

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA DE APOIO À INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO AMAZONAS

ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LÍQUIDO RUMINAL DE BOVINOS
CRIADOS NO MUNICÍPIO DE PARINTINS, AM: IDENTIFICAÇÃO,
DINÂMICA E EFICIÊNCIA ENZIMÁTICA DA MICROBIOTA

Bolsista: Edson Ferreira de Figueiredo Neto, FAPEAM

PARINTINS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA DE APOIO À INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL
PIB- A/0016/2012
ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO LÍQUIDO RUMINAL DE BOVINOS
CRIADOS NO MUNICÍPIO DE PARINTINS, AM: IDENTIFICAÇÃO,
DINÂMICA E EFICIÊNCIA ENZIMÁTICA DA MICROBIOTA

Bolsista: Edson Ferreira de Figueiredo Neto; UFAM
Orientadora: Prof^aM.Sc. Angela Maria da Silva Lehmkuhl

PARINTINS
2013

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Relação Água-Solo-Planta-Animal aliado a Sustentabilidade da Amazônia e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada Universidade Federal do Amazonas, através do Programa de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Relação Água-Solo-Planta-Animal aliado a Sustentabilidade da Amazônia.

RESUMO

Os animais ruminantes possuem uma complexa população microbiana que tem a capacidade de reverter alimentos com baixo teor de proteínas em proteína microbiana capaz de suprir as necessidades dos animais. Neste contexto, é importante relacionar o processo de digestão do rúmen com o tipo de alimento que o animal está recebendo e as condições ambientais a qual ele é submetido. O estudo dessa comunidade ainda é incipiente no Brasil e precisa de mais pesquisas para entender a dinâmica dos microrganismos do rúmen e obter um aproveitamento efetivo destes no processo nutricional do animal. O município de Parintins, AM, possui clima quente e úmido com períodos de cheia (dezembro a maio) e seco (junho a novembro), de modo que os animais são transportados para lugares diferentes e submetidos a pastagens diferentes de acordo com o nível das águas. O trabalho teve como objetivo caracterizar a população microbiana do rúmen de bovinos confinados com dieta específica, a fim de subsidiar trabalhos que envolvam produção e nutrição animal. O líquido ruminal foi coletado com auxílio de uma sonda oro-ruminal, de dois animais com dietas distintas, durante o período de setembro de 2012 a maio de 2013. Essas amostras foram cultivadas para análise microbiológica em meio anaeróbico e aeróbico. As bactérias foram isoladas para extração do material genético e posterior seqüenciamento para identificação. As formas fúngicas foram avaliadas e identificou a presença de levedura do gênero *Pichia* tanto em meio aeróbico como anaeróbico. Foram identificadas as espécies *Epidinium* sp.1, *Epidinium* sp.2, *Epidinium* sp.3, *Eudiplodinium* sp., *Diplodinium* sp.1, *Entodinium* sp1, *Entodinium* sp.2, *Entodinium* sp.3 e *Dasytricha* sp.

ABSTRACT

Ruminant animals have a complex microbial population that has the ability to reverse food with low protein content of microbial protein able to meet the needs of animals. In this context, it is important to relate the rumen digestion process with the type of food the animal is receiving and environmental conditions to which it is subjected. The study of this community is still incipient in Brazil and need more research to understand the dynamics of microorganisms in the rumen and obtain an effective use of these animal nutrition in the process. The city of Parintins, AM, has hot and humid climate with periods of flooding (December-May) and dry (June-November), so that the animals are transported to different places and subjected to different pastures according to the level of water. The study aimed to characterize the microbial population of the rumen of feedlot cattle with specific diet in order to subsidize work involving production and animal nutrition. The rumen fluid was collected with the aid of an oro-ruminal probe, two animals with different diets during the period September 2012 to May 2013. These samples were cultured for microbiological analysis in an anaerobic and aerobic. Bacteria were isolated for extraction of genetic material and subsequent sequencing for identification. The fungal forms were evaluated and identified the presence of yeast of the genus *Pichia* both aerobic and anaerobic environment. Species were identified *Epidinium* sp.1, *Epidinium* sp.2, *Epidinium* sp.3, *Eudiplodinium* sp., *Diplodinium* sp.1 *Entodinium* sp1, *Entodinium* sp.2, *Entodinium* sp.3 and *Dasytricha* sp.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	7
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
5 CONCLUSÕES	13
6 REFERÊNCIAS.....	14
7 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	15

1 INTRODUÇÃO

Os ruminantes têm a capacidade de transformar celulose e outros polissacarídeos em proteína de alto valor biológico, adaptação que animais não ruminantes não possuem com tanta eficiência. Isto se deve a simbiose entre ruminantes e microrganismos anaeróbios presentes no rúmen. Estes também são capazes de utilizar fontes de nitrogênio não protéico para sintetizar aminoácidos e vitaminas (SWENSON & REECE, 2006; BERCHIELLI et al. 2006).

A microbiota presente no rúmen é composta de bactérias, fungos e protozoários e para ser eficiente é necessário manter a ingestão de alimentos com teor fibroso somado aos demais nutrientes necessários. O rúmen possui temperatura que varia de 38 a 42°C, pH tampão variando de 5,5 a 7 e anaerobiose (HOOVER & MILLER, 1991).

Essa particularidade na nutrição de ruminantes serve para mostrar que é extremamente importante manter um equilíbrio no ambiente ruminal, capaz de maximizar a eficiência da microbiota ligada a taxa de crescimento do bovino, alcançando a eficiência nutricional com os suplementos oferecidos.

Com isso, o estudo da dinâmica ruminal relacionado ao tipo de alimento oferecido aos animais e o acompanhamento do ganho de peso, pode nos trazer informações sobre a eficiência microbiana em assimilar e transformar o alimento oferecido em material de alto valor biológico, podendo trazer melhorias nas técnicas de alimentação.

O município de Parintins no interior do Amazonas localiza-se na margem direita do rio Amazonas e tem clima equatorial quente e úmido, com períodos de seca (junho-novembro) e cheia (dezembro à maio). Essa característica ambiental submete os animais a diferentes tipos de alimentação à pasto, já que são transportados para outros pastos em conformidade com o nível da água do rio, levando à uma adaptação da microbiota ruminal e do processo de digestão, já que animais criados extensivamente estão submetidos a diferentes tipos de forragem de acordo com a época do ano.

O objetivo do trabalho foi caracterizar a microbiota ruminal e se houve diferença qualitativa da população microbiana ruminal de bovinos confinados com diferente concentração de farelo de cupuaçu na dieta.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Hungate (1969) foi o precursor dos estudos com microrganismos anaeróbios do rúmen com o desenvolvimento de técnicas de cultivo de anaeróbios. Hoje, com o advento de técnicas de biologia molecular, especialmente aquelas que utilizam sondas moleculares, o estudo da ecologia de sistemas microbianos, imunologia e interações entre os microrganismos e o animal hospedeiro, têm permitido o melhor entendimento sobre o assunto e futuramente a descrição completa desses microrganismos e sua dinâmica (STAHL *et al.*, 1996).

Segundo Hoover & Miller (1991) o rúmen é uma ambiente favorável ao desenvolvimento de um grande número de microrganismos anaeróbios, tendo características únicas como temperatura em torno de 38 a 42°C, sendo normalmente a temperatura mais comumente encontrada de 39°C. O pH pode variar de acordo com a natureza da dieta, porém normalmente se encontra entre 5,5 a 7,0, sendo que valores de pH abaixo de 6,0 podem comprometer a sobrevivência das bactérias fermentadoras de fibra e diminuir a síntese de proteína microbiana (RUSSELL & STROBEL, 1987).

A eficiência digestiva dos ruminantes se deve a uma complexa microbiota composta de bactérias, fungos e protozoários, responsáveis pela digestão dos alimentos ingeridos. Os ruminantes possuem um pré-estômago dividido em região não secretora, formada pelo retículo, rúmen e omaso, onde ocorre a atividade microbiana e região secretora (abomaso) responsável pela digestão enzimática (LEEK, 2006). Theodorou & France (2005) complementam dizendo que o rúmen-retículo apresenta mais de 50% da capacidade digestiva, constituída de 10^{10} bactérias, 10^6 protozoários e 10^4 fungos por mililitro de conteúdo ruminal.

A classificação dos principais grupos de bactérias ruminais está relacionado com o processo de degradação da fibra vegetal, sendo classificadas como bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais, bactérias fermentadoras de carboidratos não-estruturais, lipolíticas, proteolíticas, metanogênicas que são as mais estritamente anaeróbicas do rúmen e as anaeróbias facultativas.

Para Van Soest (1994) os protozoários podem contribuir com mais da metade da massa microbiana no rúmen. 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).

Os fungos anaeróbicos fazem parte da microflora natural do rúmen e sua ocorrência é conhecida desde a década de 70 (ORPIN & JOBLIN, 1988). As principais

cepas, *Neocallimastixfrontalis*, *Piromycescommunis* e *Orpinomycesjoyoni* degradam celulose com maior eficiência do que as principais espécies de bactérias celulolíticas ruminais. Há evidências de que a inoculação ruminal com fungos pode melhorar a digestão da fibra e também a ingestão e o crescimento de ruminantes jovens, pois, segundo Grenet & Barry (1988) os fungos são capazes de digerir celulose e hemicelulose, mesmo quando estes carboidratos estão presentes em paredes celulares lignificadas.

No Brasil, estudos que avaliem a microbiota do rúmen, utilizam as técnicas de digestibilidade *in vitro*, onde um ambiente anaeróbico é criado em saquinhos com microrganismos do rúmen e a ingesta a ser oferecida aos animais. Essa técnica é mais fácil de ser conduzida do que *in vivo*. Com essa técnica, alimentos alternativos podem ser testados antes de serem oferecidos aos animais. Destaca-se os trabalhos de Geronet *al.* (2007).

Tomichiet *al.* (2004) avaliaram a digestibilidade *in vitro* de silagens de girassol para ser usado no lugar do milho, no entanto concluíram que a inserção desse produto precisa ser limitado e calculado para não prejudicar os bovinos.

Almeida (2010) coletou líquido ruminal de animais submetidos a diferente dieta alimentar, com objetivo de verificar a comunidade de bactérias e fungos que estavam presentes no rúmen. Para tanto, foi realizada análise microbiológica em meios de cultura específicos com o líquido ruminal coletado. A identificação das bactérias foi molecular. Em seus estudos ela identificou diferença na eficiência enzimática dos fungos entre os animais estudados. Sugere-se que mais estudos sejam realizados para aperfeiçoar o uso biotecnológico dessas espécies, a fim de melhorar a produtividade e saúde dos bovinos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de líquido ruminal foram realizadas no Parque de Exposições Agropecuária de Parintins “Luis Lourenço de Souza”, localizado na rodovia Odovaldo Novo, no município de Parintins, AM. Foram realizadas coletas de dois bovinos da raça Nelore, não castrados, com aproximadamente 12 meses de idade e peso inicial médio de 250 kg, as dietas fornecidas eram isoprotéicas de 35% PB, sendo os ingredientes dessas dietas: Farelo de cupuaçu, farelo de soja, casquinha de soja, uréia, sulfato de amônia e mistura mineral. O que diferenciou às dietas foi a quantidade de farelo de cupuaçu adicionado na mesma. Os animais que foram submetidos às coletas eram das dietas que continham 25 e 50% de farelo de cupuaçu, estes estavam confinados em baias individuais de 80m² (piso totalmente concretado),

providas de bebedouros e cochos para forragem e suplementos, alocados em um galpão coberto, com pé direito de 4 metros com cobertura de telhas de cimento amianto. Cada animal será considerado uma unidade experimental.

Para retirada do líquido ruminal os animais foram contidos em troncos e presos com cinta para manter a segurança do manejador e do animal (Figura 1). Foi utilizada uma sonda oro-ruminal flexível com ponteira de inox e bomba á vácuo para fazer a sucção (Figura 2 e 3). Cerca de 100ml da amostra ruminal foram retirados e armazenada em garrafa térmica pré-aquecida, estabilizando em temperatura em torno de 40°C, semelhante ao do rúmen (Figura 4). Um alíquota de 10ml foi analisada em campo, observando odor, cor, viscosidade, pH e tempo de reação do azul de metileno (PRAM) na concentração de 0,03% (Figura 5, 6 e 7).



Figura 1. Bovino contido no tronco através da cinta



Figura 2. Introdução da sonda oro-ruminal flexível para retirada do líquido ruminal



Figura 3. Sucção do líquido ruminal



Figura 4. Garrafa térmica pré-aquecida



Figura 5. Teste colorimétrico do pH



Figura 6. Teste do azul de metileno (PRAM) na concentração de 0,03%

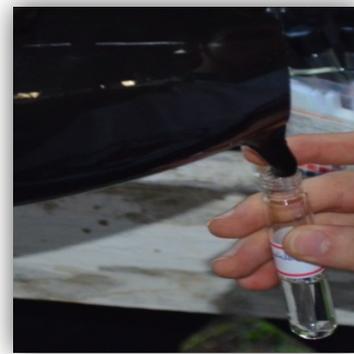


Figura 7. Fixação dos protozoários no formaldeído

O restante da amostra coletada foi encaminhado ao laboratório de Microbiologia, Histologia e Fisiologia do ICSEZ.

O cultivo de bactérias se deu em meio ágar nutriente para isolamento das colônias para posterior extração do DNA realizado no laboratório de Biotecnologia do ICSEZ. A extração de DNA seguiu a seguinte metodologia:

As colônias dos cultivos de bactérias foram raspadas e centrifugadas por 5 minutos a 9.700 giros, descartando o sobrenadante;

O precipitado foi ressuscitado em 500 μ L de TE (Tris-HCl 1M pH 7,5; 10ml de EDTA 0,5M pH 8, 2ml; de água destilada, 1000ml) seguido de centrifugação por 10 minutos e descartando o sobrenadante;

Ressuscitou-se o sobrenadante em 500 μ L de TE e levou-se ao banho maria por 15 minutos a 97°C;

30 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% foi adicionado, para auxiliar na lise da parede celular;

Adicionou-se 0,5g de sílica na amostra dentro de eppendorf e agitou em vórtex por 15 minutos para auxiliar no processo de lise da parede celular;

Após a agitação, foram adicionadas 500 μ L de fenol saturado, logo em seguida homogeneizadas e centrifugadas a 9.700 giros por 10 minutos;

A fase superior foi transferida para um novo tubo e 200 μ L de fenol e 200 μ L de clorofórmio foram adicionadas;

A solução foi homogeneizada por inversão e posteriormente centrifugada a 9.700 giros por 5 minutos;

Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo, adicionando-se 10% (50 μ L) do volume de NaCl 5M e 60% (300 μ L) do volume de isopropanol. Incubou-se por 5 minutos em temperatura ambiente e em seguida foi centrifugada por 10 minutos a 9.700 giros;

Descartou-se o sobrenadante, e lavou-se o DNA com 400 μ L de etanol 70% a fim de eliminar o excesso de NaCl, centrifugando por 2 minutos a 9.700 giros;

Removido o sobrenadante, a amostra foi seca a 37°C por uma hora e ressuscitada em 100 μ L de água bi-distilada por 24 horas e estocar a -20°C.

O cultivo de fungos foi realizado em meio ágar Sabourand acrescido de cloranfenicol, como proposto por Lacaz et al. (2002), onde a amostra ruminal foi inoculada com swab em placas de petri e coloca-se em estufa a 37°C deixando cultivar por 21 dias para o crescimento das colônias para verificar a presença de fungos aeróbios e em câmara anaeróbica para verificar o crescimento de fungos anaeróbios.

A descrição das formas fúngicas da amostra se deu por microcultivo com lâminas de microscopia, e fotografadas em fotomicroscópio. Quando necessário as amostras foram coradas com azul de metileno para melhor visualização das amostras.

Para análise da população de protozoários, 10ml da amostra foi fixada no momento da coleta com 10ml de formaldeído e em laboratório a amostra foi corada com verde brilhante, azul de metileno e lugol para confecção de lâminas para análise e identificação dos grandes grupos utilizando microscópio óptico. As amostras de protozoários foram fotografados em fotomicroscópio acoplado com câmara Zeiss ICc3.

A análise dos dados deu-se por estatística descritiva básica, testes de significância, análise multivariada e de agrupamento para descrever, caracterizar e diferenciar a microbiota nos diferentes animais e em coletas distintas, a fim de verificar se houve alguma mudança significativa na população microbiana em relação ao tipo de alimento oferecido e época do ano. Os programas que serão utilizados são MINITAB 14, PAST e EXCEL.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas duas amostras de líquido ruminal de bovinos nelore confinados. Para ambos os animais era fornecido uma dieta com 35% PB de modo que na dieta do animal 1 havia 25% de farelo de cupuaçu e na dieta do animal 2 a ração apresentava 50% de farelo de cupuaçu.

As características do líquido ruminal analisadas em campo foram cor, odor, viscosidade, pH e tempo de reação do azul de metileno (PRAM) na concentração de 0,03% (tabela 1).

Tabela 1 – Características do líquido ruminal dos animais 1 e 2 verificadas no momento da coleta.

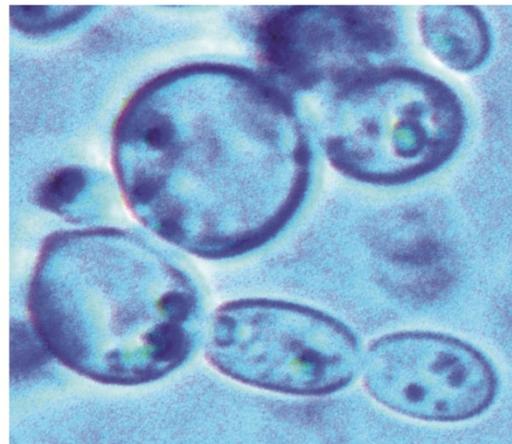
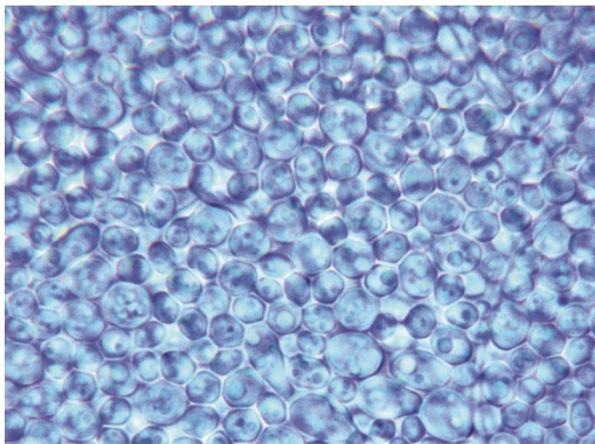
	cor	odor	viscosidade	ph	PRAM
Animal 1	verde oliva	aromatico	presente alta	8	3 minutos
Animal 2	verde escuro	aromatico	presente média	8	6 minutos

As amostras apresentaram-se verdes, com viscosidade levemente espessa e odor aromático. Segundo Dirksen (1993), o suco ruminal com essas características apresentaria uma microbiota levemente ativa.

O pH das amostras coletadas foram 8, o que segundo Gonzáles et al. (2000) Detecta-se pH alto (8,0 a 10,0) em vigência de putrefação de proteína ou se a amostra estiver misturada com saliva. O pH varia de acordo com o tipo de alimento e o intervalo temporal entre a última refeição e a obtenção de uma amostra para verificação do pH. Toda via o pH normal varia de 6,2 a 7,2, devendo ser verificado imediatamente após obtenção de amostra com tira de variação ampla de pH. Já um pH baixo (4,0 a 5,0) é encontrado após consumo de carboidrato. Em geral um pH abaixo de 5,0 indica sobrecarga por grãos.

Segundo Abrão (2011), o tempo de redução do azul de metileno poderia ser justificado pelo tempo de jejum em que o bovino se encontrava, o que proporciona a redução na concentração das enzimas redutoras. Estudos mostram que a dieta fornecida para os animais influencia diretamente na redução do azul de metileno. Para Dirksen (1993), uma dieta com elevada proporção de concentrado provoca redução de apenas um minuto, e uma dieta constituída exclusivamente de feno pode levar à redução de três a seis minutos. As dietas nesse experimento são isoprotéicas de 35% PB, o que levaria a uma redução do azul de metileno mais rápida, porém o último fornecimento da dieta fora as 07:00 horas e a coleta sucedeu-se pelo horário de 17:00 horas, então se subentende que o tempo de jejum tornaram as enzimas redutoras menos eficientes ou há uma redução das mesmas.

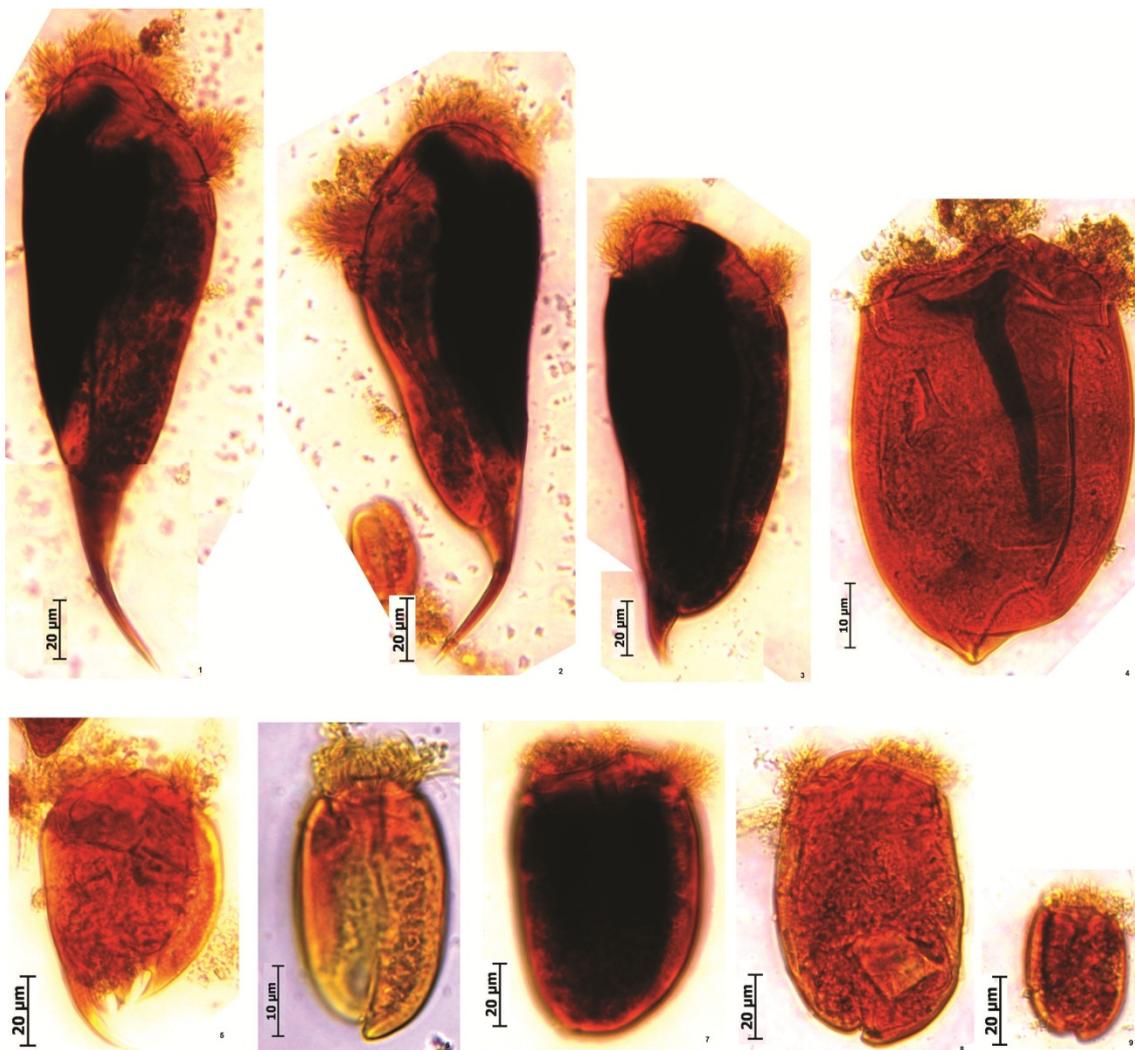
O cultivo de fungos deu positivo para as amostras cultivadas em meio aeróbio e anaeróbio. Fungos leveduriformes foram os mais encontrados nas amostras, sendo o gênero *Pichia* muito comum (Prancha 1). O que corrobora com os dados de Almeida et al. (2012) que 38 isolados de levedura foram selecionados e sujeitos a identificação por meio de testes bioquímicos e fisiológicos e análise de sequências de rDNA, consolidou com 32 isolados indicaram que correspondia ao espécies *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*), quatro para as espécies *Candida glabrata*, e duas foram identificadas como *Candida pararugosa*. Sendo que Todas as amostras de *P. membranifaciens* apresentaram capacidade de utilização de etanol, e isso poderia indicar um possível efeito benéfico, por reduzir perdas no processo de fermentação ruminal. A levedura, após crescer e utilizar esse substrato poderia compor parte da proteína microbiana ruminal e ser utilizada pelo hospedeiro (Abrão, 2011).



Prancha 1 - Fig. 1 *Pichia* sp.1; Fig. 2 *Pichia* sp.2, Fig. 3 *Pichia* sp.3

A população de protozoários foi encontrada somente no animal 1, sendo as espécies encontradas *Epidinium* sp.1, *Epidinium* sp.2, *Epidinium* sp.3, *Eudiplodinium* sp., *Diplodinium* sp.1, *Entodinium* sp1, *Entodinium* sp.2, *Entodinium* sp.3 e *Dasytricha* sp. (Prancha 2). Na amostra ruminal do animal 2 não foi possível visualizar protozoários, isso pode estar relacionado com a troca da dieta de sal mineral para 75% de farelo de cupuaçu, trazendo uma diminuição no pH do rúmen e causando uma defaunização, alterando a dinâmica da população microbiana no processo de digestão.

O qual teve os mesmo resultados que no trabalho de Franzolin & Franzolin (2000), sendo os principais grupos encontrados de protozoários ciliados no rúmen foram do gêneros *Entodinium*, *Epidinium*, *Isotricha* e *Dasytricha*. Com isso se observa que de acordo com o tipo de alimentação disponível ao ruminante, o mesmo fará com que ao ingerir alimento diferenciado a sua população de protozoários se torne diferenciada ao longo do tempo para se adaptar a melhor utilização do alimento, de acordo principalmente com o nível de concentrado e volumoso disponível na dieta.



Prancha 2 - *Epidinium* sp.1, *Epidinium* sp.2, *Epidinium* sp.3, *Eudiplodinium* sp., *Diplodinium* sp.1, *Entodinium* sp.1, *Entodinium* sp.2, *Entodinium* sp.3 e *Dasytricha* sp.

5 CONCLUSÕES

Em relação aos resultados demonstrados, evidenciou-se que o presente líquido ruminal está de acordo com os encontrados nas revisões e apresentaram resultados semelhantes, com apenas uma ressalva nos protozoários que houve uma grande quantidade da espécie *Epidinium* sp., o que pode estar relacionado com o tipo de alimentação fornecida. As análises tiveram seu início tardio, pois a chegada dos reagentes não coincidiu com a data de entrega. A extração de DNA das bactérias não pôde ser concluída a tempo, mas o seqüenciamento será realizado assim que terminarmos o processo. O número reduzido dos números amostrais está relacionado com a falta de disponibilidade de animais.

É importante conhecer a dinâmica da população microbiana para que os animais não sofram perdas de peso por receber um tipo de alimentação não

adequada. O uso de alimentos alternativos para os produtores amazonenses deve ser melhor visto para não ocasionar perdas.

6 REFERÊNCIAS

ABRÃO, F.O.; FREITAS, C.E.S.; DUARTE, E.R. et al. Leveduras no rúmen de caprinos e bovinos de corte criados em pastagem tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p.526-529, 2011.

ALMEIDA, P. N. M. et al. Aerobic fungi in the rumen fluid from dairy cattle fed different sources of forage1, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.11, p.2336-2342, 2012.

ALMEIDA, P. N. M. **População microbiana ruminal e atividade celulolítica de fungos provenientes de bovinos leiteiros alimentados com diferentes forragens**. 2009. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia), Universidade Federal de Minas Gerais, MG, 2010

DIRKSEN, G. Sistema digestivo. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. (Eds.). Rosenberger: **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1993. p.167-169.

GONZÁLES, F. H. D.; BORGES, J. B.; CECIM, M. (Eds.). **Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos**. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2000.

GRENET, E., BARRY, P. Colonization of thick walled plant tissues by anaerobic fungi. **Animal Feed Science Technology**.v.19, n.1-2. 1988.

HOOVER, W. H.; MILLER, T.K. **Rumendigestive physiology and microbial ecology**.The Veterinary Clinics of North America. In: SNIFFEN, C.J. & HERDT, T.H. (Eds).1991.p.311-325.

Hungate, R. E. **A roll tube method for cultivation of strict anaerobes**. In: J. R. Norris, D. W. Ribbons (ed.); ed. New York City, NY , Academic Press, Inc.,1969. p.117 - 132.

GERON, L. J. V.; ZEOULA, L. M.; BRANCO, A. F.; ERKE, J. A.; PRADO, O. P. P.; JACOBI, G. 2007. Caracterização, fracionamento protéico, degradabilidade ruminal e digestibilidade *in vitro* da matéria seca e proteína bruta do resíduo de cervejaria úmido e fermentado. **Acta Sci. Anim. Sci. Maringá**. v. 29, n. 3, p. 291-299.

KOSLOSKI, G.V. **Bioquímica de ruminantes**.2002, 140p.

LEEK, B. F. Digestão no Estômago do Ruminante. In: SWENSON, M.J, REECE, W.O. (Ed.) **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12^a. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. 926p.

Mackie, R.. Gut **environment and evolution of mutualistic fermentative digestion**. In: R. Mackie, B. A. White (ed.); *Gastrointestinal Microbiology*. New York, NY , International Thompson Publishing,1997. p.13-38.

ORPIN, C. G., JOBLIN, K. N. The rumen anaerobic fungi In: HOBSON P. N. e STEWART, C.S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. 2 ed. London: Chapman & Hall, 1988. p.140-195.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H.J. Concentration of ammonia across cell membranes of mixed rumen bacteria. *Journal of Dairy Science*. 1987.

RUSSELL, J.B. **Rumen Microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, NY, 2002.119p.

Stahl, D. A. **Molecular approaches for the measurement of density, diversity, and phylogeny**. In: C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, M. V.Walter (ed.); *Manual of environmental microbiology*. 1st ed. Washington, D.C. , ASM Press, 1996.

SWENSON, M.J, REECE, W.O. *Fisiologia dos Animais Domésticos*. 12ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.

THEODOROU, M.K.; FRANCE, J. **Rumen microorganisms and their interactions**. In: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. DIJKSTRA, J.; FORBES, J.M.; FRANCE, J.(eds). 2 ed. 2005.p.207-228.

TOMICHI, T. R.; GONÇALVES, L. C.; TOMICHI, R. G. P.; RODRIGUES, J. A. S.; BORGES, I.; RODRIGUEZ, N. M. 2004. Características químicas e digestibilidade *in vitro* de silagens de girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 33, n. 6, p. 1672-1682.

VALADARES FILHO, S. DE C.; PINA, D. DOS S. Fermentação Ruminal. IN: BERCHIELLE, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2 ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

WILLIAMS, A. G. Rumen holotrich ciliate protozoa. **Microbiology Reviews**. v. 50, n. 1, 1986.p. 25-49.

7 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
		2012					2013						
01	Revisão Bibliográfica	X	X										
02	Coleta do líquido ruminal						X	X	X	X	X		
03	Coleta das forragens e						X	X	X	X	X		

