens e por alimentos previamente contaminados com aquelas estruturas de resistência.

As populações fúngicas tornam-se estáveis entre seis e oito semanas (Lowe et al., 1987; Milne et al., 1989).

2.2.2 Taxonomia e características dos fungos

A maioria dos fungos ruminais isolados até o presente é do tipo monocêntrico (Orpin,1989), ou seja, seu rizóide conduz a um único esporângio. Fungos monocêntricos podem ser exemplificados pelas espécies *Neocallimastix frontalis*, *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communi* e *Sphaeromonas communis* (Akin & Bonerman,1990).

A taxonomia desses fungos ainda não está bem definida. A descoberta de um fungo policêntrico, ou seja, vários esporângios associados a um único rizóide, em bubalinos, bovinos e ovinos (Borneman et al., 1989; Breton et al., 1989), indica que a diversidade dos fungos encontrados nos ruminantes é muito maior do que se pensava.

O ciclo biológico desses microrganismos envolve dois estágios: uma célula flagelada móvel, chamada de zoósporo, que transita livre na fase líquida do rúmen, sendo efêmero e uma forma vegetativa, imóvel, fixa nas partículas da digesta (Orpin,1977a; Bauchop,1979) e que apresenta capacidade reprodutiva, pelo esporângio.

O organismo maduro consiste de um sistema rizoidal que pode ser altamente ramificado ou simples e o esporângio (Orpin, 1989). O rizóide invade a parede celular da planta e se desenvolve dentro do tecido (Bauchop, 1989), podendo, assim, romper e degradar os tecidos fibrosos das plantas no rúmen (Bauchop, 1979; Bauchop & Mountford, 1981).

Os zoósporos se desenvolvem dentro do esporângio e a dissolução eventual de parte da parede deste resulta na liberação dos zoósporos flagelados que apresentam movimento amebóide (Orpin, 1989) e podem aderir-se a um fragmento de planta, desenvolvendo um novo organismo vegetativo, repetindo, assim, o ciclo biológico (Bauchop,1989).

Este zoósporo pode apresentar flagelo simples ou múltiplo, dependendo do gênero (Orpin, 1989). O gênero *Neocallimastix* apresenta zoósporo poliflagelado, enquanto que o gênero *Sphaeromonas* tem zoósporo monoflagelado.

Se o animal é alimentado uma vez por dia, a zoosporogênese e a liberação do zoósporo do estágio vegetativo ocorrem logo após a ingestão (Orpin & Joblin, 1988). No gênero *Neocallimastix*, o pico da população de zoósporos foi observado entre 15 e 30 minutos após a alimentação (Orpin, 1974; 1975), mas, nos gêneros *Sphaeromonas* e *Piromonas*, o pico da população de zoósporo ocorreu uma hora após a alimentação (Orpin, 1976; 1977b).

Os fungos não vivem exclusivamente no ambiente ruminal, mas também no intestino dos ruminantes, segundo Grenet & Breton (1989). Os mesmos constataram que a população de fungos é menor no intestino do que no rúmen, mas seguem as mesmas alterações que ocorrem no mesmo. Assim, dietas desfavoráveis à presença de fungos no rúmen diminuem o número dos mesmos no intestino.

A presença de fungos no intestino indica que estes podem ser transportados para fora do rúmen, associados às partículas da digesta ou por meio dos zoósporos e sobrevivem às condições ácidas do abomaso.

2.2.3 Influência da dieta na população de fungos

O tipo de dieta que o animal hospedeiro ingere exerce influência significativa na população de microrganismos do rúmen (Hungate, 1966).

Orpin (1977a) relatou que os componentes de várias forragens induziram a esporogênese dos fungos no rúmen, resultando em aumento da população.

De acordo com Bauchop (1979), os fungos anaeróbicos vivem em maior abundância no rúmen de animais que se alimentam de forragens maduras ou feno, em comparação com aqueles que se alimentam de forragens novas ou grãos de cereais. É provável que a pequena população de fungos geralmente encontrada no rúmen de ovinos alimentados com grãos não seja devido à baixa atividade amilolítica dos fungos e, sim, à incapacidade destes em sobreviverem em pH abaixo de 6,8.

A relação positiva entre o teor de fibra e a população de fungos também foi demonstrada por Bauchop & Muontford (1981), Orpin (1984) e Bauchop (1989). Os fungos são encontrados em pequeno número em animais que se alimentam de dietas ricas em açúcar, de pastos jovens (Bauchop,1989) ou de dietas ricas em cereais (Bauchop & Muontford,1981).

2.2.4 Influência do enxofre na população de fungos

Estudos mostram que o enxofre contido na dieta de ruminantes é fator significativo para o crescimento da população de fungos anaeróbios no rúmen (Akin et al., 1983). Em estudos com ovinos, a população de fungos cresceu drasticamente após a aplicação de fertilizantes sulfurosos na pastagem, resultando em aumento de 38 % no consumo da dieta (Akin et al., 1983).

Dietas com baixa concentração de enxofre podem ter efeito negativo na população de fungos no rúmen, podendo, em vários casos, torná-los ausentes (Morrison et al., 1990). Suplementando-se feno de gramínea tropical com enxofre, de 0,04% para 0,07% de MS, observou-se aumento de bactérias, protozoários e fungos anaeróbicos no rúmen (Morrison et al., 1990).

2.2.5 Interações dos fungos com os outros microrganismos ruminais

Entre os microrganismos do rúmen existem várias e constantes interações. Os protozoários engolfam bactérias e também competem com as mesmas por substratos, como o amido e outros nutrientes, incluindo minerais e vitaminas. Como consequência, há uma relação negativa entre o número de bactérias e de protozoários ciliados.

Estudos com ruminantes submetidos a dietas fibrosas de baixo teor protéico sugerem que também há interação competitiva entre protozoários e fungos. Em estudos envolvendo ovinos defaunados, as quantidades de zoósporos no fluido de rúmen eram de duas a cinco vezes maior do que em ovinos faunados e recebendo a mesma dieta (Bird & Leng, 1984). Protozoários ciliados podem ingerir bactérias de tamanho similar ao dos zoósporos, de modo que é provável que a predação de zoósporos por protozoários também ocorra. Não há nenhuma evidência direta, mas Orpin (1977a) também observou, em animais defaunados, aumento na população de fungos.

Em coculturas de *Neocallimastix frontalis* e *Ruminococcus flavefaciens* (bactéria celulolítica), a atividade do fungo foi parcialmente inibida, enquanto que, na presença de *Fibrobacter succinogenes*, a atividade celulolítica não foi afetada (Bernalier et al., 1988 citados por Fonty & Joblin, 1990). Em trabalhos desses mesmos autores, a incubação de *Neocallimastix frontalis* ou *Piromonas communis* com *Selenomonas ruminantium* (bactéria proteolítica) levou à inibição completa da degradação da celulose pelos fungos. As interações entre as bactérias e os fungos parecem ser bastante variáveis de acordo com as espécies e os sistemas dessas interações ainda precisam ser elucidados.

2.3 Bactérias

As bactérias ruminais são microrganismos que variam, em tamanho, de 1 a 5 µm. Esta população é a mais diversa no rúmen, tanto em termos de número de espécies quanto em capacidade metabólica. A densidade de bactérias no rúmen é uma das maiores em qualquer ecossistema conhecido. Frequentemente, são observados valores na grandeza de 10^{10} células/g de conteúdo ruminal (Stewart et al., 1997) (Raskin et al., 1997). O número total de espécies ruminais não é conhecido (Krause & Russel, 1996), porém, mais de 400 espécies já foram isoladas dos tratos digestivos de diferentes animais (Nagaraja et al., 1997). Mais de 20 espécies apresentam contagens superiores a 10^7 /g (Russell & Rychlick, 2001).

Os principais grupos de bactérias ruminais estão relacionados com o processo de degradação da fibra vegetal.

2.4 Protozoários

Os protozoários são microrganismos unicelulares, anaeróbios, não patogênicos, que variam, em tamanho, de 20 a 200 µm (portanto, cerca de 10 a 100 vezes maiores que as bactérias) (Dehority, 1993). Apresentam uma organização interna complexa e altamente diferenciada, com estruturas funcionais semelhantes a boca, esôfago, estômago, reto, ânus. Em algumas espécies, ocorre ainda uma placa rígida, semelhante a um esqueleto (Dehority, 1993). A população de protozoários do conteúdo ruminal de animais alimentados com diferentes tipos de dieta varia em concentração, entre 10^4 e 10^6 protozoários/ml de conteúdo ruminal (D'agosto et al., 1998; Franzolin & Dehority, 1996; D'agosto et al., 2001). Devido ao seu tamanho, essa concentração, em geral, representa de 40% a 60% da biomassa microbiana total

do rúmen (Dehority e Orpin, 1997; Ezequiel, 2002). Como consequência, a presença de protozoários no rúmen traz efeitos benéficos e outros adversos para a produção animal. Alguns protozoários são celulolíticos, mas os principais substratos utilizados pela fauna ruminal como fonte de energia são os açúcares e amidos, que são assimilados rapidamente e estocados na forma de amilopectina ou amido protozoário (Williams, 1986). Portanto, os protozoários desempenham um efeito tamponante, pois as bactérias não têm acesso a uma quantidade excessiva de substratos prontamente fermentáveis. Conseqüentemente, a presença de protozoários no rúmen reduz o risco de acidose, em dietas ricas em grãos ou açúcares (Dehority & Orpin, 1997; Lopes et al., 2002).

Uma característica peculiar dos protozoários é o quimotactismo, isto é, a capacidade de se locomoverem num gradiente de concentração de açúcares ou glicoproteínas. Dehority et al., 1989 sugerem que o grupo holotrica é capaz de se fixar à parede do retículo e migrar em direção ao rúmen, logo após a alimentação do hospedeiro, possivelmente em função do aparecimento de açúcares solúveis. Por meio deste mecanismo, os protozoários maiores são seletivamente retidos no rúmen, o que lhes permite sobreviver neste ambiente, uma vez que têm um tempo de geração muito longo (Leng, 1989).

2.5 Fermentação de carboidratos

Os principais produtos finais da fermentação da celulose pelos fungos são o acetato, o lactato, o formato, o etanol, o CO₂ e o H₂ (Gordon & Phillips, 1989).

A degradação física dos polissacarídios estruturais das plantas pelos fungos é extremamente importante para o entendimento da contribuição destes na digestão da fibra no rúmen. De acordo com os trabalhos conduzidos por Orpin (1984), os fungos ruminais não utilizam a pectina para o seu crescimento

in vitro. Conseqüentemente, a perda de pectina pode contribuir para o “pool” de carboidratos presentes no líquido de rúmen, tornando estes carboidratos disponíveis para outros microrganismos. Da mesma forma, a arabinose, que embora possa ser removida das xilanas pelas glicosidases desses microrganismos e que não é utilizada para o crescimento dos mesmos, também contribui para o “pool” de carboidratos na fase líquida do rúmen.

Embora os fungos do rúmen colonizem, preferencialmente, os tecidos lignocelulósicos das plantas, seu papel na degradação de lignina não está claro. *In vitro*, estes são capazes de solubilizar os polifenóis precursores da lignina das paredes celulares das plantas, mas não há evidência de que sejam capazes de utilizar a lignina como fonte de carbono (Orpin, 1984).

Segundo Bonerman et al.(1989), citados por Akin & Bonerman (1990), os fungos mostraram a capacidade de produzir esterases que liberam os ácidos p-cumáricos e ferúlicos dos seus ésteres metílicos e da parede celular da planta intacta e, por isso, é possível que essas enzimas desempenhem papel significativo na degradação da parede celular das plantas ricas em compostos fenólicos.

A produção das enzimas que degradam as fibras e a utilização dos carboidratos são extra-celulares e ocorrem tanto no estágio vegetativo quanto no estágio de adesão pelo zoósporo (Williams & Orpin,1987, citados por Fonty & Joblin,1990).

A molécula de celulose presente na parede celular vegetal é o principal fornecedor de energia aos ruminantes. Entretanto, outros componentes não celulósicos, como a lignina, podem exercer influência significativa na susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática (Conner & Richardson, 1987). Cristalinização também é mencionada por Akin (1986) como fator limitante para a quebra desta cadeia em glicose. Segundo o mesmo autor, na

forragem, a celulose livre de compostos agregados e quimicamente pura pode ser completamente degradada pela população microbiana ruminal.

Windham & Akin (1984) observaram que as bactérias ruminais são as principais responsáveis pela degradação da fibra das forragens e que os fungos não apresentaram atividade degradadora expressiva em tecidos lignificados ou não.

Entretanto, Akin et al., (1983) afirmaram que os fungos ruminais são mais capazes de degradar tecidos lignocelulósicos do que as bactérias. Akin (1986) cita que os fungos ruminais podem proporcionar melhoria na degradação de tecidos lignocelulósicos de forrageiras tropicais.

Bauchop & Muontford (1981) observaram tendência dos fungos ruminais colonizarem forrageiras fibrosas e de regiões tropicais. Observaram também que essa população é reduzida quando os ruminantes se alimentam de forrageiras com baixo teor de fibra. Porém, apesar de Windham & Akin (1984), em trabalhos anteriores, terem observado que dietas mais fibrosas propiciam maior população de fungos, os mesmos deduziram que devem existir outros fatores, além da quantidade de fibra, que interferem no desenvolvimento da população fúngica ruminal.

Akin et al (1983) verificaram, *in vitro*, que, na ausência de bactérias, fungos ruminais degradaram 62% da matéria seca (MS) da forragem ingerida e concluíram que esses microrganismos possuem papel importante na degradação da fibra das forrageiras, incluindo tecidos lignificados e contribuem para aumentar o consumo de forragens pelos ruminantes. Orpin (1981) relatou que os fungos ruminais podem solubilizar até 16% da lignina da fibra. Akin & Benner (1988), inibindo o crescimento bacteriano no líquido ruminal, concluíram que a atividade fúngica foi responsável por perda de aproximadamente 70% de matéria orgânica, enquanto que Windham & Akin (1984) relataram que a maior

densidade do fungo ruminal celulolítico *Neocallimastix frontalis* resultou em menor digestibilidade da MS.

Identificar e conhecer os mecanismos específicos pelos quais os fungos ruminais degradam a fração fibrosa do alimento, tornariam possível a manipulação dos mesmos na biodegradação dos resíduos lignocelulósicos, objetivando tornar frações pouco degradáveis da parede celular de plantas mais disponíveis para ruminantes.

2.6 Método do número mais provável

O método do número mais provável permite estimar a quantidade de organismos viáveis em uma amostra (Oblinger & Koburger, 1984) e baseia-se na probabilidade estatística. Os resultados da análise NMP estão diretamente relacionados com a frequência de ocorrência de uma série de resultados positivos muito prováveis de ocorrer quando um dado tipo de organismo está presente em alíquotas da amostra, numa série de diluições. A estimativa da quantidade de organismos viáveis na amostra é obtida a partir de diluições decimais e da transferência de alíquotas para vários tubos, utilizando-se, freqüentemente, de três a cinco tubos por diluição (Jacobs & Gerstein, 1960).

Segundo Oblinger & Koburger (1984), a precisão associada com a técnica NMP não é equivalente à técnica da contagem direta, apresenta problemas e está sujeita a várias fontes de erro e, por isso, é importante que o número de tubos inoculados por diluição seja de três ou cinco, buscando maior exatidão do método. A série de três tubos é a mais usada, embora tabelas para outros números de tubos, por exemplo, cinco por diluição, sejam encontradas na literatura (Hoskins, 1933; Oblinger & Koburger, 1975; American Public Health Association, 1980, citados por Oblinger & Koburger, 1984).

Existem alguns fatores que contribuem para o erro no uso desta metodologia, porém, a variação entre as alíquotas repicadas é o principal. A dificuldade de obter uma amostra verdadeiramente representativa do lote também contribui para a obtenção de resultados errôneos, e, ainda, existe a possibilidade da distribuição desigual dos microrganismos.

O método NMP tem sido extensivamente usado para estimar os números das populações de bactérias e de fungos no conteúdo ruminal. De acordo com Dehority et al. (1989), se o isolamento e a identificação das espécies microbianas não são necessários, o método NMP é mais simples e exige menor tempo do que o método da contagem direta pelo procedimento de “roll tubes” (Dehority, 1989). Além disso, a manutenção das condições anaeróbias é facilitada pelo uso do meio líquido, tanto na preparação quanto na inoculação do meio.

O método NMP foi investigado por Dehority et al. (1989) para, simultaneamente, estimar o número de bactérias totais e o número de bactérias celulolíticas no rúmen. Além disso, o tempo requerido para gerar os dados foi menor do que aquele que seria necessário para estimar o número total de bactérias usando o método “roll tubes”.

A desvantagem do método NMP está na impossibilidade de isolar e identificar os microrganismos. As aplicações do método NMP são numerosas, porém, duas suposições devem ser consideradas: a casualidade da distribuição dos microrganismos pela amostra, se estes nela existirem, e quando uma alíquota é colocada em meio apropriado e inoculada corretamente, observa-se resultado positivo quando a mesma contiver um ou mais microrganismos presentes.

Quando a amostra homogênea é dividida em subamostras em uma série de diluições e distribuída em tubos contendo meio de cultivo, algumas das alíquotas poderão não conter os microrganismos visados. Por isso, o método NMP, que é baseado nessas subdivisões da amostra, pode ser descrito como o

“método de diluição múltipla em tubos até à extinção” (Oblinger & Koburger, 1984).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e instalações experimentais

O experimento foi conduzido no período de junho a novembro de 2003, no Campo Experimental de Coronel Pacheco (CECP), pertencente à EMBRAPA Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco, Minas Gerais,. Foram utilizadas quatro novilhas 7/8 Holandês x Zebu, não gestantes, não lactantes, com peso médio de 450 kg, fistuladas no rúmen e providas de cânulas permanentes de látex. Os animais permaneceram em baias individuais com aproximadamente 50 m², recebendo alimento à vontade fornecido uma vez ao dia, com livre acesso à água.

3.2 Tratamentos e delineamento experimental

3.2.1 Tratamentos

Os quatro níveis de S avaliados foram definidos a partir da recomendação do NRC (2001) para o S total da dieta dos bovinos leiteiros de 0,32% da matéria seca ingerida por dia: Tratamento 1 (controle, 0,0% de S adicionado à dieta); tratamento 2 (subótimo, 0,16% de S adicionado à dieta); tratamento 3 (ótimo, 0,32% de S adicionado à dieta) e tratamento 4 (excesso, 0,48% de S adicionado à dieta).

O enxofre foi fornecido na forma de sulfato de amônio e o cálculo da quantidade tomou como base o consumo médio de MS verificado na semana anterior. Nos tratamentos, foram considerados a quantidade de S verificado na semana anterior mais o S contido na forragem. A forragem utilizada foi obtida

de uma área de capineira, isto é, a qualidade da mesma não poderia ser rigorosamente controlada.

O S foi fornecido na forma de sulfato de amônio por ser solúvel e metabolizável pelos microrganismos anaeróbios. Adicionou-se uréia ao capim picado, a fim de que todas as dietas apresentassem 7% de proteína bruta na matéria seca (NRC, 2001). Testes iniciais demonstraram que o S na forma de flôr-de-enxofre (enxofre elementar, S₀) não foi completamente solubilizado no trato digestivo dos animais, ocorrendo, inclusive, o aparecimento de partículas de S visíveis nas fezes.

A mistura mineral fornecida foi preparada pela NUTRIPLAN Ltda., de Juiz de Fora, Minas Gerais (Tabela 1) de modo a não conter S.

TABELA 1 Composição da mistura mineral fornecida, em percentagem.

Elementos	%
Fósforo	8
Cálcio	15
Cobre	15
Zinco	39,6
Cobalto	0,5
Iodo	2,94
Selênio	0,2
Sódio	16,3

3.2.2 Fornecimento aos animais

O sulfato de amônio e o sal mineralizado foram dosados diariamente no momento do fornecimento do alimento em sacos de papel de 5x10 cm. As doses da mistura mineralizada e do sulfato de amônio foram pesadas individualmente e imersas no conteúdo ruminal pela cânula, permitindo a mistura rápida no rúmen. Por ocasião da amostragem do conteúdo ruminal para as contagens microbianas e a determinação de composição química do mesmo, processaram-se as amostras após a retirada das mesmas.

Os animais receberam, diariamente, capim-elefante picado e maduro, com aproximadamente 120 dias. Antes do fornecimento, a forragem era dividida em quatro, para que a solução de uréia fosse adicionada nas quantidades previamente calculadas para cada tratamento. As misturas forragem + uréia eram homogeneizadas com garfo, pesadas e imediatamente distribuídas aos animais.

3.2.3 Delineamento, modelos estatísticos e análise estatística

Os animais foram submetidos aos tratamentos num arranjo em quadrado latino 4 x 4 (quatro animais submetidos aos quatro tratamentos), conforme a Tabela 2. Cada período experimental teve a duração de 21 dias, sendo 7 dias de adaptação e 15 dias de coletas.

TABELA 2 Esquema dos tratamentos e dos animais em quadrado latino

Períodos (21 dias)	Tratamentos (Número dos animais)			
	0445	0525	1401	1439
1º	0,0 (1)	0,48 (4)	0,16 (2)	0,32 (3)
2º	0,16 (2)	0,0 (1)	0,32 (3)	0,48 (4)
3º	0,32 (3)	0,16 (2)	0,48 (4)	0,0 (1)
4º	0,48 (4)	0,32 (3)	0,0 (1)	0,16 (2)

O modelo estatístico adotado para a análise de variância das médias dos dados está descrito abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \theta_i + D(i)j + P(i)k + \pi_l + \pi_{\theta il} + e_{ijkl}$$

sendo:

Y_{ijkl} = valor para as variáveis consumo de capim-elefante, contagem microbiana e digestibilidade

μ = média geral

θ_i = efeito do quadrado latino i ($i = 1, 2, 3$ e 4)

$D(i)j$ = efeito do animal j ($j = 1, 2, 3$ e 4)

$P(i)k$ = efeito do período k ($k = 1, 2, 3$ e 4)

π_l = efeito do tratamento l ($l = 1, 2, 3$ e 4)

$\pi_{\theta il}$ = efeito da interação do quadrado i x tratamento l

e_{ijkl} = erro associado a todas observações

Os dados de consumo de capim-elefante, protozoários e digestibilidade foram submetidos à análise de variância e do teste de Tuckey (SAEG, 2000).

Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a contagem de fungos e bactérias ruminais, utilizou-se o delineamento em quadrado latino, em esquema

de parcelas subdivididas com os tratamentos alocados nas parcelas e os dias na subparcela, utilizando o PROC GLM do SAS, 1991.

As regressões foram realizadas e obteve-se como variável dependente consumo de MS e FDN, contagem de fungos ruminais e digestibilidade e, como variável independente, os tratamentos, sendo elas testadas em efeito linear e quadrático pelo PROC REG do SAS, 1991.

3.3 Preparo das soluções e dos meios de cultivo

3.3.1 Solução mineral

As soluções minerais foram preparadas antecipadamente e armazenadas em frascos de vidro com tampa, em geladeira a 5°C.

Solução mineral I: 3,9 g KH_2PO_4

Solução mineral II: 3 g KH_2PO_4 ; 3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6,01 g NaCl; 0,6 g MgSO_4 ; 0,60 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

3.3.2 Solução de ácidos graxos voláteis (AGV), rezarzurina e heme

A solução de AGV foi preparada previamente e mantida, em frasco de vidro, em geladeira a 5°C, com 17,0 mL de ácido acético, 6,0 mL de ácido propiônico, 4,0 mL de ácido butírico, 1,0 mL de ácido n-valérico, 1,0 mL de ácido isovalérico e 1,0 de mL ácido alfa-metil-butírico (Obispo & Dehority, 1992).

A solução de rezarzurina foi preparada dissolvendo-se 100 mg de rezarzurina em 100 mL de água destilada e mantida em frasco de vidro em geladeira a 5°C (Obispo & Dehority, 1992).

Para a solução de heme 0,1% foram utilizados 100 mg de heme dissolvidos em NaOH 0,02% e diluído para 100 mL de água destilada (Obispo & Dehority, 1992).

3.3.3 Solução de diluição anaeróbica (ADS)

A solução de ADS está descrita na Tabela 3.

TABELA 3 Composição da solução de diluição anaeróbia (ADS)

Soluções	Quantidade (mL)
Solução mineral I	90
Solução mineral II	90
Rezarzurina 0,1%	0,6
Água destilada	785
Na ₂ CO ₃ 12%	25
Cisteína HCL 3%	10
Total	1000

Alíquotas de 9 mL foram transferidas para os tubos de ensaio que então eram vedados, lacrados e esterilizados (1 atm, 121°C, 20 min). O mesmo procedimento era adotado para as garrafas contendo 180 mL de ADS.

3.3.4 Meio de cultivo

O meio de cultura para fungos foi preparado seguindo-se a recomendação de Obispo & Dehority (1992). A composição do meio está descrita na Tabela 4. Este foi preparado sempre sob fluxo contínuo de CO₂. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 6,7 – 6,9, se necessário, com HCl ou hidróxido de sódio 0,1 N. Após 1 hora sob fluxo constante de CO₂, alíquotas de

8,5 mL foram distribuídos com o auxílio de pipetas, para os tubos de ensaio e estes vedados com rolhas de borracha butil, lacrados e autoclavados .

TABELA 4 Composição do meio de cultura para fungos

Item	Quantidades
Solução mineral I	15 mL
Solução mineral II	15 mL
Solução rezarzurina 0,1%	0,1 mL
Solução heme 0,1%	0,1 mL
Glicose	0,1 g
Celobiose	0,1 g
Maltose	0,1 g
Xilose	0,1 g
Tripticase	0,2 g
Extrato de levedura	0,05 g
Solução de ácidos graxos voláteis	0,45 mL
Líquido de rúmen	20 mL
Carbonato de sódio 12%	3,33 mL
Cisteína HCl 3%	1,67 mL
Água destilada q.s.p.	100,00 mL

3.3.5 Solução de antibióticos

Antibióticos foram utilizados no meio de cultura para a contagem de fungos, objetivando inibir o crescimento bacteriano. Foram seguidas as recomendações de Obispo & Dehority (1992). Em 100 mL de água destilada

saturada com CO₂, foram suspensos 1,21 g de penicilina sódica G (Sigma) e 0,2 g de sulfato de estreptomicina (Vetec Química Fina Ltda). Em cada tubo de meio de cultura, foram adicionados, assepticamente, 0,9 mL da solução de antibiótico. As concentrações finais no meio de cultivo, portanto, foram 0,0109 g e 0,002 g, respectivamente. Eventualmente, devido ao atraso na aquisição da penicilina sódica, o medicamento benzetacil foi utilizado, ajustando-se as concentrações.

3.4 Amostragem do conteúdo ruminal

Durante cada período experimental foram feitas quatro amostragens do conteúdo ruminal, sendo duas na primeira semana de coleta e duas na segunda, de cada um dos quatro animais. A coleta do conteúdo ruminal foi feita sempre uma hora após a alimentação. O conteúdo ruminal foi amostrado colhendo-se manualmente alíquotas de posições diferentes do rúmen, sendo estas imediatamente colocadas em garrafas térmicas devidamente identificadas, desinfetadas e pré-aquecidas com água a 40°C. Após as amostragens, as garrafas térmicas eram armazenadas em caixa de isopor e imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Rúmen da EMBRAPA Gado de Leite, localizado em Juiz de Fora.

3.5 Inoculação para as contagens dos fungos e das bactérias

O procedimento de inoculação iniciava-se com a diluição das amostras dos conteúdos de rúmen, de acordo com as recomendações de Obispo & Dehority (1992). Em um liquidificador/homogeneizador (“Waring Blender” marca Osterizer), previamente desinfetado, recebendo fluxo constante de CO₂, à velocidade máxima de 2.000 rpm e constante, por 3 minutos.

Homogeneizaram-se completamente 180 mL da solução de diluição anaeróbica contendo resazurina e uma alíquota de 20 g do conteúdo ruminal, medida em becker graduado de 20 mL. Em seguida, agitou-se com bastão de vidro a suspensão homogenizada e, com uma seringa de plástico, estéril e capacidade de 5 mL, trasferiu-se anaerobiamente 1 mL (diluição 10^{-1}) da suspensão para os tubos de ensaio próprios para culturas anaeróbias, lacráveis (marca Bellco Glass, Inc., Vineland, NJ, EUA mod. nº 2048-00150) contendo 9 mL de solução ADS estéril (diluição 10^{-2}). Essa diluição seriada era repetida até 10^{-14} e serviu de inóculo para as contagens de fungos e bactérias. Todos os tubos eram vedados com rolhas de borracha butil, impermeável a gases (Bellco, Inc. mod. nº 2048-11800) e selados com lacres rasgáveis de alumínio.

3.6 Estimativa das populações de fungos e bactérias

A estimativa das populações foi obtida pelo método do número mais provável (NMP), descrito por Obispo & Dehority (1992) a partir do resultado de três tubos contendo meio de cultivo e inoculados com uma determinada diluição do conteúdo ruminal. A amostra era diluída à extinção, isto é, pelo menos na última diluição não era observado nenhum crescimento. Assim, a série de diluição para fungos, contendo meio de cultivo e antibióticos, era executada até 10^{-7} e, para bactérias contendo apenas meio de cultivo, até 10^{-14} .

Os dados de fungos, bactérias e protozoários totais foram transformados para $\log_{10}(x + 1)$, conforme recomendação de Obispo & Dehority (1992).

3.7 Coleta, contagem e identificação de protozoários

Para as contagens de protozoários, alíquotas das amostras do conteúdo ruminal eram obtidas das garrafas térmicas (Item 3.4) no momento em que as

mesmas eram vertidas em recipiente sob fluxo de CO₂, no Laboratório de Microbiologia do Rúmen, em Juiz de Fora, utilizando-se um recipiente plástico de 10 mL. Este volume de conteúdo ruminal era então vertido em frasco de vidro de 50 mL com tampa rosqueada. A este adicionou-se igual volume de formalina (aldeído fórmico 37% diluído 1:1 em água destilada) constituindo diluição 1:2 (D'Agosto et al., 1999). A suspensão era, então, homogeneizada e identificada para contagem posterior.

Para as contagens, uma alíquota de 1,0 mL da amostra preservada era transferida para tubo de ensaio de 16 x 150 mm, adicionando-se, em seguida, três gotas do corante lugol (5 g de iodo, 10g de iodeto de potássio e água destilada q.s.p. 100 mL) (D'Agosto et al., 1999). A suspensão era agitada e, em seguida, deixada em descanso por, pelo menos, quinze minutos.

Após o período de descanso para a coloração, 9 mL de solução de glicerol a 30% foram adicionados ao tubo de ensaio, constituindo diluição final de 1:20 do conteúdo ruminal original. A alíquota diluída era pipetada para uma câmara de contagem do tipo "sedgewick-rafter" (Thomas Scientific, Inc. No. 9851C20) montada sobre uma lâmina de vidro, com as dimensões de 20 mm x 50 mm x 1 mm, ou 1000 mm³ ou ainda 1 mL de volume, evitando-se, com isso, que, durante o procedimento de contagem, os protozoários fossem esmagados. Os protozoários eram então contados no aumento de 100 vezes, usando-se tela de contagem de 25 mm² na ocular do microscópio (D'Agosto et al., 1999). O procedimento de contagem consistia em obter-se o número de protozoários presentes em 50 campos da tela, ao longo de toda a superfície da câmara. Para maior precisão, girava-se a câmara 180° e contavam-se, novamente, 50 campos da mesma tela. A contagem final consistia na média aritmética das duas contagens. A quantidade de protozoários por mL de conteúdo ruminal era então calculada considerando-se que cada tela de contagem cobre a superfície de 25 mm² (5 mm x 5 mm) ou 0,25 cm². Uma vez que todos os protozoários são

acomodados no fundo da câmara, quando suspensos em glicerol 30%, a profundidade da célula não precisa ser considerada. Portanto, 50 campos x 25 mm² = 1.250 mm². Foram contados 1.000 mm³/1.250 mm² ou 8/10 mm da superfície total da lâmina. Como o aumento utilizado no microscópio foi de 100 x, o fator de correção usado foi 0,8 x 100 = 80.

Então, multiplicando-se a média de 50 campos por 80 e depois por 20, (fator de correção da diluição do conteúdo ruminal), obteve-se o número de protozoários por mL de conteúdo ruminal.

3.8 Composição química dos alimentos, da digesta e das fezes

As análises das amostras da dieta (forragem + uréia + sulfato de amônio), do conteúdo ruminal (digesta) e das fezes, quanto aos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e o nitrogênio amoniacal (N-NH₃), foram realizadas de acordo com as metodologias descritas em AOAC (1990). A fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas de acordo com as metodologias descritas por Silva (1990). A digestibilidade aparente foi estimada utilizando-se como indicador interno a matéria seca (MS) indigestível, após 144 horas de incubação *in vitro*, conforme descrito por Berchielli et al (2000).

Amostras de conteúdo ruminal foram coletadas para análises de N-NH₃ e pH.

3.8.1 Determinação de enxofre

Amostras da forragem oferecida (capim-elefante + uréia), das fezes e do sangue dos animais durante os quatro períodos foram analisadas para enxofre (S), de acordo com metodologia proposta por Monttershead (1971). Seguindo as

recomendações desse método, as amostras foram coletadas e levadas a estufa de 105°C para serem secas e armazenadas em frascos com tampa. Em seguida, eram pesavam-se 0,5 g das amostras secas e moídas do alimento, da digesta e das fezes. Amostras de sangue foram centrifugadas para a remoção de células e, em seguida, alíquotas de 0,5 mL de plasma foram usadas para a determinação de enxofre. Todas as análises foram feitas com réplica, e em tubos de ensaio adaptados para o bloco digestor, eram pipetados 5 mL de mistura digestora (previamente preparada) e levados ao bloco digestor a uma temperatura de 90°C, por 40 minutos. Após, eram colocados funis na parte superior dos tubos e a temperatura era elevada a 250°C. As amostras eram digeridas em aproximadamente 1 hora, e, após, eram retiradas do bloco digestor e resfriadas à temperatura ambiente. Depois, adicionavam-se 25 mL de mistura ácida (previamente preparada) e, então, os tubos eram lavados com até 50 mL de água destilada. As amostras digeridas eram armazenadas em frascos de plástico identificados e reservados para leitura em espectrofotômetro em 623 nm. Para a determinação dos teores de S, para cada batelada de amostra digerida, preparava-se uma curva padrão (0, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 mg/L) de sulfato de potássio, previamente preparado e armazenado em geladeira.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise bromatológica

Como pode ser verificado nos dados da Tabela 5, houve uniformidade na composição bromatológica do capim durante todo experimento. O capim utilizado tinha aproximadamente 120 dias, sem adubação recente. A composição química do alimento é influenciada por vários fatores, como idade da forrageira, condições do solo e clima e, por isso, é tão variada na literatura. Na Tabela 5 observam-se as condições em que o capim deveria se apresentar para o presente trabalho, que tinha por finalidade testar uma condição drástica de alimentação, com fins exploratórios do efeito da adição de enxofre na forma de sulfato de amônio, sobre o consumo e as populações de microrganismos ruminais. Os resultados encontrados estão de acordo com os encontrados por Gomes et al. (1994), que trabalharam com feno de capim-camerounês com tamanho de corte de 3 m, apresentando 74,4% de FDN e 49,0% de FDA. Vieira et al. (1997), trabalhando com idades diferentes de capim-elefante, encontraram no capim de 124 dias, teores MS de 26,2%, FDN de 69,7% e FDA de 52,5%.

A proteína bruta do experimento foi controlada de acordo com cada tratamento com o uso de uréia para ser utilizado o teor de 7%, conforme recomendado pelo NRC (2001).

TABELA 5 Efeito dos períodos experimentais nos componentes nutritivos do Capim–elefante, em base de matéria seca.

Períodos	Fração (%)			
	MS	FDN	FDA	PB
1°	40,72	77,61	43,94	5,89
2°	39,20	76,30	44,26	7,95
3°	39,57	74,73	45,54	6,73
4°	37,32	75,88	43,12	6,99
Media	39,20	76,13	44,22	6,89
DP	1,4	1,2	1,0	0,8

4.2 Conteúdo de enxofre na dieta, digesta e fezes

Os tratamentos apresentaram uma faixa de concentração de S que variou de baixa a muito alta, para os tratamentos 1, 2, 3 e 4, como pode ser observado na Tabela 6.

TABELA 6 Valores médios dos teores de enxofre nos tratamentos

Tratamentos	Enxofre observado (% MS)
1 (0,0%)	0,15
2 (0,16%)	0,31
3 (0,32%)	0,46
4 (0,48%)	0,92

No presente trabalho, os tratamentos 1, 2, 3, e 4 serão denominados pelos valores de S observados, isto é, 0,15%, 0,31%, 0,46% e 0,92%.

Os teores de enxofre encontrados no alimento fornecido (forragem + uréia), digesta, fezes e sangue estão apresentados na Tabela 7. Os teores médios

de enxofre encontrados no alimento fornecido (forragem + uréia) não variaram ao longo do período experimental. Constatou-se 1,47 g de S/kg de matéria seca (MS) na dieta, o que pode ser considerado baixo se comparado com a faixa relatada por Weston et al. (1988) de 1,7 a 1,8 g de S/kg de MS, em trabalhos com carneiros. Os valores apresentados para digesta variaram entre 1,15 e 1,55 g S/kg MS e os valores apresentados para as fezes foram entre 1,65 e 2,35 g S/kg MS. Segundo Kennedy (1974), o enxofre excretado aumenta de acordo com seu consumo e a principal porção do enxofre fecal é orgânica, oriunda de proteína bacteriana (Bird & Hume, 1971).

As médias de concentração de enxofre no sangue, apresentadas na Tabela 7, indicam que não houve diferença entre os tratamentos 2,2 mg/l. Foram encontrados na literatura valores muito diferentes dos encontrados neste trabalho. Weston et al. (1988) encontraram, em trabalho com ovelhas, 8,36 mg S l⁻¹ e Rees & Minson (1978) encontraram, em experimento com ovelhas, 0,083 mg/L de enxofre no sangue. A reciclagem do enxofre do plasma para o rúmen contribui com aproximadamente 7 mg de S/dia/kg de peso corporal e a taxa em que ocorre essa transferência está relacionada também com as concentrações de sulfato no sangue (Kandylis, 1983).

Observou-se que a intoxicação dos animais ocorreu apenas no rúmen tendo os animais apresentado falta de motilidade ruminal e inapetência, não ocorrendo sintomas de estresse nervoso e nem respiratório. Preston & Leng (1987) alertaram que níveis mais altos do que os recomendados conduzem à geração de grandes quantidades do gás sulfeto de hidrogênio que, quando eructado, entra no pulmão e causa estresse nervoso e respiratório.

TABELA 7 Teores médios e desvio padrão de enxofre no volumoso oferecido, digesta, fezes (g/kg MS) e sangue (mg/L)

Tratamentos	Volumoso	DP	Digesta	DP	Fezes	DP	Sangue	DP
1	1,53	0,34	1,15	0,13	1,73	0,56	2,2	0,02
2	1,55	0,48	1,33	0,29	2,25	0,7	2,2	0,02
3	1,35	0,19	1,35	0,24	1,65	0,17	2,2	0,02
4	1,55	0,38	1,55	0,13	2,35	0,9	2,2	0,02

O volumoso oferecido não inclui as doses de sulfato de amônio, pois estas foram fornecidas via inoculação no rúmen.

Pode-se observar que, no volumoso oferecido, capim picado + uréia, os teores de enxofre variaram pouco durante todo o experimento.

O mais alto teor de enxofre encontrado na digesta (1,55 g/kg MS) foi observado no tratamento 0,92%, responsável também pela maior excreção de enxofre (2,35 g/kg MS). Pode-se observar ainda, no tratamento 0,31%, maior excreção de enxofre (2,25 g/kg MS) do que no tratamento 0,46% (1,65 g/kg MS), que continha uma maior quantidade de enxofre. Supõe-se que, como o volumoso analisado do tratamento 0,31% apresentou um maior teor de enxofre (1,55g/kg MS) em pelo menos um período experimental do que o tratamento 0,46% (1,35g/kg MS), esta diferença seria responsável pela diferença observada nos valores de S das fezes.

4.3 Consumo de matéria seca

O consumo dos animais (Figura 1) manteve-se estável nos tratamentos 0,15%, 0,31% e 0,46%, não ocorrendo diferença significativa entre os mesmos ($P>0,05$). A média observada foi de 1,2 % do PC na matéria seca, sendo inferior aos 2,2% PC encontrados por Gomes et al. (1994), em novilhas mestiças de aproximadamente 370 kg PC consumindo feno de capim-camerom com mais

de 3,0 m de altura de corte no momento da fenação. O consumo foi uma das variáveis observadas e teve como objetivo avaliar o efeito do S na ingestão de forragens de baixo valor nutritivo. Kariuki et al. (1998) encontraram valores de 2,57% PC em consumo em capim-napier com 90 dias de corte. Lopes & Aroeira (1998) encontraram 1,9% PC, em trabalho realizado com vacas em lactação e capim-elefante com 60 dias de crescimento.

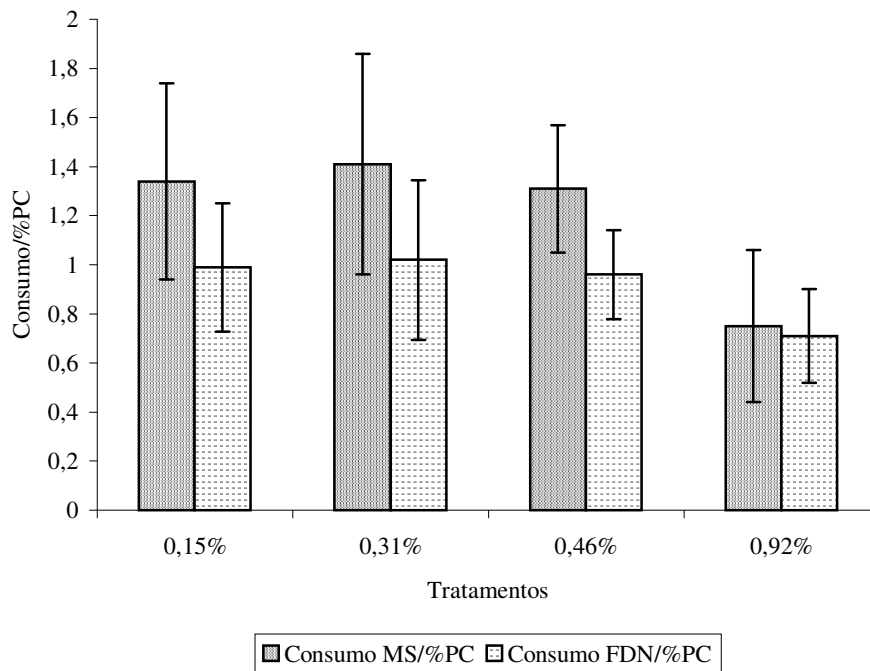


FIGURA 1 Médias do consumo de MS e FDN pelo peso vivo.

Os valores de consumo obtidos por Soares (2002) também foram superiores, de 2,12% PC, quando utilizou-se capim-elefante com 60 dias fornecido para vacas em lactação. O principal fator que pode ter afetado o consumo dos animais está relacionado aos teores de fibra em detergente neutro (FDN) no capim (Tabela. 8). O consumo obtido por Lopes & Aroeira (1998), utilizando capim-elefante com idade de corte de 60 dias, foi de 1,3% PC na FDN, tendo, no presente trabalho, sido encontrado 0,92% PC na FDN. O capim-elefante, utilizado com cerca de 120 dias de idade de corte, apresentou teor médio de FDN de 76,13%, conforme Tabela. 5. Este valor foi superior ao encontrado por Soares (2002) de 70,1% de FDN, com capim-elefante com 60 dias. Gomes et al. (1994) obtiveram um consumo de FDN de 1,6% PC, usando feno de capim-camerounês de aproximadamente 90 dias. O efeito do teor de FDN do volumoso utilizado pode ser observado pelos indicadores de consumo (Tabela 8).

Os resultados encontrados na Tabela 6 foram determinados a partir da quantidade de enxofre presente no sulfato de amônio fornecido e são as médias do enxofre na forrageira nos quatro períodos experimentais. Na Tabela 7 são apresentados os consumos de MS e FDN por tratamento experimental. Pode-se observar um discreto aumento de consumo no tratamento 0,31%, sendo possível, sugerir que esse tratamento acompanhou as recomendações da literatura.

O tratamento 0,92%, demonstrou queda no consumo em comparação aos outros tratamentos e causou leve intoxicação em dois animais. Durante o ensaio, os animais apresentaram inapetência e falta de motilidade ruminal, características de intoxicação por enxofre, conforme apresentado por Preston & Leng (1987). Estes autores sugerem que excesso de enxofre na dieta pode causar a redução do consumo. Dougherty et al. (1965) observaram uma diminuição da motilidade ruminal quando utilizaram níveis de enxofre acima dos recomendados. Quantidades maiores que a recomendada de enxofre podem ser

prejudiciais para os microrganismos celulolíticos do rúmen, reduzindo a digestão de fibras (Hubbert et al., 1958).

TABELA 8 Consumo de matéria seca e FDN nos tratamentos.

Tratamento	Matéria seca (% Peso corporal)	FDN (% Peso corporal)
0,15%	1,34	0,99
0,31%	1,41	1,02
0,46%	1,31	0,96
0,92%	0,75	0,71

4.4 Contagens das populações de microrganismos do rúmen

4.4.1 Contagem da população de fungos

A estimativa da população de fungos ruminais, obtida das médias dos quatro períodos experimentais para cada tratamento, é apresentada na Figura 2. Observou-se menor crescimento da população de fungos ruminais no tratamento 0,31%, quando comparado com os outros tratamentos. Pode-se considerar que o tratamento 0,15% foi o que apresentou maior crescimento, que, segundo o NRC (2001), é baixo para bovinos. O resultado observado difere do encontrado por Morrison et al. (1990), que em dietas de baixa concentração de enxofre, observaram efeito negativo na população de fungos ruminais em carneiros.

A população de fungos ruminais não apresentou diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$), como apresentado na Tabela 9. Apenas nos tratamentos 0,46% e 0,92% observou-se diferença entre as coletas, devido ao ajuste da metodologia. Esses resultados não confirmam os encontrados na literatura, que relacionam o consumo de matéria seca com a população de fungos ruminais.

Bauchop & Muontford (1981) observaram tendência dos fungos ruminais colonizarem forrageiras fibrosas, de regiões tropicais e também que essa população é reduzida quando os ruminantes se alimentam de forrageiras com baixo teor de fibra. Porém, apesar de Windham & Akin (1984), em trabalhos anteriores, terem observado que dietas mais fibrosas propiciam maior população de fungos, estes deduziram que devem existir outros fatores, além da quantidade de fibra, que interferem no desenvolvimento da população fúngica ruminal.

No tratamento 0,31% observou-se que temos um menor crescimento de fungos (Figura 2). No gráfico da Figura 4 observa-se aumento na população de protozoários, considerando que os protozoários são predadores de fungos, conforme estudos com ruminantes submetidos a dietas fibrosas de baixo teor protéico. Pode-se sugerir, então que houve interação competitiva entre protozoários e fungos.

Em estudos envolvendo ovinos defaunados, as quantidades de zoósporos no fluido de rúmen eram de 2 a 5 vezes maiores do que em ovinos faunados e recebendo a mesma dieta (Bird & Leng, 1984). Protozoários ciliados podem ingerir bactérias de tamanho similar ao dos zoósporos, de modo que é provável que a predação de zoósporos por protozoários também ocorra. Além do efeito da predação, pode-se considerar que esses resultados de contagem de fungos do presente trabalho não estão de acordo com o descrito na literatura e nem com o objetivo do trabalho. Isso pode ter ocorrido devido ao ajuste da técnica de contagem durante o experimento e, por isso, pode ter influenciado na contagem de fungos.

TABELA 9 Estimativa da população de fungos ruminais em relação às coletas, aos tratamentos, para cada período de coleta (repetição).

Coletas	Tratamento			
	0,15%	0,31%	0,46%	0,92%
1	2,44 ^a	2,42 ^a	3,28 ^{ab}	3,38 ^a
2	3,62 ^a	2,59 ^a	3,39 ^{ab}	2,01 ^b
3	3,57 ^a	2,58 ^a	2,27 ^a	3,2 ^{ab}
4	3,46 ^a	3,13 ^a	3,67 ^b	3,72 ^a

CV (%) 30,4

* Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tuckey ao nível de 5 % de probabilidade ($P > 0,05$).

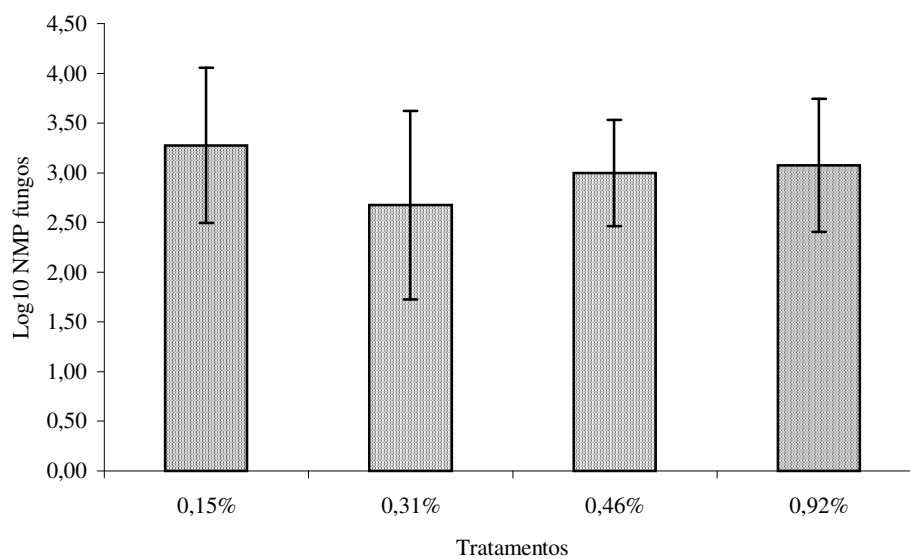


FIGURA 2 Gráfico de médias de contagem, por tratamento, da população de fungos anaeróbios totais

4.4.2 Contagem da população de bactérias

Os valores das contagens bacterianas, observados na Figura 3, não apresentaram diferenças entre tratamentos. Porém, o tratamento 0,31% apresentou o maior consumo de MS, 1,41% MS PC e maior consumo de FDN, 1,02% FDN PC, mas as diferenças não foram significativas. Esses resultados confirmam os encontrados por Morrison et al. (1990), que apresentaram aumento de bactérias, protozoários e fungos anaeróbios no rúmen, quando o conteúdo de enxofre da suplementação de feno de gramínea tropical aumenta de 0,04% para 0,07%.

TABELA 10 Estimativa da população de bactérias ruminais em relação aos tratamentos, em cada período experimental (repetição).

Coletas	Tratamento			
	1	2	3	4
1	2,5 ^a	3,04 ^a	2,89 ^a	2,86 ^a
2	2,75 ^a	3,04 ^a	3,04 ^a	2,75 ^a
3	3,04 ^a	2,71 ^a	3,04 ^a	2,68 ^a
4	2,63 ^a	3,04 ^a	2,65 ^a	3,04 ^a

CV (%) 18,9

* Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tuckey, a 5 % de probabilidade ($P > 0,05$).

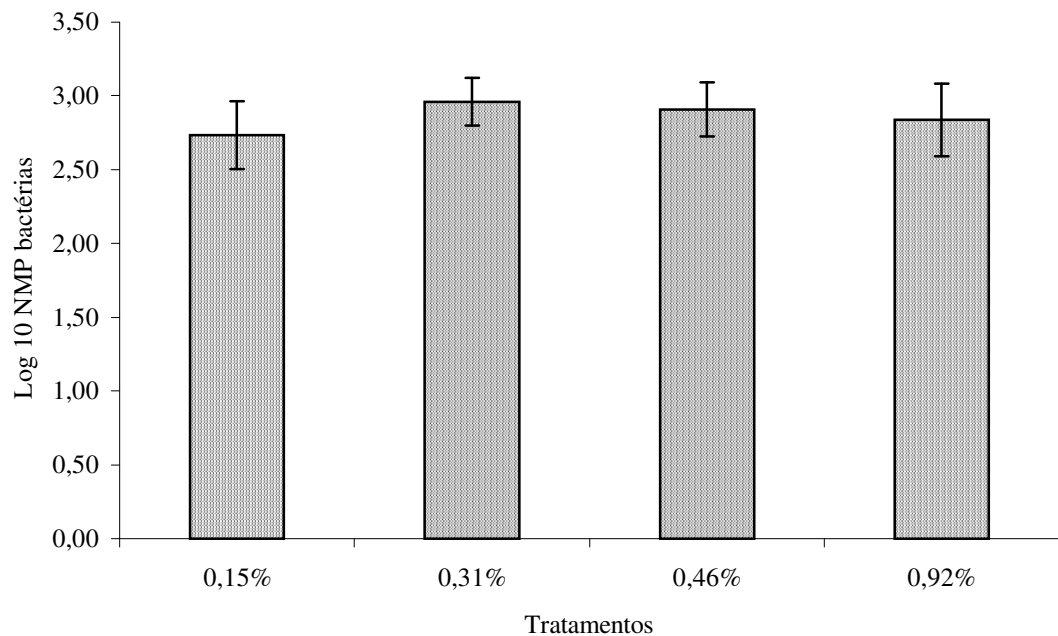


FIGURA 3 Médias das estimativas da população de bactérias anaeróbios totais, obtidas pelo método NMP, de quatro períodos experimentais.

A análise estatística não detectou diferenças na população de bactérias ruminais entre os tratamentos ($P > 0,05$).

4.4.3 Contagem da população de protozoários totais

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para as contagens de protozoários ruminais ($P > 0,05$), apresentadas na Figura 4. Os valores das contagens de protozoários apresentaram um pequeno aumento no tratamento 2, que teria o teor de enxofre de 3,1 g de S/kg de MS, Tabela 5 e seria o teor ideal indicado pelo NRC (2001). Não foi observado nenhum efeito específico das doses de enxofre sobre estes grupos de protozoários, nem efeito dos animais. Em outras palavras, as populações de diferentes grupos de protozoários não variaram em função das diferentes doses de enxofre fornecidas.

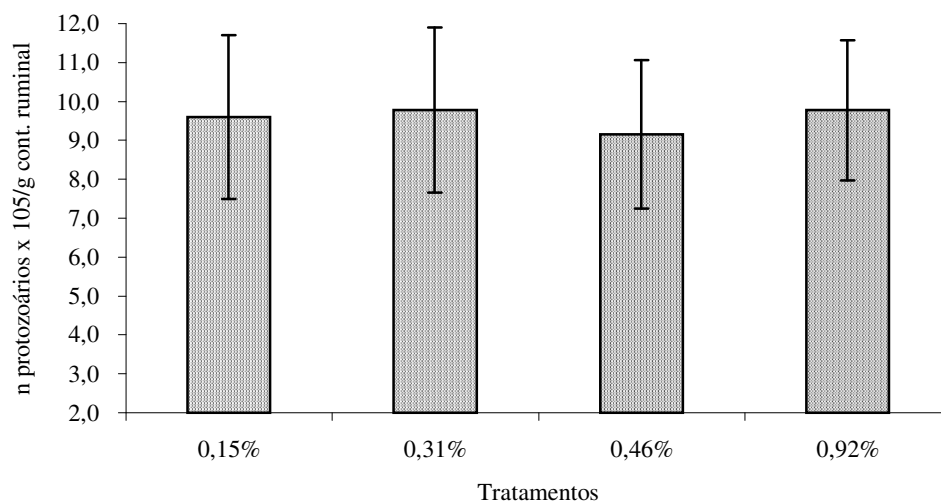
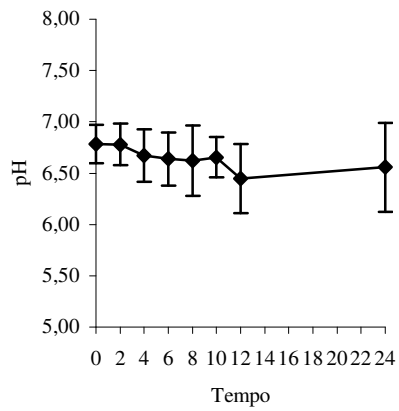


FIGURA 4 Gráfico de médias de contagem de população de protozoários

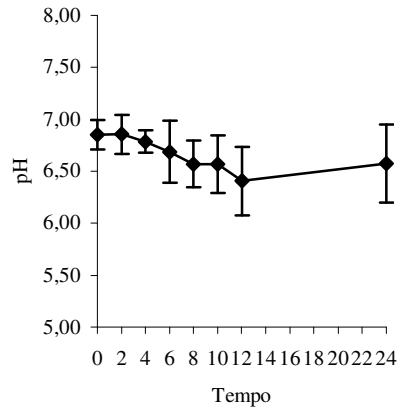
4.5 Parâmetros ruminais

4.5.1 pH

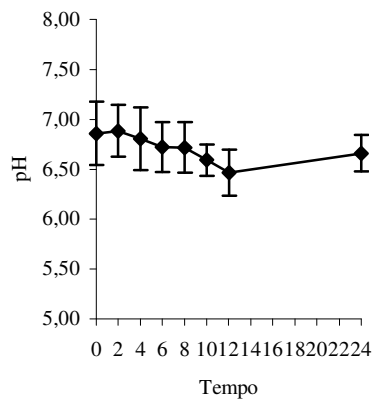
Observou-se variação do pH, mantendo-se dentro da neutralidade (Figura 5) e, provavelmente, efeito da ingestão de alimentos. O comportamento do pH está de acordo com os encontrados em dietas exclusivas de forragens, cujos valores variam de 6,2 a 7,0, segundo Owens & Goetsh (1986). O enxofre inorgânico é transformado em aminoácidos pelos microrganismos do rúmen (ARC,1988). Um importante intermediário no metabolismo do enxofre no rúmen é o íon sulfeto. Já em 1956, Anderson propôs a redução microbiana do sulfato a sulfeto, sendo a taxa de produção de sulfeto rápida. Segundo Bird & Moin (1971), o pH ótimo para a redução do sulfato é 6,5. Para o crescimento microbiano o pH ideal é 6,8, sendo esse apresentado em todos os tratamentos principalmente nos tratamentos, 2, 3 e 4, nos horários de 2, 4 e 6 horas após a alimentação.



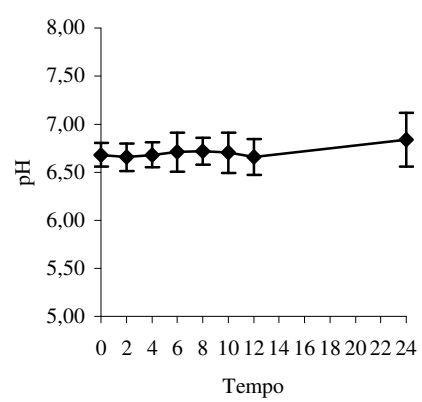
5 A. Tratamento 0,15%



5.B. Tratamento 0,31%



C. Tratamento 0,46%

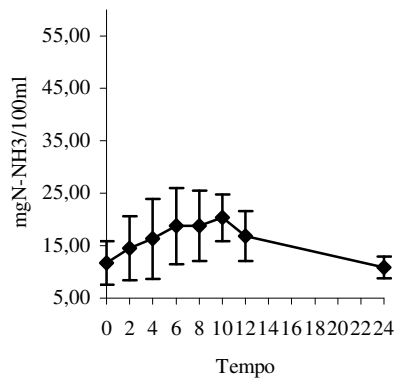


D. Tratamento 0,92%

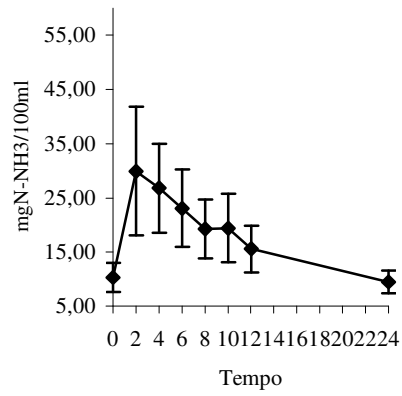
FIGURA 5. Médias de pH para cada tratamento

4.5.2 Nitrogênio amoniacal

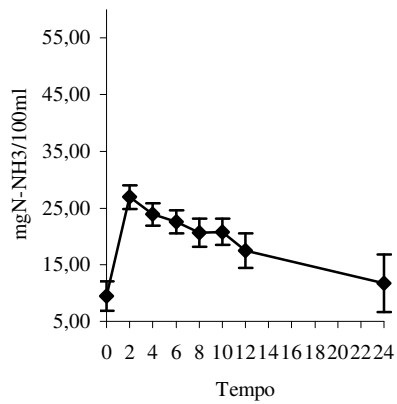
Como pode ser verificado nos gráficos da Figura 6, o nitrogênio amoniacal se manteve constante em todos os tratamentos nos horários de 0 e 24 horas, sendo ambos anteriores ao fornecimento do alimento que continha uréia e do fornecimento do sulfato de amônio de acordo com o tratamento. Observou-se, nos tratamentos 2, 3 e 4, um pico de nitrogênio amoniacal, no horário de 2 horas. Como a coleta para N-NH₃ era feita 2 horas após a alimentação dos animais e após o fornecimento do tratamento, isso se deve, provavelmente, à rápida liberação de N-NH₃ no rúmen após a solubilização do mesmo. Esses resultados encontrados para nitrogênio amoniacal podem ser relacionados com a suplementação fornecida de sulfato de amônio e uréia, principalmente, podendo ainda ser originado da degradação do alimento, reciclagem da uréia via saliva ou difusão pela parede ruminal (Van Soest, 1994).



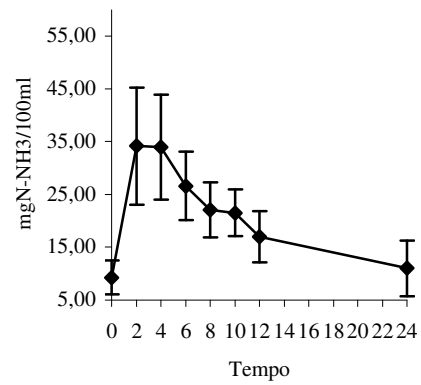
6.A. Tratamento 0,15%



6.B. Tratamento 0,31%



C. Tratamento 0,46%



D. Tratamento 0,92%

Figura 6. Médias de N-NH₃ para cada tratamento

4.6 Digestibilidade aparente

TABELA 11 Digestibilidade capim-elefante com 120 dias

Tratamentos	Coefficiente de digestibilidade (%)
0,15%	30,56
0,31%	40,71
0,46%	45,99
0,92%	38,57

Conforme os dados da na Tabela 11, a digestibilidade aparente foi baixa, devido, principalmente, à qualidade do capim e à dieta fornecida, sem suplementação de concentrado. Os valores encontrados estão abaixo dos apresentados por Gomes et al. (1994), que encontraram em feno de capim-cameroon com 3 m de altura de corte, digestibilidade de 50,4%. Soares (2002) encontrou valores de 58,7%, 57,7% e 55,2% para o capim-elefante com idade de corte de 30, 45 e 60 dias, respectivamente. Pode-se afirmar que o teor de FDN do capim utilizado no trabalho foi de 76,14%, considerado alto, por isso observando-se digestibilidade baixa.

Utilizou-se a matéria seca indigestível (MSi) como indicador interno para a obtenção da digestibilidade, por ter sido demonstrado por Detmann et al. (2001) comportamento semelhante entre MSi e FDNi. Além disso, utilizou-se MSi para reduzir custos e evitar o risco de intoxicação dos microrganismos devido aos resíduos de detergente aderidos à fibra.

5 CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi realizado concluiu-se que:

O consumo de matéria seca e FDN apresentaram tendência de superioridade no tratamento 0,31% de S na dieta, podendo ser recomendado como teor de enxofre na alimentação;

Teores de enxofre mais elevados do que os recomendados podem levar a intoxicação;

O tratamento 0,15% apresentou o maior crescimento de fungos ruminais, mas o tratamento 0,31% foi mais eficiente em aumentar os microrganismos ruminais (fungos, protozoários e bactérias) e, com isso, aumentando o consumo de forrageira de baixa qualidade.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. **The nutrient requirement of ruminant livestock**. London: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1988. 351 p.

AGOSTO D',M.; CARNEIRO, M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.16, n.3, p.725-729, 1999.

AKIN, D. Interaction of ruminal bacteria and fungi with southern forages. **Journal of Animal Science**, Cambridge, v.63, n.3, p.962-977, 1986.

AKIN, D.E. Biological structure of lignocellulose and its degradation in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v.21, p.295-310, 1988.

AKIN, D.E.; BENNER R. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.5, p.1117-1125, 1988.

AKIN, D.E.; BONEMAN, W.S. Role of rumen fungi in fiber degradation. **Journal of Dairy Science**, Champain, v.73, n.10, p.3023-3032, 1990.

AKIN, D.E.; GORDON, G.L.R.; HOGAN, J.P. Rumen bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with or without sulfur. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.46, n.3, p.738-748, 1983.

ANDRIGUETTO, J.M. **Nutrição animal**: as bases e os fundamentos da nutrição animal. Os alimentos. 2.ed. São Paulo, 1993. v.1.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Washington, 1990. 1094p.

BAUCHOP, T. The anaerobic fungi of cattle and sheep. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.38, n.1, p.148-158, 1979.

BAUCHOP, T. Colonization of plant fragments by protozoa and fungi. In: NOLAN, J.V.; LENG, R.A.; DEMEYER, D.I. (Ed.). **The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion**, Armidale, 1989. p.13-96.

BAUCHOP, T.; MUONTFORD, D.O. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and presence of rumen methanogens. **Applied of Environmental Microbiology**, Washington, v.42, n.6, p.1103-1110, 1981.

BERCHIELLI, T.T.; ANDRADE, P.; FURLAN, C.L. Avaliação de indicadores em ensaios de digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.3, p.830-833, 2000.

BIRD, P.R.; HUME, I.D. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. IV Cysteine and sulphate effects upon the flow of sulphur from the rumen and upon sulphur excretion by sheep. **Australian Journal Agricultural Research**, v.22, p. 443-452, 1971.

BIRD, P.R.; MOIR, R.J. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. I. The absorption of sulphate in sheep after intraruminal or intraduodenal infusions of sodium sulphate. **Australian Journal of Biological Science**, v.24, p.1319-1328, 1971.

BIRD, S.H.; LENG, R.A. Futher studies on the effects on the presence or absence of protozoa in the rumen on liveweight gain and wool growth of sheep. **British Journal of Nutrition**, London, v.52, n.3 p.607-611, 1984.

BORNEMAN, W.S.; AKIN, D.E.; LJUNGDAHL, L.G. Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. **Applied and environmental Microbiology**, v.55, p.1066-1073, 1989.

BRETON, A. et al. Morphological and metabolic characterization of a new species of strictly anaerobic rumen fungus: *neocallimastix joyonni*. **FEMS Microbiology Letters**, v.58, p.309-314, 1989.

CONNER, M.C.; RICHARDSON, C.R. Utilization of cotton plant residues by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.65, n.4, p.1131-1138, 1987.

D' AGOSTOM. et al. Influência da dieta no comportamento da população de ciliados no rúmen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.2, p.153-159, 1998.

D' AGOSTOM. et al. Comportamento e distribuição de protozoários ciliados (Protista, Ciliophora) no rúmen e no retículo de bovinos submetidos ao jejum. **Revista Brasileira de Ciência e Veterinária**, v.8, n.1, p.16-18, 2001.

DEHORITY, B.A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa**. Boca Raton: CRC, 1993. 325p.

DEHORITY, B.A.; ORPIN, C.G. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London: Blackie Academic, 1997. v.2. p.196-245.

DEHORITY, B.A.; TIRABASSO, P.A.; GRIFO, A.P. Most-probable-number procedures for enumeration ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of the total and cellulolytic numbers in one medium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, n.11, p.2789-2792, 1989.

DETMAN, E. Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1600-1609, 2001.

DOUGHENTY, R.W.; MULLENAX, C.H.; ALLISON, M.J. Physiological phenomena associated with eructation in ruminants. in: DOUGHERTY, R.W., (Ed.). **Physiology of digestion in the ruminant**. Washington: Butterworth, 1965. p.159-170.

ERYAVUZ, A. et al. Effects of urea and sulfur on performance of faunate and defaunate Ramlic lambs, and some some rumen and blood parameters. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.109, p.35-46, 2003.

EZEQUIEL, J.M.B. et al. Quantificação das bactérias sólido-aderidas, bactérias e protozoários líquidos-associados do rúmen de bovinos jovens alimentados com amiréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.707-715, 2002.

FONTY, G. et al. Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. **Journal of General Microbiology**, London, v.133, n.1835, 1987.

FONTY, G.; JOBLIN, K.N. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. In: TSUDA, T.; et al (Ed.). **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. San Diego: Academic, 1991. p.655-680.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B.A. Efeitos do PH ruminal e ingestão alimentar na defaunação em ovinos sob rações concentradas. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.25, n.6, p.1207-1215, 1996

GOMES, B.V. et al. Estudo das características físicos-químicas de feno e palha e efeitos sobre ingestão, digestibilidade aparente e taxa de passagem da matéria seca, ph e concentração de amônia ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.23, n.3, p.352-365, 1994.

GORDON, G.L.R.; PHILLIPS, M.W. Comparative fermentation properties of anaerobic fungi from the rumen. In: NOLAN, J.V.; LENG, R.A.; DEMEYER, D.I. (Ed.). **The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion**. Armidale, 1989, p.127-138.

GOULD, D.H. Polioencephalomalacia. **Journal of Animal Science**, v.76, p.309-314, 1998.

GRENET, E.; BARRY, P. Colonization of thick-walled plant tissues by erobcs fungi. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.19, n.1-2, p.25-31, 1989.

GRENET, E. et al. Influence of the diet on rumen anaerobic fungi. **Reprod. Nutr. Develop.**, v.28, p.127-128, 1988.

GRENET, E. et al. Rumen anaerobic fungi and plant substrate colonization as affected by diet composition. **Animal Feed Science and Technology**, v.26, p.55-70, 1989.

HUBBERT, F. JR.; CHEG, E.; BURROUGHS, W. Mineral requeriment of rumen micro-organisms for cellulose digestion in vitro. **Journal of Animal Science**, v.17, p.559-568, 1958.

HUNGATE, R.E. **The rumen and its microbes**. Nova York: Academic, 1966.

JACOBS, E; GERSTEIN, S. **Handbook of microbiology**. Princeton: D. Van Nostrand, 1960.

KANDYLIS, K. Trasfer of plasma sulfata from blood to rumen. A review. **Journal of Dairy Science**, v.66, p.2263-2270, 1983.

KANDYLIS, K. Toxicology of sulfur in ruminants: Review. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.2179-2187, 1984.

KARIUKI, J.N. **The potential of im proving napier grass under small holder dairy farmers' conditions in Kenya**. 1998. Chapter 6. 91p. PhD thesis (Animal Nutrition Group, Department of Animal Science)-Wageningen Agricultural University, Wageningen, the Netherlands.

KENNEDY, P.M. The utilization and excretion of sulphur in cattle fed tropical roughages. **Australian Journal Agricultural Research**, v.25, p.1015-1022, 1974.

KRAUSE, D.O.; J. B. Russel. How many ruminal bacteria are there? **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1467-1475, 1996.

LEE, S.S. et al. Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. **Animal Feed Science and Technology**, v.88, p.201-217. 2000.

LENG, R.A. Dynamics of protozoa in the rumen. In: NOLAN, J.V. et al. (Ed.). **The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion**. Armidale: Penambul Books, 1989. p.51-58.

LOPES, F.C.F.; AROEIRA, L.J.M. Consumo, digestibilidade e parâmetros ruminais em vacas Holandês X Zebu alimentadas com capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) picado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.5, p. 593-599, 1998.

LOPES, F.C.F. et al. Efeitos da defaunação em ovinos alimentados com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.) adicionada de uréia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.2, p.180-188, 2002.

LOWE, S. E.; THEODOROU, M.K.; TRINCI, A.P.J. Cellulases and xylases of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. **Applied Environmental Microbiology**, v.53, p.1216-1223, 1987.

MILNE, A. et al. Survival of anaerobic fungi in faeces, in saliva, and in pure culture. **Experimental Mycology**, v.13, p.27-37, 1989.

MORRISON, M.; MURRAY, R.M.; BONIFACE, A.N. Nutrient metabolism and rumen microorganisms in sheep fed a poor-quality tropical grass hay supplemented with sulfate. **Journal of Agricultural Science**, v.115, p.269-275, 1990.

MOTTRSHHEAD, B.E. Estimation of sulphur in biological materials using. The technicon auto analyser. **Laboratory Practice**, Australia, v.20, n.6, p.483-484, 1971

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle.** 7.ed. Washington: National Academy, 2001.381p.

OBISPO, N.E.; DEHORITY, B.A. Amost probable number method for enumeration of rumen fungi with studies on factors affecting their concentration in the rumen. **Journal of Microbiological Methods**, v.16, p.259-270, 1992.

OBLINGER, J.L.; KOBURGER, J.A. The most probable number technique. In SPECK, M.L. (Ed.). **Compedium of methods for the microbiological examination of foods.** Washington, 1984. p.99-111.

ORPIN, C.G. The rumen flagellate *Callimastix frontalis*: does sequestration occur? **Journal of General Microbiology**, London, v.84, p.395-398, 1974.

ORPIN, C.G. Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. **Journal of General Microbiology**, London, v.91, 249-262, 1975.

ORPIN, C.G. Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*. **Journal of General Microbiology**, London, v.94, p.270-280, 1976.

ORPIN, C.G. The rumen flagellate *Piromonas communis*: its life history and invasion of plant material in the rumen. **Journal of General Microbiology**, London, v.99, p.107-117, 1977a.

ORPIN, C.G. The ocorrence of chitin in the cell walls of the rumen organisms *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*. **Journal of General Microbiology**, London, v.99, p.215-218, 1977b.

ORPIN, C.G. Isolation of celulolitic phycomycete fungi from the caecum of the horse. **Journal of General Microbiology**, Madison, v.123, n.2, p.287-296, Apr. 1981.

ORPIN, C.G. Ecology of rumen anaerobic fungi in relation on the host animal. In: NOLAN, J.V.; LENG, R.A.; DEMEYER, D.I. (Ed.). **The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion.** Armidale, 1989. p.129-138.

ORPIN, C.G.; JOBLIN, K.N. The rumen anaerobic fungi. In: ROBSON, P.N., (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. Washington, 1988. p.129-150.

OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. **Digesta passage and microbial protein synthesis** In: MILLIGAN, L.P.; GROVUN, W.L.; DOBSON, A.D. Control of digestion and metabolism in ruminants. New Jersey: Prentice-Hall, 1986. p.196.

PRESTON, T.R.; LENG, R.A. Sulphur nutrition of ruminants. In: PRESTON, T.R.; LENG, R.A. (Ed.). **Matching ruminant production systems with available resources in the tropics and sub-tropics**. Armidale: Penambul Books, 1987. p.46-47.

RASKIN, L.W.C.C. et al. Molecular ecology of gastrointestinal ecosystems. In: MACKIE, R.I. et al. (Ed.). **Gastrointestinal microbiology; gastrointestinal microbes and host interactions**. New York: Chapman & Hall/International Thomson, 1997. v.2. p.243-298. (Chapman & Hall Microbiology Series).

RESS, M.C.; MINSON, D.J. Fertilizer sulphur as a factor affecting voluntary intake, digestibility and retention time of pangola grass (*Digitaria decumbens*) in sheep. **British Journal of Nutrition**, v.39, p.5-11, 1978.

SAS Institute Inc. **SAS ® User's Guide: Statistics**. Version 6. 4th ed. Cary, NC, 1991.

SILVA, D.J. da. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UFV, 1990. 166p.

SOARES, J.P.G. **Fatores limitantes do consumo de capim – elefante cv. Napier utilizando vacas leiteiras confinadas**. 2002. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, SP.

STEWART, C.S. et al. Selective isolation and characteristics of *Bacteoides succinogenes* from the rumen of a cow. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.41, n.2, p.504, 1981.

THEODOROU, M.K. et al. Anaerobic fungi in the digestive tract of mammalian herbivores and their potential for exploitation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.55, n.3, p.913-926, 1996.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.

VIEIRA, R.A.M. et al. The influence of elephant-grass (*Pennisetum purpureum* Schum., Mineiro variety) growth on the nutrient kinetics in the rumen. **Animal Feed Science Technology**, v.67, p.151-161, 1997.

WESTON, R.H. et al. Feed intake and digestion responses in sheep to the addition of inorganic sulfur to a herbage diet of low sulfur content. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.39, p.1107-1119, 1988.

WINDHAM, W.R.; AKIN, D.E. Rumen fungi and forage fiber degradation. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.48, n.3, p.473-476, Sept. 1984.