

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

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 - AM

2014

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

RELATÓRIO FINAL

PIB-A/0090/2013

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

Orientadora: Prof^a M.Sc. Angela Maria da Silva Lehmkuhl

PARINTINS - AM

2014

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciências Agrárias e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciências Agrárias.

RESUMO

Os animais ruminantes possuem uma complexa população microbiana responsáveis pelo processo de digestão do alimento e por tornar disponível compostos essenciais ao metabolismo do animal. O estudo sobre a dinâmica da comunidade ruminal de ambientes tropicais precisa ser melhor entendida para que avanços nas pesquisas sobre digestibilidade de alimentos sejam avançados. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo conhecer a população de protozoários e ação enzimática dos fungos presentes no rúmen de bovinos criados a pasto no município de Parintins, AM. Para tanto, foram coletados 50 mL de líquido ruminal de 50 bovinos recém abatidos no abatedouro municipal. Foram mensurados pH, odor e cor do líquido ruminal, os protozoários foram identificados e contados em câmara Sedgewick-Rafter. Para analisar atividade celulolítica dos fungos, os isolados foram inoculados em meio CMC e utilizou-se a técnica de vermelho congo para verificar o halo que indica a degradação da celulose. Foram identificadas 74 espécies de protozoários distribuídas em 14 gêneros, sendo estes: *Ostracodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Metadinium*, *Entodinium*, *Polyplastron*, *Enoploplastron*, *Diploplastron*, *Elytroplastron*, *Isotricha*, *Dasytrichae* *Charonina*. As espécies mais ocorrentes foram *Entodinium loboso-espinosum*, *Diplodinium tetracanthum*, *Entodinium bursa* e *Entodinium furca* f. *dilobum*. Espécies exclusivas ocorreram apenas no animal 6, a saber *Elytroplastron bubali*, *Polyplastron multivesiculatum* e *Charonina ventriculi*. O teste da atividade celulolítica em meio CMC (3%) verificou que 50% dos isolados não apresentaram atividade celulolítica, enquanto que 28% apresentaram baixa atividade e 19% apresentaram alta atividade celulolítica. Concluiu-se que a diversidade de protozoários dos animais analisados é alta, e que há diferença entre animais de localidades diferentes. Os fungos apresentaram potencial de degradação de compostos celulolíticos.

Palavras-chave: diversidade, fungos, protozoários

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	7
2. – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3 – OBJETIVOS	10
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.1 – ANÁLISE ENZIMÁTICA E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS RUMINAIS.....	11
4.2- IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PROTOZOÁRIOS	12
4.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
5. – RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
5.1 – PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS.....	13
5.2 – ANÁLISE QUALITATIVA DOS GÊNEROS DE PROTOZOÁRIOS	14
5.3 – ANÁLISE QUANTITATIVA DAS ESPÉCIES DE PROTOZOÁRIOS.....	16
5.4 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS FUNGOS RUMINAIS.....	19
6 – CONCLUSÃO	19
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
8. – CRONOGRAMA EXECUTADO	22

1 – INTRODUÇÃO

Os ruminantes têm a capacidade de utilizar carboidratos complexos como a celulose e fontes de nitrogênio não protéico e transformar em proteína de alto valor biológico, adaptação que animais não ruminantes não possuem com tanta eficiência. Sendo assim, se torna um sistema de real interesse, pois funciona como uma máquina transformadora, ao consumir a forragem e transformá-la em alimentos como carne e leite (SWENSON & REECE, 2006).

O processo de síntese de material de alto valor biológico se dá principalmente pela ação da microbiota presente no rúmen, composta de bactérias, fungos e protozoários. A microbiota tem exigências para ser eficiente, e essa exigência é mantida com a ingestão de alimentos de 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, a identificação dos microrganismos do rúmen, a relação deles com o alimento oferecido aos animais, somado ao 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.

2. – REVISÃO BILIOGRÁFICA

Os avanços tecnológicos acerca do conhecimento da microbiologia gastrointestinal do rúmen, ocorreram basicamente dos estudos de Hungate (1969) com o desenvolvimento de técnicas de cultivo de microrganismos anaeróbios. Com o advento de técnicas de biologia molecular, o estudo da ecologia de micro ecossistemas microbianos, imunologia e interações entre os

microrganismos e o animal hospedeiro, têm progredido rapidamente, permitindo o melhor entendimento sobre o assunto e descrição desses indivíduos (STAHL et al., 1996).

Segundo Hoover e Miller (1991) o rúmen é um ambiente favorável ao desenvolvimento de um grande número de microrganismos anaeróbios, tendo características únicas como temperatura em torno de 38 a 42°C, pH variando entre 5,5 a 7,0. A variação de algum desses parâmetros pode modificar a microbiota trazendo consequências para as vias metabólicas do animal (RUSSELL e 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 rúmen, retículo e omaso, onde ocorre a atividade microbiana e região secretora, abomaso responsável pela digestão enzimática (LEEK, 2006). Theodorou e 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 das bactérias ruminais podem variar de acordo com eficiência em degradar o substrato ofertado ao animal, segundo Koslozki (2002) elas podem ser fermentadoras de carboidratos estruturais (CE), que degradam componentes da parede celular dos vegetais, particularmente celulose e hemicelulose, como por exemplo as espécies *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*. Fermentadoras de carboidratos não-estruturais (CNE) associam-se às partículas de grãos de cereais ou grânulos de amido e podem utilizar amônia, aminoácidos ou peptídeos para síntese de suas proteínas, como por exemplo, *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus* e *Lactobacillus* sp.. Proteolíticas, que compõem a maior parte das espécies bacterianas ruminais que degradam proteínas, por exemplo, *Peptostreptococcus* sp., *Prevotella ruminicola* e *Streptococcus bovis*.

As bactérias metanogênicas são as mais estritamente anaeróbicas do rúmen, produzem metano a partir de CO₂ e H₂ derivados da atividade

fermentativa das demais espécies, como as *Methanobacterium* sp. e *Methanobrevibacter* sp. (RUSSELL, 2002).

As bactérias lácticas crescem em condições de baixo pH ruminal e utilizam, entre outros, ácido láctico como substrato energético, por exemplo *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*. Pectinolíticas fermentadoras de pectina apresentam metabolismo fermentativo semelhantes àquelas que fermentam os carboidratos não estruturais, por exemplo, *Lachnospira multiparus* e *Succinivibrio dextrinosolvens*. As lipolíticas hidrolisam triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos como, por exemplo, *Anaerovibrio lipolytica*. E finalmente as bactérias ureolíticas, que se apresentam aderidas ao epitélio ruminal e hidrolisam uréia liberando amônia no rúmen como *Enterococcus faecium* (KOSLOZKI, 2002).

A população de protozoários contribui 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 pelos protozoários (VAN SOEST, 1994; WILLIAMS, 1986).

Os fungos encontrados no rúmen, embora pouco estudados, possuem a capacidade de realizar a digestão de celulose e hemicelulose, mesmo quando estes carboidratos estão presentes em paredes celulares muito lignificadas. As principais cepas, *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces communis* e *Orpinomyces joyonii* degradam celulose com maior eficiência do que as principais espécies de bactérias celulolíticas ruminais.

O estudo referente a microbiota do rúmen, focando identificação e dinâmica da comunidade vem ganhando espaço com os avanços das técnicas de biologia molecular, principalmente no que tange a identificação de bactérias. O levantamento e quantificação das espécies de protozoários (SALVIO e D'AGOSTO, 2001; NOGUEIRA FILHO et al. 2001; LIMA et al. 2012) e fungos (ABRÃO et al. 2010; são mais comuns, já que não exigem técnicas caras para sua identificação.

A técnica de digestibilidade e degradabilidade *in vitro*, onde um ambiente anaeróbico é criado em sacos com microrganismos do rúmen e a ingesta a ser oferecida aos animais é muito comum para avaliar a eficiência da microbiota

ruminal em diferentes tipos de alimentos, desta forma, alimentos alternativos podem ser testados antes de serem oferecidos aos animais (GERON et al., 2007; TOMICHI et al., 2004).

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 locais e consomem diferentes culturas em conformidade com o nível da água do rio, levando à uma adaptação da microbiota ruminal e do processo de digestão.

3 – OBJETIVOS

O trabalho tem como objetivo conhecer a microbiota do rúmen de bovinos criados a pasto no município de Parintins, AM.

Objetivos Específicos

- Conhecer a população de bactérias, protozoários e fungos do rúmen;
- Comparar a comunidade microbiana nas diferentes coletas;
- Conhecer a origem dos animais que são abatidos no município de Parintins.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletados líquido ruminal de 50 bovinos recém abatidos no “Matadouro e Frigorífico Ozorio Melo”, município de Parintins, Amazonas nos meses de março, abril e maio de 2014. Os bovinos eram pertencentes às propriedades de gado dos municípios de Parintins e Nhamundá no estado do Amazonas e Juruti estado do Pará. Criados em modo extensivo, consumindo apenas forragem.

A coleta do líquido ruminal foi realizada na sala de evisceração do abatedouro municipal de Parintins, AM, o qual possui salas de carneamento,

descarte das vísceras, sala refrigerada. Para tanto, realizou-se um corte no rúmen e com auxílio de tubos falcon, foram retirados alíquotas de 50 mL. As amostras foram armazenadas em caixa térmica para manter em temperaturas próximas ao do rúmen.

No laboratório de Microbiologia do ICSEZ uma alíquota de 10 mL de cada amostra foi separadas em tubos de ensaio para análise do odor, cor, viscosidade, pH e tempo de reação do azul de metileno (PRAM) na concentração de 0,03%.

Foram armazenados 2 mL de líquido ruminal para futuras análises de extração de DNA das bactérias, 5 mL para identificação e quantificação dos protozoários e uma alíquota de 100 µL para cultivo dos fungos.

4.1 – ANÁLISE ENZIMÁTICA E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS RUMINAIS

O cultivo de fungos foi realizado em meio ágar Sabourand acrescido de terramicina. Inoculou-se a amostra ruminal em placas de petri, as quais foram incubadas em estufa a 37°C. O crescimento foi avaliado entre 5 e 7 dias. Após o cultivo, foram retiradas colônias fungicas para isolamento dos fungos em meio ágar Sabourand.

Após 5 dias os isolados foram inoculados em meio Carboximetilcelulose (CMC) 3%. Passado 5 dias as amostras foram incubadas por 16 horas a 50°C, passado esse período, foi realizado o teste da atividade celulolítica. Para isso utilizou-se 10 mL do corante Vermelho Congo (0,025%) em tampão Tris HCl 0,1M pH 8 em cada placa de petri, deixando agir por 30 minutos. Após 30 minutos a solução Vermelho Congo foi descartada e se colocou 5 mL de NaCl a 0,5M em tampão Tris HCl 0,1M pH 8, deixando agir por 5 minutos. Posteriormente essa solução foi descartada, então o Halo pode ser revelado.

Para quantificar a atividade celulolítica dos fungos isolados, foi mensurado o tamanho do Halo e tamanho da colônia e utilizada a fórmula $AC = DC + H / DC$, onde AC= Atividade celulolítica, DC= Diâmetro da colônia e H= Halo. De forma que quando o resultado foi 0-0,99 (-), significando ausência de atividade enzimática, de 1-1,10 (+), apresentando baixa atividade celulolítica, 1,11-1,20 (++) e 1,21-1,30(+++), apresentando média atividade celulolítica e

1.31-1,40(++++), apresentando alta atividade celulolítica (NOGUEIRA; CAVALCANTI, 1996).

Os isolados dos fungos foram armazenados em tubos de ensaio, conteúdo Glicerina 30%, para posterior identificação, que fará uso de bibliografia especializada. Todas as colônias fúngicas foram fotografadas em microscópio acoplado com câmera Zeiss modelo AxioCam ICc3.

4.2- IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PROTOZOÁRIOS

Para análise da população de protozoários, as amostras foram fixadas com formaldeído (40%), coradas com lugol e armazenadas com glicerina (30%), para manter a conservação das formas dos protozoários. Para identificação dos protozoários, utilizaram-se bibliografias clássicas e especializadas (WILLIAMS e COLEMAN, 1992; BERCHIELLI, PIRES, e OLIVEIRA, 2006; LATTEUR, 1966; IMAI, 1997). As amostras de protozoários foram fotografados em fotomicroscópio acoplado com câmera Zeiss modelo AxioCam ICc3.

Para análise quantitativa dos protozoários, utilizou-se 1 mL da amostra em câmara Sedgewick-Rafter. Contou-se 40 quadrantes e o valor obtido foi multiplicado por cinco, para ajustar ao volume total da câmara, assim obtendo-se a densidade de protozoários em 1 mL da amostra.

4.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram compilados em tabelas, utilizando software Excel. Os dados foram avaliados utilizando índice de Bray Curtis para os dados quantitativos das espécies de protozoários encontrados e gerando um dendograma de similaridade entre os animais. Para análise de similaridade entre os animais, levando em consideração os gêneros de protozoários encontrados, aplicou-se o índice de Jaccard, gerando também um dendograma de similaridade. Esses índices ajudarão na diferenciação e caracterização da microbiota nos diferentes animais e em coletas distintas, a fim de verificar diferenças na população de protozoários em relação aos animais de diferentes localidades.

Para ambas análises foi utilizado software livre PAST. A densidade da população de protozoários ainda foi avaliada quanto a abundância e dominância das espécies nas amostras. Onde as espécies abundantes foram aquelas que apresentaram densidade maior que a média de indivíduos contados. E espécies dominantes foram aquelas que apresentaram densidade maior que 50% da densidade total de protozoários nas amostras (LOBO; LEIGHTON, 1989).

5. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Segundo Radostits *et al.* (2002), o exame do líquido ruminal consiste em observar vários fatores, dentre eles a coloração que pode depender do alimento ingerido pelo animal, sendo classificado em verde, verde oliva ou castanho esverdeado. Em bovinos a pasto ou que recebam feno de boa qualidade, comumente a cor é verde escura. Quando a alimentação básica do animal é silagem ou palha (alimento seco) a cor é amarelo acastanhado. Na alimentação por grãos a cor é branca leitosa à acinzentada e nos casos de estase ruminal (fluxo digestivo parado) prolongada é esverdeado e enegrecido, pois já terá ocorrido putrefação. Nas amostras analisadas 66% apresentaram cor verde escura e 34% dos animais apresentaram com verde oliva, mostrando que mesmo em modo extensivo os bovinos recebem boa alimentação.

Quanto ao odor todas as amostras foram classificadas como aromáticas, porém 22% estavam com aroma mais acentuado, o que é descrito por Zilio *et al.* (2008) como sendo normal, já o odor de mofo ou podre em geral indica putrefação de proteína e um cheiro desagradável intenso, é indicio de formação excessiva de ácido láctico decorrente de sobrecarga por carboidratos ou grãos.

Os animais apresentaram viscosidade em seu líquido ruminal, porém 20% com uma maior viscosidade e 80% com uma menor viscosidade. Esse aspecto ligeiramente viscoso foi estabelecido como padrão fisiológico na espécie bovina (DIRKSEN *et al.* 1993).

O pH das amostras coletadas tiveram a média de 7,6, variando entre as amostras pH 7 e 8 com exceções de três animais que tiveram pH 9. Segundo Gonzáles *et al.* (2000) pH alto (8,0 a 10,0) ocorre devido a putrefação de proteína ou a presença de saliva. Segundo HOOVER (1986), a faixa de pH ideal para a ótima digestão da fibra varia de 6,2 a 7,0. 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.

O tempo da prova de determinação da atividade redutiva bacteriana, chamado de teste do azul de metileno está relacionado com a qualidade do alimento ingerido e pode chegar a até 6 minutos, sendo que em animais que recebem alimentos ricos em carboidratos não-estruturais esse tempo de redução pode ser inferior a um minuto (DIRKSEN *et al.*,1993). Segundo Radostits *et al.* (2002) os tempos são interpretados da seguinte forma: microflora normal (3 a 6 minutos), indigestão simples (mais de 8 minutos), e acidose aguda (mais de 30 minutos). O que relacionado aos resultados obtidos com 62% dos animais com microflora normal, 34% dos animais com acidose e 4% com indigestão simples.

5.2 – ANÁLISE QUALITATIVA DOS GÊNEROS DE PROTOZOÁRIOS

Foram encontrados 14 gêneros de protozoários, sendo esses: *Ostracodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Metadinium*, *Entodinium*, *Polyplastron*, *Enoploplastron*, *Diploplastron*, *Elytroplastron*, *Isotricha*, *Dasytrichae* *Charonina*. Os mais comumente encontrados foram os gêneros: *Diplodinium* ocorrentes em 90% dos animais, seguido de *Entodinium* com 80%, *Ostracodinium* 78% e *Eudiplodinium* 62%. E os gêneros exclusivos com 2% de ocorrência foram *Polyplastron* e *Elytroplastron* no animal 6 e *Enoploplastron* no animal 49.

O índice de Jaccard demonstra um dendograma qualitativo, onde se formam grupos de acordo com o grau de similaridade da população de protozoários identificados em nível de gêneros presentes nas amostras de cada animal. Foram formados 5 grandes grupos, com baixa similaridade entre eles (32%). Como o gênero compreende uma grande quantidade de espécies,

os grupos formados foram de fazendas distintas, não diferenciando em diversidade de gênero (Figura 1).

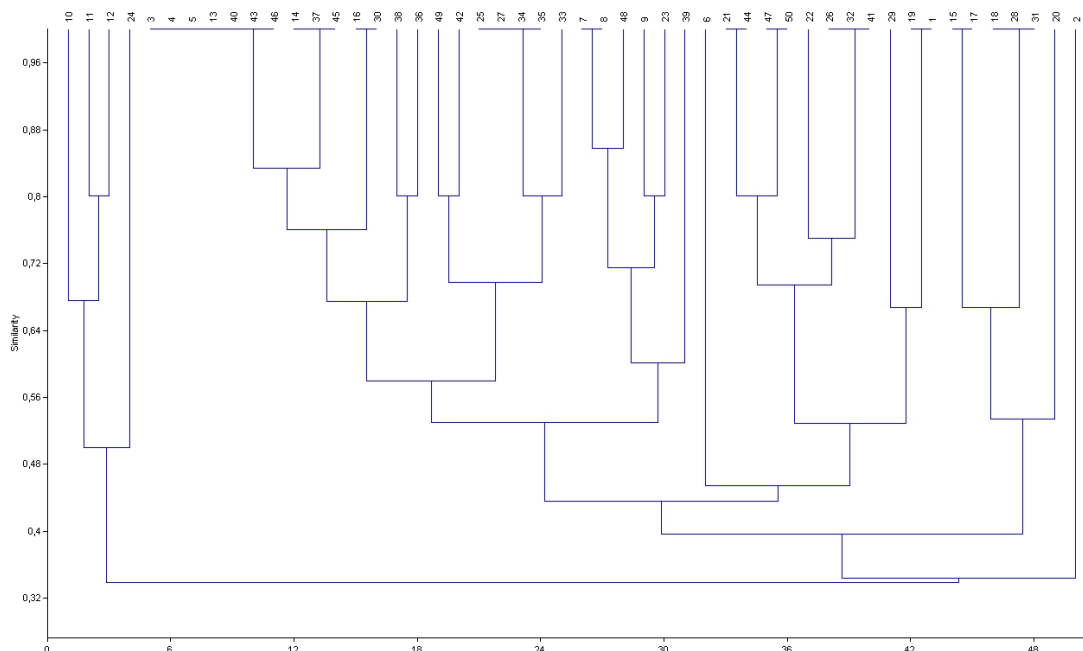


Figura 1. Dendrograma de Jaccard para os gêneros de protozoários encontrados nos bovinos obtidos no “Matadouro e Frigorífico Ozorio Melo”.

Salvio e D’Agosto (1999) encontraram 13 gêneros de protozoários em bovinos recém abatidos no Matadouro Municipal de Além Paraíba-MG. O município possui um clima equatorial, com estações definidas de período chuvoso e seco, os animais foram alimentados a pasto braquiária (*Brachiaria*), capim gordura (*Melinis*) e/ou capim colônia (*Panicum*). Os gêneros encontrados foram *Isotricha*, *Charonina*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Eudiplodinium*, *Eremomplastron*, *Ostracodinium*, *Eodinium*, *Polyplastron*, *Diplodinium*, *Diploplastron*, *Metadinium* e *Epidinium*.

Martineli *et al.* (2008) trabalhando com animais confinados em *free-stall*, sendo a base da alimentação silagem de milho e concentrado, no município de Coronel Pacheco, MG, identificou 11 gêneros de protozoários, *Diplodinium*, *Entodinium*, *Eodinium*, *Epidinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Isotricha*, *Dasytricha*, *Metadinium*, *Ostracodinium* e *Polyplastron*. Assemelhando com o resultado de outro experimento, com alimentação a base de capim-elefante

(*Penninsetum purpureum* Schum.) onde observaram 12 gêneros *Isotricha*, *Dasytricha*, *Charonina*, *Diplodinium*, *Diploplastron*, *Entodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Metadinium*, *Ostracodinium* e *Polyplastron* (MARTINELE *et al.* 2008).

Ríspoliet *al.* (2009) onde se encontrou 11 gêneros em bovinos criados em confinamento na cidade de Brasília, os quais foram alimentados a base de silagem de milho, milho em grão e farelo de soja. Os gêneros encontrados foram *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Diploplastron*, *Polyplastron*, *Metadinium*, *Ostracodinium* e *Enoploplastron*.

Em clima subtropical úmido houve uma diminuição na diversidade de gêneros, como mostra os resultados de Franzolin e Franzolin (2000) onde encontraram 9 gêneros em bovinos criados no município de Pirassununga-SP, tiveram como base da alimentação cana-de-açúcar fresca picada e 3kg de concentrado por dia. Os gêneros encontrados foram *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Epidinium*, *Ostracodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Metadinium* e *Polyplastron*. Sendo similar aos resultados de Valinote *et al.* (2005) onde teve como base da alimentação cana-de-açúcar picada como volumoso e quatro concentrados diferentes – controle, sal de cálcio de ácidos graxos, caroço de algodão, e caroço de algodão sem monensina. Os gêneros encontrados foram *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Eudiplodinium* e *Ostracodinium*.

Menor diversidade foi encontrado nos resultados de Manella e Lourenço (2004) onde foi observado 5 gêneros em bovinos, criados no sistema de pastejo rotacionado no município de Odessa-SP, com base da alimentação *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e *Leucaena leucocephala* cv. Cunnigaham. Os gêneros encontrados foram *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Isotricha* e *Dasytricha*.

5.3 – ANÁLISE QUANTITATIVA DAS ESPÉCIES DE PROTOZOÁRIOS

Foram realizadas a identificação de espécies de protozoários e contagem em 7 animais, onde se encontrou 74 espécies, as mais ocorrentes, acima de 50%, foram *Entodinium loboso-espinosum*, *Diplodinium tetracanthum*,

Entodinium bursa e *Entodinium furca* f. *dilobum*. Espécies exclusivas ocorreram apenas no animal 6, a saber *Elytroplastron bubali*, *Polyplastron multivesiculatum* e *Charonina ventriculi*.

Nos animais quantificados ocorreram 16 espécies abundantes e somente uma dominante. *Entodinium bursa* foi dominante apenas no animal 1 e abundante nos animais 3 e 5. As demais espécies abundantes foram *Entodinium loboso-espinosum* (Animais 1, 4 e 5), *Eudiplodinium* sp. 1 e *Ostracodinium* sp. 1 (3, 4 e 5), *Isotricha* sp. 1 e *Diplodinium anisacanthum* (4 e 5), *Entodinium bovis*, *Entodinium dubadi*, *Entodinium furca* f. *monolobum*, *Entodinium simplex* e *Entodinium* sp. 7 (6), *Entodinium* sp., *Epidinium caudatum*, *Eremoplastron spectabile*, *Ostracodinium minorum* e *Ostracodinium nucleolobum* (7).

O índice de Bray Curtis, gerou um dendograma quantitativo, onde houve a formação de um grupo separado dos demais indivíduos. Foi levado em consideração as espécies e a densidade de cada espécie de protozoários de cada amostra animal. Como há uma peculiaridade na presença de espécies de protozoários no rúmen, no grupo formado existem apenas animais de uma mesma fazenda, mostrando que a composição de espécies pode ser específica de um local, diferenciando entre animais de diferentes localidades, expostos a diferentes condições ambientais (Figura 2).

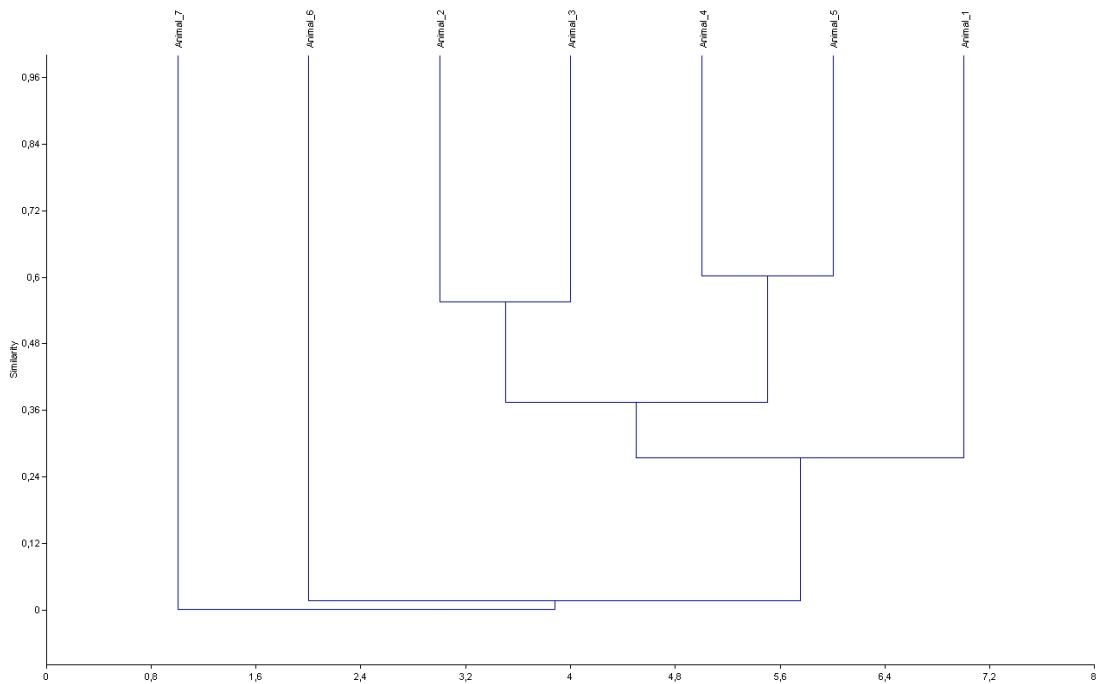


Figura 2. Dendrograma de Bray Curtis para a contagem das espécies de protozoários de bovinos abatidos no “Matadouro e Frigorífico Ozorio Melo”

Estudos sobre o metabolismo dos protozoários estão restritos principalmente a espécie *Dasytricha ruminantium*, *Isotricha intestinalis* e *I. prostoma*. Estas colonizam rapidamente os fragmentos de vegetais que entram no rúmen. E o que se verifica é que estes ciliados estão envolvidos com a utilização de carboidratos solúveis e armazenamento de polissacarídeos não estruturais, e rapidamente consomem glicose e amido disponível. Os entodiniomorífideos são protozoários que engolfam grãos de amido, no entanto, somente as espécies de *Entodinium* apresentam claro requerimento por grãos de amido. No entanto, diferentes espécies deste grupo apresenta exigências diferentes para seu ótimo enzimático, assim como associações com outras espécies de protozoários, até mesmo de fungos e bactérias (WILLIAMS; COLEMAN, 1992).

Infelizmente, trabalhos com a população de protozoários ruminais no Brasil enfocam somente a contagem e identificação em nível de gêneros. Essa prática pode estar mascarando informações importantes sobre o comportamento da microbiota no ambiente ruminal. São necessários estudos com a identificação de espécies e autoecológicos para conhecer as exigências das espécies mais comuns no rúmen. Estudos com essa temática poderiam

trazer informações relevantes sobre o metabolismo dos protozoários em animais que vivem em ambientes tropicais, podendo melhorar as dietas dos animais de acordo com seu ambiente.

5.4 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS FUNGOS RUMINAIS

Dos 50 animais amostrados, foram realizados 167 isolamentos de fungos aeróbios facultativos, de modo que 23% dos animais tiveram 3 fungos isolados, 3% tiveram 4 fungos isolados, 1,8% com cinco fungos isolados e 1,2% com 6 fungos isolados. Os animais com seis fungos isolados foram os animais 4 e 5.

O teste da atividade celulolítica em meio CMC (3%) verificou que 50% dos isolados não apresentaram atividade celulolítica, enquanto que 28% apresentaram baixa atividade e 19% apresentaram alta atividade celulolítica. Ainda tiveram três isolados fúngicos que cresceram em toda a placa, e não sendo possível contar o halo.

O estudo de fungos ruminais ainda é muito escasso. O que se sabe é que os fungos embora em menor proporção em relação as bactérias e aos protozoários, tem grande importância na degradação de tecidos vegetais altamente lignificados. Eles conseguem, através dos rizoides, penetrar nos tecidos e expor os conteúdos das células vegetais para que bactérias e protozoários atinjam essas reservas. Estudos demonstram que o acréscimo de células fúngicas na dieta de animais pode aumentar o uso de nutrientes pelos ruminantes (Lee *et al.* 2000).

6 – CONCLUSÃO

A microbiota ruminal dos animais abatidos no abatedouro municipal de Parintins, AM, possui grande diversidade de protozoários. Essa diversidade é distinta entre os animais de localidades diferentes.

A população fúngica apresenta produção de enzimas com potencial de degradação de celulose.

Neste cenário, recomenda-se uma maior atenção ao realizar estudos que visem compreender os processos fermentativos dentro do rúmen, levando em consideração o comportamento da comunidade microbiana ruminal.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, F. O.; BARRETO, S. M. P.; GERASEEV, L. C.; DUARTE, E. R. 2010. Fungos anaeróbios do rúmen de bovinos e caprinos de corte criados em pastagens tropicais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 3, p. 757-760.

BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006.

DIRKSEN G.; GRÜNDER H.D.; STÖBER M. **Exame Clínico dos Bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

FRANZOLIN, R. e FRANZOLIN, M. H. T. População Protozoários Ciliados e Degradabilidade Ruminal em Búfalos e Bovinos Zebuínos sob Dieta à Base de Cana-de-Açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Pirassununga-SP, 2000.

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 edigestibilidade *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.

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.

HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **J. Dairy Sci.**, 69(10):2755-2766, 1986.

HOOVER, W. H.; MILLER, T.K. Rumen digestive physiology and microbialecolgy. In: SNIFFEN, C.J.; HERDT, T.H.(Eds). **The Veterinary Clinics of North America**. 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.

IMAI, S. Phylogenetic taxonomy of rumen ciliate protozoa based on their morphology and distribution. **J. Appl. Anim. Res.**, 13: 17-36, 1998.

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**. 12ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. 926p.

LATTEUR, B. Contribution a la systematique de la famille des Ophyroscolecidae Stein. **Annales de la Societe Royal Zoologique de Belgique**, p. 117-144, 1966.

LEE, S. S.; HA, J. K.; CHENG, K. J.; Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. **Animal Feed Science and Technology**. v. 88, n. 201. 2000.

LIMA, M. E.; VENDRAMIN, L.; HOFFMANN, D. A. C.; LISBOA, F. P.; GALLINA, T.; RABASSA, V. R.; SCHWEGLER, E.; CORRÊA, M. N. 2012. Alterações na população de protozoários ruminais, quantificados a partir da adaptação da técnica de Dehority, de ovinos submetidos a uma dieta de confinamento. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1.

MANELLA, M. Q. e LOURENÇO, A. J. 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. **B. Industr. anim.**, Nova Odessa-SP, v.61, n.1, p.01-11, 2004.

MARTINELLI, I.; EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; ARCURI, P. B. e D'AGOSTO, M. Efeito da monensina e do óleo de soja sobre os protozoários ciliados do rúmen e correlação dos protozoários com parâmetros da fermentação ruminal e digestivos. **R. Bras. Zootec.**, v.37, n.6, p.1129-1136, 2008.

MARTINELE, I.; SIQUEIRA-CASTRO, I. C. V. e D'AGOSTO, M. Protozoários ciliados no rúmen de bovinos alimentados com dietas de capim-elefante e com dois níveis de concentrado. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.9, n.1, p. 74-81, jan/mar, 2008.

NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; MARTIN-ORÚE, S. M.; BALCELLS, J.; FONDEVILA, M.; ABLAS, D. S. 2001. Níveis de proteína degradável para novilhas em crescimento sobre a concentração de protozoários ciliados e outros parâmetros ruminais. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4. p. 945-951.

RADOSTITS, O.M.; MAYHEW, I.G.J.; HOUSTON, D.M. **Exame clínico e diagnóstico em veterinária**. 1 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 332-338, 2002.

RÍSPOLI, T. B. et al. Protozoários ciliados do rúmen de bovinos e bubalinos alimentados com dietas suplementadas com monensina ou própolis. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.44, n.1, p.92-97, janeiro, 2009.

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

