

CONTAGENS DIFERENCIAIS DE PROTOZOÁRIOS CILIADOS EM RÚMEN DE BOVINOS ARRAÇOADOS COM CAPIM ELEFANTE NAPIER (*Pennisetum purpureum* SCHUM), EM VÁRIOS ESTÁDIOS DE CRESCIMENTO VEGETATIVO

JOSÉ CARLOS MACHADO NOGUEIRA FILHO
Professor Doutor
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

CARLOS DE SOUZA LUCCI
Professor Titular
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

LAÉRCIO MELOTTI
Professor Doutor
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

MARIA ELY MISEROCHI DE OLIVEIRA
Professor Doutor
Instituto de Ciências Biomédicas da USP

CESAR GONÇALVES DE LIMA
Professor Assistente
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

JOSÉ APARECIDO DA CUNHA
Técnico Especializado
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LUCCI, C.S.; MELOTTI, L.; OLIVEIRA, M.E.M.; LIMA, C.G.; CUNHA, J.A. Contagens diferenciais de protozoários ciliados em rúmen de bovinos arraçoados com capim elefante Napier (*Pennisetum purpureum* Schum), em vários estádios de crescimento vegetativo. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.29, n.2, p.215-21, 1992.

RESUMO: Capim elefante Napier (*Pennisetum purpureum* Schum) colhido em quatro estádios de desenvolvimento: a) 1,30 m de altura e 17,54% de matéria seca; b) 2,35 m de altura e 25,84% de matéria seca; e c) 3,25 m de altura e 26,31% de matéria seca, foi fornecido "ad libitum" a 8 bovinos com 5/8 de sangue europeu-zebu, com 220 kg de peso vivo médio, providos de fístulas ruminais. Todos receberam 1,5 kg de uma mistura concentrada com 24,10% de proteína bruta. Os tratamentos foram comparados em um delineamento inteiramente casualizado, sendo que na quarta semana de cada período experimental colheram-se amostras de líquido de rúmen antes da oferta dos alimentos, para contagens

diferenciais dos seguintes gêneros de protozoários ciliados e auferir suas concentrações por mililitro: *Entodinium* spp; *Diplodinium* spp; *Eudiplodinium* spp e *Polyplastron* spp. Os resultados mostraram que os protozoários ciliados do gênero *Entodinium* predominaram com 96,73% do total da população desses microorganismos. O número de *Entodinium* spp decresceu com a maturação da planta: a) $18,2 \times 10^4$ /ml; b) $12,1 \times 10^4$ /ml; e c) $9,8 \times 10^4$ /ml.

UNITERMOS: Rúmen, microbiota; Protozoários; Nutrição, ruminantes; Bovinos

INTRODUÇÃO

A população microbiana no rúmen é caracterizada por diversas espécies de bactérias e protozoários. Embora os tipos de unicelulares no rúmen sejam relativamente estáveis devido às condições de meio ambiente naquele compartimento, as proporções das várias espécies podem ser influenciadas pelo tipo de alimento da dieta, pela qualidade da forragem volumosa, e pela espécie de ruminante.

Diets de forragens podem variar extensivamente na disponibilidade de seus nutrientes para o uso microbiano. A maior parte da energia em dietas com volumosos está na forma de carboidratos estruturais presentes na parede celular da planta, a qual é atacada, concomitantemente, por bactérias e protozoários ciliados. Entre os protozoários, os da espécie *Epidinium ecaudatum* parecem ser mais eficientes no ataque e ingestão de paredes celulares de plantas forrageiras (AKIN¹, 1981). Este autor, admite que a anatomia das lâminas dos volumosos e os tipos de tecidos que os constituem influenciam a degradação microbiana, devido a maior ou menor presença de celulose, hemicelulose, lignina e ácidos fenólicos, e conclui que a digestão de forragens resulta de uma complexa interação dos microorganismos do rúmen com a estrutura da parede celular da planta.

HUNGATE⁸ (1966) salienta que protozoários Holotricha surgem em grande número no rúmen de animais em regime de pastejo, ou em dietas contendo quantidades consideráveis de feno, ao passo que os *Diplodinium* spp nunca são detectados em quantidades maciças, tanto em animais ingerindo elevadas quantidades de grãos, como naqueles submetidos a condições de pastejo ou apascentados com feno.

QUINN et al.¹⁷ (1962) asseguraram que ciliados *Entodinium* spp parecem estar dependentes de uma fonte de celulose e amido na dieta.

OLIVEIRA et al.¹⁴ (1987), trabalhando com líquido ruminal colhido de ovinos manejados exclusivamente em pastagens, verificaram que as espécies de *Entodinium* e *Diplodinium*, perfizeram 92,3% do total de protozoários ciliados detectados. Quando trabalharam com bezerros da raça

Holandesa e do tipo Mantiqueira, arraçoados com pequenas quantidades de concentrados e feno, e pasto à vontade, NOGUEIRA FILHO et al. ^{12,13} (1983, 1984) observaram que os gêneros acima mencionados constituíram mais de 90% do total de ciliados.

Estudos levados a efeito por NAKAMURA e KANEGASAKI ¹⁰ (1969), com ovinos, demonstraram a influência do tipo de ração sobre as concentrações de protozoários ciliados. Um amplo decréscimo no número de ciliados foi observado ($2-4 \times 10^5$ /ml) quando a dieta era somente de feno de gramínea, enquanto com uma ração contendo concentrado mais feno de gramínea a população de ciliados variou de $7-12 \times 10^5$ /ml. Já os dados auferidos por GRUBB e DEHORITY ⁷ (1975), também com ovinos, revelaram números de protozoários ciliados de $4-6 \times 10^5$ /ml, quando os animais estavam em um tratamento somente com feno de gramínea, e de $10-18 \times 10^5$ /ml quando submetidos a uma dieta com 60% de milho e 40% de volumoso.

Por outro lado, com base em observações conduzidas por BRYANT e SMALL ² (1960); EADIE ⁵ (1962); HUNGATE ⁸ (1966); PURSER e MOIR ¹⁶ (1966); NOGUEIRA FILHO ¹¹ (1981); NOGUEIRA FILHO et al. ^{12,13} (1983, 1984); DEHORITY ⁴ (1987); OLIVEIRA et al. ¹⁴ (1987), o pH do líquido ruminal parece ser importante no estabelecimento e permanência dos protozoários ciliados no rúmen.

O presente trabalho procurou estudar a ocorrência nas variações de populações de protozoários ciliados, quando o mesmo capim elefante Napier foi oferecido em estádios vegetativos diferentes, junto com porção de 1,5 kg de mistura concentrada por animal e por dia.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento em pauta foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, SP, situado a $21^{\circ}8'$ de latitude sul e $47^{\circ}25'42''$ de longitude oeste, com altitude de 634 metros.

O clima da região, segundo classificação de Koeppen (OMETTO ¹⁵, 1981), é do tipo Cwa, isto é, temperado chuvoso com inverno seco e verão quente chuvoso, típico de subtropical.

Foram trabalhadas amostras de capim elefante Napier (*Pennisetum purpureum* Schum), colhidas em três estádios de crescimento vegetativo, a saber:

- I estádio - altura de 1,30 m e matéria seca a 65°C igual a 17,54%. Período compreendido entre 01/02/88 a 28/02/88.
- II estádio - altura de 2,35 m e matéria seca a 65°C igual a 25,84%. Período compreendido entre 29/02/88 a 27/03/88.
- III estádio - altura de 3,25 m e matéria seca a 65°C igual a 26,31%. Período compreendido entre 28/03/88 a 24/04/88.

O capim era picado e fornecido a oito bovinos providos de fístulas ruminais, machos castrados, com 5/8 de sangue europeu-zebu, com idades aproximadas de 14 meses, 220 kg de peso vivo médio e portes semelhantes.

Os consumos médios do capim elefante Napier foram de 15,45 kg (17,54% de matéria seca); 11,03 kg (25,84% de matéria seca); e 10,50 kg (26,31% de matéria seca) por cabeça e por dia, respectivamente para os períodos I, II e III. Junto com o volumoso foram fornecidos 1,5 kg por animal e por dia, durante os 3 períodos, da seguinte mistura concentrada: fubá de milho - 29,20%; farelo de algodão - 29,20%; farelo de soja - 19,86%; farelo de trigo - 19,86%; e sal mineral - 1,88%, compondo uma ração concentrada de 24,16% de proteína bruta.

Amostras de líquido de rúmen foram colhidas antes da oferta dos alimentos e da administração do polietilenoglicol (PEG-4.000 F), na última semana de cada período, diretamente do rúmen, através de bomba de sucção. O marcador da fase líquida do rúmen (PEG-4.000 F) foi administrado na base de 50, 80 e 100 g, respectivamente para os períodos I, II e III, com o propósito de se estudarem volume e "turn-over" do líquido ruminal (HYDEN ⁹, 1956). Antes da colocação do PEG-4.000 F, colhiam-se 30 a 40 ml de fluido ruminal que eram recebidos em um balão kitasato, e uma alíquota de 10 ml, transferida para um tubo de ensaio com 20 ml de formaldeído (diluído em água destilada a 1:2); o tubo era agitado imediatamente após a colheita, para fixação dos protozoários. O pH da amostra foi medido no momento da colheita do líquido de rúmen, utilizando-se peagâmetro digital portátil.

As amostras permaneciam em repouso por uma noite, sendo depois diluídas a 1:20 em solução de glicerol a 30%, em água destilada. O "verde brilhante" foi o corante utilizado, consoante DEHORITY ³ (1977).

Um ml do material foi transferido para uma câmara de Sedgwick-Rafter, para contagem diferencial dos gêneros, conforme DEHORITY ³ (1977).

A análise estatística foi feita por delineamento inteiramente casualizado (GOMES ⁶, 1970), com 3 tratamentos (períodos de crescimento vegetativo do capim) e 8 repetições por tratamento, transformando-se os dados em $\sqrt{x + 0}$, dentro do seguinte esquema:

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE
Tratamentos	2
Regressão linear	1
Desvios da regressão	1
Resíduo	21
Total	23

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tab. 1 mostra os resultados obtidos segundo as contagens por mililitro de líquido ruminal, para os seguintes protozoários ciliados: número total, *Entodinium* spp; *Diplodinium* spp; *Eudiplodinium* spp e *Polyplastron* spp

A variação do número de protozoários totais por mililitro, constituído em sua maioria por *Entodinium* spp (96,73%), bem como do número de *Entodinium* spp por mililitro, mostrou uma queda linear altamente significativa ($p < 0,01$), com o avançar do crescimento vegetativo do capim. O desenho traçado da regressão, obtido para protozoários totais e *Entodinium* spp por ml de líquido ruminal, pode ser visto nas Fig. 1 e 2.

Também foram encontrados decréscimos significativos no número de *Diplodinium* spp e *Polyplastron* spp. O predomínio quase absoluto do gênero *Entodinium* já foi acusado em outros trabalhos nacionais (NOGUEIRA FILHO et al. 12,13, 1983, 1984; OLIVEIRA et al. 14, 1987).

Por outro lado, as médias das concentrações de protozoários ciliados encontradas são superiores às acusadas para dietas com feno apenas (20.000 a 40.000/ml), conforme NAKAMURA e KANEGASAKI¹⁰ (1969), embora com feno mais concentrados os mesmos autores tivessem atingido valores de 70.000 a 120.000/ml, próximos aos deste trabalho. GRUBB e DEHORITY⁷ (1975) indicam valores de 100.000 a 180.000/ml quando em dietas com 60% de concentrados e 40% de volumosos.

A diminuição do número total de protozoários e de *Entodinium* spp por mililitro pode ser explicada pela diminuição de açúcares solúveis e aumento da fibra, com o crescimento do capim em períodos sucessivos. Com dietas mais fibrosas, provavelmente tenha ocorrido maior retenção de matéria seca no rúmen e conseqüente decréscimo na população de ciliados.

Os valores de pH encontrados foram de 6,88; 6,67; e 6,49, respectivamente para os tratamentos a, b e c.

Outro aspecto a ser considerado é o do número de protozoários ciliados no volume líquido total do rúmen. Com o emprego do marcador PEG-4.000 F, foi possível estimar o volume de líquido no rúmen dos animais, e a Tab. 2 fornece o número de protozoários no total do conteúdo ruminal.

CONCLUSÕES

Nas condições do presente experimento, as seguintes conclusões podem ser enumeradas:

1. houve decréscimo linear no número de *Entodinium* spp, *Diplodinium* spp e *Polyplastron* spp, por mililitro de líquido ruminal, com o avançar da idade da planta forrageira;
2. houve decréscimo linear no número total de protozoários por mililitro de líquido ruminal, com o avançar da idade da planta forrageira.

NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LUCCI, C.S.; MELOTTI, L.; OLIVEIRA, M.E.M.; LIMA, C.G.; CUNHA, J.A. Differential rumen protozoa counting from steers fed Napier elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum) at different maturity stages. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.* São Paulo, v.29, n.2, p.215-21, 1992.

SUMMARY: Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum) in 3 growing stages: a) 1,30 m tall and 17.54% dry matter; b) 2,35 m tall and 25.84% dry matter; and c) 3,25 m tall and 26.31% dry matter, was fed "ad libitum" to eight rumen fistulated steers all crossbred (5/8 european-zebu) weighting 220 kg, being fed 1,5 kg of a concentrate meal with 24.16% of crude protein. Treatments were compared in a completely randomized design using the 4th week of each experimental period for rumen liquor sampling for differential counts of the following protozoa: *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium* and *Polyplastron*. Results showed *Entodinium* as 96.73% of total protozoa and its concentration per milliliter of rumen fluid decreased linearly as the plant matured ($a = 18.2 \times 10^4/ml$; $b = 12.1 \times 10^4/ml$; and $c = 9.8 \times 10^4/ml$).

UNITERMS: Rumen, microbiology; Protozoa; Nutrition of ruminants; Cattle

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-AKIN, D.E. Microbial breakdown of feed in the digestive tract. In: HACKER, J.B., ed. **Nutritional limits to animal production from pastures**. Queensland, Commonwealth Agricultural Bureaux, 1981, p.201-23.
- 02-BRYANT, M.P.; SMALL, N. Observations on the ruminal microorganisms of isolated and inoculated calves. *J. Dairy Sci.*, v.43, p.654-67, 1960.
- 03-DEHORITY, B.A. **Classification and morphology of rumen protozoa**. Wooster, Ohio Agricultural Research and Development Center, 1977.
- 04-DEHORITY, B.A. **Rumen microbiology**. Wooster, Ohio Agricultural Research and Development Center, 1987.
- 05-EADIE, J.M. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. *J. gen. Microbiol.*, v.29, p.563-78, 1962.
- 06-GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba, Nobel, 1970.

- 07-GRUBB, J.A.; DEHORITY, B. Effects of an abrupt change in ration from all roughage to high concentrate upon rumen microbial numbers in sheep. **Appl. Microbiol.**, v.30, p.402-12, 1975.
- 08-HUNGATE, R.E. **The rumen and its microbes**. New York, Academic Press, 1966.
- 09-HYDEN, S. A turbidometric method for the determination of higher polyethylene glycols in biological material. **kgl. Lantbruks hogskol. Ann.**, v.22, p.139-45, 1956.
- 10-NAKAMURA, K.; KANEGASAKI, S. Densities of ruminal protozoa of sheep established under different dietary conditions. **J. Dairy Sci.**, v.52, p.250-5, 1969.
- 11-NOGUEIRA FILHO, J.C.M. **Contribuição ao estudo sobre protozoários em rúmen de bezerros de rebanhos leiteiros**. São Paulo, 1981. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 12-NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; OLIVEIRA, M.E.M.; VEIGA, J.S.M.; LUCCI, C.S. Observações pertinentes à instalação da fauna de protozoários ciliados no rúmen de bezerros da raça Holandesa. (*Bos taurus* L.) criados em Pindamonhangaba, S. Paulo, Brasil. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo**, v.20, p.177-82, 1983.
- 13-NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; OLIVEIRA, M.E.M.; VEIGA, J.S.M.; LUCCI, C.S. Cronologia do aparecimento de protozoários ciliados no rúmen de bezerros do tipo "Mantiqueira" (*Bos taurus* L.), na região do Vale do Rio Paraíba, SP, Brasil. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo**, v.21, p.119-24, 1984.
- 14-OLIVEIRA, M.E.M.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LUCCI, C.S.; DUPAS, W.; LIMA, C.G. Desenvolvimento de populações de protozoários ciliados no rúmen de ovinos (*Ovis aries* L.), criados em Itapetininga, São Paulo. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo**, v.24, p.225-32, 1987.
- 15-OMETTO, J.C. **Bioclimatologia vegetal**. São Paulo, Agronômica Ceres, 1981.
- 16-PURSER, D.B.; MOIR, R.J. Dietary effects upon concentrations of protozoa in the rumen. **J. anim. Sci.**, v.25, p.663-74, 1966.
- 17-QUINN, L.Y.; BURROUGHS, W.; CHRISTIANSEN, W.C. Continuous culture of ruminal microorganisms in chemically defined medium. II. Culture medium studies. **Appl. Microbiol.**, v.10, p.583-92, 1962.

Recebido para publicação em 17/01/91
Aprovado para publicação em 21/05/92

TABELA 1 - Número de protozoários ciliados por mililitro de líquido ruminal, segundo o estágio vegetativo do capim elefante Napier. Pirassununga, 1992.

Tratamento	Consumo MS/animal/ dia (Kg)*	Total/ML	Entodinium spp	Diplodinium spp	Eudiplodinium spp	Polyplastron spp
I	2,71	187.274	182.139	3.338	743	1.053
II	2,85	126.758	120.799	4.027	972	959
III	2,76	100.757	98.312	1.675	486	284
Média final		138.263	133.750	3.013	734	766
C.V. (%)		36.1	37.3	40.0	64.0	42.2
		R.L.**	R.L.**	R.L.**	N.S.	R.L.**

Obs.: R.L.** = Regressão linear ($P \leq 0,01$)

N.S. = Não significativo

C.V. = Coeficiente de variação

* = Consumo de capim Napier, base seca

TABELA 2 - Volume ruminal (litros) e número de protozoários ciliados no volume líquido total do rúmen. Pirassununga, 1992.

Animal nº	I Período	II Período	III Período
590	V.R. = 3,79 $8,42 \times 10^8$	V.R. = 5,85 $6,25 \times 10^8$	V.R. = 13,58 $17,07 \times 10^8$
571	V.R. = 5,00 $16,80 \times 10^8$	V.R. = 7,59 $10,83 \times 10^8$	V.R. = 19,41 $19,62 \times 10^8$
552	V.R. = 3,91 $9,12 \times 10^8$	V.R. = 7,33 $11,82 \times 10^8$	V.R. = 14,79 $19,40 \times 10^8$
573	V.R. = 3,37 $3,83 \times 10^8$	V.R. = 10,33 $11,76 \times 10^8$	V.R. = 17,88 $12,31 \times 10^8$
1077	V.R. = 5,02 $5,63 \times 10^8$	V.R. = 10,11 $11,22 \times 10^8$	V.R. = 24,21 $15,90 \times 10^8$
583	V.R. = 3,06 $4,04 \times 10^8$	V.R. = 6,35 $8,99 \times 10^8$	V.R. = 14,64 $12,70 \times 10^8$
557	V.R. = 2,98 $3,76 \times 10^8$	V.R. = 8,50 $9,40 \times 10^8$	V.R. = 15,57 $20,45 \times 10^8$
1080	V.R. = 2,92 $6,50 \times 10^8$	V.R. = 11,31 $14,23 \times 10^8$	V.R. = 13,86 $13,06 \times 10^8$

V.R. = Volume ruminal em litros.

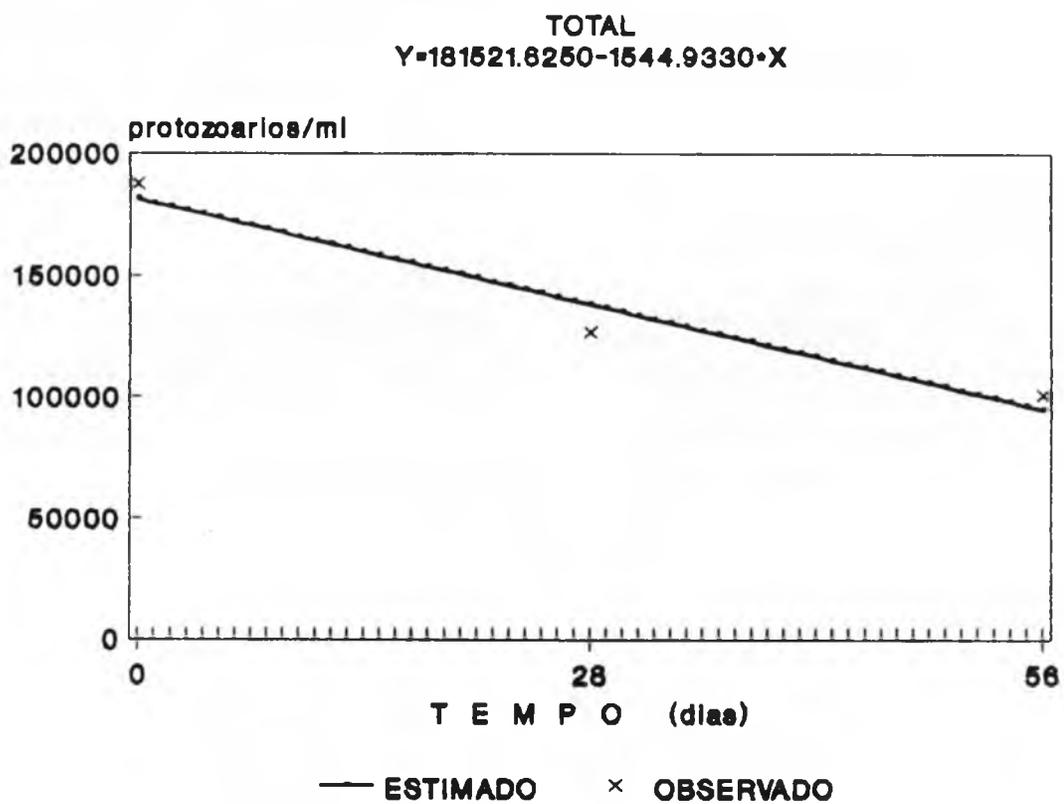


FIGURA 1 - Regressão linear obtida para protozoários totais por mililitro de líquido do rúmen. Pirassununga, 1992.

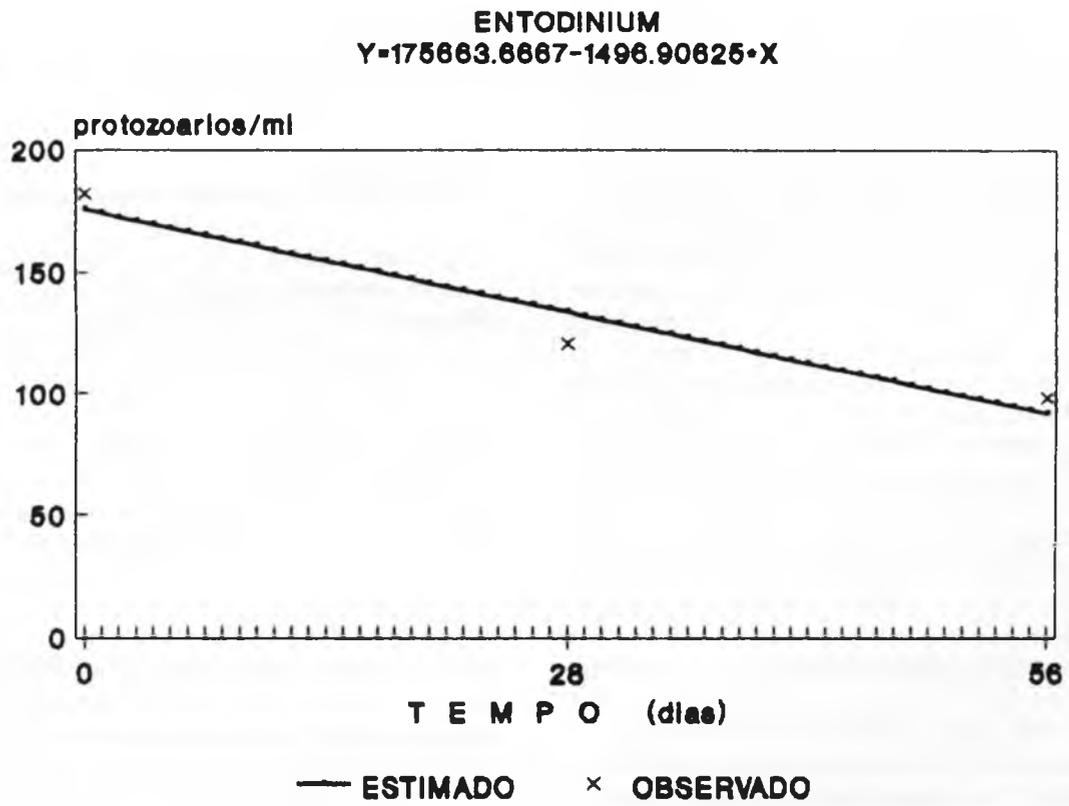


FIGURA 2 - Regressão linear obtida para Entodinium spp por mililitro de líquido de rúmen. Pirassununga, 1992.