

POPULAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS CILIADOS NO RÚMEN DE BOVINOS NELORE EM PASTOS DE *Brachiaria brizantha* MARANDU RECEBENDO SUPLEMENTO PROTEICO OU COM LIVRE ACESSO A BANCO DE PROTEÍNA DE *Leucaena leucocephala* NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.¹

MARCELO DE QUEIROZ MANELLA², ANTÔNIO JOÃO LOURENÇO³

¹Recebido para publicação em:19/05/04 Aceito para publicação em:30/06/04

²Centro Avançado de Pesquisa e Tecnologia do Agronegócio de Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Heitor Penteado nº 56, Centro, Caixa postal 60, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP. E-mail: manella@iz.sp.gov.br

³Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Nutrição Animal e Pastagens, Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Rua Heitor Penteado n. 56, CEP 13460-000, Nova Odessa - SP

RESUMO: A população de protozoários ciliados do rúmen de bovinos foi avaliada em animais recém desmamados em pastos de *B. brizantha* (Teste), com banco de *L. leucocephala* (Banco), suplemento protéico (46,6%PB) nas secas (Seca) ou suplementação protéica (43,9%) durante o ano todo (Ano), em blocos casualizados, com quatro repetições por tratamento. As coletas de líquido ruminal foram realizadas em Agosto, Novembro, Fevereiro e Maio. A contagem total de protozoários mostrou efeito de época do ano, apresentando em Maio as maiores populações e em Fevereiro as menores ($P<0,05$). O gênero *Entodinium* teve as concentrações em Maio maiores que Fevereiro ($P<0,05$), sendo este o gênero predominante (74,8%). Os *Diplodinium* apresentaram menores concentrações no Ano ($P<0,05$), e os meses de Fevereiro e Maio superiores a Novembro ($P<0,05$). Em Fevereiro observou-se população do gênero *Epidinium* mais elevada ($P<0,05$). A população de *Isotricha* teve maiores concentrações no tratamento Banco ($P<0,05$), e no mês de Maio ($P<0,05$). Nas diferentes épocas, Agosto mostrou menores concentrações de *Dasytricha*, quando comparado aos outros períodos ($P<0,05$).

Palavras chave: suplementação protéica, bovinos de corte, pastejo, banco de proteína, protozoários ciliados.

RUMEN CILIATE PROTOZOA OF NELORE STEERS GRAZING Brachiaria brizantha WITH PROTEIC SUPPLEMENT OR FREE ACCESS TO A PROTEIN BANK OF Leucaena leucocephala IN DIFFERENT SEASONS OF THE YEAR.

ABSTRACT: The rumen ciliate protozoa population was evaluated on nelore steers grazing *Brachiaria brizantha* pastures (Teste), or supplemented during the dry season (Seca), dry and wet seasons (Ano) or with free access to a leucaena bank (Banco), was evaluated in a randomized block design with four replications. The rumen liquor was collected on August, November, February and May. The total counting of rumen ciliate protozoa showed a period effect, were May had highest concentrations and February lowest ($P<0.05$). The genus *Entodinium* counts were higher in May than February ($P<0.05$), and it were the predominant genus (74.8%). *Diplodinium* showed lower concentrations on Ano ($P<0.05$), February and May were higher than November ($P<0.05$). In February the population of the genus *Epidinium* were larger ($P<0.05$) than the other periods. The *Isotricha* had higher concentrations on Banco ($P<0.05$), and May ($P<0.05$). The *Dasytricha* had the lowest concentration on August ($P<0.05$).

Key words: proteic supplements, beef cattle, grazing, protein bank, rumen ciliate protozoa.

INTRODUÇÃO

Os protozoários perfazem cerca de 40 a 80% da biomassa microbiana ruminal (VEIRA, 1986), compondo em cerca de 31% a proteína de origem microbiana (PUNIA e LEIBHOLTS, 1984). A habilidade em digerir a maioria dos componentes dos alimentos conferem importante papel aos ciliados no processo de fermentação ruminal, sendo responsáveis por 34% da digestibilidade da fibra. A ausência dos ciliados está associada à diminuição da digestibilidade da forragem (HEGARTY *et al.*, 1994; ANKRAH *et al.*, 1990; PUNIA *et al.*, 1987), assim como a diminuição das concentrações de N-NH₃, que limita a ação das bactérias celulolíticas do rúmen.

Segundo HUNGATE (1966) as concentrações de protozoários variam conforme o tipo da dieta e qualidade da mesma, assim como a frequência com que o animal é alimentado, estado fisiológico, e a raça dos animais.

WILLIANMS e COLEMAN (1991) sugerem que as adições de proteína na alimentação de bovinos apresentem resultados pouco conclusivos, podendo haver aumento, ou diminuição da contagem total. Os autores revisaram, que na adição de uréia há tendências em aumentar a densidade de protozoários totais, principalmente os gêneros *Entodinium*, *Dasytricha* e *Isotricha*. JOUANY (1996) relata que os *Holotricha (Isotricha spp. e Dasytricha spp.)* atacam preferencialmente a proteína solúvel, enquanto os *Entodinium* são degradadores da parte insolúvel da proteína.

VEIRA (1986) afirma que o número de protozoários pode ser relativamente baixo em animais recebendo dietas exclusivas de forragens, e maior nas misturas de forragens e grãos. GRUBB e DEHORITY (1975) em estudos conduzidos com ovinos, observaram decréscimo no número total de ciliados $2-4 \times 10^5$ (ml)⁻¹, quando a dieta era somente feno de gramínea, e aumento $10-12 \times 10^5$ (ml)⁻¹, na alimentação composta por milho e feno (60:40%). Os autores também relatam que o fato de ter ocorrido um aumento numérico de protozoários *Holotricha* na maior proporção de concentrado na dieta foi devido à maior quantidade de carboidratos solúveis do alimento.

NOGUEIRA FILHO *et al.* (1992) forneceram capim elefante, cortados em diferentes estádios vegetativos, a bovinos fistulados, e observaram a presença de

Entodinium spp., *Diplodinium spp.* e *Polyplastron spp.* Houve queda linear nas concentrações de *Entodinium spp.*, bem como nas concentrações totais de protozoários com o avançar da idade da planta forrageira.

Vários autores descrevem o gênero *Entodinium spp.* como o protozoário predominante na contagem total, chegando a 90%, especialmente quando a alimentação é a base de concentrado, (HUNGATE, 1966; NOGUEIRA FILHO *et al.*, 1992). Já os protozoários dos gêneros *Diplodinium spp.* e *Epidinium spp.*, por apresentarem concentrações consideráveis de celulase, são degradadores de fibra, haja visto que suas populações aumentam em dietas fibrosas (HUNGATE, 1966; WILLIANMS e COLEMAN, 1991; JOUANY, 1996).

Os *Holotricha (Isotricha spp. e Dasytricha spp.)* aparecem em maior número nos ruminantes em regime de pastejo, recebendo feno ou cana de açúcar, pois tem a capacidade de degradar os polissacarídeos não estruturais e carboidratos solúveis das plantas (HUNGATE, 1966; WILLIANMS e COLEMAN, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 1992; JOUANY, 1996).

A adição de bagaço de cana de açúcar in natura em níveis crescentes (9, 15 e 21%) à dieta com alta quantidade de concentrado promoveu crescimento linear na contagem total dos *Entodinium spp.*, porém em termos de porcentagem houve decréscimo, indicando que o nível de bagaço estimulou muito mais a proliferação dos gêneros *Epidinium*, *Isotricha*, *Dasytricha* e *Eudiplodinium*. Isto ocorreu devido ao aumento da fibra e maior fornecimento de açúcares solúveis na dieta (NOGUEIRA FILHO *et al.*, 1999).

Coletando material ruminal após o abate de ovinos oriundos de pastagens naturais, MARINHO (1983) observou variações no número total de protozoários entre $50-300 \times 10^4$ g⁻¹ do conteúdo ruminal. Sendo que os gêneros que ocorreram com maior frequência foram *Entodinium spp.*, *Eudiplodinium spp.*, *Polyplastron spp.* e *Dasytricha spp.* Os *Holotricha*, particularmente o gênero *Dasytricha spp.*, foram observados em número relativamente elevado, estando, segundo os autores, condizentes ao tipo de dieta que os animais estavam submetidos.

FRANZOLIN NETO *et al.* (1988), fornecendo níveis crescentes de *Leucaena leucocephala* associada a feno de capim Rhodes, observaram aumento aparente de

protozoários do gênero *Entodinium* spp., enquanto houve um decréscimo do gênero *Dasytricha* spp. GALINDO *et al.* (1995) notaram que a população total de protozoários ciliados não foi alterada com a inclusão de *Leucaena leucocephala* nas dietas de vacas holandesas.

VANDERWATH e MYBURGH (1941) em trabalho realizado na África com carneiros, avaliaram as variações das populações de ciliados entre o inverno, primavera, verão e outono, onde observaram 100, 277, 455 e 278 x 10³ protozoários (ml)⁻¹, respectivamente. Sendo que os grandes entodiniomorfos (*Diplodinium* spp.) apareceram em maiores concentrações no inverno, pois podem degradar com mais eficiência a fibra da forragem. WESTERLING (1970) trabalhando com renas, observou concentrações de 350 x 10⁴ protozoários (ml)⁻¹ no verão, e 200 x 10⁴ protozoários (ml)⁻¹ no inverno, também com maiores concentrações de *Diplodinium* spp.

São poucas as informações sobre variação da população de protozoários ciliados no rúmen durante as diferentes estações do ano, pois a maioria dos trabalhos são realizados sob condições controladas (confinamento, gaiolas, etc.). Desta forma o objetivo deste trabalho foi de avaliar a variação da população total e dos diferentes gêneros de protozoários ciliados no rúmen de bovinos nelore nas diferentes estações do ano e diferentes estratégias de alimentação a pasto.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Área Experimental: O trabalho foi realizado na Estação Experimental Central, do Instituto de Zootecnia, localizado no município de Nova Odessa, SP. A área experimental utilizada era formada por 48 piquetes de 1 hectare cada, formando 16 parcelas experimentais dividida em 3 piquetes. O pastejo foi rotacionado dentro da parcela, com período de descanso e ocupação foi de 42 e 21 dias, respectivamente. O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com 4 tratamentos e 4 repetições.

Os animais foram submetidos aos seguintes tratamentos: pastagem exclusiva de *Brachiaria brizantha* (**Teste**); pastagem de *Brachiaria brizantha* associada a uma área adjacente (banco de proteína) com livre acesso a *Leucaena leucocephala* (**Banco**); Pastagem de *Brachiaria brizantha* + suplementação alimentar fornecida no cocho apenas período da seca (junho a

novembro de 1998) (**Seca**); pastagem de *Brachiaria brizantha* + suplementação alimentar fornecida no cocho no período da seca e das águas (junho 1998 a maio de 1999) (**Ano**).

A pastagem utilizada foi formada de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, e o banco de proteína de *Leucaena leucocephala* cv. Cunnigaham, representando 25% da área do piquete. Foi realizada adubação de manutenção com 100kg P₂O₅ ha⁻¹, e 60kg K₂O ha⁻¹, por cobertura e a lanço 100kg N ha⁻¹ (500kg de sulfato de amônio ha⁻¹), em abril de 1998 e março de 1999.

O período da seca considerado durou 140 dias (25 de junho de 1998 a 12 de novembro 1999) e o das águas 174 dias (12 de novembro de 1998 a 4 de maio de 1999), sendo o período experimental total de 314 dias.

Pastagem e forragem disponível: A disponibilidade de forragem foi estimada pelo método do quadrado (1,0 x 1,0m), e avaliação das áreas de *Leucaena leucocephala* foi feita segundo Lourenço *et al.* (1981), em 5 pontos aleatórios das áreas avaliadas. Foram determinadas a matéria seca a 105°C, a proteína bruta (PB) pelo método micro Kjeldahl (A.O.A.C., 1990), a digestibilidade “in vitro” (Tiley & Terry, 1963), a fibra detergente neutro (FDN) e fibra detergente ácido (FDA; Robertson & Van Soest, 1981).

Animais experimentais e carga animal: Foram utilizados 192 bovinos machos inteiros da raça Nelore, recém desmamados, pesando em média 152 kg de peso vivo. A carga animal média foi de 683 kg peso vivo ha⁻¹ (12 animais por parcela) no período da seca, e de 1182 kg de peso vivo ha⁻¹ (14 animais por parcela) no período das águas. A carga animal foi ajustada para que ao final de cada período de pastejo o piquete apresentasse o mínimo de 1500 Kg de MS ha⁻¹. As pesagens individuais dos animais foram feitas com auxílio de balança eletrônica em intervalos de 28 dias, sempre pelo período da manhã sem jejum (MANELLA *et al.*, 2002).

Suplementação Alimentar: A análise dos dados do Quadro 1 mostra os ingredientes utilizados na composição do suplemento alimentar para os períodos das secas e águas, e no Quadro 2 a composição química dos suplementos. Utilizou-se 6,8 % de sal e 0,16 % de Rumensinã (monensina) no suplemento para limitar o consumo em aproximadamente 600 g/animal/dia. O suplemento foi fornecido a

Quadro 1: Composição em base seca do suplemento para a época das secas e das águas

Ingrediente (%)	Seca	Águas
Farelo de soja	63,0	64,25
Farelo de trigo	11,84	10,0
Farinha de peixe	-	12,0
Uréia	5,0	1,0
F. proteinoso de milho	8,5	-
Caulim	1,3	1,3
Calcêreo	2,0	2,0
Fosfato bicalcico	1,0	1,0
Micro-nutrientes	0,4	0,4
Rumensin®	0,16	0,16
Sal	6,8	6,8
Consumo/d (g)	493,0	766,0
IPNDR/d (g) ¹	64,0	124,1

¹Ingestão de proteína não degradável no rúmen

Quadro 2: Composição química do suplemento alimentar para o período das secas e das águas na base seca(%MS)

Composição Química	Seca	Águas
MS	90,7	91,3
NDT*	76,78	73,96
PB	46,9	43,9
PNDR *	13,1	16,2
FDN	12,7	15,6
FDA	8,7	11,0
MM	20,3	17,7
Ca	3,2	1,7
P	1,2	0,6

* NRC (1996).

cada 3 dias em cocho coberto, sendo que as quantidades eram ajustadas em função das sobras do concentrado cocho.

Colheita de Líquido Ruminal e de sangue e análises laboratoriais: As colheitas foram feitas nos meses de agosto/1998 (inverno), novembro/1998 (primavera), fevereiro/1999 (verão) e maio/1999 (outono), em 3 animais, sorteados ao acaso em cada parcela experimental, perfazendo um total de 48 ani-

mais por período de colheita. Foi colhido aproximadamente 500 ml de líquido ruminal através de sonda flexível oro-gástrica, com auxílio de bomba de vácuo acoplada a um Kitassato (ROSENBERGER, 1987).

Contagem diferencial de protozoários: Foram tomados 05 ml do líquido ruminal para fixação em 05 ml de formol a 20 % em um tubo de ensaio.

As contagens diferenciais dos protozoários ciliados do rúmen foram determinadas utilizando-se um retículo de 0,5 mm x 0,5 mm de área, com subdivisões de 25 quadriculos, acoplado na ocular de um microscópio marca Olympus modelo CH2 e com câmara de contagem de "Sedgwick-Rafter" com medidas internas de 50 mm x 20 mm x 01 mm (capacidade 01 ml), conforme técnica descrita por DEHORITY (1977).

Cerca de 01 ml da amostra diluída foi colocada em um tubo de ensaio para ser corada com 02 gotas de verde brilhante a 02% por 04 horas, em seguida foram adicionados 09 ml de glicerol a 30% e homogenizada a mistura, tornando a alíquota do líquido ruminal diluída 20 vezes. Com auxílio de uma pipeta encheu-se a câmara de contagem com a amostra, que acoplada ao microscópio contaram-se 50 campos óticos através do retículo, com aumento de 100x. O fator de correção de 1,6 foi multiplicado pelo valor médio da contagem dos campos.

Os protozoários foram classificados nos gêneros *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Epidinium* e na sub-família *Diplodinae* (incluem os gêneros *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium* e *Polyplastron*).

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

O delineamento foi em blocos casualizados com quatro repetições por tratamento, adicionado ao fator de medida de tempo. Os resultados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1985), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo Teste F. Os dados que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação logarítmica [$\log(X + 1)$] ou pela raiz quadrada [$\sqrt{X+1/2}$]. Os dados originais ou transformados, quando este último procedimento foi necessário, foram submeti-

dos à análise de variância pelo procedimento GLM (PROC GLM). Foi adotado um nível de significância de 5% para todos os testes realizados.

Tal análise foi realizada utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS), sendo as médias comparadas através do teste Tukey. Na presença de interação

entre efeito do tratamento e de tempo a separação foi feita dentro de cada período de coleta.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

As avaliações das pastagens de *Brachiaria brizantha* e dos bancos de *Leucaena leucocephala* por ocasião da colheita do líquido ruminal encontram-se no Quadro 3.

Quadro 3: Disponibilidade (kgMs ha⁻¹), e composição químico bromatológica (%MS) da pastagem nos meses do ano (agosto, novembro, fevereiro e maio) em que foram realizadas as coletas de líquido ruminal

Análise Química	<i>Brachiaria rizantha</i>				<i>Leucaena leucocephala</i>			
	Ago.	Nov.	Fev.	Mai	Ago.	Nov.	Fev.	Mai
MS	51,8	26,4	24,5	26,7	31,8	26,6	23,9	26,3
Disponibilidade	4793	3439	4232	3954	1857	3588	3423	1987
Matéria verde (%)	56,9	83,8	81,7	89,5	-	-	-	-
PB	3,5	9,6	5,5	9,6	25,4	26,7	25,3	27,6
FDN	75,6	71,8	78,0	71,2	40,3	34,9	51,5	32,5
FDA	43,7	38,0	46,8	37,1	31,5	22,6	38,3	24,1
Digestibilidade <i>in vitro</i>	46,1	64,9	35,7	50,3	61,2	63,8	47,8	63,7

Em fevereiro os teores de PB e a digestibilidade “in vitro” da brachiaria estiveram baixos para a época, provavelmente pelo fato da pastagem estar velha, devido maior taxa de crescimento da planta e o longo período de descanso para a gramínea no período (42 dias), propiciando aumento dos constituintes da parede celular (FDN e FDA). Em Maio, o maior teor de proteína foi reflexo da adubação de manutenção ocorrida em março de 1999.

O ganho diário de peso vivo observado estão descritos em MANELLA *et al.* (2002). No período seco os tratamentos Seca e Ano propiciaram ganhos individuais médios diários superiores ao Banco e Teste (534 e 486 x 277 e 201 g por dia, respectivamente, P<0,05), e no período das águas os ganhos obtidos nos tratamentos Ano e Banco foram maiores que os animais Seca e Teste (782 e 741 x 584 e 645 g por dia; P<0,05).

A análise de variância dos dados das concentrações totais de protozoários ciliados no Quadro 4,

apresentam efeitos significativos para época do ano (P=0,0161) A concentração total de protozoários ciliados no mês de Maio 21,43 x10⁴(ml)⁻¹ foi superior (P.<0,05) a encontrada no mês de Fevereiro 15,91 x10⁴(ml)⁻¹.

As concentrações médias totais de protozoários obtidas neste trabalho 17,63x10⁴ (ml)⁻¹ estão no intervalo proposto por VANDERWATH e MYBURGH (1941), ORTOLANI e TAKIMOTO (1987), DEHORITY e ORPIN (1988) e MARINHO (1983) para animais recebendo dietas com alto volumoso ou em pastejo.

VANDERWATH e MYBURGH (1941) observaram maior concentração de protozoários no verão 45,5x10⁴ (ml)⁻¹, e no inverno as menores 10,0 x10⁴ (ml)⁻¹. No presente trabalho, o outono (Maio) mostrou concentração mais elevadas 21,43x10⁴ (ml)⁻¹ que os outros meses de avaliação. Provavelmente, esse fato esteja relacionado com adubação nitrogenada realizada em Março, proporcionando rebrota ao capim, disponibilizando forragem de melhor qualidade ao pastejo pelos bovinos.

Quadro 4: População total de protozoários ciliados ($X 10^4$ (ml)⁻¹ de líquido ruminal nas diferentes épocas do ano (Agosto, Novembro, Fevereiro e Maio) em bovinos recebendo diferentes estratégias de alimentação

Período	Tratamento				Média	C.V.	P.
	Ano	Secas	Banco	Teste			
	Protozoários X 10 ⁴ (ml) ⁻¹						
Agosto	18,11	14,82	16,35	15,99	16,31ab	24,24	-
Novembro	13,12	18,99	20,10	15,32	16,88ab	40,81	-
Fevereiro	12,4	14,49	17,89	18,88	15,91b	26,37	-
Maio	23,19	16,85	24,36	21,30	21,43a	30,04	-
Média	16,70	16,29	19,67	17,88	17,63	33,10	0,4419

Linhas com letras diferentes são significativas quando $P < 0,05$;

Efeito de época do ano: $P = 0,0161$;

Interação época do ano*tratamento: $P = 0,3356$

Estas observações estão de acordo com as feitas por NOGUEIRA *et al.* (1992), que observaram decréscimo linear na população de ciliados no rúmen de bovinos ao fornecer capim napier em diferentes estádios de crescimento, com valores de $18,73 \times 10^4$ (ml)⁻¹ e $10,1 \times 10^4$ (ml)⁻¹ quando fornecido plantas jovens e plantas em idade mais avançadas, respectivamente.

No presente trabalho não foi possível constatar aumento na população de ciliados em decorrência do suplemento protéico, ao contrário de outros autores, que relatam aumento do número de protozoários com fornecimento de concentrado (HUNGATE, 1966, ABE *et al.*, 1973; GRUBB e DEHORITY, 1975; VEIRA, 1986; CARVALHO *et al.*, 1997 e D'AGOSTO

et al. 1998), e ou de dietas ricas em proteína (PURSE e MOIR, 1966; WILLIAMS e COLEMAN, 1991).

A ausência do aumento esperado na concentração total de protozoários no rúmen dos animais suplementados, pode ter sido em função da presença de monensina no suplemento, pois esta, causa diminuição na população dos ciliados (KARTZ *et al.* 1986).

A concentração de protozoários do gênero *Entodinium spp.*, inserida no Quadro 5 apresentam os efeitos para época do ano ($P = 0,0011$). A avaliação de Maio $15,63 \times 10^4$ (ml)⁻¹ foi superior ($P < 0,05$) aos resultados obtidos no mês de Fevereiro ($10,65 \times 10^4$ (ml)⁻¹).

Quadro 5: População total de *Entodinium spp.* ciliados ($X 10^4$ (ml)⁻¹ de líquido ruminal) nas diferentes épocas do ano (Agosto, Novembro, Fevereiro e Maio) em bovinos recebendo diferentes estratégias de alimentação

Período	Tratamento				Média	C.V.	P.
	Ano	Secas	Banco	Teste			
	<i>Entodinium spp.</i> X 10 ⁴ (ml) ⁻¹						
Agosto	14,69	11,70	12,89	12,95	13,06ab	29,65	-
Novembro	9,62	13,51	15,46	11,24	12,46ab	54,10	-
Fevereiro	7,59	9,73	11,33	13,93	10,65b	37,15	-
Maio	18,43	11,68	16,43	16,00	15,63a	35,86	-
Média anual	12,58	11,66	14,03	13,53	12,95	41,47	0,6632

Linhas com letras diferentes são significativas quando $P < 0,05$

Efeito de época do ano: $P = 0,0395$

Interação época do ano*tratamento: $P = 0,3484$

NOGUEIRA FILHO *et al.* (1992) relatam redução linear para o gênero *Entodinium spp.* no rúmen dos animais alimentados com forragens envelhecidas. A população de protozoários do gênero *Entodinium spp.* no presente trabalho, teve comportamento semelhante aos relatados por NOGUEIRA FILHO *et al.* (1992).

DENNIS *et al.* (1983) menciona que a população de *Entodinium spp.* é maior quando se tem dieta rica em energia. Em média a população total de protozoários foi predominantemente de *Entodinium*

spp. (74,8%), estando de acordo com outras observações (HUNGATE, 1966; VANCE *et al.* 1972; DENNIS *et al.*, 1983, FFOULKES e LENG, 1988; NOGUEIRA FILHO *et al.*, 1992).

O Quadro 6 mostram os resultados das avaliações da população do gênero *Diplodinium spp.* A análise de variância demonstrou que houve efeito significativo das comparações das médias entre os tratamentos e para efeito de épocas de avaliação na população do gênero *Diplodinium*.

Quadro 6: População total de *Diplodinium spp.* ($\times 10^4(\text{ml})^{-1}$ de líquido ruminal) nas diferentes épocas do ano (Agosto, Novembro, Fevereiro e Maio) em bovinos recebendo diferentes estratégias de alimentação

Período	Tratamento						
	Ano	Secas	Banco	Teste	Média	C.V.	P.
Agosto	0,564	0,796	0,571	0,890	0,705ab	44,29	-
Novembro	0,500	0,533	0,554	0,397	0,495b	49,39	-
Fevereiro	0,653	1,135	1,100	0,860	0,937a	38,24	-
Maio	0,580	1,040	1,227	0,778	0,955a	43,83	-
Média anual	0,574B	0,889A	0,863A	0,731A	0,760	47,36	0,0029

colunas com letras minúsculas diferentes são significativas quando $P < 0,05$

linhas com letras maiúsculas diferentes são significativas quando $P < 0,05$

Efeito de época do ano: $P = 0,0038$

Interação época do ano*tratamento: $P = 0,2933$

As concentrações para os tratamentos Teste ($0,731 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$), Seca ($0,889 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) e Banco ($0,863 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) foram superiores ($P < 0,05$) ao tratamento Ano ($0,574 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$).

Durante as épocas do ano os meses de Maio e Fevereiro foram superiores a Novembro $0,898$ e $0,937$ vs $0,494 \times 10^4(\text{ml})^{-1}$; $P < 0,05$, e em Agosto as concentrações intermediárias ($0,705 \times 10^4$).

Quando se tem dietas mais fibrosas ocorre aumento na população de *Diplodinium spp.* (PURSE e MOIR, 1966). Neste trabalho, quando foram avaliados as concentrações entre tratamentos, o comportamento da população de *Diplodinium spp.* esteve de acordo com relatos feitos por PURSE e MOIR (1966), pois em Agosto e Fevereiro, quando as plantas forrageiras apresentaram qualidade inferior, a população deste protozoário aumentou. Em Maio foi observada maior concentração de *Diplodinium*, porém representou apenas 4,2% do total, em Fevereiro foi de 6,1% da população total.

VANDERWATH e MYBURGH (1941) observaram tendências semelhantes ao avaliarem a população de protozoários ciliados de ovinos sob pastejo na África durante as estações do ano. As proporções de *Diplodinium spp.* foram mais elevadas (20,6%) quando as forragens apresentaram qualidade inferior, e com a melhora da forragem, houve diminuição (15,7%). WESTERLING (1970) também relatou tendências semelhantes quanto ao comportamento deste protozoário nas diferentes épocas do ano.

Os animais com acesso ao banco de proteína em *Leucaena* apresentaram tendências a ter maior densidade de *Diplodinium spp.* FRANZOLIN NETO, *et al.* (1988) também observaram essa mesma tendência de aumento nas proporções de *Diplodinium spp.* quando adicionaram 30% de feno de leucena a dietas de feno de capim Rhodes.

A análise dos dados referente ao gênero *Epidinium spp.* (Quadro 7) apresentou efeito de épo-

Quadro 7: População total de *Epidinium spp.* ($X 10^4(\text{ml})^{-1}$ de líquido ruminal) nas diferentes épocas do ano (Agosto, Novembro, Fevereiro e Maio) em bovinos recebendo diferentes estratégias de alimentação

Período	Tratamento				Média	C.V.	P.
	Ano	Secas	Banco	Teste			
Agosto	0,057	0,162	0,219	0,139	0,144b	95,20	-
Novembro	0,187	0,186	0,225	0,127	0,181b	48,92	-
Fevereiro	0,292	0,393	0,405	0,267	0,339a	40,20	-
Maio	0,148	0,187	0,364	0,172	0,208b	63,82	-
Média anual	0,170	0,299	0,232	0,176	0,181	65,61	0,0605

Linhas com letras diferentes são significativas quando $P < 0,05$;
 Efeito de época do ano: $P = 0,0001$
 Interação época do ano*tratamento: $P = 0,1900$

ca do ano ($P = 0,0001$), onde a concentração de Fevereiro foi maior que Agosto, Novembro e Maio $0,339$ vs $0,144$, $0,181$ e $0,208 X 10^4(\text{ml})^{-1}$, $P < 0,05$.

Segundo WILLIANMS e COLEMAN (1991) os ciliados do gênero *Epidinium spp.* por apresentarem a enzima celulase, assim como os *Diplodinium spp.*, são capazes de degradar a celulose. Isto pode explicar as maiores concentrações deste gênero nas coletas feitas em Fevereiro. Ao fornecer níveis crescentes de bagaço de cana-de-açúcar a bovinos confinados, NOGUEIRA FILHO *et al.* (1999) observaram aumento na população de *Epidinium spp.*, que segundo os autores isto provavelmente ocorreu devido à maior fibra dietética.

O gênero *Epidinium spp.* apresentou menores concentrações em relação aos outros gêneros, semelhante a relatos de DENNIS *et al.* (1983) e FRANZOLIN NETO *et al.* (1988) e inferiores às observações de MARINHO (1983) e NOGUEIRA FILHO *et al.* (1993). WILLIANMS e COLEMAN (1991) descrevem vários trabalhos onde o gênero *Epidinium spp.* era predominante, em animais recebendo dietas exclusivas de volumoso, justamente pela capacidade em degradar a fibra.

No Quadro 8 é possível observar efeito significativo para época do ano ($P = 0,0001$) e para tratamentos ($P = 0,0011$) na análise de variância do gênero *Isotricha spp.*.

Quadro 8: População total de *Isotricha spp.* ciliados ($X 10^4(\text{ml})^{-1}$ de líquido ruminal) nas diferentes épocas do ano (Agosto, Novembro, Fevereiro e Maio) em bovinos recebendo diferentes estratégias de alimentação.

Período	Tratamento				Média	C.V.	P.
	Ano	Secas	Banco	Teste			
Agosto	0,760	0,578	0,817	0,623	0,704c	33,74	-
Novembro	0,647	1,088	1,267	1,154	1,038b	41,46	-
Fevereiro	0,690	0,650	1,053	0,838	0,808bc	31,63	-
Maio	0,993	1,128	2,053	1,300	1,362a	40,62	-
Média anual	0,773C	0,861BC	1,291A	0,988B	0,978	46,92	0,0011

colunas com letras diferentes minúsculas são significativas quando $P < 0,05$
 Linhas com letras diferentes maiúsculas são significativas quando $P < 0,05$
 Efeito de época do ano: $P = 0,0001$
 Interação época do ano*tratamento: $P = 0,1458$

A população de *Isotricha* no mês de Maio foi superior a Agosto, Novembro e Fevereiro $1,362 \times 0,704$, $1,038$, $0,808 \times 10^4(\text{ml})^{-1}$, $P < 0,05$. Novembro apresentou população maior que Agosto $1,038 \times 0,704 \times 10^4(\text{ml})^{-1}$, $P < 0,05$.

O tratamento Banco teve população maior que o Ano, Seca e Teste $1,291 \times 0,773$, $0,861$ e $0,988 \times 10^4(\text{ml})^{-1}$, $P < 0,05$, e o Teste maior que o Ano ($0,988 \times 0,773 \times 10^4(\text{ml})^{-1}$, $P < 0,05$. FRANZOLIN NETO *et al.* (1988) observaram tendência de aumento nas con-

centrações de *Isotricha spp.*, quando adicionaram leucena na dieta, semelhante as observações feitas para o tratamento banco (*L. leucocephala*) no presente trabalho.

No Quadro 9 os protozoários do gênero *Dasytricha spp.*, apresentaram efeito para época do ano ($P = 0,0001$). Nos meses de Novembro, Fevereiro e Maio mostraram Maiores concentrações de *Dasytricha* que em Agosto $2,548$, $3,013$ e $3,035 \times 1,596 \times 10^4(\text{ml})^{-1}$, $P < 0,05$.

Quadro 9: População total de *Dasytricha spp.* ciliados ($\times 10^4(\text{ml})^{-1}$ de líquido ruminal) nas diferentes épocas do ano (Agosto, Novembro, Fevereiro e Maio) em bovinos recebendo diferentes estratégias de alimentação

Período	Tratamento				Média	C.V.	P.
	Ano	Secas	Banco	Teste			
Agosto	2,036	1,585	1,416	1,348	1,596b	28,27	-
Novembro	2,160	3,027	2,607	2,398	2,548a	28,34	-
Fevereiro	3,167	2,573	3,327	2,985	3,013a	25,28	-
Maio	3,044	2,627	3,428	3,047	3,035a	22,19	-
Média anual	2,601	2,452	2,693	2,444	2,548	34,31	0,7925

Linhas com letras diferentes são significativas quando $P < 0,05$;

Efeito de época do ano: $P = 0,0001$

Interação época do ano*tratamento: $P = 0,2216$

A população de holotrichas (*Isotricha spp.* e *Dasytricha spp.*) aparece em maior concentração em dietas ricas em carboidratos solúveis (HUNGATE, 1966; WILLIANMS e COLEMAN, 1988; WILLIANMS e COLEMAN, 1991; JOUANY, 1996), assim como nas forragens novas (WILLIANMS e COLEMAN, 1991).

NOGUEIRA FILH *et al.* (1999) observaram aumento de ciliados holotricha ao fornecer níveis crescentes de bagaço de cana *in natura* (9, 15, 21%). As concentrações variaram de $6,4$ a $14,8 \times 10^4(\text{ml})^{-1}$ para *Dasytricha*, e de $6,5$ a $14,8 \times 10^4(\text{ml})^{-1}$ para os *Isotricha*, segundo os autores este aumento foi em decorrência do aumento de açúcares solúveis na dieta.

MARINHO (1983) constatou variações de *Isotricha* $0,5$ a $2,6 \times 10^4(\text{ml})^{-1}$ e *Dasytricha* $1,8$ a $7,6 \times 10^4(\text{ml})^{-1}$ semelhantes as variações observadas neste ensaio.

Bubalinos a pasto complementados com cana-de-açúcar apresentaram predominância de ciliados do gênero *Dasytricha spp.* (OLIVEIRA *et al.*, 1992). No

presente trabalho este gênero compôs em média apenas 14,1% da população total. Segundo WILLIANMS e COLEMAN (1991) a participação média nos holotrichas para animais a pasto é de 20% da concentração total, concordando com nossas observações, onde as proporções de *dasytricha* e *isotricha* somados, perfizeram 19,9%.

As oscilações nas características da forragem durante as quatro épocas analisadas foram as principais causa da variação na concentração total dos protozoários, e principalmente pelas alterações ocorridas nos gêneros. A suplementação protéica ou o acesso a banco de proteína, não modificou a população de protozoários, bem como as variações individuais de cada gênero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; SHIBUI, H.; IRIKI, T.; KUMENO, F. Relation between diet and protozoal population in the rumen. Br. J. of Nutr., London, v. 29, p. 197-202, 1973.

- ANKRAH, P.; LOERCH, S.C.; KAMPMAN, K.A.; DEHORITY, B.A. Effects of defaunation on in situ dry matter and nitrogen disappearance in steers and growth of lambs. *J. Anim. Sci., Champaign*, v.68, p.3330-3336, 1990.
- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analyses*. 15.ed . v.1. 1990. p. 72-74.
- CARVALHO, A.U.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, J.F.C.; CECON, P.R.; VALADARES, R.F.D.; SAMPAIO, R.L.. Níveis de concentrado em dietas de zebuínos. 3. Eficiência microbiana e população de protozoários ruminais. *Rev. Bras. Zoot., Viçosa, MG*, v.26, n.5, p.1007-1015, 1997.
- D'AGOSTO, M.D.; SANTA ROSA, M.R.; AROEIRA, L.J.M.; LOPES, F.C.F. Influência da dieta no comportamento da população de ciliados no rúmen. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot., Belo Horizonte*, v.50, p.153-159, 1998.
- DEHORITY, B.A. Classification and morphology of rumen protozoa. *Wooster: Ohio Agriculture Research and Development Center*, 1977. 82 p. (apostila).
- DEHORITY, B.A.; ORPIN, C.G. Development of, and natural fluctuations in rumen microbial populations. In: HOBSON, P. N., Ed. *The rumen microbial ecosystem*. London : Elsevier Applied Science, 1988. p. 151-183.
- DENNIS, S.M.; ARAMBEL, J.M.; BARTLEY, E.E.; DAYTON, A.D. Effect of energy concentration and source of nitrogen on numbers and types of rumen protozoa. *J. Dairy Sci., Champaign*, v. 66, p. 1248-1254, 1983.
- FFOULKES, D.; LENG, R.A. Dynamics of protozoa in the rumen of cattle. *Br. J. Nutr., London*, v.59, p.429-436, 1988.
- FRANZOLIN NETO, R.; FRANZOLIN, M.H.T.; ELLOSO, L.; LIMA, C.J. Efeitos da *Leucaena leucocephala* (Lam.) de with. sobre a concentração de protozoários ciliados no rúmen de ovinos. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. USP*, v. 25, n.2, p. 267-273, 1988.
- GALINDO, J.; MARRERO, J.; ARANDA, N.; CHONGO, B. Effect of *Leucaena leucocephala* on ruminal microbial population in cows consuming sugar cane forage and king grass. *Cuban J. Agric. Sci., Cuba*, v.29, p. 45-51. 1995.
- GRUBB, J.A.; DEHORITY, B. Effects of an abrupt change in ration from all roughage to high concentrate upon rumen microbial number in sheep. *Appl. Microbiol., Washington*, v. 30, p.402-412, 1975.
- HEGARTY, R.S.; NOLAN, J. V.; LENG, R.A. The effects of protozoa and supplementation with nitrogen and sulfur on digestion and microbial metabolism in the rumen of sheep. *Aust. J. Agric. Res., Melbourne*, v.45, p.1215-1227, 1994.
- HUNGATE, R.E. *The rumen and its microbes*. New York: Academic Press, 1966. 533 p.
- JOUANY, J.P. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *J. Nutr., Bethesda*, v.126 (suppl.), p. 1335-1346, 1996.
- KARTZ, M.P.; NAGARAJARA, T.G.; FINA, L.R. Ruminal changes in monensin and lasalocid fed grazing bloat provocative alfalfa pastures. *J. Anim. Sci., Champaign*, v. 63, p.1246-1257, 1986.
- LOURENÇO, A.J.; MATSUI, E. Avaliação da proporção de gramínea e leguminosa na dieta de bovinos por determinação de isótopos estáveis de carbono nas fezes. *Zootecnia, Nova Odessa*, v. 19, p. 5-15, 1981.
- MANELLA, M.Q. ; LOURENÇO, A.J.; LEME, P.R. Recria de bovinos Nelore em pastos de *Brachiaria brizantha* com suplementação protéica ou com acesso a banco de proteína de *Leucaena leucocephala*. I. Desempenho Animal. *Rev. Bras. Zoot., Viçosa, MG*, v.31, n.6, p.2274-2282, 2002.
- MARINHO, A.A.M. Protozoários ciliados no rúmen de ovinos em pastoreio. *Rev. Port. Ci. Vet., Lisboa*, v 78, n. 467, 1983.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. 7. Ed.. Washington: National Academy Press, 1996.
- NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LUCCI, C.S.; OLIVEIRA, M.E.M.; MELOTTI, L.; VALVASORI, E.; LIMA, C.G.; CUNHA, J.A. Influencia da soja fornecida crua, tostada ou como farelo de soja, na composição de rações para bovinos, sobre o número e gêneros de protozoários ciliados do rúmen. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo*, v 27, n 1, p 123-127, 1990.
- NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LUCCI, C.S.; OLIVEIRA, M.E.M.; MELOTTI, L.; VALVASORI, E.; 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. 27, n 2, p 215-221, 1992.

- NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; OLIVEIRA, M.E.M.; ZANETTI, M.A.; VELLOSO, L.; SCHALCH, F. Avaliação dos protozoários ciliados no rúmen de zebuínos da raça Nelore, cruzados Caracu vs. Nelore e cruzados Gir vs. Caracu vs. Nelore em regime de confinamento. ARS Vet., Jaboticabal, v.9, n.1, p.40-45, 1993.
- NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LEME, P. R.; RIBEIRO, F. G.; TITTO, E.A.L.; TOLEDO, L.R.A., OLIVEIRA, M.E.M.; PÁDUA, M.B. Bagaço de cana de açúcar em dieta com alto concentrado para bovinos jovens. 2. Protozoários ciliados no rúmen. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, Porto Alegre, 1999. Anais... Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. (CD-ROM).
- OLIVEIRA, M.E.M; WATANABE, I; NOGUEIRA FILHO, J.C.M. Ultra estrutura de membrana celular de *Dasytricha ruminatum* encontrada no líquido ruminal de bubalinos *Bubalus bubalis* da raça Mediterrânea. In: SIMPÓSIO TÉCNICO ESP. ULTRAESTRUTURA DE MEMBRANAS, 1992. p. 63-64.
- ORTOLANI, E.L.; TAKIMOTO, C. Estudos comparativos da fauna no rúmen entre o *bos taurus*, *bos indicus* e mestiços. Aspectos quantitativos. Arq. Bras. Med.Vet. Zoot., Belo Horizonte, v.39, p.81-91, 1987.
- PUNIA, B.S.; LEIBHOLTZ, S. Protozoal nitrogen in the stomach of cattle. Can. J. Anim. Sci., Ottawa, v. 64 (supl.), p. 24-25, 1984.
- PUNIA, B.S.; LEIBHOLTZ, S.; FAICHNEY, G.J. The role of rumen protozoa in the utilization of paspalum (*Paspalum dilatatum*) hay by cattle. Br. J. Nutr., London, v.57, p. 395-406, 1987.
- PURSER, D.B.; MOIR, R. J. Variations in rumen volume and associated effects as factors influencing metabolism and protozoa concentrations in the rumen of sheep. J. Anim. Sci., Champaign, v.25, p.516-520, 1966.
- ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: JAMES, W. P. T.; THEANDER, O. The analysis of dietary fiber in food. New York: Marcel Dekker, 1981. p.123-158.
- ROSENBERGER, G. Exame clínico dos bovinos. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. ,1987. p.193-208.
- SAS Institute Inc. SAS User's guides: statistics. Ver. 5 ed.. SAS Inst., Cary, NC, 1985.
- TILEY, J.M.A.; TERRY, R.A. Two-stage technique for the in vitro digestion of forage crop. J. Brit. Grassl. Soc., Oxford, v.18, p.104-111, 1963.
- VANCE, R. D.; PRESTON, R.L.; KLSTERMAN, E.W.; CAHILL, V.R. Utilization of whole shelled and crimped corn grain varying proportions of corn grain silage by growing-finishing steers. J. Anim. Sci., Champaign, v.35, p.598-605, 1972.
- VANDERWATH, J. G.; MYBURGH, S. J. Studies on the alimentary tract of merino sheep in South Africa. VI. The role of infusoria in ruminal digestion with some remarks on ruminal. Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Indust., Transvaal, v. 17, p. 61-88, 1941.
- VEIRA, D.M. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. J. Anim. Sci., Cambridge, v. 63, p.1547-1560, 1986.
- WESTERLING, B. Rumen ciliate fauna of semi-domestic reindeer (*Rangifer tarandus* L.) in finland: Composition, volume and some seasonal variations. Acta Zool. Fenn., Helsinki, v. 127, p. 1-76, 1970.
- WILLIANMS, A.G.; COLEMAN, G.S. The rumen protozoa. In: The rumen microbial Ecosystem. London: Elsevier Applied Science, 1988. p.77-128.
- WILLIANMS, A.G.; COLEMAN, G.S. The rumen protozoa. London: Springer-Verlag, 1991. 441 p.