

ISABELA PENA CARVALHO DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO CAUSAL DO “EFEITO PROTEÍNA” SOBRE A ATIVIDADE
MICROBIANA EM SUBSTRATOS FIBROSOS INSOLÚVEIS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2009

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C331a
2009

Carvalho, Isabela Pena Carvalho de, 1983-
Avaliação causal do “efeito proteína” sobre a atividade
microbiana em substratos fibrosos insolúveis / Isabela Pena
Carvalho de Carvalho. – Viçosa, MG, 2009.
xii, 35f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Edenio Detmann.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal
de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 31-35.

1. Bovino de corte - Nutrição. 2. Rúmen - Microbiologia.
3. Proteínas microbianas. 4. Rúmen - Análise. I. Universi-
dade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 636.2085

ISABELA PENA CARVALHO DE CARVALHO

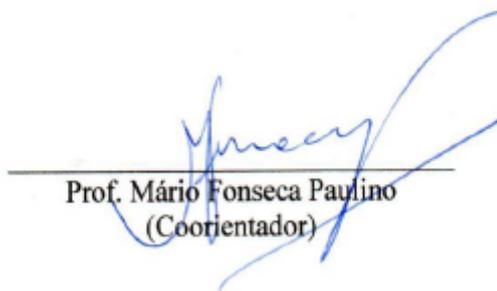
**AVALIAÇÃO CAUSAL DO “EFEITO PROTEÍNA” SOBRE A ATIVIDADE
MICROBIANA EM SUBSTRATOS FIBROSOS INSOLÚVEIS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título de
Magister Scientiae

APROVADA: 10 de Fevereiro de 2009



Prof. Sebastião de C. Valadares Filho
(Coorientador)



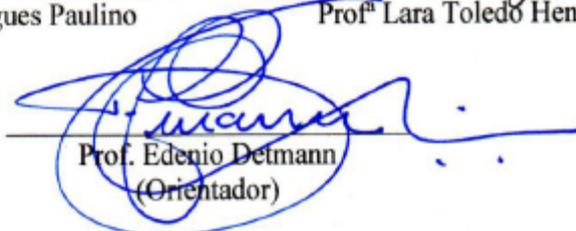
Prof. Mário Fonseca Paulino
(Coorientador)



Prof. Pedro V. Rodrigues Paulino



Prof.ª Lara Toledo Henriques



Prof. Edenio Detmann
(Orientador)

À Deus, sempre presente em minha vida,
À minha mãe, a quem devo tudo,
Ao meu avô José Lino, exemplo de trabalho e integridade,
À minha querida avó Luzia e meus tios Antônio Carlos e Maurício,
Aos meus primos Filipe, Fernanda, Geovana e Bernardo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e saúde.

À Universidade Federal de Viçosa, e ao Departamento de Zootecnia, por tornar possível a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro para realização deste trabalho (Programa Pesquisador Mineiro).

À minha amada mãe, pelo amor incondicional, cumplicidade, apoio, incentivo, compreensão e confiança.

À minha família, pelo exemplo, carinho e pelos momentos de felicidade.

À minha avozinha Luzia, pelas orações e novenas.

Aos meus tios e tias (Tó, Girlene, Maurício e Dirce) pelo apoio e cuidado.

Aos meus queridos primos, Roni, Filipe, Fernanda, Geovana, e Bernardo, cuja alegria me encoraja e enche de esperanças.

À minha prima e amiga Ninha, pela torcida sincera.

À Glória, pelo carinho e amizade.

Ao meu namorado, Bruno, pela dedicação, conselhos e por tornar minha vida mais rica.

Ao Professor Edenio Detmann, pela orientação valiosa, generosidade em transmitir conhecimento, dedicação, paciência e entusiasmo. Por ser exemplo de profissional, alguém para se espelhar.

Ao Professor Hilário Mantovani, pelos ensinamentos, atenção e por ceder generosamente as instalações do Laboratório de Anaeróbios.

Aos Professores Mário Fonseca Paulino, Sebastião Valadares, Rogério Lanna e Pedro Veiga, pelas contribuições na dissertação.

Aos professores Odilon e Obeid, pelo apoio no início dessa caminhada.

Aos demais professores do Departamento de Zootecnia, pela contribuição essencial em minha formação acadêmica.

Aos Funcionários do Departamento de Zootecnia, em especial ao Monteiro e ao Raimundo.

À minha querida amiga Nana, que ao longo desses 6 anos se tornou uma irmã, pela lealdade, compreensão, amizade, carinho e honestidade.

Aos amigos Victor e João Paulo, pelos momentos de diversão e momentos de estudo, que sempre se sobrepunham.

Às amigas da antiga república Indy e Bruna, por fazerem parte de tantos momentos de alegria desde a graduação.

À Viviane e Daiany, amigas que muito se dedicaram à execução deste trabalho, sem as quais não teria conseguido.

Aos estagiários Eric, Matheus e Luana.

Aos amigos do Laboratório de Anaeróbios, Ana Andréia, Fernanda, Marcelinho, Aline, Claudinha, Janaína, Gabi, Jú, Débora, Alexandra, Esquilo e Vanessa, por me receberem com tanto carinho e pela ajuda no trabalho realizado.

À todos os meus amigos e todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Isabela Pena Carvalho de Carvalho, filha de Roberto José Carvalho e Ângela Maria Pena de Carvalho, nasceu na cidade de João Monlevade, no dia 10 de setembro de 1983.

Em julho de 2007 graduou-se em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2007 iniciou o curso de mestrado em Zootecnia pela Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nutrição de Ruminantes, submetendo-se a defesa de dissertação em 10 de fevereiro de 2009.

CONTEÚDO

RESUMO	vii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	5
Experimento 1 - Avaliação do crescimento de bactérias lácticas a partir de incubações com celulose micro-cristalina ou amido e diferentes fontes de compostos nitrogenados.....	5
Experimento 2 – Avaliação da atividade das enzimas carboxi-metil-celulase e glutamato desidrogenase <i>in vitro</i> em função de suplementação com compostos nitrogenados.....	8
Experimento 3 – Avaliação da atividade das enzimas carboxi-metil-celulase e glutamato desidrogenase <i>in situ</i> em bovinos alimentados com forragem tropical de alta qualidade	12
RESULTADOS	15
DISCUSSÃO.....	23
CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO

CARVALHO, Isabela Pena Carvalho de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Avaliação causal do “efeito proteína” sobre a atividade microbiana em substratos fibrosos insolúveis.** Orientador: Edenio Detmann. Co-orientadores: Hilário Cuqueto Mantovani, Mário Fonseca Paulino e Sebastião de Campos Valadares Filho.

Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com diferentes fontes de compostos nitrogenados sobre a utilização da fibra insolúvel por intermédio da mensuração do crescimento de bactérias ácido-láticas (BAL), produção microbiana e atividade das enzimas carboxi-metil-celulase (CMC) e glutamato desidrogenase (GDH). Foram realizados três experimentos. No primeiro experimento realizaram-se quatro incubações utilizando-se como inóculo o fluido ruminal de um novilho mestiço Holandês-Zebu fistulado no rúmen, e alimentado com pasto de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.) e 200 g/dia de proteína bruta (PB) suplementar. O fluido ruminal coletado foi centrifugado e o *pellet* de microrganismos re-suspenso em meio basal utilizado como inóculo. Os substratos foram acondicionados em frascos de vidro de forma a compor oito tratamentos: Celulose, Celulose + Caseína, Celulose + Peptona de Soja, Celulose + Uréia:Sulfato de Amônio (9:1), Amido, Amido + Caseína, Amido + Peptona de Soja, Amido + Uréia:Sulfato de Amônio (9:1). Os frascos foram mantidos a 39 °C, sob agitação orbital (70 rpm). Foram realizadas incubações sucessivas a fim de selecionar os microrganismos em função das fontes energéticas e de compostos nitrogenados. Após 24 horas de incubação, nas terceira e quarta transferências, procedeu-se à avaliação do pH e o fluido resultante foi diluído e plaqueado em meio seletivo para bactérias ácido láticas (BAL) segundo técnica de *spread plate*. Após 48 horas de crescimento, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Com o objetivo de detectar a presença de substâncias inibidoras do crescimento microbiano, realizou-se teste de atividade inibitória com as BAL obtidas no procedimento anterior. O crescimento de BAL foi favorecido ($P < 0,05$) quando se utilizou amido como fonte de energia em relação à celulose. As fontes de compostos nitrogenados de origem protéica (peptona de soja e caseína) estimularam o crescimento dessas bactérias ($P < 0,05$) em comparação ao controle e ao uso de uréia. O pH não sofreu influência da fonte de energia ($P > 0,05$); entretanto, a inclusão de uréia resultou em pH mais elevado ($P < 0,05$) em relação às demais fontes de compostos nitrogenados. Não foi

detectada atividade antimicrobiana nas culturas de BAL isoladas. No segundo experimento realizaram-se três incubações segundo os mesmos procedimentos do experimento descrito anteriormente, avaliando-se quatro tratamentos: Celulose, Celulose + Caseína, Celulose + Uréia:Sulfato de Amônio (9:1) e Celulose + Casaminoácidos. Após uma transferência, tomou-se um frasco de cada tratamento às 6, 12 e 24 horas de incubação, realizando-se extrações das enzimas e teste de atividades da CMC e da GHD. Incubou-se uma segunda bateria de frascos a fim de se obter amostras nos tempos 6, 12 e 24 horas para quantificação da concentração de nitrogênio amoniacal (NA) e de proteína microbiana. Nos três tempos de incubação, a concentração de NA foi maior ($P < 0,05$) quando uréia foi utilizada como fonte de compostos nitrogenados. Às 12 e 24 horas de incubação as fontes de compostos nitrogenados protéicos (caseína e casaminoácidos) causaram incremento nas concentrações NA em relação ao controle ($P < 0,05$). De maneira geral, a concentração de proteína microbiana manteve-se estável entre os tratamentos. A atividade da enzima CMC foi superior com a utilização de uréia e casaminoácidos ($P < 0,05$) em relação ao controle e caseína. A suplementação com casaminoácidos propiciou maior atividade da GDH ($P < 0,05$) em relação ao controle na 6ª hora de incubação, com posições intermediárias observadas para caseína e uréia, às 12 horas a atividade da GDH passou a ser estimulada também pela caseína ($P < 0,05$). Às 24 horas a atividade da GDH não apresentou diferenças entre tratamentos ($P > 0,05$).

Para o terceiro experimento utilizaram-se três novilhos mestiços Holandês x Zebu, com peso corporal inicial de 350 kg fistulados no rúmen, mantidos em baias individuais recebendo feno de Tifton (*Cynodon* sp.) *ad libitum*. Os tratamentos foram: controle, sem suplementação; suplementação com compostos nitrogenados não-protéicos (uréia:sulfato de amônio, 9:1); e suplementação com compostos nitrogenados protéicos (albumina). Para os tratamentos que compreenderam suplementação com compostos nitrogenados definiu-se o fornecimento em 1 g/kg de peso vivo dos animais em proteína bruta. O experimento foi conduzido segundo delineamento em quadrado latino 3 x 3, com três períodos experimentais com duração de cinco dias cada, sendo os três primeiros dias destinados à adaptação ruminal dos animais à suplementação. Para avaliação do pH e da concentração de NA ruminal coletou-se, no quarto dia de cada período experimental, alíquotas de líquido ruminal nos tempos 6, 12 e 24 horas após a suplementação. Simultaneamente a esta avaliação, conduziu-se procedimento de incubação *in situ* para quantificação da atividade das enzimas CMC e GHD. A média do pH do líquido de rúmen foi de 6,55, não havendo diferenças entre os tratamentos e os

tempos de avaliação ($P>0,05$). Em termos gerais, a atividade da GHD foi ampliada nos intervalos avaliados ($P<0,05$). Entretanto não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($P>0,05$) sobre a atividade da GDH. De maneira geral, o tratamento controle apresentou maior atividade da CMC em relação ao tratamentos que continham fontes suplementares de nitrogênio ($P<0,05$). Entretanto, a suplementação com uréia propiciou maiores atividades da CMC em relação à albumina ($P<0,05$). As fontes de compostos nitrogenados (uréia e albumina) causaram incremento nas concentrações NA em relação ao controle ($P<0,10$). As concentrações de NA decresceram a partir do primeiro momento de avaliação ($P<0,10$). A partir dos resultados obtidos concluiu-se que fontes de compostos nitrogenados de origem protéica provocam efeitos deletérios sobre a utilização de substratos fibrosos insolúveis devido ao favorecimento do crescimento de bactérias fermentadoras de carboidratos não-estruturais.

ABSTRACT

CARVALHO, Isabela Pena Carvalho de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Causal evaluation of “protein effect” in the microbial activity on insoluble fibrous substrates.** Adviser: Edenio Detmann. Co-advisers: Hilário Cuqueto Mantovani, Mário Fonseca Paulino and Sebastião de Campos Valadares Filho.

The objective in this trial was to evaluate the effects of supplementation with nitrogenous compounds sources on insoluble fiber utilization of through acid lactic bacteria (LAB) growth, microbial protein production, and activity of the enzymes carboxymethylcellulase (CMC) and glutamate dehydrogenase (GDH). Three experiments were carried out. At the first one, four incubations were performed using the ruminal fluid taken from a Holstein x Zebu steer fitted with ruminal cannulae and fed signal grass (*Brachiaria decumbens* Stapf.) pasture plus 200 g/day of supplemental protein. The fluid was collected and centrifuged. The microbial *pellet* was re-suspended in a basal media and used as inoculum. Eight treatments were evaluated: Cellulose, Cellulose plus Casein, Cellulose plus Soy Peptone, Cellulose plus Urea:Ammonium Sulfate (9:1), Starch, Starch plus Casein, Starch plus Soy Peptone, and Starch plus Urea:Ammonium Sulfate (9:1). The flasks were kept at 39°C with orbital shaking (70 rpm). Successive incubations were done to select the microorganisms according to the energy and nitrogenous sources. After 24 hours of incubation, on the third and fourth transfers, the pH were evaluated and the resulting fluid was diluted and plated on a selective media for LAB according to *spread plate* technique. After 48 hours the colonies forming units (CFU/mL) were counted. It was performed a test to detect the presence of inhibitory substances on the inhibitory activity by using the LAB obtained in the previous procedure. The growth of LAB was favored ($P < 0.05$) when starch was used as energy source compared to cellulose. The true protein sources (soy peptone and casein) increased the growth of these bacteria ($P < 0.05$) compared to control and urea. The pH was not affected by energy source ($P > 0.05$), but the inclusion of urea resulted in higher pH ($P < 0.05$) compared to other sources of nitrogenous compounds. None inhibitory activity was detect on LAB cultures. In the second experiment, three incubations were performed according to the experimental procedures described above. Four treatments were evaluated: Cellulose, Cellulose plus Casein, Cellulose plus Urea:Ammonium Sulfate (9:1), and Cellulose plus Casaminoacids. After the first

transfer, a flask of each treatment was taken at 6, 12 and 24 hours of incubation. The microbial enzymes were extracted and the activities of CMC and GDH were evaluated. A second group of flasks was incubated in order to obtain samples at 6, 12 and 24 hours to quantify the concentration of ammonia nitrogen (AN) and microbial protein. In all incubation times higher AN concentration was observed for urea ($P < 0.05$). At 12 and 24 hours of incubation the sources of true protein (casein and casaminoacids) caused increase in AN concentrations compared to control ($P < 0.05$). In a general, the concentration of microbial protein was stable among treatments. The activity of CMC was higher with the use of urea and casaminoacids ($P < 0.05$) compared to control and casein. Supplementation with casaminoacids implied higher activity of GDH ($P < 0.05$) compared to control at 6 hours of incubation, with intermediate positions for casein and urea. At 12 hours, the activity of GDH was also stimulated by casein ($P < 0.05$). At 24 hours the activity of GDH was not different among treatments ($P > 0.05$). In the third experiment three Holstein x Zebu steers, with average initial body weight of 350 kg, fitted with ruminal cannulae and kept in individual stalls, were used. The animals were fed Tifton hay (*Cynodon* sp.), *ad libitum*. The treatments were: control, without supplementation; supplementation with non-protein nitrogenous compounds (urea: ammonium sulfate, 9:1); and supplementation with true protein (albumin). The level of supplementation with nitrogenous compounds was 1 g/kg body weight in crude protein. The experiment was carried out according to a 3 x 3 Latin square design, with three experimental periods lasting five days each, being three days for the adaptation of animals to supplementation. In the fourth day of each experimental period, samples of rumen fluid were collected at 6, 12 and 24 hours after supplementation to evaluate pH and ruminal AN concentration. At same time, it was carried out an *in situ* incubation procedure in order to quantify the activity of the enzymes CMC and GDH. The average of the ruminal pH was 6.55, with no differences among treatments and time of evaluation ($P > 0.05$). In a general way, the activity of GDH was increased between times of evaluation ($P < 0.05$). However, there were no differences among treatments ($P > 0.05$). The control treatment show higher activity of the CMC compared to treatments with supplementation ($P < 0.05$). However, supplementation with urea implied higher activities of the CMC than albumin ($P < 0.05$). The sources of nitrogen compounds (urea and albumin) caused increase in RAN concentrations compared to control ($P < 0.10$). The concentrations of RAN decreased from the first moment of evaluation ($P < 0.10$). From those results, it can be concluded that true protein sources cause deleterious effects on

utilization of insoluble fibrous substrates because they stimulate the growth of non-structural carbohydrates degrading bacteria.

INTRODUÇÃO

As forragens disponíveis em pastagens tropicais durante o período favorável ao crescimento das forrageiras (época das águas), embora possuam teores de proteína bruta (PB) considerados adequados para a atividade microbiana ruminal (Detmann et al., 2005), têm proporcionado ganhos de peso aquém do observado sob condições similares em regiões temperadas. Esta discrepância poderia ser, ao menos em parte, atribuída à alta degradação da PB em relação aos componentes fibrosos da forragem, o que provocaria perda excessiva de compostos nitrogenados no ambiente ruminal na forma de amônia (Poppi & McLennan, 1995; Paulino et al., 2008).

Embora durante o período de chuvas as principais deficiências nutricionais do pasto estejam relacionadas à proteína, a melhoria da qualidade da forragem implicaria alteração do enfoque nutricional das deficiências, passando de dietéticas durante o período de seca, para metabólicas durante o período de chuvas (Detmann et al., 2005). Desta forma, as principais limitações para o crescimento microbiano residiriam sobre o fato de a forragem disponível ao pastejo permitir baixa assimilação do nitrogênio disponível no rúmen em proteína microbiana, em função da alta velocidade de degradação dos compostos nitrogenados e/ou baixa velocidade de degradação dos carboidratos fibrosos da forragem (Paulino et al., 2008).

Sob esses pressupostos, em função dos elevados níveis de compostos nitrogenados não-protéicos em gramíneas tropicais sob pastejo durante o período favorável a seu crescimento, respostas positivas poderiam ser obtidas com a ampliação do aporte de proteína metabolizável. Isto seria obtido por intermédio da suplementação com níveis moderados de carboidratos não-fibrosos (que ampliaria a assimilação de nitrogênio no rúmen) e/ou com fontes protéicas não-degradáveis no rúmen (Detmann et al., 2005; Paulino et al., 2008).

Contudo, resultados recentes conduzidos em condições tropicais têm permitido evidenciar incrementos na produção animal a partir da suplementação com fontes de compostos nitrogenados não-protéicos (Paulino et al., 2005; Porto, 2005; Paulino et al., 2008), o que contraria os pressupostos teóricos apresentados anteriormente.

Em adição, têm-se demonstrado que a suplementação isolada com proteína verdadeira causa efeitos deletérios sobre a utilização ruminal da fibra em detergente neutro (FDN), fenômeno denominado “efeito proteína”, o qual seria atribuído a

possíveis interações negativas entre espécies microbianas fibrolíticas e não-fibrolíticas (Paez-Bernal, 2007; Zorzi, 2008; Costa et al., 2009). Nestas situações, a suplementação com uréia incorreria benefícios sobre a utilização dos compostos fibrosos, possivelmente em função da ausência de interações amensais entre espécies microbianas (Zorzi, 2008).

A queda da degradação ruminal dos carboidratos fibrosos com a adição de proteína verdadeira tem sido também relatada por outros autores. Cone & Van Gelder (1999) constataram redução na taxa de produção de gases por unidade de matéria orgânica *in vitro* à medida que caseína foi adicionada ao meio de incubação. Em estudo similar *in vitro*, Oliveira et al. (2005) observaram redução proporcional à adição de caseína ao meio sobre a taxa de produção de gases a partir de celulose.

Um dos possíveis efeitos benéficos observados pelo uso de uréia em suplementos para animais em pastejo durante o período das águas parece residir sobre sua maior eficiência em conferir níveis de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) em comparação a fontes de proteína verdadeira (Paulino et al., 2008). Sob condições similares de equivalentes protéicos suplementares, a uréia mostra-se mais eficiente em implementar níveis de NAR (Zorzi, 2008), o que poderia influenciar diretamente o crescimento microbiano sobre a FDN.

A forma amoniacal dos compostos nitrogenados (NAR) constitui a principal fonte de nitrogênio para os microrganismos ruminais. Diferentes sistemas enzimáticos podem ser utilizados na assimilação da amônia, sendo que a predominância de determinado sistema depende da concentração no meio e do acúmulo intracelular.

O sistema enzimático de maior afinidade pela amônia é o glutamina sintetase-glutamato sintase (GS-GOGAT) (Brown et al., 1974), o qual inclui gasto de ATP. Se a concentração de NAR é baixa, a eficiência do crescimento microbiano pode ser reduzida, porque ATP é desviado do crescimento para o processo de assimilação de nitrogênio.

Quando se tem alta concentração de NAR, a principal via de assimilação de nitrogênio é a enzima glutamato-desidrogenase (GDH), a qual não demanda ATP (White, 2000).

Desta forma, o equilíbrio entre os sistemas enzimáticos para assimilação de nitrogênio apresenta íntima dependência, dentre outros fatores (e.g. disponibilidade de energia, cofatores, permeabilidade da membrana bacteriana, etc) (Chalupa, 1969), da concentração de NAR no meio. Assim, a eficiência de implementação de níveis de NAR

de determinada fonte de compostos nitrogenados suplementares poderia influenciar na disponibilidade de energia para o crescimento de espécies microbianas dependentes do NAR, como as espécies fibrolíticas.

Sob condições de baixa concentração de NAR, os microrganismos poderiam utilizar com maior intensidade o mecanismo de assimilação baseado no sistema GS-GOGAT, reduzindo a disponibilidade de ATP para o crescimento microbiano. No entanto, em condições favoráveis de concentração de NAR, poderia haver predomínio do mecanismo de assimilação via GDH direcionando maior proporção de energia para as reações envolvidas diretamente no crescimento microbiano.

Por outro lado, interações microbianas, competições ou alterações na prioridade de utilização de substratos também aparecem como possíveis causas do “efeito proteína” sobre a utilização da FDN de forragens tropicais de alta qualidade (Paulino et al., 2006; Paez-Bernal, 2007; Costa et al., 2009).

Em trabalhos conduzidos em condições tropicais, especulou-se que o “efeito proteína” poderia ser atribuído à ocorrência de interações antagonistas entre espécies microbianas, ou seja, à inibição do crescimento de uma ou mais espécies em função da produção de compostos inibidores por outras espécies (Paez-Bernal, 2007; Zorzi, 2008; Costa et al., 2009). Como exemplo de compostos inibidores envolvidos em interações amensais destacam-se as bacteriocinas, as quais podem ser definidas como peptídeos e proteínas produzidos por intermédio de síntese ribossomal, que apresentam estreito espectro de atividade antimicrobiana, caracterizando-se pelo fato do microrganismo produtor apresentar algum mecanismo de auto-proteção (Parente & Ricciardi, 1999).

Resultados obtidos *in vitro* permitem indicar que a ampliação no fornecimento de aminoácidos implica incremento na produção de bacteriocinas como reflexo do favorecimento do crescimento de algumas espécies microbianas (De Vuyst & Vandamme, 1993; Kim et al., 1997; Parente & Ricciardi, 1999; Aasen et al., 2000). A ação de bacteriocinas pode reduzir a atividade celulolítica no rúmen (Wolin et al., 1997). Portanto, efeitos deletérios com a suplementação com uréia não seriam obtidos devido ao fato de não se adicionar aminoácidos ao meio.

As bactérias ácido-láticas (BAL) são responsáveis pela produção de diversos tipos de bacteriocinas; portanto, é provável que este grupo de bactérias seja o maior responsável pela síntese desses peptídeos no ambiente ruminal. Geralmente, as BAL são gram-positivas, ácido-tolerantes, não respiram, não esporulam, possuem forma de bacilos ou cocos e têm o ácido láctico como principal produto de fermentação. Os

principais gêneros das bactérias ácido lácticas são os *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* (Axelsson, 1998). No rúmen, as BAL são classificadas como fermentadoras de carboidratos não-estruturais.

A atividade celulolítica da enzima carboxi-metil-celulase (CMC) constitui indicador da atividade de degradação microbiana, uma vez que apresenta alta correlação com as características de degradação de forragem em diferentes ambientes ruminais. A atividade da CMC não somente reflete a extensão da degradação, mas acentua as pequenas diferenças observadas na taxa de degradação, conferindo maior sensibilidade no estudo dos efeitos de diferentes tratamentos em alterar a dinâmica de degradação de substratos celulosídicos (Silva et al., 1987).

Neste sentido, a atividade desta enzima poderia servir como referência para quantificação dos efeitos da suplementação com compostos nitrogenados sobre a degradação microbiana da fibra insolúvel.

Contudo, releva-se a necessidade de estudos que procurem ampliar o entendimento entre a suplementação com diferentes formas químicas de compostos nitrogenados (protéicos e não-protéicos) sobre a utilização dos carboidratos fibrosos de forragens tropicais de alta qualidade, incluindo-se sua influência sobre a atividade de enzimas microbianas envolvidas nos processos de assimilação de compostos nitrogenados e degradação.

Assim, de acordo com os pressupostos apresentados, definiu-se como objetivo deste trabalho avaliar os efeitos da suplementação com diferentes fontes de compostos nitrogenados sobre a utilização da fibra insolúvel por intermédio da mensuração do crescimento de bactérias ácido-láticas, produção microbiana e atividade das enzimas carboxi-metil-celulase (CMC) e glutamato desidrogenase (GDH).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três experimentos nos Laboratórios de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia e de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia, ambos da Universidade Federal de Viçosa.

Experimento 1 - Avaliação do crescimento de bactérias lácticas a partir de incubações com celulose micro-cristalina ou amido e diferentes fontes de compostos nitrogenados

Animal doador e dieta

O conteúdo ruminal utilizado como inóculo para as incubações foi obtido de um novilho mestiço Holandês-Zebu (350 kg de peso corporal) fistulado no rúmen. Este novilho foi alimentado com dieta composta de pasto de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.) recebendo 200 g/dia de proteína bruta (PB) suplementar, sendo 2/3 desta fornecida na forma de albumina (fonte de proteína verdadeira) e 1/3 na forma de uréia (fonte de nitrogênio não-protéico). Este suplemento foi fornecido diariamente, via infusão ruminal, às 12h00.

O sistema de pastejo foi contínuo, em piquete com 0,34 ha, durante o período de crescimento da forrageira (período das águas; entre dezembro de 2007 e fevereiro de 2008).

Incubação

A porção líquida do conteúdo ruminal foi coletada através da fistula às 11h00 (após o pastejo matutino e antes da infusão do suplemento), filtrada em tripla camada de gaze e mantida anaerobiamente em frasco erlenmeyer por 30 min a 39°C para separação das fases fluida e particulada.

O fluido obtido da seção média do erlenmeyer foi transferido anaerobiamente para tubos de ensaio e centrifugado (3000 x g/5 min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de microrganismos re-suspenso em meio basal contendo, por litro: 4 g de glicose, 292 mg de K₂HPO₄, 480 mg de (NH₄)₂SO₄, 480 mg de NaCl, 100 mg de MgSO₄.7H₂O, 64 mg de CaCl₂.2H₂O, 500 mg de cisteína, 1 g de tripticase, 4 g de Na₂CO₃, 0,5 g de extrato de levedura, 177 µL de ácido acético, 63 µL de ácido propiônico, 31 µL de

ácido butírico, 11 µL de ácido valérico, 11 µL de ácido isovalérico e 11 µL de ácido isobutírico. Depois de feita padronização da densidade ótica (DO_{600nm}) para 2,00, esta suspensão celular foi usada como inóculo para as incubações.

Alíquotas de celulose micro-cristalina (Avicel®) (350 mg) ou amido (Merck 101252) (350 mg) foram acondicionados em frascos de vidro tipo “penicilina” com volume total de 50 mL. Em seguida, foi incluída a fonte protéica perfazendo o total de 4 mg PB/mL de solução final.

Desta forma, oito foram os tratamentos avaliados: Celulose, Celulose + Caseína, Celulose + Peptona de Soja, Celulose + Uréia:Sulfato de Amônio (9:1), Amido, Amido + Caseína, Amido + Peptona de Soja, Amido + Uréia:Sulfato de Amônio (9:1) (Tabela 1).

Foram utilizados os produtos: C7078 da marca Sigma®, como fonte de caseína; Uréia Isofar® 744; e sulfato de amônio Merck® A596117611; e peptona de soja da marca Biobrás®.

Tabela 1 - Descrição dos componentes adicionados ao sistema *in vitro* de acordo com os diferentes tratamentos

Componente	Tratamentos ¹							
	C	CC	CPS	CUA	A	AC	APS	AUA
Celulose(mg)	350	350	350	350				
Amido (mg)					350	350	350	350
Caseína (mg)		176,8				176,8		
Peptona de soja (mg)			211,1				211,1	
Uréia-SA(mg)				54,6				54,6
Inóculo Ruminant (mL)	7	7	7	7	7	7	7	7
Meio basal (mL)	28	28	28	28	28	28	28	28

^{1/} C = Celulose; CC = Celulose + Caseína; CPS = Celulose + Peptona de Soja; CUA = Celulose + Uréia Sulfato de Amônio 9:1; A = Amido (A); Amido+Caseína (AC); Amido+Peptona de Soja (APS); AUA = Amido+ Uréia Sulfato de Amônio 9:1.

Posteriormente, adicionaram-se 28 mL de meio basal (idem ao usado na re-suspensão do inóculo), injetando-se constantemente CO₂ aos frascos, a fim de manter o ambiente anaeróbio. Foram adicionados 7 mL de inóculo, procedendo-se imediatamente à vedação dos frascos, que foram mantidos a 39°C, sob agitação orbital (70 rpm). Procedeu-se à retirada dos gases oriundos da fermentação a cada três horas com o auxílio de agulhas.

Após 24 horas de incubação os frascos foram abertos sob aspersão de CO₂ para manutenção da anaerobiose, sendo este conteúdo usado como inóculo de uma nova

incubação, preservando-se os tratamentos da primeira incubação. Este procedimento foi realizado sucessivamente, desta forma, até a quarta transferência, a fim de selecionar os microrganismos em função das fontes energéticas e de compostos nitrogenados.

Plaqueamento em meio seletivo e contagem

Para o plaqueamento seletivo, utilizou-se o meio de cultura MRS (De Man et al., 1960, pH 5,4), que é seletivo para bactérias ácido lácticas (BAL). O meio de cultura foi preparado anaerobiamente, acondicionado em frascos vedados com rolhas de borracha e lacres de alumínio. Posteriormente, o meio foi vertido em placas de *petri* descartáveis de polietileno (90 x 15 mm) em câmara de anaerobiose (COY Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA) sob atmosfera de CO₂:H₂ (95:5) a 39°C.

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados em câmara de anaerobiose (39°C).

Diluiu-se sucessivamente o inóculo resultante da terceira e da quarta transferências em tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 6,5), resultando em diluições entre 10⁻¹ e 10⁻⁸. Posteriormente, 100 µL de cada diluição foram espalhados nas placas contendo o meio MRS (pH 5,4) segundo a técnica de *spread plate*. Os meios de incubação foram retirados da câmara de anaerobiose e submetidos à avaliação do pH por intermédio de potenciômetro digital. Após 48 horas de crescimento, as placas foram retiradas da câmara de anaerobiose, sendo realizada a contagem das unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

Teste de atividade

Com o objetivo de detectar a presença de substâncias inibidoras do crescimento microbiano, realizou-se teste de atividade inibitória com as BAL obtidas no procedimento anterior.

Com o auxílio de hastes de madeira estéreis, algumas colônias das BAL que cresceram nas placas de contagem foram retiradas e transferidas para tubos *ependorff* contendo 1 mL de meio MRS líquido (pH 5,4) e incubadas a 39°C por 24 horas. Microgotas destas culturas de BAL (5 µL) foram adicionadas em placas contendo meio MRS sólido (pH 5,4), sendo incubadas por 24 horas a 39°C.

Após esse período, sobre-camada de microrganismo indicador foi vertida sobre as colônias de BAL. As placas foram mantidas por 12 horas a 4°C para difusão.

Utilizaram-se como microrganismos indicadores *Lactococcus lactis* e *Ruminococcus albus*. O primeiro foi cultivado em meio MRS (pH 6,8) e o último em

meio PPB modificado “Caldwell e Bryant” (Atlas, 2005), contendo, por litro: 4 g de glicose 2,0 g de tripticase, 2,0 g extrato de levedura, 150 mL de líquido de rúmen clarificado, 292 mg de K_2HPO_4 , 480 mg de $(NH_4)_2SO_4$, 480 mg de NaCl, 100 mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 64 mg de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 4 g de Na_2CO_3 , 25 mg de cisteína, 5 mg de hemina, 177 μL de ácido acético, 63 μL de ácido propiônico, 31 μL de ácido butírico, 11 μL de ácido valérico, 11 μL de ácido isovalérico e 11 μL de ácido isobutírico.

Após o período de difusão, as placas foram mantidas durante 24 a 48 horas em temperatura de 37 e 39°C para *L. lactis* e *R. albus*, respectivamente.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana no sobrenadante das culturas isoladas, foi utilizado o método de difusão em ágar descrito por Tagg et al. (1976). Aplicou-se amostras do sobrenadante de cada cultura (25 μL) em orifícios de 5 mm de diâmetro feitos em ágar contendo inóculo de, aproximadamente, 10^6 UFC/mL do microrganismo indicador (*Lactococcus lactis*) cultivado em meio MRS (pH 6,8).

Análises estatísticas

Os procedimentos de incubação foram conduzidos quatro vezes, perfazendo quatro repetições para cada tratamento.

Os dados foram previamente avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade, de acordo com os testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente ($\alpha = 0,05$). Antecipa-se que a contagem de BAL não obedeceu a estes pressupostos básicos ($P < 0,05$), sendo transformada com base no logaritmo decimal. Após a transformação verificaram-se condições de normalidade e homocedasticidade ($P > 0,05$).

Após este procedimento, os dados foram analisados por intermédio de análise de variância, segundo delineamento em blocos completos casualizados, considerando-se as partidas de incubação como blocos, em esquema fatorial 2 x 4 (duas fontes de energia e quatro fontes de compostos nitrogenados). Quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Experimento 2 – Avaliação da atividade das enzimas carboxi-metil-celulase e glutamato desidrogenase *in vitro* em função de suplementação com compostos nitrogenados

Animal doador e dieta

O conteúdo ruminal utilizado como inóculo para as incubações foi obtido de um novilho mestiço Holandês-Zebu (350 kg de peso vivo) fistulado no rúmen. Este novilho foi alimentado com dieta composta de pasto de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.) recebendo 200 g/dia de proteína bruta (PB) suplementar, sendo 2/3 desta fornecida na forma de albumina (fonte de proteína verdadeira) e 1/3 na forma de uréia (fonte de nitrogênio não-protéico). Este suplemento foi fornecido diariamente, via infusão ruminal, às 12h00.

O sistema de pastejo foi contínuo, em piquete com 0,34 ha, durante o período de crescimento da forrageira (período das águas; entre dezembro de 2007 e fevereiro de 2008).

Incubações

A porção líquida do conteúdo ruminal foi coletada através da fistula às 11h00 (após o pastejo matutino e antes da infusão do suplemento), filtrada em tripla camada de gaze, e mantida em repouso em frasco erlenmeyer por 30 min. a 39°C para separação das fases fluida e particulada.

O fluido obtido da seção média do erlenmeyer foi transferido anaerobiamente para tubos de ensaio e centrifugado (3000 x g/5 min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de microrganismos re-suspendido em meio basal contendo, por litro: 4 g de glicose, 292 mg de KH₂PO₄, 480 mg de (NH₄)₂SO₄, 480 mg de NaCl, 100 mg de MgSO₄.7H₂O, 64 mg de CaCl₂.2H₂O, 500 mg de cisteína, 1 g de tripticase, 4 g de Na₂CO₃, 0,5 g de extrato de levedura, 177 µL de ácido acético, 63 µL de ácido propiônico, 31 µL de ácido butírico, 11 µL de ácido valérico, 11 µL de ácido isovalérico e 11 µL de ácido isobutírico. Após padronização da densidade ótica (DO_{600nm}) em 2,00, esta suspensão celular foi usada como inóculo para as incubações.

Alíquotas de celulose microcristalina (Avicel[®]) (600 mg) foram acondicionadas em frascos de vidro tipo “penicilina” com 100 mL de volume total. Em seguida, foi incluída a fonte de compostos nitrogenados, perfazendo o total de 4 mg PB/mL de solução final.

Desta forma, quatro foram os tratamentos avaliados: Celulose, Celulose + Caseína, Celulose + Uréia:Sulfato de Amônio (9:1) e Celulose + Casaminoácidos (Tabela 2).

Foram utilizados como fontes de uréia, sulfato de amônio, caseína e casaminoácidos os compostos Isofar 744, Merk A596117611, Sigma C7078 e Sigma C2427, respectivamente.

Posteriormente, adicionaram-se 48 mL de meio basal (idem ao usado na re-suspensão do inóculo), injetando-se constantemente CO₂ aos frascos, a fim de manter o ambiente anaeróbio. Foram adicionados 12 mL de inóculo ruminal, procedendo-se imediatamente à vedação dos frascos, que foram mantidos a 39°C, sob agitação orbital (70 rpm). Procedeu-se à retirada dos gases oriundos da fermentação a cada três horas com o auxílio de agulhas.

Após 24 horas de incubação, os frascos foram abertos sob aspersão de CO₂ para manutenção da anaerobiose sendo seu conteúdo usado como inóculo de uma nova incubação, de forma a preservar os tratamentos da primeira incubação. Após a transferência, tomou-se um frasco de cada tratamento às 6, 12 e 24 horas de incubação, realizando-se extrações das enzimas, segundo métodos descritos por Silva et al. (1987).

Neste sentido, transferiu-se todo o conteúdo dos frascos para tubos de ensaio, os quais foram centrifugados (120 x g/15 min). O sobrenadante foi descartado, a fim de se retirar os microrganismos não aderidos às partículas. Um grama do *pellet* foi transferido para frasco tipo *becker*, sendo o restante pesado em pesa-filtro e levado à estufa (105°C/16 horas) para obtenção da matéria seca.

Tabela 2 - Descrição dos componentes adicionados ao sistema *in vitro* de acordo com os diferentes tratamentos

Componente	Tratamentos ¹			
	C	CC	CUA	CCA
Celulose(mg)	600	600	600	600
Caseína (mg)		303,0		
Uréia-SA (mg)			93,6	
Casaminoácidos (mg)				351,0
Inóculo Ruminal (mL)	12	12	12	12
Meio basal (mL)	48	48	48	48

^{1/} C = Celulose; CC = Celulose + Caseína; CUA = Celulose + Uréia Sulfato de Amônio 9:1; CCA = celulose + casaminoácidos.

Ao resíduo úmido acrescentaram-se 10 mL de solução de fosfato de sódio (10 mM, pH 6,8), 25 µL de mercaptoetanol e 125 µL de lisozima 0,4% (Farenzena et al., 2008), sendo mantido em banho-maria (37°C/3 horas). A porção fibrosa foi removida por centrifugação (1000 x g/15min; 4°C), sendo o sobrenadante utilizado para estimar a atividade das enzimas CMC e GDH.

Para quantificação da atividade da CMC utilizou-se o método descrito por Miller et al. (1960). Para tal, 1 mL do extrato enzimático obtido foi incubado a 50°C por 20 min com 1 mL do substrato de carboxi-metil-celulose (contendo por litro: 11,2 g de

carboxi-metil-celulose, 7 g de ácido cítrico, 19,6 g de citrato de sódio di-hidratado, 400 mg de merthiolate e 400 mg de glicose). Após o período de incubação, os tubos foram resfriados em água corrente e 3 mL do reagente DNS foram adicionados (10 g de ácido dinitrossalicílico, 300 g de tartarato duplo de Na e K, 500 mL de água destilada, 300 mL de NaOH 2 M). Para cada 20 mL do reagente DNS, adicionaram-se 28 µL de solução de fenol 5% e 80 µL de solução de metabisulfito de sódio 35%. Os tubos foram incubados em água fervente por 15 min, resfriados e levados ao espectrofotômetro (leitura a 540 nm).

A atividade da CMC foi obtida pela avaliação da quantidade de açúcares redutores liberados após o período de incubação da enzima com o substrato. Gerou-se curva padrão com soluções contendo 0,3; 0,6; 1,2; 3,0; 4,2; 5,4 e 6,0 mM de glicose.

A atividade da enzima GDH foi avaliada de acordo com o método descrito por King (1974). Em tubos de ensaio adicionaram-se 500 µL de solução 2-oxoglutarato (14 mg de 2-oxaloglutarato em 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,067 M; pH 7,0), 500 µL de solução sulfato de amônio (3,96 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,067 M; pH 7,0) e 200 µL do extrato enzimático. Equilibrou-se a temperatura dos tubos em banho-maria a 37°C e adicionou-se solução de NADH 0,4 mM (200 µL). Os tubos foram novamente incubados a 37°C por 60 min. Após o tempo de incubação foi acrescentado 1 mL de reagente cetona (200 mg/L de 2,4-dinitrofenilhidrazina em HCl 1 N) e incubados por mais 20 min. Por fim, acrescentaram-se 10 mL de NaOH 0,4 N, procedendo-se à avaliação da absorvância em 390 nm.

A atividade da enzima foi calculada como a diferença entre o tubo “branco” e os tubos contendo amostras. No tubo branco, a solução 2-oxaloglutarato foi acrescentada após a incubação por 60 min. Para confecção da curva padrão utilizou-se solução padrão de NADH 0,96 mM (8,5 mg de NADH- Na_2 em 10 mL da solução 2-oxaloglutarato).

A atividade da GDH obtida através do procedimento acima é definida em “unidades arbitrárias”, em que cada unidade equivale à variação de 1 nmol na concentração de 2-oxaloglutarato/mL/min (King, 1974).

Incubou-se uma segunda bateria de frascos a fim de se obter amostras nos tempos 6, 12 e 24 horas para quantificação da concentração de nitrogênio amoniacal (NA) e de proteína microbiana. Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas nos tempos determinados acima e armazenados a -15°C para posterior estimativa da concentração de NA pela técnica colorimétrica proposta por Chaney & Marbach (1962). A concentração

de proteína microbiana foi avaliada pela técnica colorimétrica descrita por Bradford et al. (1976).

Análises estatísticas

Os procedimentos de incubação foram conduzidos três vezes, perfazendo três repetições para cada tratamento em cada tempo de avaliação.

Os dados foram previamente avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade, de acordo com os testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente ($\alpha = 0,05$). Antecipa-se que a atividade de CMC e GHD e a concentração de proteína microbiana não obedeceram a estes pressupostos básicos ($P < 0,05$), sendo transformadas com base no logaritmo natural. Após a transformação verificaram-se condições de normalidade e homocedasticidade ($P > 0,05$).

Após este procedimento, os dados foram analisados por intermédio de análise de variância, segundo delineamento em blocos completos casualizados, considerando-se as partidas de incubação como blocos, de forma independente para cada tempo de avaliação. Quando necessário, as médias foram comparadas pelo teste DMS de Fisher ($\alpha = 0,05$).

Experimento 3 – Avaliação da atividade das enzimas carboxi-metil-celulase e glutamato desidrogenase *in situ* em bovinos alimentados com forragem tropical de alta qualidade

Animais e tratamentos

Utilizaram-se três novilhos mestiços Holandês x Zebu, com peso corporal médio inicial de 350 kg fistulados no rúmen, mantidos em baias individuais recebendo feno de Tifton (*Cynodon* sp.) *ad libitum* (Tabela 3). Os animais foram adaptados às instalações, ao manejo e à forragem por um período de sete dias.

Os tratamentos foram: controle (sem suplementação); suplementação com compostos nitrogenados não-protéicos (NNP); e suplementação com compostos nitrogenados protéicos.

Para os tratamentos que compreenderam suplementação com compostos nitrogenados definiu-se o fornecimento em 1 g/kg de peso vivo dos animais em PB, que corresponde ao suprimento de 60% das exigências de proteína degradável no rúmen (PDR) de um animal bovino macho não-castrado com 350 kg de peso corporal e ganho

esperado de 1 kg/dia (Valadares Filho et. al.,2006). Utilizou-se abumina (*Maximus*, Arve Alimentos) e uréia (uréia:sulfato de amônio, 9:1) como fontes de compostos nitrogenados protéicos e não-protéicos, respectivamente. Os suplementos foram introduzidos no rúmen dos animais diariamente às 12h00.

O experimento foi conduzido segundo delineamento em quadrado latino 3 x 3, com três períodos experimentais com duração de cinco dias cada, sendo os três primeiros dias destinados à adaptação ruminal dos animais à suplementação.

Para avaliação do pH e da concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) coletou-se, no quarto dia de cada período experimental, alíquotas de líquido ruminal nos tempos 6, 12 e 24 horas após a suplementação. As amostras foram coletadas manualmente na interface líquido:sólido do ambiente ruminal, filtradas por uma camada tripla de gaze e submetidas à avaliação do pH por intermédio de potenciômetro digital. Amostras de líquido ruminal foram armazenados a -15°C para posterior avaliação da concentração de nitrogênio amoniacal pela técnica colorimétrica proposta por Chaney & Marbach (1962).

Simultaneamente a esta avaliação, conduziu-se procedimento de incubação *in situ* para quantificação da atividade das enzimas CMC e GHD.

Tabela 3 - Composição química do feno de Tifton (*Cynodon* sp.) fornecido aos animais

Item	Teor
Matéria Seca ¹	893,6
Matéria Orgânica ²	957,5
Proteína Bruta ²	136,1
Extrato Etéreo ²	11,3
Fibra em Detergente Neutro (cp) ²	729,7
Carboidratos Não-Fibrosos ²	80,4
Fibra em Detergente Ácido ²	340,0
Lignina (H ₂ SO ₄ 72% p/p) ²	30,1
Proteína Insolúvel em Detergente Neutro ³	185,9

^{1/} g/kg de matéria natural. ^{2/} g/kg de matéria seca. ^{3/} g/kg de proteína bruta.

Amostras do feno fornecido foram processadas em moinho de facas (2 mm) e posteriormente submetidas à extração do conteúdo celular a fim de se isolar a fração fibrosa insolúvel (Mertens, 2002). Após secagem em estufa com ventilação forçada (60°C) a fibra foi acondicionada em sacos de tecido não-tecido (TNT, 100 g/m²) (Casali et al., 2008), com dimensões 4 x 5 cm, na proporção de 20 mg/cm² de superfície. As amostras foram incubadas em duplicata para cada tempo de incubação no rúmen dos animais, empregando-se os seguintes tempos de incubação: 6, 12 e 24 horas. Após a

retirada, as amostras foram congeladas em ultra-freezer (-70°C) para posterior análise das atividades enzimáticas.

Realizou-se a extração das enzimas segundo métodos descritos para o Experimento 2. Os sacos de TNT com as amostras de fibra foram descongelados e 1 g do resíduo fibroso foi transferido para recipiente *becker* e o restante acondicionado em pesa-filtro e levado à estufa (105°C/16 horas) para obtenção da matéria seca. Ao resíduo úmido acrescentou-se 10 mL de solução fosfato de sódio (10 mM, pH 6,8), 25 µL de mercaptoetanol e 125 µL de lisozima 0,4% (Farenzena et al., 2008), mantendo-o em banho-maria a 37°C por 3 horas. O conteúdo da incubação foi centrifugado (1000 x g/15 min; 4°C), sendo a porção fibrosa removida por filtração em camada tripla de gaze. A fração líquida foi utilizada para estimar as atividades das enzimas CMC e GDH conforme descrito para o Experimento 2.

Análises estatísticas

Os dados foram previamente avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade, de acordo com os testes de Lilliefors e Bartlett, respectivamente ($\alpha = 0,05$). Antecipa-se que as atividades de CMC e GHD não obedeceram a estes pressupostos básicos ($P < 0,05$), sendo transformadas com base no logaritmo natural. Após a transformação verificaram-se condições de normalidade e homocedasticidade ($P > 0,05$).

Após este procedimento, os dados foram analisados por intermédio de análise de variância, segundo delineamento em quadrado latino 3 x 3 em esquema multivariado de medidas repetidas no tempo (Littell et al., 1991). A avaliação dos dados repetidos no tempo foi complementada utilizando-se análise de perfil segundo Curi (1980). Para todos os procedimentos utilizou-se $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1

Para nenhuma das variáveis, em ambas as transferências, observou-se efeito de interação entre fontes de energia e de compostos nitrogenados ($P>0,05$).

Após três transferências, o crescimento de BAL foi favorecido ($P<0,05$) quando se utilizou amido como fonte de energia em relação à celulose (Tabela 4). As fontes de compostos nitrogenados de origem protéica (peptona de soja e caseína) estimularam o crescimento dessas bactérias ($P<0,05$) em comparação à uréia (Tabela 4).

Tabela 4 - Logaritmo decimal da concentração de bactérias lácticas a partir do líquido ruminal (UFC/mL) após a terceira incubação sucessiva em função das fontes de energia e de compostos nitrogenados

Fonte de energia	Fonte de Compostos Nitrogenados ¹				Média
	Controle	Caseína	Peptona de Soja	Uréia	
Celulose	5,540	6,803	7,533	5,302	6,295B
Amido	7,544	7,902	8,382	7,003	7,708A
Média	6,542bc	7,353ab	7,958a	6,152c	CV(%) = 8,6

^{1/} Médias na coluna, seguidas por letras maiúsculas diferentes, ou na linha, seguidas por letras minúsculas diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

O pH não sofreu influência da fonte de energia ($P>0,05$); entretanto, a inclusão de uréia resultou em pH mais elevado ($P<0,05$) em relação às demais fontes de compostos nitrogenados (Tabela 5).

Tabela 5 - pH da cultura oriunda do líquido ruminal após a terceira incubação sucessiva em função das fontes de energia e de compostos nitrogenados

Fonte de energia	Fonte de Compostos Nitrogenados ¹				Média
	Controle	Caseína	Peptona de Soja	Uréia	
Celulose	6,19	6,09	6,21	6,64	6,28A
Amido	6,09	6,23	6,43	6,80	6,39A
Média	6,14b	6,16b	6,32b	6,72a	CV(%) = 3,5

^{1/} Médias na coluna, seguidas por letras maiúsculas diferentes, ou na linha, seguidas por letras minúsculas diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Na quarta transferência, o crescimento de BAL também foi favorecido ($P<0,05$) quando se utilizou amido como fonte de energia (Tabela 6). Assim como na terceira transferência, as fontes de compostos nitrogenados de origem protéica estimularam o crescimento dessas bactérias ($P<0,05$), ao passo que a uréia propiciou concentração de BAL similar à observada no controle ($P>0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Logaritmo decimal da concentração de bactérias lácticas a partir do líquido ruminal (UFC/mL) após a quarta incubação sucessiva em função das fontes de energia e de compostos nitrogenados

Fonte de energia	Fonte de Compostos Nitrogenados ¹				Média
	Controle	Caseína	Peptona de Soja	Uréia	
Celulose	5,778	6,552	7,861	5,589	6,445B
Amido	7,371	7,947	8,288	6,698	7,576A
Média	6,575b	7,250ab	8,075a	6,144b	CV(%) = 12,3

^{1/} Médias na coluna, seguidas por letras maiúsculas diferentes, ou na linha, seguidas por letras minúsculas diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey (P<0,05).

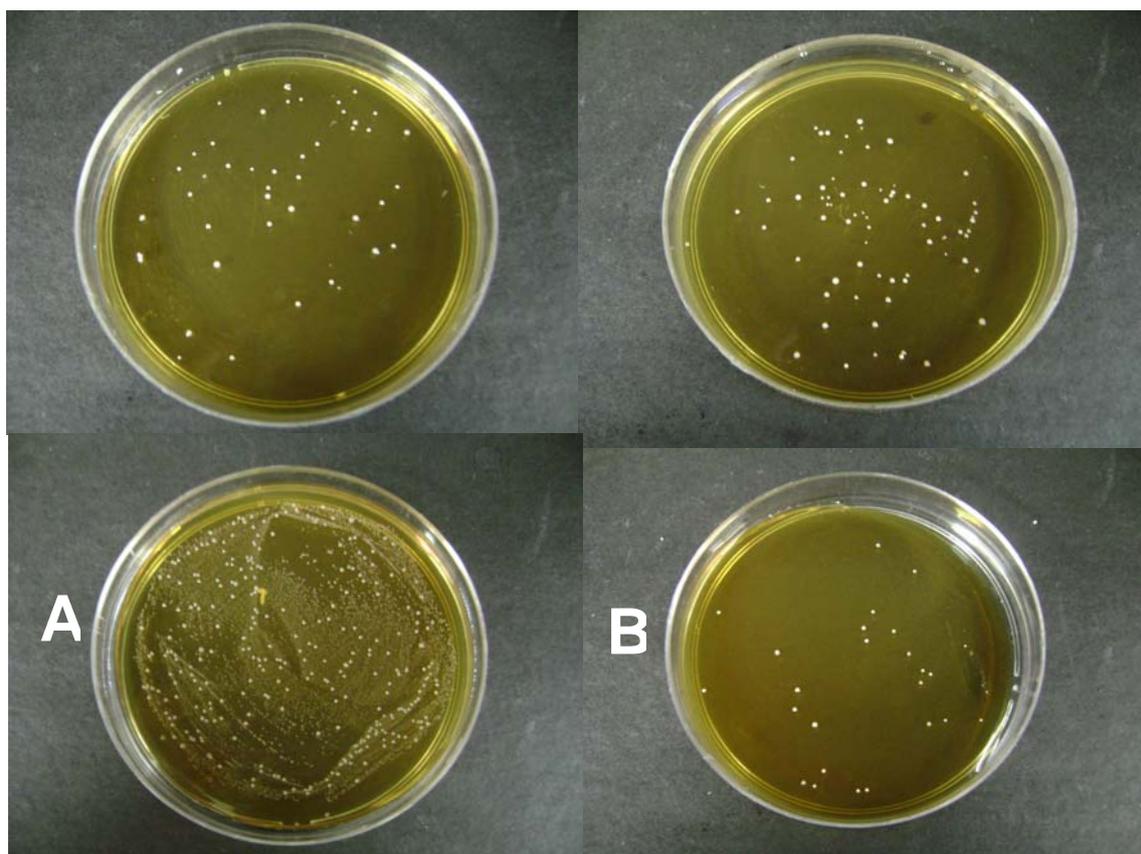


Figura 1 - Crescimento das bactérias ácido lácticas (BAL) após 24 horas de incubação com celulose microcristalina e fontes de nitrogênio em meio seletivo. O fluido oriundo da incubação foi diluído 100 vezes. Fontes de compostos nitrogenados: Controle (A); Caseína (B); Peptona de soja (C); e Uréia (D).

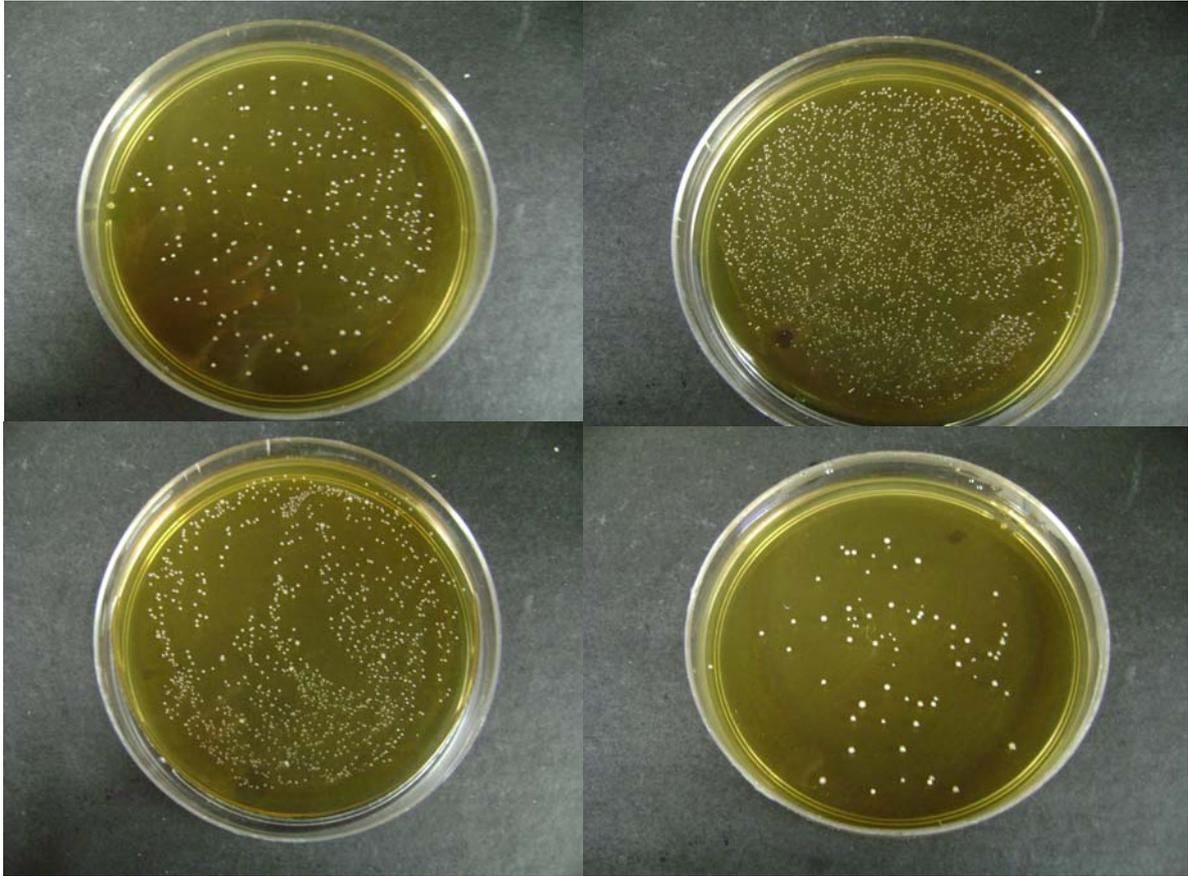


Figura 2 - Crescimento das bactérias ácido lácticas (BAL) após 24 horas de incubação com amido e fontes de nitrogênio em meio seletivo. O fluido oriundo da incubação foi diluído 10000 vezes. Fontes de compostos nitrogenados: Controle (A); Caseína (B); Peptona de soja (C); e Uréia (D).

De maneira similar à transferência anterior, o pH não foi afetado pela fonte de energia ($P > 0,05$); entretanto, a inclusão de uréia resultou em pH mais elevado ($P < 0,05$) em relação às demais fontes de compostos nitrogenados (Tabela 7).

Tabela 7 - pH da cultura oriunda do líquido ruminal após a quarta incubação sucessiva em função das fontes de energia e de compostos nitrogenados

Fonte de energia	Fonte de Compostos Nitrogenados ¹				Média
	Controle	Caseína	Peptona de Soja	Uréia	
Celulose	6,18	6,12	6,17	6,69	6,29A
Amido	6,19	6,19	6,29	6,73	6,35A
Média	6,18b	6,16b	6,23b	6,71a	CV(%) = 3,7

^{1/} Médias na coluna, seguidas por letras maiúsculas diferentes, ou na linha, seguidas por letras minúsculas diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Nas Figuras 1 e 2 é ilustrado o crescimento das BAL após a quarta incubação sucessiva com celulose e amido em meio sólido seletivo, respectivamente. Não foram

detectados halos de inibição nos testes realizados com *L. lactis* e *R. albus*, quando utilizadas culturas ou sobrenadante das culturas de BAL.

Experimento 2

Com seis horas de incubação, a concentração de NA foi maior ($P < 0,05$) quando uréia foi utilizada como fonte de compostos nitrogenados, enquanto as fontes de proteína verdadeira (caseína e casaminoácidos) não propiciaram concentrações de NA superiores ao controle ($P > 0,05$) (Tabela 8).

A concentração de proteína microbiana foi similar entre fontes suplementares ($P > 0,05$), sendo superior ao controle quando utilizada caseína e uréia ($P < 0,05$) (Tabela 8).

A atividade da enzima CMC foi estimulada pelas suplementações com uréia e casaminoácidos ($P < 0,05$) em relação ao controle. A caseína propiciou estimativas intermediárias a estes grupos (Tabela 8). Por outro lado, a suplementação com casaminoácidos propiciou maior atividade da GDH ($P < 0,05$) em relação ao controle, com posições intermediárias observadas para caseína e uréia (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentração de nitrogênio amoniacal (NA – mg/dL) e de proteína microbiana (PTN – mg/mL) e atividades das enzimas carboxi-metil-celulase (CMC – nmol açúcar redutor liberado/g MS/min) e glutamato desidrogenase (GDH – unidades arbitrárias) após 6 horas de incubação, em função da suplementação com compostos nitrogenados

Item	Fonte de Compostos Nitrogenados ¹				CV(%)
	Controle	Caseína	Uréia	Casaminoácidos	
NA	18,42b	36,84b	85,23 ^a	37,77b	28,9
PTN	246,5	299,7	310,2	264,6	-
PTN ²	5,408b	5,646a	5,687 ^a	5,514ab	1,8
CMC	1568,0	1792,3	2287,9	2285,7	-
CMC ²	7,344b	7,455ab	7,691 ^a	7,686a	2,1
GDH	23,97	24,37	24,22	24,61	-
GDH ²	2,934b	2,941ab	2,952ab	2,971a	0,5

^{1/} Médias na linha, seguidas por letras maiúsculas diferentes, ou na linha, seguidas por letras minúsculas diferentes, são diferentes pelo teste DMS de Fisher ($P < 0,05$). ^{2/} Valores transformados com base no logaritmo natural.

Com 12 horas de incubação, a concentração de NA manteve-se mais elevada ($P < 0,05$) quando uréia foi incluída como fonte de compostos nitrogenados (Tabela 9). Entretanto, diferentemente do observado em seis horas, as fontes de compostos nitrogenados proteicos (caseína e casaminoácidos) causaram incremento nas

concentrações NA em relação ao controle ($P<0,05$). Não foram observadas diferenças na concentração de proteína microbiana entre tratamentos ($P>0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Concentração de nitrogênio amoniacal (NA – mg/dL) e de proteína microbiana (PTN – mg/mL) e atividades das enzimas carboxi-metil-celulase (CMC – nmol açúcar redutor liberado/g MS/min) e glutamato desidrogenase (GDH – unidades arbitrárias) após 12 horas de incubação, em função da suplementação com compostos nitrogenados

Item	Fonte de Compostos Nitrogenados ¹				CV(%)
	Controle	Caseína	Uréia	Casaminoácidos	
NA	15,98c	50,19b	99,63 ^a	50,09b	7,3
PTN	325,6	360,1	459,4	314,5	-
PTN ²	5,672a	5,866a	6,104 ^a	5,736a	4,9
CMC	2924,6	2024,6	3515,2	2695,6	-
CMC ²	7,929ab	7,605b	8,108 ^a	7,872ab	2,4
GDH	24,47	24,81	24,63	24,79	-
GDH ²	3,026b	3,041a	3,036ab	3,043a	0,2

^{1/} Médias na linha, seguidas por letras minúsculas diferentes, são diferentes pelo teste DMS de Fisher ($P<0,05$). ^{2/} Valores transformados com base no logaritmo natural.

Após 12 horas de incubação, a suplementação com uréia suportou maiores estimativas de atividade da enzima CMC, embora tenha havido similaridade com as estimativas do tratamento controle e com o uso de casaminoácidos ($P<0,05$). Observou-se, contudo, inibição da CMC pela caseína ($P<0,05$). Em comparação às seis horas de incubação, observou-se que a atividade da GDH passou a ser estimulada também pelo uso de caseína (Tabela 9).

Tabela 10 - Concentração de nitrogênio amoniacal (NA – mg/dL) e de proteína microbiana (PTN – mg/mL) e atividades das enzimas carboxi-metil-celulase (CMC – nmol açúcar redutor liberado/g MS/min) e glutamato desidrogenase (GDH – unidades arbitrárias) após 24 horas de incubação, em função da suplementação com compostos nitrogenados

Item	Fonte de Compostos Nitrogenados ¹				CV(%)
	Controle	Caseína	Uréia	Casaminoácidos	
NA	12,19d	77,5b	95,3 ^a	65,9c	7,8
PTN	622,1	620,2	683,1	616,7	-
PTN ²	6,347a	6,377a	6,380 ^a	6,466a	1,9
CMC	3799,8	3505,7	4654,2	4791,2	-
CMC ²	8,157b	8,100b	8,373 ^a	8,410a	1,2
GDH	22,25	21,42	22,67	20,85	-
GDH ²	2,972a	2,947a	2,988 ^a	2,924a	1,6

^{1/} Médias na linha, seguidas por letras minúsculas diferentes, são diferentes pelo teste DMS de Fisher ($P<0,05$). ^{2/} Valores transformados com base no logaritmo natural.

No último tempo de incubação avaliado (24 horas), a uréia proporcionou maiores concentrações de NA, seguida pela caseína, casaminoácidos e pelo controle ($P < 0,05$) (Tabela 10).

A concentração de proteína microbiana manteve-se estável entre os tratamentos, após 12 e 24 horas de incubação ($P > 0,05$) (Tabelas 9 e 10). A atividade da enzima CMC foi superior com a utilização de uréia e casaminoácidos ($P < 0,05$) em relação ao controle e caseína, que não diferiram entre si ($P > 0,05$) (Tabela 10). A atividade da GDH não apresentou diferenças entre tratamentos ($P > 0,05$) (Tabela 10).

Experimento 3

Não houve efeito ($P > 0,05$) de fonte de compostos nitrogenados, tempo, ou interação entre esses fatores nas medidas de NA e pH (Tabela 11). A atividade da enzima CMC apresentou efeito de interação entre tempo e fonte ($P < 0,05$). Sobre a atividade da GDH observou-se efeito de fonte de compostos nitrogenados e tempo ($P < 0,05$); contudo, não houve interação entre os fatores ($P > 0,05$) (Tabela 11). A média do pH do líquido de rúmen foi de 6,55 (Tabela 12).

Tabela 11 - Níveis descritivos de probabilidade para o erro tipo I associado à hipótese de ausência de efeitos da fonte de compostos nitrogenados, do tempo de avaliação e de sua interação para a concentração de nitrogênio amoniacal e pH ruminal e para a atividade das enzimas carboxi-metil-celulase (CMC) e glutamato desidrogenase (GDH)

Variável	Efeito		
	Fonte	Tempo	Fonte x Tempo
NA	0,0647	0,0771	0,2018
pH	0,7429	0,3584	0,6706
CMC ¹	0,0001	0,0001	0,0060
GDH ¹	0,0111	<0,0001	0,1082

^{1/} Variável avaliada após transformação com base no logaritmo natural.

Com seis horas de incubação, a atividade da enzima CMC foi menor ($P < 0,05$) com ambas fontes de compostos nitrogenados em relação ao controle (Tabela 13). Entretanto, a albumina proporcionou atividade inferior à uréia ($P < 0,05$). De seis para doze horas pós-suplementação observou-se incremento na atividade da CMC com a uréia ($P < 0,05$). Este comportamento propiciou às 12 horas pós-suplementação atividade similar entre controle e uréia ($P > 0,05$), sendo ambos superiores à albumina ($P < 0,05$) (Tabela 13).

De 12 a 24 horas pós-suplementação, verificou-se estabilidade da atividade da CMC com o uso de uréia ($P>0,05$), sendo observado incremento de atividade no controle e com a suplementação com albumina ($P<0,05$) (Tabela 13). Este comportamento levou à similaridade entre fontes de compostos nitrogenados suplementares ($P>0,05$) em 24 horas pós-suplementação, sendo ambas inferiores ao controle ($P<0,05$) (Tabela 13).

Tabela 12 - pH do líquido ruminal em função dos tempos de incubação e das fontes de compostos nitrogenados

Fonte	Tempo					Média
	6	Δ_{6-12}	12	Δ_{12-24}	24	
Controle	6,50	-0,32	6,18	+0,48	6,66	6,45
Albumina	6,50	+0,04	6,54	+0,13	6,67	6,57
Uréia	6,52	+0,14	6,66	+0,06	6,72	6,63
Média	-	-0,05	-	+0,22	-	

Como não houve interação entre fontes de compostos nitrogenados e tempo para a atividade da enzima GDH ($P>0,05$), procedeu-se à comparação das médias marginais de cada tratamento; contudo, nenhuma diferença ($P>0,05$) foi observada (Tabela 14). A atividade da enzima, em termos gerais, foi ampliada nos intervalos avaliados ($P<0,05$).

Tabela 13- Logaritmo natural da atividade da carboxi-metil-celulase (nmol açúcar redutor/g de MS/min) em função dos tempos de incubação e das fontes de compostos nitrogenados

Fonte	Tempo				
	6 ¹	Δ_{6-12} ²	12 ¹	Δ_{12-24} ²	24 ¹
Controle	9,073a	-0,005	9,068a	+0,220*	9,288a
Albumina	8,858c	+0,089	8,947b	+0,159*	9,106b
Uréia	8,945b	+0,172*	9,117a	+0,038	9,155b

¹/ Médias na coluna, seguidas por letras maiúsculas diferentes, são diferentes pela análise de perfil ($P<0,05$). ²/ Diferenciais seguidos por (*) são diferentes de zero pela análise de perfil ($P<0,05$).

Embora não se tenha detectado efeitos da fonte de compostos nitrogenados e do tempo de incubação sobre a concentração de NA pelo nível de significância adotado neste estudo ($\alpha = 0,05$), devido à relevância desta variável, optou-se por adotar $\alpha=0,10$ na avaliação das diferenças entre tratamentos e tempos de incubação, dado os níveis de probabilidade expressos na Tabela 11.

Tabela 14 - Logaritmo natural da atividade da glutamato desidrogenase (unidades arbitrárias) em função dos tempos de incubação e das fontes de compostos nitrogenados

Fonte	Tempo					Média ¹
	6	Δ_{6-12}	12	Δ_{12-24}	24	
Controle	1,146	+0,183	1,329	+0,623	1,952	1,397a
Albumina	1,257	+0,262	1,519	+0,600	2,119	1,551a
Uréia	0,937	+0,671	1,608	+0,309	1,917	1,426a
Média ²	-	+0,435*	-	+0,546*	-	-

¹/ Médias na coluna, seguidas por letras minúsculas diferentes, são diferentes pela análise de perfil (P<0,05). ²/ Diferenciais seguidos por (*) são diferentes de zero pela análise de perfil (P<0,05).

As fontes de compostos nitrogenados (uréia e albumina) causaram incremento (P<0,10) nas concentrações NA em relação ao controle (Tabela 15). As concentrações de NA decresceram a partir do primeiro momento de avaliação (P<0,10) (Tabela 15).

Tabela 15 - Concentração de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal (mg/dL) em função dos tempos de incubação e das fontes de compostos nitrogenados

Fonte	Tempo					Média
	6 ¹	Δ_{6-12} ²	12 ¹	Δ_{12-24} ²	24 ¹	
Controle	9,97	-0,54	9,43	-0,84	8,59	9,33b
Albumina	36,22	-20,72	15,50	-6,05	9,45	20,39a
Uréia	47,04	-25,20	21,84	-10,93	10,91	26,60a
Média	-	-15,49*	-	-5,94*	-	-

¹/ Médias na coluna, seguidas por letras minúsculas diferentes, são diferentes pela análise de perfil (P<0,10). ²/ Diferenciais seguidos por (*) são diferentes de zero pela análise de perfil (P<0,10).

DISCUSSÃO

O rúmen constitui ambiente complexo, composto por diversas espécies microbianas, no qual bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais (CE) e fermentadoras de carboidratos não-estruturais (CNE) competem por substratos limitantes como amônia, peptídeos e enxofre (Russell et al., 1992).

Uma vez que os componentes fibrosos são hidrolisados a taxas mais lentas em comparação aos carboidratos não-estruturais, a energia para o crescimento microbiano também se torna disponível mais lentamente. Assim, as bactérias fermentadoras de CNE podem crescer a taxas maiores. Por outro lado, os microrganismos fibrolíticos estão em associação física com as partículas de forragem, ricas em substratos. Este comportamento amplia, porém não permite suplantar, a capacidade de competição desses microrganismos com os fermentadores de CNE, que possuem comportamento predominantemente não-aderente, como as bactérias ácido lácticas (BAL).

A inclusão de amido como fonte de energia nas incubações com inóculo ruminal propiciou maior crescimento das BAL, demonstrando que o fornecimento de carboidratos prontamente fermentáveis favorece as bactérias fermentadoras de CNE em detrimento das fermentadoras de CE (Tabelas 4 e 6). Este fenômeno, conhecido como “efeito carboidrato”, amplia a competição por nutrientes essenciais entre grupos de espécies microbianas (El-Shazly et al., 1961; Coelho da Silva & Leão, 1979; Mould et al., 1983), o que desfavorece a utilização da fibra insolúvel pelos microrganismos fibrolíticos (Rooke et al., 1987; Huhtanen, 1987; Paez-Bernal, 2007; Zorzi, 2008; Costa et al., 2009), de menor taxa de crescimento e, conseqüentemente, menor capacidade competitiva.

Resultados obtidos em condições tropicais permitem evidenciar que a suplementação exclusiva com fontes de proteína verdadeira causa inibição da utilização da fibra de forragens de alta qualidade de forma similar à suplementação exclusiva com fontes de carboidratos rapidamente fermentáveis (Paez-Bernal, 2007; Zorzi, 2008; Costa et al., 2009).

No presente trabalho, ficou evidenciado que fontes de compostos nitrogenados de origem protéica (caseína e peptona de soja) proporcionam maior contagem de BAL, enquanto a utilização de compostos nitrogenados de origem não-protéica (uréia) implicou número de BAL igual ou inferior em relação à não inclusão de fontes

nitrogenadas suplementares (Tabelas 4 e 6). Este comportamento evidencia que, ao menos parte dos efeitos deletérios sobre o crescimento microbiano fibrolítico observados com a suplementação com proteína verdadeira (Paez-Bernal, 2007; Zorzi, 2008; Costa et al., 2009), parecem advir de ampliação na competição no ambiente ruminal.

Desta forma, embora as bactérias fibrolíticas possuam comportamento aderente, e isto constitua uma vantagem competitiva, a inclusão de amido e/ou fontes nitrogenadas de origem protéica estimula o crescimento de bactérias que utilizam carboidratos de rápida fermentação (e.g. BAL), suplantando a vantagem da adesão celular às partículas.

Traçando-se analogia aos resultados aqui obtidos, BAL encontradas em alimentos, tais como queijos, possuem atividade proteolítica eficiente, a qual é responsável pelo fornecimento de aminoácidos; como resultado, essas bactérias possuem capacidade limitada para bio-síntese de proteína a partir de NA (Hugenholtz & Kleerebezem, 1999). Deste modo, a suplementação com compostos nitrogenados de origem não-protéica não ampliaria a disponibilidade de substratos para o crescimento das bactérias fermentadoras de CNE, reduzindo sua capacidade de competição com as fermentadoras de CE. Isto corroboraria o estímulo sobre a utilização da fibra insolúvel observados por alguns autores ao utilizarem uréia como fonte de compostos nitrogenados no meio de crescimento microbiano (Paez-Bernal, 2007; Zorzi, 2008).

Alguns autores têm reportado a inibição da atividade de enzimas fibrolíticas em função da presença de amido no meio (Hiltne & Dehority, 1983, citados por Arroquy et al., 2005; Piwonka & Firkins, 1993), fato que parece estar associado à liberação de compostos inibidores pelos microrganismos que degradam amido (El-Shazly et al., 1961), os quais parecem ser de natureza protéica (bacteriocinas) (Piwonka & Firkins, 1993; Kalmokoff et al., 1996). Em condições tropicais, têm-se especulado que a suplementação exclusivamente protéica estimula a produção de bacteriocinas no meio (Paez-Bernal, 2007; Zorzi, 2008; Costa et al., 2009), como reflexo do aumento na disponibilidade de aminoácidos (De Vuyst & Vandamme, 1993).

As BAL são responsáveis pela produção de diversos tipos de bacteriocinas (Axelsson, 1998). Entretanto, nenhuma atividade antimicrobiana foi detectada nas BAL isoladas do rúmen neste trabalho. Isso pode demonstrar que, sob condições laboratoriais, bacteriocinas não foram expressas ou liberadas; indicando que os eventos

de competição parecem predominar sobre o balanço de atividades de microrganismos fibrolíticos e não-fibrolíticos no tocante à suplementação com compostos nitrogenados.

Contudo, sugere-se a realização de mais estudos sobre o possível papel das bacteriocinas na atividade fibrolítica ruminal, uma vez que existem grandes dificuldades para sua quantificação.

O pH das incubações (*in vitro*) com uréia foi mais elevado em relação ao controle e à suplementação com compostos nitrogenados de origem protéica (Tabelas 5 e 7), o que pode ter favorecido as bactérias fermentadoras de CE.

Bactérias celulolíticas (e.g. *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *R. flavefaciens*) demonstram sensibilidade abrupta a declínios do pH (Russell & Dombrowski, 1980). Mould et al. (1983) concluíram que o crescimento de bactérias celulolíticas é totalmente inibido em valores de pH abaixo de 6,0; entretanto, no presente trabalho, o pH foi mantido sempre acima de 6,08 (Tabelas 5 e 7).

No ensaio *in vivo* o pH não foi afetado pela inclusão de compostos nitrogenados (média de 6,55) (Tabela 12). Geralmente, em animais alimentados com rações predominantemente volumosas, a variação do pH devido à suplementação é relativamente pequena, sendo possível que não haja interferências negativas deste fator sobre o crescimento das bactérias celulolíticas. Portanto, nessas condições, alterações sobre o pH não parecem constituir efeito relevante no tocante ao estudo da influência da suplementação com compostos nitrogenados.

Em sistemas *in vitro*, como não há dreno aos produtos gerados, a concentração de NA é sempre maior do que aquela observada em ensaios *in vivo*. O fornecimento de uréia propiciou maiores concentrações de NA em todos os tempos de incubação do ensaio *in vitro* (Tabelas 8, 9 e 10). O NA proveniente dos compostos nitrogenados protéicos foi superior ao controle apenas após a 6ª hora de incubação; entretanto, essas concentrações foram sempre inferiores às obtidas com uréia (Tabelas 8, 9 e 10).

In vivo, devido à absorção pelo epitélio ruminal, as concentrações de NA elevam-se no período após a suplementação, e diminuem com o tempo; entretanto, devido aos mecanismos de reciclagem de nitrogênio, quando fontes exógenas de compostos nitrogenados foram adicionadas ao sistema, as concentrações de NA foram sempre superiores ao controle (Tabela 15), mesmo com a forragem fornecida possuindo teores de PB acima de 130g/kg (Tabela 3). Maiores concentrações de NA favorecem o

ambiente ruminal, principalmente para as bactérias fibrolíticas as quais utilizam NA como principal fonte de nitrogênio.

Apesar da maior disponibilidade de NA quando fontes de compostos nitrogenados são incluídos, incrementos nas concentrações de proteína microbiana foram observadas apenas na sexta hora de incubação (Tabelas 8, 9 e 10). Isso poderia ser explicado devido às maiores concentrações de NA nas primeiras horas após a suplementação.

De forma geral, todas as fontes de compostos nitrogenados utilizadas acarretaram concentrações similares de proteína microbiana (Tabelas 8, 9 e 10). Este comportamento reforça a existência de competição entre grupos de espécies microbianas, uma vez que o favorecimento de determinado grupo reduz a produção e o rendimento de outro grupo, levando a um equilíbrio final da produção microbiana total no meio.

A celulose é um polímero linear constituído por ligações glicosídicas β -1,4, que possui uma estrutura primária simples e estruturas terciárias mais complexas. Em algumas regiões a cadeia da celulose é altamente ordenada e fortemente ligada por pontes de hidrogênio formando arranjos cristalinos, enquanto moléculas de celulose fracamente arranjadas formam a região amorfa (Bhat & Hazlewood, 2001). A região cristalina da celulose é rígida e pouco acessível às celulasas, enquanto a região amorfa é facilmente atacada por endoglucanases ou exoglucanases (Sinitsyn et al., 1990). Portanto, para a hidrólise completa da celulose faz-se necessário um sistema enzimático completo, capaz de atuar sobre as regiões cristalina e amorfa.

O sistema celulase contém principalmente endoglucanases, exoglucanases ou celobiohidrolases e β -glucosidase ou celobiase. A atividade das endoglucanases é geralmente determinada pela mensuração dos açúcares redutores liberados da carboximetil-celulose (Wood & Bhat, 1988).

As celulasas das bactérias podem adotar diferentes mecanismos para a hidrólise da celulose. Bactérias anaeróbias, incluindo as espécies ruminais, possuem um complexo enzimático de alta massa molecular chamado celulosoma (Beguin & Lemaire, 1996). De acordo com Bhat & Hazlewood (2001), as celulasas são enzimas induzíveis; entretanto, uma vez que os polissacarídeos não podem adentrar a célula microbiana, baixos níveis de celulasas são produzidos constitutivamente. Assim, a hidrólise da celulose produz açúcares solúveis que, ao entrarem na célula, agem como ou são convertidos em indutores da transcrição dos genes da celulase (Biely, 1993;

Kubicek et al., 1993). Desta forma, a inibição da atividade hidrolítica da celulase acarreta, indiretamente, menor síntese da enzima, o que potencializa a ação de fatores inibitórios.

A inclusão de albumina inibiu a atividade da enzima CMC no ensaio *in vivo* (Tabela 13). Por outro lado, a inclusão de uréia favoreceu a atividade dessa enzima no sistema *in vitro* (Tabelas 8, 9, 10). Este resultado corrobora com os dados do primeiro experimento, mostrando que fontes nitrogenadas de origem protéica favorecem o crescimento de bactérias fermentadoras de CNE, aumentando a competição e desfavorecendo as fermentadoras de CE.

Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Firkins et al. (1991), que verificaram estímulo sobre a atividade da CMC utilizando uréia como fonte de compostos nitrogenados.

Ressalta-se que a atividade da CMC não somente reflete a extensão da degradação, mas acentua as pequenas diferenças observadas na taxa de degradação, conferindo maior sensibilidade no estudo dos efeitos de diferentes tratamentos em alterar a dinâmica de degradação de substratos celulosídicos (Silva et al., 1987).

Embora alguns autores tenham atribuído a maior eficiência de implementação de níveis de NA no rúmen como um dos fatores favoráveis da uréia como suplemento (Paulino et al., 2008), os resultados obtidos *in vivo* (Tabela 15) evidenciam que fontes protéicas e não-protéicas foram igualmente efetivas neste quesito. Assim, a menor atividade da CMC *in vivo* com a utilização de albumina não parece estar associada à disponibilidade de precursores nitrogenados para síntese de enzimas fibrolíticas.

A inclusão de casaminoácidos resultou em níveis na atividade da CMC similares aos obtidos com uréia (Tabelas 8, 9, e 10). Este composto é resultante da hidrólise ácida da caseína, que resulta em aminoácidos livres. Sob este ponto de vista, a inibição na utilização da fibra pela inclusão de proteína verdadeira não parece ser devido à natureza deste nutriente, mas sim aos mecanismos de assimilação e competição dos microrganismos.

Bactérias ruminais são capazes de utilizar peptídeos a taxas mais rápidas do que aminoácidos livres. Isso acontece porque a energia despendida para transportar um peptídeo contendo vários aminoácidos é a mesma despendida para transportar um único aminoácido livre (Chen et al. 1987a,b; Russell et al. 1991). Estudos indicam que o produto final da degradação de proteínas são peptídeos, e não aminoácidos livres (Hino

& Russel, 1986). Estes autores sugeriram que o transporte, e não a deaminação, seria o passo limitante no metabolismo de proteína.

Contudo, no presente trabalho, sob a ótica da competição entre bactérias fermentadoras de CE e CNE, o melhor desempenho das bactérias fibrolíticas (relacionado à maior atividade da CMC) pode ser explicado pelo menor favorecimento das bactérias amilolíticas, que utilizam peptídeos de maneira mais eficiente. Por outro lado, a competição por substratos nitrogenados pode ser favorável às celulolíticas quando aminoácidos são fornecidos no lugar de peptídeos ou proteína, pois a assimilação de peptídeos pelas bactérias fermentadoras de CNE diminui a competitividade das fermentadoras de CE que necessitam de fontes nitrogenadas mais disponíveis, como aminoácidos ou NA.

Diferentes sistemas enzimáticos podem ser utilizados na assimilação da amônia, sendo que a predominância de determinado sistema depende da concentração no meio e do acúmulo intracelular.

O sistema enzimático de maior afinidade é o glutamina sintetase-glutamato sintase (GS-GOGAT) (White, 2000). A amônia é primeiramente incorporada na glutamina, usando glutamato como substrato, hidrolisando ATP. O NH_2 é então transferido ao α -oxaloglutarato formando duas moléculas de glutamato (Wallace et al., 1997). Se a concentração de amônia é baixa, a eficiência do crescimento microbiano é reduzida, porque o ATP é desviado do crescimento para o processo de captação de compostos nitrogenados pela GS-GOGAT. Erfle et al. (1977) verificaram atividade de GS-GOGAT em condições de baixas concentrações de amônia, mas a atividade desta enzima não foi significativa em concentrações elevadas.

Quando se têm alta concentração de amônia, a principal via de assimilação de nitrogênio é a glutamato-desidrogenase (GDH) (White, 2000). Os sistemas de assimilação de menor afinidade presente nos microrganismos ruminais incluem glutamato desidrogenase-NADP (GDH-NADP), GDH-NAD e alanina desidrogenase (Wallace et al., 1997). Contudo, a GDH-NAD é o principal sistema enzimático envolvido na assimilação de amônia em proteína microbiana no rúmen (Chalupa et al., 1969). Schaefer et al. (1980) determinaram as constantes de saturação da amônia em culturas puras representativas do conteúdo ruminal e concluíram que, para a maioria das espécies ruminais, a constante de saturação (k_s) para amônia variou entre 15 e 45 mM. Estes autores também determinaram que a assimilação de amônia pela bactéria por intermédio do sistema ATP-dependente pode diminuir o rendimento de ATP na célula

em até 14%. Torna-se importante perceber que a atividade enzimática constitui estimativa do potencial metabólico e pode não refletir as taxas reais de formação do produto. A utilização da amônia ruminal é controlada não somente pelas enzimas que ligam a amônia ao carbono, mas também por outros fatores como a disponibilidade de energia e cofatores, nível de substrato e permeabilidade da membrana bacteriana (Chalupa et al., 1969).

Nas incubações *in vitro*, a atividade da GDH mostrou-se, de forma geral, superior nos tratamentos que continham fontes suplementares de compostos nitrogenados (Tabelas 8, 9 e 10). Isso parece ser devido à maior concentração de NA nesses tratamentos, uma vez que o k_m da GDH para amônia é de 20 a 33 mM, que correspondem a 34 a 56 mg/dL, respectivamente (Erfle et al., 1977; Wallace, 1979).

Por outro lado, no ensaio *in vivo*, não foi detectada diferença na atividade da GDH entre os tratamentos. Chalupa et al. (1969) obtiveram resultados semelhantes alimentando ovelhas com uréia ou farelo de soja.

Paulino et al. (2008) especularam que a elevação do nível de NA no rúmen com a suplementação com uréia poderia incrementar a atividade da GDH, permitindo a otimização do uso de energia para o crescimento microbiano. Contudo, os resultados obtidos *in vivo* (Tabela 14) indicaram que a suplementação não alterou o potencial de ação da GDH em animais alimentados com forragem de alta qualidade, mesmo com concentrações de NA inferiores ao que seria teoricamente definido como k_m desta enzima, como observado no tratamento controle (Tabela 15).

CONCLUSÕES

Fontes de compostos nitrogenados de origem protéica provocam efeitos deletérios sobre a utilização de substratos fibrosos insolúveis devido ao favorecimento de bactérias fermentadoras de CNE que utilizam peptídeos preferencialmente a aminoácidos e compostos nitrogenados não-protéicos em detrimento das bactérias fermentadoras de CE. Por outro lado, compostos nitrogenados de origem não-protéica incrementam a hidrólise da celulose, como consequência do favorecimento das bactérias fermentadoras de CE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASEN, I.M.; MØRETRØ, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L.; STORRØ, I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.159-166, 2000.
- ARROQUY, J.I.; COCHRAN R.C.; NAGARAJA T.G.; TITGEMEYER, E.C.; JOHNSON, D.E. Effect of types of non-fiber carbohydrate on *in vitro* forage fiber digestion of low-quality grass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v.120 p.93-106, 2005.
- ATLAS, R.M. **Media for environmental microbiology**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. 454p.
- AXELSSON, L. Classification and physiology In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A; OUWEHAND, A.C. (Eds.) **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional Aspect**. 3ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p.1-66.
- BEGUIN P.; LEMAIRE M. The cellulosome: an exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. **Critical Reviews in Biochemistry**, v. 31, p.201-236, 1996.
- BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. (Eds.) **Hemicellulose and hemicellulases**. London: Portland Press, 1993. p.29-51.
- BHAT, M.K.; HAZLEWOOD, G.P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: BEDFORD, M.R.; PARTRIDGE, G.G. (Eds.) **Enzymes in farm animal nutrition**. Wiltshire: CABI Publishing, 2001. p. 11-60.
- BRADFORD, M. Photometric methods for protein determination. Procedures and materials. **Animal Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BROWN, C.M.; MACDONALD-BROWN, D.S.; MEERS, J.L. Physiological aspects of microbial inorganic nitrogen metabolism. **Advances in Microbiology Physiology**, v.11, p.1-52, 1974.
- CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PEREIRA, J.C.; FREITAS, S.G.; PAULINO, M.F. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.335-342, 2008.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.
- CHALUPA, W.; CLARK, J.; OPLIGER P.; LAVKER R. Ammonia metabolism in rumen bacteria and mucosa from sheep fed soy protein or urea. **Journal of Nutrition**, v.100, p.161-169, 1969.

- CHEN, G.; RUSSELL, J.B.; SNIFFEN, C.J. A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptide uptake can be a rate-limiting step in ruminal protein degradation. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.1211-1219, 1987a.
- CHEN, G.; RUSSELL, J.B.; SNIFFEN, C.J. Effect of hydrophobicity on utilization of peptides by ruminal bacteria *in vitro* **Applied And Environmental Microbiology**, v.53, p.2021-2025, 1987b.
- COELHO DA SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. **Fundamentos da nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 380 p.
- CONE, J.W.; Van GELDER, A.H. Influence of protein fermentation on gas production profiles. **Animal Feed Science and Technology**, v.76, p.251-264, 1999.
- COSTA, V.A.C.; DETMANN, E. VALADARES FILHO, S.C.; MANTOVANI, H.C.; PAULINO, M.F.; HENRIQUES L.T. Degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de forragem tropical de alta qualidade em função da suplementação com proteína e/ou carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2009 (no prelo).
- CURI, P.R. Análises de medidas repetidas em experimentos biológicos. **Revista Brasileira de Estatística**, v.41, p.137-150, 1980.
- De MAN J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**. v 23, p.130-135, 1960.
- DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; VALADARES FILHO, S.C. CECON, P.R.; ZERVOUDAKIS, J.T.; CABRAL, L.S; GONÇALVES, L.C.; VALADARES, R.F.D. Níveis de proteína em suplementos para terminação de bovinos em pastejo durante período de transição seca/águas: digestibilidade aparente e parâmetros do metabolismo ruminal e dos compostos nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1380-1391, 2005.
- De VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p.17-22, 1993.
- EL-SHAZLY, K.; DEHORITY, B.A.; JONSON, R.R. Effect of starch on the digestion of cellulose *in vitro* and *in vivo* on rumen microorganisms. **Journal of Animal Science**, v.20, p.268-276, 1961.
- ERFLE, J.D.; SAUER, F.D.; MAHADEVAN, S. Effect of ammonia concentration on activity of enzymes of ammonia assimilation and on synthesis of amino acids by mixed rumen bacteria in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v.60, p.1064-1071, 1977.
- FARENZENA, R. KOZLOSKI, G.V., CASTAGNINO, P.S. MEZZOMO, M.; ZAGO, D.; OLIVEIRA, L.; MESQUITA, F.R. Metodologia para determinação da atividade enzimática de bactérias fibrolíticas ruminais: uso do ditiotreitól ou mercaptoetanol como antioxidantes, com ou sem tetracloreto de carbono. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45, Lavras, **Anais...** Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2008 (CD-ROM).

- FIRKINS, J.L.; BOWMAN, J.G.P.; WEISS, W. P.; NADERER, J. Effects of protein, carbohydrate, and fat sources on bacterial colonization and degradation of fiber *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.4273-4283, 1991.
- HINO, T.; RUSSELL, J.B. Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.64, p.261-270, 1986.
- HUGENHOLTZ, J.; KLEEREBEZEM, M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. **Food Biotechnology**, v.10, p.492-497, 1999.
- HUHTANEN, P. The effects of intraruminal infusions of sucrose and xylose on the nitrogen and fibre digestion in the rumen of cattle receiving diets of grass silage and barley. **Journal of Agriculture Science in Finland**, v.59, p.101-120, 1987.
- KALMOKOFF, M.L.; BARTLETT, F. TEARHER, R.M. Are ruminal bacterias armed with bacteriocins? **Journal of Animal Science**, v.79, p.2297-2306, 1996.
- KIM W.S.; HALL, R.J.; DUNN, N.W. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, p.449-453, 1997.
- KING, J. Glutamate dehydrogenase – Colorimetric assay. In: BERGMAYER, H.U (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. 2 ed., New York: Academic Press, 1974. p.656-659.
- KUBICEK, C.P.; MESSNER, R.; GRUBER, F.; MACH, R.L.; KUBICEK-PRANZ, E.M. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle - from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, p.90-99, 1993.
- LITTELL, R.C.; FREUND, R.J.; SPECTOR, P.C. **SAS system for linear models**. Cary: SAS Institute, 1991. 329p.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- MILLER, G.L.; BLUM, R.; GLENNON, W.E; BURTON, A.L. Measurement of carboxymethylcellulase activity. **Analytical Biochemistry**, v.2, p.127-132, 1960.
- MOULD, F.L.; ORSKOV, E.R.; MANN, S.O. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, v.10, p.15-30, 1983.
- OLIVEIRA, A.L.F.; CABRAL, L.S.; VALADARES FILHO, S.C.; DETMANN, E. Efeito da fermentação de proteínas na cinética de produção de gases *in vitro*. In: ZOOTEC'2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Associação Brasileira de Zootecistas, 2005 (CD-ROM).

- PAEZ-BERNAL, D.M. **Dinâmica de degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de capim-braquiária em função de suplementação com diferentes fontes de compostos nitrogenados e carboidratos.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007, 49p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52, p.628-638, 1999.
- PAULINO, M.F.; MORAES, E.H.B.K.; ZERVOUDAKIS, J.T.; ALEXANDRINO, E.; FIGUEIREDO, D.M. Fontes de energia em suplementos múltiplos de auto-regulação de consumo na recria de novilhos mestiços em pastagens de capim-*Brachiaria decumbens* durante o período das águas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.957-962, 2005.
- PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. Suplementação animal em pasto: energética ou protéica? In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 3, 2006, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SIMFOR, 2006. p.359-392.
- PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; VALENTE, E.E.L.; BARROS, L.V. Nutrição de bovinos em pastejo. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 4, 2008, Viçosa, **Anais...** Viçosa: SIMFOR, 2008. p.131-169.
- PIWONKA, E.J.; FIRKINS, J.L. Effect of glucose fermentation on fiber digestion by rumen microorganisms *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1196-2206, 1993.
- POPPI, D.P.; McLENNAN, S.R. Protein and energy utilization by ruminants at pasture. **Journal of Animal Science**, v.73, p.278-290, 1995.
- PORTO, M.O. **Suplementos múltiplos para recria e terminação de bovinos em pastejo durante o período das águas.** Viçosa: UFV, 2005, 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- ROOKE, J.A; LEE, N.H.; ARMSTRONG, D.G. The effects of intraruminal infusions of urea, casein, glucose syrup and a mixture of glucose syrup and casein on nitrogen digestion in the rumen of cattle receiving grass silage diets. **British Journal of Nutrition**, v.57, p. 89-98, 1987.
- RUSSELL, J.B.; DOMBROWSKI, D.B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied And Environmental Microbiology**, v.39, p. 604-610, 1980.
- RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J. D.; FOX D.G. Van SOEST, P.J.; SNIFFEN, C.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3551-3561, 1992.
- RUSSELL, J.B.; ONDERA, R.; HINO, T. Ruminant protein fermentation: new perspectives on previous contradictions. In: TSUDA, T.; SASAKI, Y.;

- KAWASHIMA, R. (Eds.). **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. New York: Academic Press, 1991. p.681-697.
- SCHAEFER, D.M.; DAVIS, C.L.; BRYANT, M.P. Ammonia saturation constants for predominant species of rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1248-1263, 1980.
- SINITSYN, A.P.; GUSAKOV, A.V.; YU VLASENKO, E. Effect of structural and physico-chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, p. 43-59, 1990.
- SILVA, A.T.; WALLACE, R.J.; ØRSKOV, E.R. Use of particle-bound microbial enzyme activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. **British Journal of Nutrition**, v.57, p.407-415, 1987.
- TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriology Review**. v 40, p. 722 - 756, 1976.
- VALADARES FILHO, S. C. ; PINA, D. S.; CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES, R. F. D.; LEÃO, M. I. ; CAMPOS, J. M. S. Degradação Ruminal da Proteína dos Alimentos e síntese de Proteína Microbiana. In: VALADARES FILHO S. C.; PAULINO, P.V.R.; MAGALHÃES, K. A. (Eds.). **Exigências Nutricionais de Zebuínos e Tabelas de Composição de Alimentos**. 1 ed. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora Ltda, 2006, v. , p. 13-43.
- WALLACE, R.J. Effect of ammonia concentration on the composition, hydrolytic activity and nitrogen metabolism of the microbial flora of the rumen. **Journal of Applied Microbiology**, v.47, p.443-455, 1979.
- WALLACE, R.J.; ONDERA, R.; COTTA, M.A. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2 ed. London: Chapman Hall, 1997. p.283-328.
- WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. 2ed. New York: Oxford University Press, 2000. 565p.
- WOOD, T.M.; BHAT, K.M. Methods for measuring cellulase activities. In: WOOD, W.A. AND KELLOGG, S.T. (Eds) **Methods in enzymology**, London: Academic Press, 1988. p.87-112.
- WOLIN, M.J.; MILLER, T.L; STEWARD, C.S. Microbe-microbe interactions. In: HOBSON, P.N.; STEWARD, C.S. (Eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2. ed. London: Chapman Hall, 1997. p.467- 491.
- ZORZI, K.; **Dinâmica de degradação *in vitro* da fibra em detergente neutro de capim-braquiária em função de suplementação com diferentes níveis e fontes de compostos nitrogenados** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007, 39p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2008.