

JULIANA SILVA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO SORO DE LEITE FERMENTADO
PELO CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS *Enterococcus faecium* E *Veilonella*
parvula NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do Título de “*Doctor Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

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

T

O48a
2008

Oliveira, Juliana Silva de, 1981-

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do soro de leite fermentado
pelo consórcio de bactérias *Enterococcus faecium* e
Veilonella parvula na alimentação de ruminantes
/ Juliana Silva de Oliveira. – Viçosa, MG, 2008.
xii, 67f.: il. ; 29cm.

Orientador: Augusto César de Queiroz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Nutrição animal. 2. Bovino - Alimentação e rações.
3. Alimentos - Aditivos. 4. Rúmen - Microbiologia.
5. Ácidos orgânicos. 6. Probióticos. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.085

JULIANA SILVA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO SORO DE LEITE FERMENTADO
PELO CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS *Enterococcus faecium* E *Veilonella*
parvula NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do Título de “*Doctor Scientiae*”.

APROVADA: 21 DE MAIO DE 2008

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Co-Orientador)

Edenio Detmann
(Co-Orientador)

Prof. Antônio Bento Mâncio

Márcia Maria Cândido da Silva

Augusto César de Queiroz
(Orientador)

ÍNDICE

	Página
RESUMO -----	iii
ABSTRACT -----	viii
INTRODUÇÃO GERAL-----	1
REVISÃO DE LITERATURA -----	4
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	13
CAPÍTULO 1 -----	16
Efeito do ácido propiônico e ácido láctico sobre o crescimento das bactérias ruminais <i>in vitro</i> -----	16
Introdução -----	16
Material e Métodos -----	17
Resultados e Discussão -----	21
Conclusões -----	31
Literatura Citada -----	32
CAPÍTULO 2 -----	33
Efeito do soro de leite fermentado pelo consórcio de <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Veilonella parvula</i> sobre as bactérias ruminais <i>in vitro</i> -----	33
Introdução -----	33
Material e Métodos -----	34
Resultados e Discussão -----	39
Conclusões -----	46
Literatura Citada -----	47
CAPÍTULO 3 -----	48
Avaliação do soro de leite fermentado pelo consórcio de <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Veilonella parvula</i> na alimentação de ruminantes -----	48
Introdução -----	48
Material e Métodos -----	50

Resultados e Discussão -----	54
Conclusões -----	64
Literatura Citada -----	65
3. CONCLUSÕES GERAIS -----	67

RESUMO

OLIVEIRA, Juliana Silva de, D. Sc.. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2008. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do soro de leite fermentado pelo consórcio de bactérias *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* na alimentação de ruminantes.** Orientador: Augusto César de Queiroz. Co-Orientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Edenio Detmann.

A indústria de laticínios vem crescendo gradualmente ao longo dos últimos anos, destacando-se a produção de queijo. Um dos subprodutos advindos da produção do queijo é o soro de leite. Este apresenta alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que, ao ser descartado em rios ou esgotos públicos, representa importante problema ambiental. Assim, medidas para aproveitamento desse resíduo devem ser tomadas. Uma das possíveis formas de aproveitamento desse soro pode ser a utilização na alimentação animal. Na forma *in natura* o soro apresenta menores atributos nutricionais que o leite. Porém, se fermentado, pode-se tornar um produto que propicie bom desempenho de animais, principalmente de ruminantes. Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado objetivando-se avaliar o efeito do ácido propiônico, ácido láctico e do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* sobre a atividade de microrganismos ruminais *in vitro*; e avaliar o efeito do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* na dieta de bovinos, sobre o consumo, pH e concentração de nitrogênio amoniacal ruminal, as concentrações séricas de uréia e glicose, as excreções urinárias de uréia, a produção de proteína microbiana, o balanço de compostos nitrogenados e a digestibilidade aparente total. No capítulo 1, foram realizados dois experimentos para avaliar o efeito isolado de diferentes níveis de ácido láctico e do ácido propiônico sobre a fermentação de microrganismos ruminais *in vitro*. No experimento 1, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com 12 tratamentos e duas repetições. Os tratamentos foram os seguintes: sem adição de ácido láctico, adição de 50 mM de ácido láctico; adição de 100 mM de ácido láctico; adição de 150 mM de ácido láctico; adição de 200 mM de

ácido láctico; adição de 250 mM de ácido láctico; sem adição de ácido propiônico; adição de 50 mM de ácido propiônico; adição de 100 mM de ácido propiônico; adição de 150 mM de ácido propiônico; adição de 200 mM de ácido propiônico; e adição de 250 mM de ácido propiônico. No experimento 2, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e duas repetições. Os tratamentos foram os seguintes: presença de 12 mM de ácido propiônico; presença de 24 mM de ácido propiônico; presença 12 mM de ácido propiônico e 40 mg de glicose; e presença de 24 mM de ácido propiônico e 40 mg de glicose. As incubações dos dois experimentos foram feitas em tubos anaeróbios, em que o meio foi saturado com dióxido de carbono, os tubos lacrados e mantidos a temperatura de 39°C. Ao aumentar a concentração de ácido láctico no meio para 50, 100 e 150 mM e ácido propiônico 50 e 100 mM houve um aumento na velocidade específica de crescimento dos microrganismos. Entretanto, quando nos meios havia concentrações maiores de ácido láctico e ácido propiônico, houve uma menor velocidade específica de crescimento e uma maior fase lag que o tratamento controle. A concentração de 24 mM de ácido propiônico inibiu a produção de ácido acético em meio com glicose. A produção de ácido butírico também foi afetada pela concentração de ácido propiônico no meio. As concentrações de 24 mM de ácido propiônico no meio inibiram a produção de ácido butírico, principalmente no meio que continha glicose. Apesar do ácido propiônico não ser utilizado como fonte de energia pelos microrganismos ruminais, ele afeta o metabolismo dos mesmos. O ácido láctico e o ácido propiônico, em baixas concentrações, estimularam o crescimento microbiano *in vitro*. Entretanto, em concentrações elevadas, esses ácidos inibiram o crescimento microbiano. Os microrganismos ruminais não foram capazes de utilizar o ácido propiônico como fonte de energia. O ácido propiônico apresentou efeito inibitório na velocidade de crescimento de microrganismos ruminais em baixas concentrações mais acentuadamente do que o ácido láctico. No capítulo 2, também foram realizados dois experimentos com o objetivo de avaliar o efeito do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veillonella parvula* sobre os microrganismos ruminais *in vitro*. No experimento 1, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, arranjado em um esquema fatorial 6x3 (seis substratos x três níveis de soro) com duas repetições, resultando em 18 combinações entre os fatores: sem substrato;

sem substrato mais 10% de soro no meio; sem substrato mais 20% de soro no meio; trypticase; trypticase mais 10% de soro no meio; trypticase mais 20% de soro no meio; amido; amido mais 10% de soro no meio; amido mais 20% de soro no meio; carboximetilcelulose (CMC); CMC mais 10% de soro no meio; CMC mais 20% de soro no meio; pectina; pectina mais 10% de soro no meio; pectina mais 20% de soro no meio; glicose; glicose mais 10% de soro no meio; e glicose mais 20% de soro no meio. No experimento 2, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram os seguintes: Células ruminais mais meio de cultura sintético mais glicose; Células ruminais mais soro inativo (*Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* sem capacidade de crescimento) mais meio de cultura sintético mais glicose; Células ruminais mais soro ativo (*Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* com capacidade de crescimento) mais meio de cultura sintético mais glicose; e soro ativo mais meio de cultura sintético mais glicose. As incubações foram realizadas no primeiro experimento em tubos anaeróbios, saturados com CO₂ e mantidos a temperatura de 39° C e no segundo experimento em seringas de vidro calibradas, com capacidade de 100 ml, e mantidas a temperatura de 39°C, em agitação (70 rpm). Houve aumento linear ($P<0.01$) da DO_{600 nm} nos meios sem substrato e que continham trypticase e glicose em função da adição de soro de leite fermentado. Quando se tinha como substrato o amido e a pectina houve um aumento quadrático ($P<0.01$) do crescimento microbiano em função dos níveis de soro de leite fermentado. A inclusão de soro de leite fermentado no meio aumentou significativamente a concentração de proteína microbiana no tempo zero e 48 horas de incubação, exceto quando se tinha no meio somente soro ativo. Houve crescimento microbiano durante 48 horas de incubação no meio que continha somente soro ativo demonstrando que os microrganismos contidos no soro continuam os processos de fermentação e consequentemente, de crescimento microbiano após serem adicionados em outro meio, que não o soro de leite. Quando se verifica os valores de crescimento microbiano entre zero hora e 48 horas de incubação, o meio que continha soro inativo apresentou maior crescimento microbiano que os meios apenas com baterias ruminais ou soro ativo. O crescimento microbiano entre zero hora e 48 horas de incubação, no meio com bactérias ruminais e soro ativo, não diferiu

significativamente do tratamento que continha apenas bactérias ruminais. O soro de leite fermentado estimulou o crescimento *in vitro* de bactérias proteolíticas e fermentadoras de carboidratos não estruturais, e em altas concentrações inibe o crescimento *in vitro* de bactérias amilolíticas e pectinolíticas. Entretanto, o soro não afeta o crescimento *in vitro* de microrganismos celulolíticos. O soro de leite fermentado contendo culturas ativas de bactérias aumenta a concentração de proteína microbiana *in vitro*. A adição de altas concentrações de soro de leite fermentado juntamente com bactérias ruminais em meio sem restrição de energia e proteína não estimula o crescimento das bactérias fibrolíticas ruminais *in vitro*. No capítulo 3, foram utilizadas cinco novilhas mestiças Holandês:Zebu fistuladas com peso médio de 350 kg, distribuídos em quadrado latino 5 x 5. Cada animal foi alojado em baia individual, provida de comedouro e bebedouro. A alimentação dos animais foi constituída de uma dieta isoproteica, à base de feno de capim tifton 85, com relação volumoso concentrado de 70:30, na base da matéria seca. O delineamento utilizado foi o quadrado latino, arranjado em esquema fatorial 2 x 2 + 1. Os tratamentos constituíram da não adição de soro de leite (controle), da adição de dois níveis de soro de leite não-fermentado (2,5 e 5 L/dia) e dois níveis de soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* (2,5 e 5 L/dia). Quando os animais foram suplementados com soro de leite, houve maior consumo ($P<0,10$) de extrato etéreo (EE) em relação aos animais não suplementados. Houve efeito positivo ($P<0,10$) da fermentação do soro de leite sobre o consumo de MS (matéria seca), MO (matéria orgânica), PB (proteína bruta), EE, CNF (carboidratos não fibrosos) e FDN_{cp} (fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína), em kg/dia. O consumo de EE foi maior ($P<0,10$) quando se adicionou na dieta maiores níveis de soro de leite. Não foram verificados efeitos do soro de leite fermentado e não-fermentado sobre os coeficientes de digestibilidade da MS, MO, PB, EE, CNF, FDN_{CP} ($P<0,10$). Todavia, o teor de NDT (nutrientes digestíveis totais) foi menor quando se adicionou na dieta maiores níveis de soro de leite. Não foram verificados efeitos ($P<0,10$) dos tratamentos sobre o pH ruminal, NAR, NUU, NUS e glicose. A suplementação com soro de leite melhorou o balanço nitrogenado aparente ($P<0,10$). A suplementação com soro de leite fermentado diminuiu o fluxo intestinal de nitrogênio microbiano e a

eficiência de síntese microbiana em relação ao soro não-fermentado ($P < 0,10$). A suplementação de bovinos com soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* implica em efeitos positivos sobre o consumo de alimentos, e negativos sobre a utilização do nitrogênio pelos microrganismos ruminais, quando comparado ao soro de leite não-fermentado. Assim, o processo de fermentação do soro de leite não otimiza as respostas fisiológicas de novilhas suplementadas com 2,5 e 5,0 L litros de soro de leite.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Juliana Silva de, D. Sc.. Universidade Federal de Viçosa, May of 2008. **Evaluation *in vitro* and *vivo* of the cheese whey fermented by the consortium of bacteria *Enterococcus faecium* and *Veilonella parvula* in the feeding of ruminants.** Adviser: Augusto César de Queiroz. Co-advisers: Hilário Cuquetto Mantovani and Edenio Detmann.

The industry of dairy products is gradually growing along the last years, standing out the cheese production. One of the by-products obtained of the production of the cheese is the cheese whey. This one presents high demand biochemistry of oxygen (DBO), that when being discarded in rivers or public sewers, it represents important environmental problem. Like this, attitudes for the use of that residue should be taken. One of the possible ways of use of that cheese whey can be the utilization in the animal feeding. In the form *in natura* whey presents smaller nutritional attributes than the milk. However, if fermented, it can become a product to improve performance of animals, mainly of ruminants. Before the exposed, the present work was realized being aimed at to evaluate the effect of the propionic acid, lactic acid and of the cheese whey fermented by the consortium of *Enterococcus faecium* and *Veilonella parvula* about the activity of ruminal microorganisms *in vitro*; and to evaluate the effect of the cheese whey fermented by the consortium of *Enterococcus faecium* and *Veilonella parvula* in the diet of bovine animals, on the consumption, pH and concentration of nitrogen amoniacal ruminal, the serum concentrations of urea and glucose, the urinary excretions of urea, the production of microbial protein, the swinging of nitrogenous compounds and the total apparent digestibility. In the chapter 1, two experiments were made to evaluate the isolated effect of different levels of lactic acid and of the propionic acid on the fermentation of ruminal microorganisms *in vitro*. In the experiment 1, treatments were 12 with two repetitions: without addition of lactic acid; addition of 50 mM of lactic acid; addition of 100 mM of lactic acid; addition of 150 mM of lactic acid; addition of 200 mM of lactic acid; addition of 250 mM of lactic acid; without addition of propionic acid; addition of 50 mM of propionic acid; addition of 100 mM of

propionic acid; addition of 150 mM of propionic acid; addition of 200 mM of propionic acid; and addition of 250 mM of propionic acid. In the experiment 2, treatments were four with two repetitions: presence of 12 mM of propionic acid; presence of 24 mM of propionic acid; presence 12 mM of propionic acid and 40 mg glucose; and presence of 24 mM of propionic acid and 40 mg glucose. The incubations of the two experiments were made in anaerobic tubes, in that culture medium was saturated with carbon dioxide, sealed tubes and maintained the temperature of 39° C. When increasing the concentration of lactic acid in the medium to 50, 100 and 150 mM and propionic acid to 50 and 100 mM there was increase in the specific speed of growth of the microorganisms. However, when in the medium there were larger concentrations of lactic acid and propionic acid, there were a smaller specific speed of growth and a larger phase lag than control treatment. The concentration of 24 mM of propionic acid inhibited the production of acetic acid in medium with glucose. The production of butyrate was also affected by the concentration of propionic acid in the medium. The concentrations of 24 mM of propionic acid in the medium inhibited the production of butyrate mainly in the medium wich contained glucose. In spite of the propionic acid not to be used as source of energy by the ruminal microorganisms, it affects the metabolism of the same ones. Lactic acid and propionic acid in low concentrations stimulated the microbial growth *in vitro*. However, in high concentrations those acids inhibited the microbial growth. The ruminal microorganisms were not capable to use propionic acid as source of energy. O propionic acid inhibited the speed of growth of ruminal microorganisms in low concentrations more strongly than lactic acid. In the chapter 2, also two experiments were made with the objective of evaluating the effect of the cheese whey fermented by the consortium of *Enterococcus faecium* and *Veilonella parvula* on the ruminal microorganisms *in vitro*. In the experiment 1, treatments were 18 with two repetitions: without source carbon; without source carbon plus 10% of cheese whey on the culture medium; without source carbon plus 20% of cheese whey on the culture medium; trypticase; trypticase plus 10% of cheese whey on the culture medium; trypticase plus 20% of cheese whey on the culture medium; starch; starch plus 10% of cheese whey on the culture medium; starch plus 20% of cheese whey on the culture medium; cellulose (CMC); CMC plus 10% of cheese whey on the

culture medium; CMC plus 20% of cheese whey on the culture medium; pectin; pectin plus 10% of cheese whey on the culture medium; pectin plus 20% of cheese whey on the culture medium; glucose; glucose plus 10% of cheese whey on the culture medium; and glucose plus 20% of cheese whey on the culture medium. In the experiment 2, treatments were four with four repetitions: Ruminal cells plus synthetic culture medium plus glucose; ruminal cells plus inactive fermented cheese whey (*Enterococcus faecium* and *Veillonella parvula* without growth capacity) plus synthetic culture medium plus glucose; ruminal cells plus active fermented cheese whey (*Enterococcus faecium* and *Veillonella parvula* with growth capacity) plus synthetic culture medium plus glucose and active fermented cheese whey plus synthetic culture medium plus glucose. The incubations were made, in the first experiment, in anaerobic tubes saturated with carbon dioxide and maintained the temperature of 39° C and in the second one in gaged glass syringes, with capacity of 100 ml, and maintained the temperature of 39°C and agitated (70 rpm). There was linear increase ($P < 0.01$) of the DO_{600nm} in the medium without source carbon and wich contained trypticase and glucose in function of the addition of fermented cheese whey. When it had as source carbon starch and pectin there was quadratic increase ($P < 0.01$) of the microbial growth in function of the levels of fermented cheese whey. The inclusion of fermented cheese whey raised the concentration of microbial protein significantly in the time zero and 48 hours of incubation, except when it had in the medium only active cheese whey. There was microbial growth during 48 hours of incubation in the medium wich contained only active cheese whey demonstrating that the microorganisms in the active cheese whey continue the fermentation processes and consequently of microbial growth after they to be added in another medium that no cheese whey. When it is verified the values of microbial growth between zero hour and 48 hours of incubation, the medium that it contained inactive cheese whey presented larger microbial growth than the medium whith only ruminal bacteria or active cheese whey. The microbial growth between zero hour and 48 hours of incubation in the medium with ruminal bacteria and active cheese whey didn't differ significantly of the treatment that contained ruminal bacteria only. The fermented cheese whey stimulated the growth *in vitro* of proteolytic bacteria and bacteria ferment nonstructural carbohydrate active, and in high concentrations it

inhibits the growth *in vitro* of bacteria ferment starch active and pectinolytic ones. However, the cheese whey doesn't affect the growth *in vitro* of cellulolytic microorganisms. The fermented cheese whey containing active cultures of bacteria increases the concentration of protein microbial *in vitro*. Addition of high concentrations of fermented cheese whey together with ruminal bacteria in medium without restriction of energy and protein doesn't stimulate the growth of the fibrolytic bacteria *in vitro*. In the chapter 3, it was used five crossbred Holstein-Zebu heifers equipped with rumen cannula with live weight of 350 kg, distributed in Latin square 5 x 5. Each animal was maintained under feedlot regime were allowed *ad libitum* access to ration presenting a feedstuff: concentrate relation of 70:30 based on dry matter. The used delineament was the Latin square, arranged in factorial outline 2 x 2 + 1. The treatments constituted of the not addition of cheese whey (controls), of the addition of two levels of no-fermented cheese whey (2.5 and 5 L/day) and two levels of cheese whey fermented by the consortium of *Enterococcus faecium* and *Veilonella parvula* (2.5 and 5 L/dia). When the animals were fed with cheese whey, there was larger consumption ($P < 0.10$) of ether extract (EE) in relation to the animals weren't fed cheese whey. There was positive effect ($P < 0.10$) of the fermentation of the cheese whey on the consumption of MS (dry matter), MO (organic matter), PB (crude protein), EE, CNF (no fibrous carbohydrates) and FDNcp (fiber in neutral detergent corrected for ashes and protein) in kg/day. The consumption of EE was bigger ($P < 0.10$) when it was added in the diet larger levels of cheese whey. Cheese whey didn't effect coefficients of digestibility of MS, MO, PB, EE, CNF, FDN_{CP} ($P < 0.10$). Though, NDT (total digestible nutrients) was smaller when was added in the diet larger levels of cheese whey. It was not verified the effects ($P < 0.10$) of the treatments on pH ruminal, NAR, NUU, NUS and glucose. The feed with cheese whey improved the swinging apparent nitrogen ($P < 0.10$). The feed with fermented cheese whey reduced intestinal flow of microbial nitrogen and efficiency of microbial synthesis in relation to the no-fermented cheese whey ($P < 0.10$). The feed of bovine animals with cheese whey fermented by the consortium of *Enterococcus faecium* and *Veilonella parvula* implicates in positive effects on the consumption of food, and negatives effects about the use of the nitrogen for the ruminal microorganisms when compared to no-fermented cheese whey. Like this, the

process of fermentation of cheese whey doesn't optimize the physiologic answers of heifers feed with 2.5 and 5.0 liters of cheese whey.

INTRODUÇÃO GERAL

A indústria de laticínios vem crescendo gradualmente ao longo dos últimos anos, destacando-se a produção de queijo. Um dos subprodutos advindos da produção do queijo é o soro de leite. Este apresenta alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que, ao ser descartado em rios ou esgotos públicos, representa importante problema ambiental. Assim, medidas para aproveitamento desse resíduo devem ser tomadas. Uma das possíveis formas de aproveitamento desse soro pode ser a utilização na alimentação animal. Na forma *in natura* o soro apresenta menores atributos nutricionais que o leite. Porém, se fermentado, pode-se tornar um produto que propicie bom desempenho de animais, principalmente de ruminantes.

No ano de 2007, a produção mundial e brasileira de queijo foram 14.246 e 505 mil toneladas, respectivamente (ANUALPEC, 2007). Isso produziu aproximadamente 128 e 4,5 bilhões de litros de soro de leite no mundo e no Brasil. Assim, tem-se uma idéia do potencial nutricional e econômico desse subproduto lácteo.

No mundo, o soro de leite é aproveitado de várias maneiras. Este pode ser industrializado, se transformando em bebidas fermentadas, sucos, aditivos para panificação, desidratado e usado como fonte energética e nutritiva, além de sofrer processos de concentração, separação das proteínas e lactose ou utilizado *in natura* na nutrição animal (Siso, 1996). Entretanto, a maioria desses processos é de alto custo.

No caso da alimentação animal, o soro *in natura* representa uma fonte principalmente de lactose; mas também de proteína, cálcio, fósforo, enxofre e vitaminas hidrossolúveis (Siso, 1996). Porém, seu uso, na alimentação animal, como fonte de nutrientes é limitado devido às excessivas proporções de água e minerais.

Grande parcela de soro de leite produzido no Brasil é ainda descartada em rios ou esgotos públicos, apesar de ser proibido pela legislação brasileira. Devido à elevada DBO do soro, seu descarte nos fluxos de água causa grande impacto ambiental. Outro problema da utilização não racional do soro é a utilização ilegal do mesmo pelas indústrias que o adicionam no leite, na forma

em pó ou *in natura*, diminuindo a qualidade do leite consumido no país. Ainda não se têm métodos eficazes de identificação dessa fraude (Carvalho et al., 2007). Uma forma de impedir esses dois processos ilegais seria encontrar melhores maneiras de utilização do soro de leite.

O mercado internacional de alimentos de origem animal está requisitando produtos isentos de qualquer substância tóxica (Stradiotti Jr et al., 2001). Por causa disso, entre os manipuladores ruminais estudados para ruminantes, tem-se dado destaque para os ácidos orgânicos e os probióticos (*direct-fed microbials*). Esses aditivos alimentares agem de diferentes formas sobre a fermentação ruminal melhorando o desempenho animal, sem deixar resíduo nos produtos de origem animal.

Em vários trabalhos demonstrou-se a ação dos ácidos orgânicos e *direct-fed microbials* prevenindo a acidose ruminal; aumentando a produção e a porcentagem de gordura e proteína do leite de vacas; melhorando a eficiência alimentar e ganho de peso de bovinos; e reduzindo o uso de antibióticos em bezerros nos períodos neonatal e pós-desmame (Khampa & Wanapat, 2007; Kung et al., 1982; Stallcup, 1979).

Alguns microrganismos conseguem utilizar a lactose como substrato para produção de lactato, outros utilizam o lactato como fonte de energia, produzindo ácido propiônico e ácido acético. Dois microrganismos do rúmen de bovinos, *Enterococcus faecium* e *Veillonella parvula*, foram isolados e quando inoculados em consórcio no soro de leite aumentaram os teores de ácido propiônico (Melo, 2007).

A inoculação de soro de leite com *Enterococcus faecium* (que utiliza a lactose transformando-a em lactato), em consórcio com *Veillonella parvula* (que fermenta o lactato até o ácido propiônico e acetato), em condições adequadas de fermentação, pode gerar produto rico em ácido propiônico e microrganismos vivos utilizadores de lactose, lactato e produtores de propionato. O propionato é o principal precursor da glicose no organismo de ruminantes (Merchen et al., 1993). O soro de leite fermentado poderia, então, melhorar o desempenho animal por atuar como manipulador ruminal. Além disso, o mesmo poderia ser fonte de energia prontamente disponível para o animal ruminante.

Assim, para que se possa realmente recomendar o processo de fermentação do soro de leite pelo consórcio de bactérias *Enterococcus faecium*

e *Veilonella parvula* é importante obter informações sobre o efeito real do produto da fermentação sobre os microrganismos ruminais e os aspectos fisiológicos de sua inclusão na alimentação de ruminantes.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado objetivando-se:

- avaliar o efeito do ácido propiônico, ácido láctico e do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* sobre a atividade de microrganismos ruminais *in vitro*; e

- avaliar o efeito do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* na dieta de bovinos, sobre o consumo, pH e concentração de nitrogênio amoniacal ruminal, as concentrações séricas de uréia e glicose, as excreções urinárias de uréia, a produção de proteína microbiana, o balanço de compostos nitrogenados e a digestibilidade aparente total.

REVISÃO DE LITERATURA

SORO DE LEITE

O soro de leite é o produto obtido durante o processamento do queijo, da trypticase ou produtos similares mediante a separação da coalhada, após a coagulação do leite e ou produtos derivados do leite (MAPA, 1996). A coagulação do leite pode ser feita por enzimas do tipo coalho (soro doce) ou por acidificação (soro ácido). A forma de coagulação faz com que o soro ácido apresente maior conteúdo de minerais e menor conteúdo de proteína em relação ao soro doce.

Em média, na fabricação de 1 kg de queijo são necessários 10 litros de leite e são produzidos 9 litros de soro. Assim, esse subproduto lácteo representa cerca de 90% do volume do leite e retém 55% dos nutrientes do mesmo. O soro de leite contém na sua composição química, aproximadamente, 93% de água. Os demais componentes de maior abundância são lactose (4,5-5,0% p/v), proteínas solúveis (0,6-0,8% p/v), e minerais (0,7% p/v) (Serpa, 2005). Além desses compostos, o soro contém gordura, ácido láctico, nitrogênio não protéico e vitaminas do complexo B (Siso, 1996).

A lactose e a proteína são os mais importantes componentes do soro de leite. A lactose, além de apresentar-se em maior quantidade no extrato seco total do soro, constitui-se fonte de energia para diversos processos biotecnológicos. A proteína do soro é considerada de alto valor nutricional por conter todos os aminoácidos essenciais (Giroto & Pawlowsly, 2001).

O soro de leite apresenta demanda biológica de oxigênio (DBO) entre 25.000 e 80.000 mg/L e, por apresentar alto conteúdo de matéria orgânica e deficiência de nitrogênio, sua estabilização por métodos convencionais de tratamento biológico é dificultada (Giroto & Pawlowsly, 2001). Assim, o soro ao ser destinado diretamente aos rios ou esgotos públicos representa importante problema ambiental (Serpa, 2005). Atualmente, a legislação brasileira proíbe o descarte do soro de leite diretamente no meio-ambiente.

A indústria de derivados lácteos está crescendo rapidamente no cenário mundial. Dentre os produtos lácteos, se destaca, com considerável aumento na produção, a indústria de queijo. A produção mundial de queijo no ano de 2007

foi de 14.246 mil toneladas (ANUALPEC, 2007). O Brasil é o terceiro maior produtor de queijo do mundo, produzindo, em 2007, 505 mil toneladas (ANUALPEC, 2007). Considerando-se que, em média, para cada 1kg de queijo produzido, são produzidos também 9 litros de soro, a produção mundial e brasileira de soro de leite são de, aproximadamente, 128 e 4,5 bilhões de litros, respectivamente.

Aproximadamente 50% do soro mundialmente produzido é industrializado sendo processado na forma de bebidas fermentadas, sucos e aditivos para panificação. Além disso, o soro pode ser submetidos a processos de concentração, separação das proteínas e lactose ou utilizada *in natura* na nutrição animal (Siso, 1996). Além desses fins, uma parcela do soro é desidratada e comercializada na forma de pó (Serpa, 2005). Entretanto, a produção de soro em pó, ou separação de proteínas e lactose com posterior secagem apresenta alto custo, o que pode torná-los inviáveis economicamente.

USO DE MICRORGANISMOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

O termo *direct-fed microbials* (DFM) é definido como fonte de microrganismos vivos que ocorrem naturalmente e são benéficos aos organismos hospedeiros (Krehbiel et al., 2003). Em ruminantes, os microrganismos utilizados como DFM incluem culturas vivas de bactérias e fungos.

O conceito original de DFM para ruminantes foi baseado primeiramente no efeito benéfico pós-ruminal, incluindo melhoria e estabilização da microbiota benéfica do intestino grosso (Fuller, 1999 citado por Ghorbani et al., 2002). Atualmente, demonstrou-se efeitos benéficos do DFM no rúmen, em particular ajudando a prevenir a acidose ruminal (Krehbiel et al., 2003).

Dentre os microrganismos utilizados como DFM, se destacam as bactérias produtoras de lactato (*Lactobacillus* e *Enterococcus*), as bactérias utilizadoras de lactato (*Megasphaera elsdenii* e *Propionibacterium*), extrato de *Aspergillus oryzae* e culturas de *Saccharomyces cerevisiae*.

A ação dos *Lactobacillus* ou *Enterococcus* no rúmen pode prevenir acidose ruminal devido à presença dessas bactérias causar adaptação da microbiota ruminal à presença de ácido láctico (Ghorbani et al., 2002). Outros efeitos desses microrganismos, principalmente *Lactobacillus*, têm sido associados à melhoria na digestibilidade da matéria seca e no ganho de peso (Weinberg et al., 2003). O mecanismo de ação ainda não se encontra bem entendido; mas se acredita que envolva outros atributos que melhoram a funcionalidade do rúmen (Weinberg et al., 2003). Em bezerros pré-ruminantes essas bactérias têm sido estudadas com o intuito de acelerar a adaptação dos bezerros aos alimentos sólidos devido à aceleração do estabelecimento dos microrganismos no rúmen e intestino e ao desenvolvimento da mucosa ruminal evitando o estabelecimento de enteropatógenos (Krehbiel et al., 2003).

A *Megasphaera elsdenii* e *Propionibacterium* podem prevenir o acúmulo de lactato quando fornecido aos animais com dietas ricas em substratos altamente fermentáveis (Krehbiel et al., 2003). *M. elsdenii*, em particular, pode utilizar simultaneamente lactato, glicose e maltose como fonte de energia e carbono, consumindo o lactato e competindo com os organismos produtores de lactato por substrato.

As bactérias propiônicas são habitantes naturais do rúmen e representam 1,4% da microbiota ruminal, produzindo ácido propiônico e ácido acético (Rehberger, 2005). Embora *Propionibacterium* também seja utilizadora de lactato, o foco da utilização dessa bactéria como DFM é a produção de propionato (Krehbiel et al., 2003). A alimentação direta com *Propionibacterium* pode aumentar a produção de glicose hepática via aumento na produção de ácido propiônico ruminal. Além disso, pode decrescer a relação acetato:propionato, proporcionando declínio na produção de metano ruminal. Segundo Ghorbani et al. (2002), o DFM de *Propionibacterium* e *Enterococcus* pode reduzir o risco de acidose metabólica em animais alimentados com dietas altamente fermentáveis.

Desempenho Animal

Os DFM têm sido utilizados como potenciais substitutos dos antibióticos para melhoria da eficiência produtiva. Em vários trabalhos demonstrou-se a ação de DFM prevenindo a acidose ruminal; aumentando a produção e a porcentagem de gordura e proteína do leite de vacas; melhorando a eficiência alimentar e o ganho de peso de bovinos (Khampa & Wanapat, 2007; Kung et al., 1982).

Como resultado, os DFM podem atuar melhorando a funcionalidade do rúmen, por meio de estímulo a bactérias produtoras de lactato e bactérias consumidoras de lactato, que, teoricamente, propiciariam melhor ambiente ruminal para outros microrganismos benéficos ao ruminante. Com isso, os DFM promoveriam aumento no número de bactérias celulolíticas, aumentando a degradação da fibra e promovendo mudanças na produção de ácidos graxos voláteis (AGV). Ocorreria então, melhora na eficiência da fermentação ruminal, com aumento na produção de AGV, principalmente de propionato, e diminuição de perdas energéticas na forma de metano. Quantidades maiores de AGV no rúmen têm como consequência quantidades maiores de AGV absorvidos, ampliando o suprimento de energia para manutenção, produção e reprodução.

ÁCIDOS ORGÂNICOS COMO MANIPULADORES RUMINAIS

Os ácidos orgânicos são ácidos carboxílicos que são comumente encontrados em tecidos biológicos (Castillo et al., 2004).

Os ácidos orgânicos estão na lista de aditivos alimentares autorizados pela legislação Europeia no uso para todas as espécies de ruminantes. Estes ácidos agem de diferentes formas sobre a fermentação ruminal. Segundo Castillo et al. (2004), essas substâncias no rúmen:

- a) Estimulam o consumo de lactato por *Selenomonas ruminantium* para prevenir ou corrigir queda do pH ruminal associado à acidose ruminal;
- b) Reduzem a perda de energia associada com produção de metano no rúmen;
- e
- c) apresentam efeito complementar ao servir como tampão sobre o pH ruminal.

Algumas bactérias anaeróbias estritas usam a via do succinato-propionato para sintetizar succinato e ou propionato que são fontes de precursores biosintéticos. Ambos, malato e fumarato são intermediários do modelo metabólico que é usado por *S. ruminantium*. Os ácidos orgânicos estimulam o crescimento de *S. ruminantium* no meio contendo lactato por repor intermediários das vias metabólicas (ex.: Ciclo de Krebs) (Martin, 1992).

A adição de ácidos carboxílicos proporciona, ainda, dreno de hidrogênio (H_2) no meio, o que permite a utilização de lactato pela *S. ruminantium* e seu crescimento. O acúmulo de hidrogênio no meio faz com que a enzima lactato desidrogenase de *S. ruminantium* não converta lactato para piruvato, e com isso, esses microrganismos não conseguem fermentar lactato. Entretanto, a fermentação de aspartato, fumarato e malato não são inibidas pela presença de H_2 , o que torna um dreno de hidrogênio do meio, proporcionando a utilização de lactato por *S. ruminantium*.

Os ácidos orgânicos podem aumentar o pH do meio, pela utilização de lactato e produção de dióxido de carbono (CO_2) por bactérias ruminais utilizadoras de lactato. Outro efeito possível dos ácidos orgânicos, especialmente o citrato e o malato é a estimulação da salivação em ruminantes, que poderia ajudar no tamponamento do rúmen e aliviar a acidose (Martin, 1998).

Outros efeitos dos ácidos orgânicos são mudanças na população bacteriana e ou da sua atividade (Castillo et al., 2004), estimulando a fermentação e consequentemente aumentando a produção de ácidos graxos voláteis no rúmen.

Ainda, os ácidos orgânicos podem ter efeito sobre o número de bactérias celulolíticas e na degradação da fibra, embora esse efeito não seja bem esclarecido. Provavelmente, os organismos degradadores de fibra são beneficiados na presença de *Archaea* metanogênicas ou de bactérias utilizadoras de H_2 devido à transferência interespecie de H_2 (Castillo et al., 2004).

ÁCIDO PROPIÔNICO

O ácido propiônico ou ácido etanocarboxílico ou ácido propanóico é um importante ácido orgânico com fórmula molecular $C_3H_6O_2$, incolor, oleoso, levemente ácido-picante e com forte odor (THE MERCK INDEX, 1989). Este tem sido aplicado em vários alimentos e na indústria química. O ácido propiônico pode ser formado por rotas petroquímicas ou por vias de fermentação microbiana.

O propionato produzido via fermentação bacteriana pode ser formado por duas vias diferentes: a do succinato (Figura 2) ou do acrilato (Figura 3).

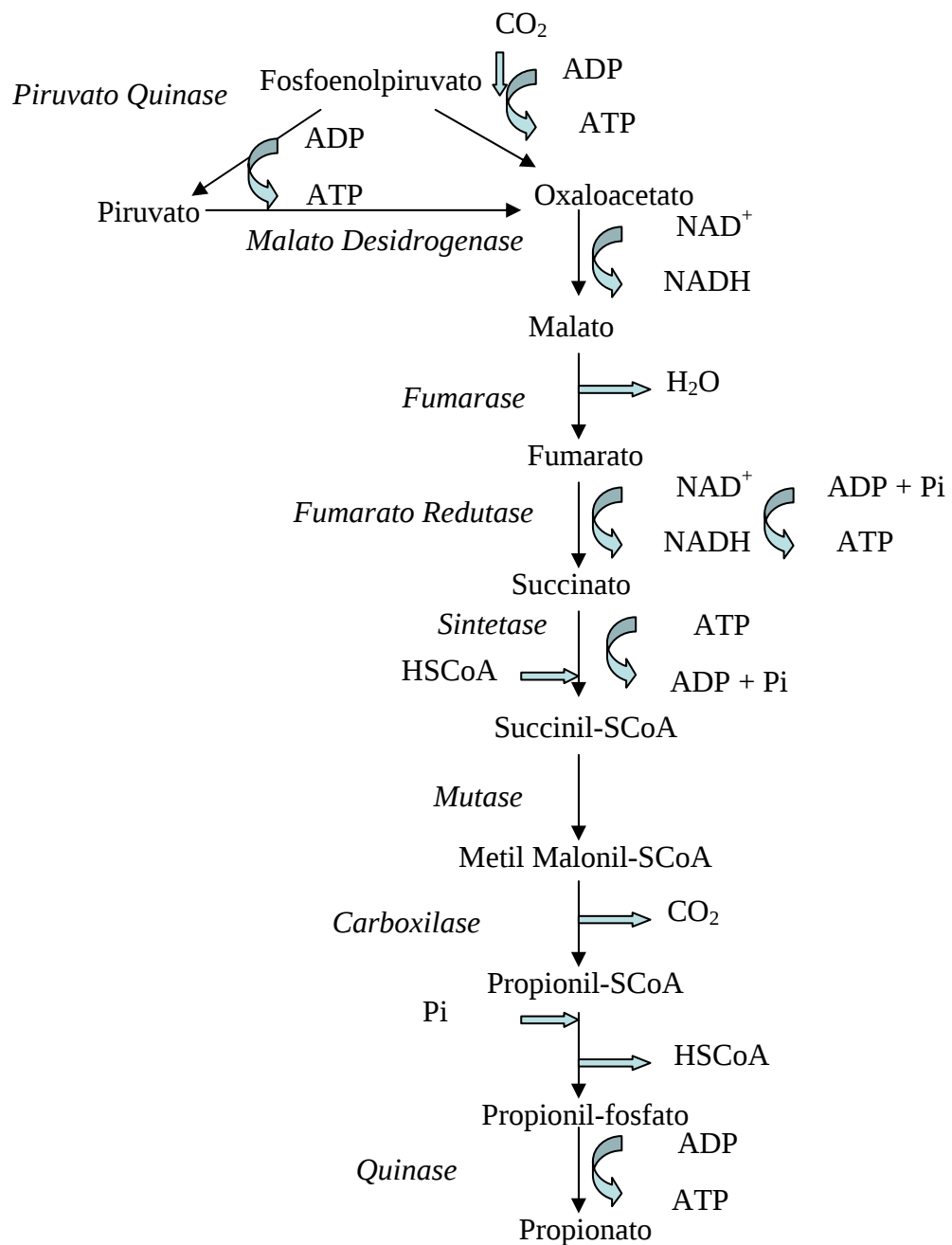


Figura 2 - Formação de propionato pela fermentação bacteriana ruminal (via do succinato). Fonte: Kozloski (2002).

Muitas bactérias ruminais são hábeis em produzir succinato, mas somente algumas espécies descarboxilam succinato via succinil-CoA para produzir propionato (Kozloski, 2002).

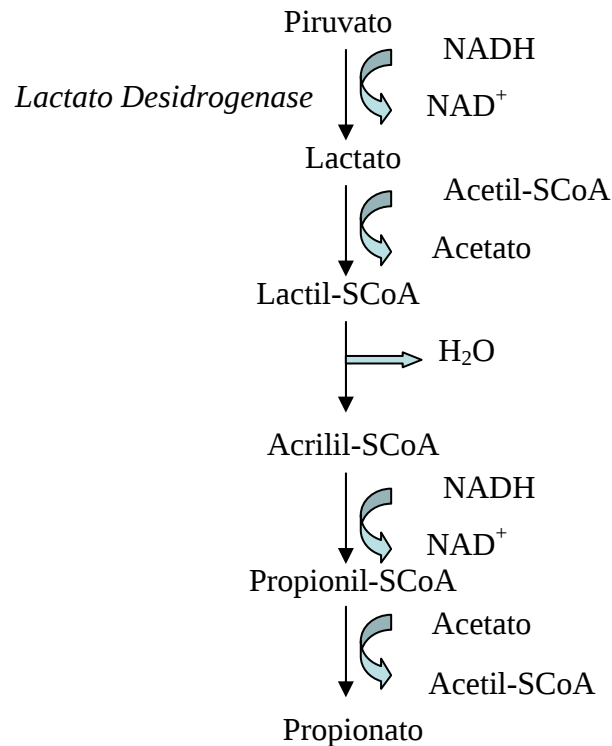


Figura 3 - Formação de propionato pela fermentação bacteriana ruminal (via do acrilato). Fonte: Kozloski (2002).

Devido à fermentação ruminal, somente pequenas quantidades de glicose são absorvidas no trato digestivo de ruminantes (Bergman, 1990). Assim, a gliconeogênese é a principal fonte de glicose nesses animais. O propionato é o principal precursor da glicose no organismo de ruminantes. Sugere-se que 27-54% da glicose é sintetizada a partir do propionato (Merchen et al., 1993). Os ácidos graxos de cadeia média e longa com número ímpar de carbonos podem também resultar em glicose, mas a quantidade produzida é pequena para ser quantitativamente importante (Bergman, 1990). Alguns aminoácidos e o glicerol são também substratos na produção de glicose. Os aminoácidos excedentes, exceto lisina, leucina e taurina, são utilizados no fígado e rins para produção de glicose, e sua contribuição máxima é de 36% (Merchen et al., 1993). A contribuição do glicerol na síntese de glicose é em torno de 5% (Merchen et al., 1993). O butirato e o acetato não são capazes de gerar glicose. Assim, quantidades adequadas de propionato são necessárias para satisfazer as necessidades de glicose do animal.

CONSÓRCIO DE *Enterococcus faecium* E *Veilonella parvula* NA FERMENTAÇÃO DE SORO DE LEITE

Bactérias propiônicas e vários outros gêneros de bactérias anaeróbias como *Veilonella*, *Selenomonas* e *Clostridium* produzem ácido propiônico como produto da fermentação (Hobson & Stewart, 1997). Dentre essas, a *Veilonella parvula* é uma bactéria em forma de cocos, anaeróbia estrita, gram-negativa que faz parte na população normal de microrganismos da boca e do trato gastrointestinal de vários animais (Randall & Denison, 1996).

Os membros do gênero *Veilonella* são incapazes de utilizar, como fonte de energia, os carboidratos, mas podem utilizar purinas e ácidos graxos de cadeia curta, como o lactato e piruvato (Stephen & Hamilton, 1971). A *Veilonella parvula* fermenta ácido láctico com produção de hidrogênio, dióxido de carbono, acetato e propionato (Stephen & Hamilton, 1971).

A lactose é substrato para o gênero *Enterococcus sp* que tem como produto final da fermentação o lactato. O *Enterococcus faecium* representa um grupo de bactérias que colonizam o ambiente ruminal e produzem ácido láctico. Essa espécie é gram-positiva, na forma de cocos, e faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal (Randall & Denison, 1996).

O lactato, como visto acima, é utilizado como fonte de energia de bactérias do gênero *Veilonella sp*. Assim, uma fonte de ácido propiônico pode ser produzida, a partir da fermentação da lactose do soro de leite resultante da produção de queijo pelo consórcio das bactérias *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula*.

Dois microrganismos ruminais, *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula*, identificados bioquimicamente (kit Biomerieux API20A) e por sequenciamento do rDNA 16S, foram isolados e quando inoculados no soro de leite aumentaram os teores de ácido propiônico. O soro fermentado apresentou como principais produtos finais da fermentação o propionato, lactato, acetato e succinato, com concentração média (mM) de 226,97; 158,30; 153,37 e 14,75, respectivamente. Além disso, observou-se que toda a lactose do meio foi consumida (Ribeiro, 2007).

Referências Bibliográficas

- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2007.
- BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v. 70, n.2. p.567-590, 1990.
- BRADFORD, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, L. M.; ALCÂNTRA, L.A.P. et al. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de leite. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.8, n°:6, 2007.
- CASTILLO, C.; BENEDITO, J.L.; MÉNDEZ,J. et al. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**. V.115, p.101-116, 2004.
- GHORBANI, G.R.; MORGAVI, D.P.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1977-1986, 2002.
- GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil alimentos**, n°10, p.43-46, 2001.
- HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. 2.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 719p.
- KHAMPA, S.; WANAPAT, M. Manipulation of rumen fermentation with organic acids supplementation in ruminants raised in the tropics. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.6, supl.1, p.20-27, 2007.
- KOZLOSKI, V.K. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: UFSM, 2002. 140p.
- KREHBIEL, C.R.; RUST, S.R.; ZHANG, G. et al. Bacterial direct-fed microabials in ruminant diets: performance response and mode of action. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.1, p.E120-E132, 2003.
- KUNG, L.; HUBER, J.T.; KRUMMREY, J.D. et al. Influence of adding malic acid to dairy cattle rations on milk production, rumen volatile acids. **Journal of Dairy Science**, v.65, p.1170-1174, 1982.
- MERCHEN, N.R. Digestion, absorcion y excrecion en los ruminiantes. In: CHURCH, D.C (ed). **El ruminante fisiología digestive y nutrición**. 4. ed. Zaragoza: Acríbia, 1993. 641p.

MARTIN, S.A.; NISBET, D. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1736-1744, 1992.

MELO, M.R. **Produção de ácido propiônico em soro de leite por bactéria do rúmen bovino**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 54p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Portaria 146, 07/03/1996 – MAPA REGULAMENTOS TÉCNICOS DE IDENTIDADE E QUALIDADES DOS PRODUTOS. Portaria 146, 07/03/1996 – MAPA. www.agricultura.gov.br

NEWBOLD, C.J.; LÓPEZ, S.; NELSON, N. et al. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, v.94, p.27-35, 2005.

RANDALL, G.F.; DENISON, M.R. *Veillonella parvula* Bacteremia without an underlying source. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.12, p.3235-3236, 1996.

REHBERGER, T. **United States Patent**. 2005.

RIBEIRO, M. D. **Desempenho e digestão em bezerros, com adição de acidificante ou ácido propiônico na ração**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 87p. Tese de doutorado – Universidade federal de Viçosa, 2007.

SERPA, L. **Concentração de proteínas do queijo por evaporação á vácuo e ultrafiltração**. Erechim: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2005. 95p. Dissertação (Mestrado em engenharia de alimentos). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, 2005.

SISO, M.I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p.1-11, 1996.

STALLCUP, O.T. Influence or addition of DL malic acid to diets of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.62, supl. 1, p.225-226, 1979.

STEPHEN, K. C.; HAMILTON, I. R. Lactate metabolism by *Veillonell parvula*. **Journal of bacteriology**, v.105, n.3, p.999-1005, 1971.

STRADIOTTI Jr, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA; R.P. et al. Ação de extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Recife.

Anais... Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [2001]. CD-ROM. Nutrição de ruminantes. TECHNOMEDIA.

THE MERCK INDEX. **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals.** Rahway: Merck & CO., Inc. 1989. 1606 p.

USHIDA, K.; LASSALAS, B.; JOUANY, J.P. Determination of assay parameters for RNA analysis in bacterial and duodenal samples by spectrophotometry. Influence of treatment and preservation. **Reproduction Nutrition Development**, v.25, p.1037- 1046. 1985.

WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E.; WELMER, P.J. The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 1066-1071, 2003.

Capítulo 1

Efeito do ácido propiônico e ácido láctico sobre o crescimento das bactérias ruminais *in vitro*

Introdução

O rúmen é considerado um ecossistema aberto e contínuo, que proporciona ambiente ideal para a manutenção de comunidades microbianas estáveis advinda da evolução de milhões de anos de seleção. Entretanto, o rúmen pode ser manipulado para melhorar a utilização dos substratos e a eficiência da fermentação dos alimentos (Bello & Escobar, 1997), com o intuito de melhorar o desempenho animal. Há, então, interesse nos efeitos de diferentes compostos sobre a fermentação ruminal (Martin, 1998).

Dentre os manipuladores ruminais estudados para ruminantes tem-se dado destaque para os ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos são ácidos carboxílicos que são comumente encontrados em tecidos biológicos (Castillo et al., 2004). Esses ácidos estão na lista de aditivos alimentares autorizados pela legislação Européia no uso para todas as espécies de ruminantes, devido ao fato de não deixarem resíduos nos produtos de origem animal (Castillo et al., 2004).

Os ácidos orgânicos agem, no rúmen, estimulando o consumo de lactato por *Selenomonas ruminantium* por prevenir ou corrigir queda do pH ruminal associado à acidose ruminal; reduzindo a metanogênese, reduzindo a perda de energia associada com produção de metano no rúmen; podendo apresentar efeito complementar como tampão sobre o pH ruminal (Castillo et al., 2004).

Assim, os ácidos orgânicos no rúmen podem estimular o crescimento de bactérias ruminais proeminentes que podem alterar favoravelmente a fermentação ruminal, melhorando o desempenho dos ruminantes (Martin, 1998).

O ácido propiônico e o ácido láctico são ácidos orgânicos com uso potencial como manipuladores ruminais. Entretanto, são poucas as pesquisas sobre o comportamento dos microrganismos ruminais submetidos a diferentes

níveis de ácido propiônico e lactato. Faz-se, então, necessário verificar os possíveis efeitos desses ácidos orgânicos sobre os microrganismos ruminais.

Assim, objetivou-se avaliar o efeito do ácido propiônico e do lactato sobre os microrganismos ruminais *in vitro*.

Material e Métodos

O trabalho foi dividido em dois experimentos com o intuito de esclarecer os efeitos isolados do ácido propiônico e do ácido láctico sobre os microrganismos ruminais.

Os dois experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbicos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa - UFV, em Viçosa, Minas Gerais. Foi utilizado um novilho fistulado no rúmen, mantido em pastagem de capim *Brachiária decumbens*, como doador de líquido de rúmen. O novilho estava alojado no Laboratório de Animais do Departamento de Zootecnia da UFV.

Experimento 1 – Efeito do ácido láctico e do ácido propiônico sobre o crescimento de microrganismos ruminais

O líquido ruminal foi coletado de um bovino fistulado no rúmen, e imediatamente transportado para o laboratório, em garrafa térmica. Em seguida, foi colocado em repouso durante 30 minutos, a 39°C, e após formação das interfaces do líquido, retirou-se o líquido intermediário que foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado, para obtenção de inóculo contendo população microbiana ativa (*pellet*). O *pellet* formado, o qual continha microrganismos predominantes no líquido ruminal, foi re-suspenso em solução salina 0,9% autoclavada e saturada com dióxido de carbono. Procedeu-se a nova centrifugação a 5000 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado novamente. O *pellet* formado na última centrifugação foi, então, re-suspenso em solução salina 0,9% autoclavada e saturada com dióxido de carbono (inóculo).

O delineamento foi o inteiramente casualizado, com 12 tratamentos e duas repetições. Os tratamentos foram o seguinte:

- 1) Sem adição de ácido láctico (Controle 1);
- 2) Adição de 50 mM de ácido láctico;
- 3) Adição de 100 mM de ácido láctico;
- 4) Adição de 150 mM de ácido láctico;
- 5) Adição de 200 mM de ácido láctico;
- 6) Adição de 250 mM de ácido láctico;
- 7) Sem adição de ácido propiônico (Controle 2);
- 8) Adição de 50 mM de ácido propiônico;
- 9) Adição de 100 mM de ácido propiônico;
- 10) Adição de 150 mM de ácido propiônico;
- 11) Adição de 200 mM de ácido propiônico;
- 12) Adição de 250 mM de ácido propiônico.

O experimento foi realizado em duas etapas, sendo a primeira etapa realizada com ácido láctico e a segunda etapa com ácido propiônico. Todos os tubos de incubação contiveram 0,2 mL de inóculo, 40 mg de glicose, e meio de cultura sintético (40 ml de solução salina A – que contém por litro: 7,3 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 40 mL de solução salina B – que contém por litro: 6,0 g de K_2HPO_4 , 12,0 g de $(NH_4)_2SO_4$, 12,0 g de NaCl, 2,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 1,6 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,50 g de extrato de levedura; 1,0 g de trypticase – Trypticase, BBL Microbiology Systems, Cockesville, MD; 0,60 g de hidrocloreto de cisteína; 1,0 mL de resazurina; 4,0 g de carbonato de sódio; e 870 mL de água) autoclavado e saturado com dióxido de carbono em quantidades necessárias para atingir 10 mL de meio no total em todos os tratamentos. O ácido láctico e o ácido propiônico foram adicionados para atingir as determinadas concentrações finais no meio de cultura de cada tratamento. As incubações foram feitas em tubos anaeróbios, em que o meio foi saturado com dióxido de carbono, os tubos lacrados e mantidos a temperatura de 39°C.

Foi lida a densidade óptica inicial (tempo zero) de cada unidade experimental em espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron, Waltham, MA, USA), com comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}). Os outros tempos de leitura foram determinados pela velocidade de crescimento

dos microrganismos em cada tratamento. Após estabilização do crescimento microbiano (mesma leitura da densidade óptica três vezes consecutivas), foi terminada a incubação.

A velocidade específica de crescimento (μ) de cada tratamento foi calculada a partir da fase linear do gráfico exponencial neperiano da DO_{600nm} , em que μ é a absoluta taxa constante com a unidade em h^{-1} :

$$\ln N = \mu t + \ln N_0$$

Em que: $\ln N$ = intercepto no eixo das ordenadas; t = abcissa de tempo; e $\ln N_0$ = intercepto no eixo das abcissas.

A densidade óptica máxima correspondeu à leitura de densidade óptica quando cessou o crescimento celular e a cultura entrou em fase estacionária.

A fase lag correspondeu ao tempo decorrido antes do crescimento exponencial observado no gráfico.

Os dados foram avaliados descritivamente.

Experimento 2 – Estabilidade do ácido propiônico em meio contendo microrganismos ruminais

O líquido ruminal foi coletado de um novilho fistulado no rúmen e imediatamente transportado para o laboratório, em garrafa térmica. Em seguida, foi colocado em repouso, e após formação das interfaces do líquido, retirou-se o líquido intermediário que foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado para obtenção de inóculo contendo população microbiana ativa (*pellet*). O *pellet* formado, o qual continha microrganismos predominantes no líquido ruminal, foi re-suspenso em meio de cultura sintético autoclavado e saturado com dióxido de carbono. Procedeu-se a nova centrifugação a 5000 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado novamente. O *pellet* formado na última centrifugação foi, então, re-suspenso em meio de cultura sintético autoclavado e saturado com dióxido de carbono (células).

O delineamento foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e duas repetições. Os tratamentos foram os seguintes:

- 1) Presença de 12 mM de ácido propiônico;
- 2) Presença de 24 mM de ácido propiônico;
- 3) Presença 12 mM de ácido propiônico e 40 mg de glicose; e
- 4) Presença de 24 mM de ácido propiônico e 40 mg de glicose.

Os meios de cultura foram preparados a partir do líquido ruminal centrifugado e re-suspenso em meio de cultura sintético (células). Os tubos de incubação contiveram 9,6 ml de células, 40 mg de glicose nos tratamentos 3 e 4, e meio de cultura sintético puro em quantidades necessárias para atingir 10 ml de meio no total em todos os tratamentos. O ácido propiônico foi adicionado para atingir na concentração final de 12 mM nos tratamentos 1 e 3 e de 24 mM nos tratamentos 2 e 4. As incubações foram feitas em tubos anaeróbios, em que o meio foi saturado com dióxido de carbono, os tubos lacrados e mantidos a temperatura de 39°C por 48 horas.

Nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas amostras do meio de cultura foram coletadas, colocadas em tubos eppendorf e centrifugadas a 5200 x *g*, por 10 minutos, sendo o sobrenadante congelado para análise de concentração de ácido propiônico, ácido acético, ácido butírico e ácido láctico por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC. Para tanto, utilizou-se um cromatógrafo Hewlett-Pacckard série 1050 acoplado a um detector de índice de refração (IR) Hewlett-Pacckard 1047A (Hewlett-Pacckard Company, Wilmington, DE, USA) mantido a 45°C, e coluna Bio-Rad HPX-87H, 300 x 7,8 mm (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) mantida a 60°C. O pH de cada unidade experimental (3 unidades por cada tratamento) foi lido com potenciômetro após 48 horas de incubação.

Os dados foram avaliados por meio de estatística descritiva para o cálculo das médias em função da concentração de ácido propiônico no meio de cultura.

Os dados de pH foram submetidos à análise de variância e os valores médios dos tratamentos comparados pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Na tabela 1 encontram-se os valores médios de velocidade específica de crescimento (μ), densidade óptica máxima (DO_{600nm} máxima) e fase lag de cultura mista de bactérias ruminais em diferentes concentrações de ácido láctico e ácido propiônico. Na figura 1 encontram-se representada as taxas de velocidade específica de crescimento dos microrganismos ruminais em diferentes concentrações de ácido láctico em relação ao tratamento controle (%). Na figura 2 encontram-se as curvas de crescimento microbiano cultivado em diferentes concentrações de ácido láctico.

Tabela 1 – Valores médios de velocidade específica de crescimento (μ), densidade óptica máxima (DO_{600nm} máxima) e fase lag de cultura mista de bactérias ruminais em diferentes concentrações de ácido láctico e ácido propiônico

Parâmetros	Níveis de Ácido Láctico					
	Controle	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM	250 mM
μ	1,0198	1,1821	1,1181	1,0774	0,9725	0,9945
DO_{600nm} máxima	2,065	2,110	2,185	2,165	2,090	1,560
Fase lag (horas)	3,0	3,0	3,0	3,5	4,0	4,0
Parâmetros	Níveis de Ácido Propiônico					
	Controle	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM	250 mM
μ	1,1277	1,1713	1,1528	0,9074	0,9512	0,9534
DO_{600nm} máxima	2,280	2,210	2,110	2,180	2,020	2,125
Fase lag (horas)	4,0	4,0	4,5	5,0	5,0	5,5

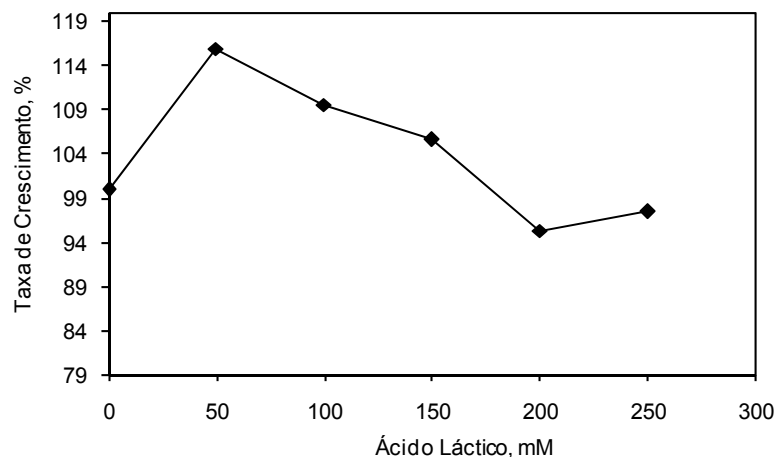


Figura 1 – Velocidade específica de crescimento de cultura mista de bactérias ruminais em diferentes concentrações de ácido láctico no meio. As velocidades específicas de crescimento apresentam-se em valores relativos, considerando o controle igual a 100.

O incremento na concentração de ácido láctico no meio de 0 para 50, 100 e 150 mM resultou em aumento na velocidade específica de crescimento dos microrganismos, com maior estimativa em 50 mM, e tiveram em média a mesma duração da fase lag (Tabela 1). Entretanto, nos meios com concentrações maiores de ácido láctico (200 e 250 mM) houve redução da velocidade específica de crescimento e uma maior fase lag quando comparado ao tratamento controle e aos níveis menores de ácido láctico (50, 100 e 150 mM) no meio. De acordo com os dados expressos na Figura 2, observou-se menor crescimento microbiano quando no meio de cultura foi adicionado concentrações maiores que 100 mM de ácido láctico. Esses resultados permitem demonstrar que altas concentrações de ácido láctico inibem o crescimento de vários grupos de bactérias ruminais.

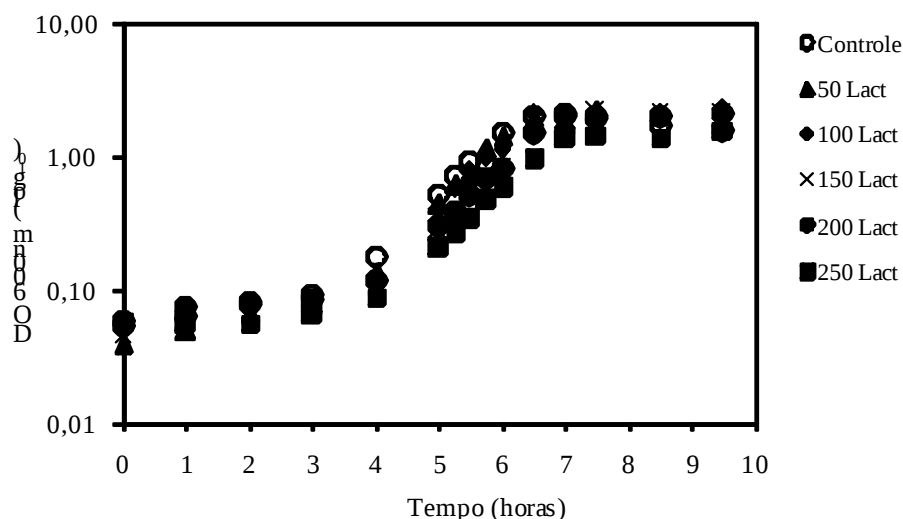


Figura 2 – Crescimento de cultura mista de bactérias ruminais em diferentes concentrações de ácido láctico no meio, expresso na forma logaritmo da DO_{600nm} . As bactérias do rúmen foram cultivadas em meio basal adicionado de diferentes concentrações de ácido láctico (Controle = 0 mM de ácido láctico; 50 Lact = 50 mM de ácido láctico; 100 Lact = 100 mM de ácido láctico; 150 Lact = 150 mM de ácido láctico; 200 Lact = 200 mM de ácido láctico; e 250 Lact = 250 mM de ácido láctico).

Muitas espécies de bactérias do rúmen produzem ácido láctico em cultura pura, mas a concentração desse ácido orgânico *in vivo* é usualmente menor que 1 mM (Hobson & Sterwart, 1997). Isso, porque outras bactérias são fermentadoras de ácido láctico como *Veilonella alcalescens*, *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* impedindo que haja acúmulo de ácido láctico no rúmen.

O ácido láctico é um ácido forte e seu acúmulo pode causar pronunciada queda de pH, inibindo a síntese de proteína microbiana (Russell, 2002; Martin, 1998). O baixo pH tem impacto negativo sobre as bactérias, particularmente quando este é devido ao acúmulo de ácidos orgânicos advindos da fermentação. A membrana celular dos microrganismos do rúmen não permitem a entrada passiva de prótons (H^+) e de hidroxilas (OH^-), mas permitem que outras moléculas, como o ácido láctico na forma não dissociada entrem na célula. O ácido láctico, ao atravessar a membrana plasmática, se dissocia no citoplasma da célula liberando um próton e acidificando o pH intracelular, o que resulta em gasto de ATP na tentativa da célula restabelecer a homeostasia do

citoplasma. (Merchen et al., 1993). Esse processo compromete a fermentação de substratos pela célula e, conseqüentemente, o crescimento microbiano.

As bactérias ruminais apresentam diferentes sensibilidades aos baixos pHs. Bactérias celulolíticas constituem um dos grupos mais sensíveis à queda de pH no meio com inibição do crescimento das mesmas (Russell & Strobel, 1989). Várias outras bactérias não celulolíticas também são sensíveis à queda de pH, decrescendo a fermentação de hexoses em baixo pH e desviando ATP do crescimento para funções de não-crescimento (Russell & Strobel, 1989).

Assim, concentrações de 200 e 250 mM de ácido láctico podem ter inibido os microrganismos ruminais sensíveis a baixo pH. Nos meios com concentrações menores de ácido láctico (50, 100 e 150 mM), principalmente 50 mM, possivelmente, os microrganismos ruminais foram capazes de utilizar esse ácido como substrato mais rapidamente, impedindo que o acúmulo de lactato iniba-se os outros microrganismos ruminais. Possivelmente, como o ácido láctico foi utilizado como substrato pelos microrganismos ruminais e a concentração desse ácido no meio não interferiu no crescimento dos microrganismos sensíveis ao baixo pH, observou-se maior velocidade específica de crescimento microbiano nos meios com 50 e 100 mM de lactato do que o tratamento controle. A partir de 150 mM de lactato no meio, o lactato começa a inibir as bactérias sensíveis ao baixo pH, diminuindo a velocidade específica de crescimento quando a concentração desse ácido atinge valores de 200 e 250 mM.

O aumento na concentração de ácido propiônico no meio de 0 para 50 e 100 mM aumentou a velocidade específica de crescimento dos microrganismos ruminais (Figura 3). Entretanto, no meio com concentração de 100 mM observou-se uma maior fase lag na curva de crescimento microbiano (Tabela 1). Diferentemente, nos meios com concentrações mais elevadas de ácido propiônico (150, 200 e 250 mM) verificou-se menor velocidade específica de crescimento e maior fase lag quando comparado ao tratamento controle e aos níveis menores de ácido propiônico (50, 100 mM) no meio (Tabela 1 e Figura 3). Não houve diferença entre as DO_{600nm} máximas dos microrganismos ruminais crescidos nos meios com diferentes concentrações de ácido propiônico. Na Figura 4 pode-se verificar crescimento microbiano mais lento, quando há no meio, concentrações maiores que 50 mM de ácido propiônico.

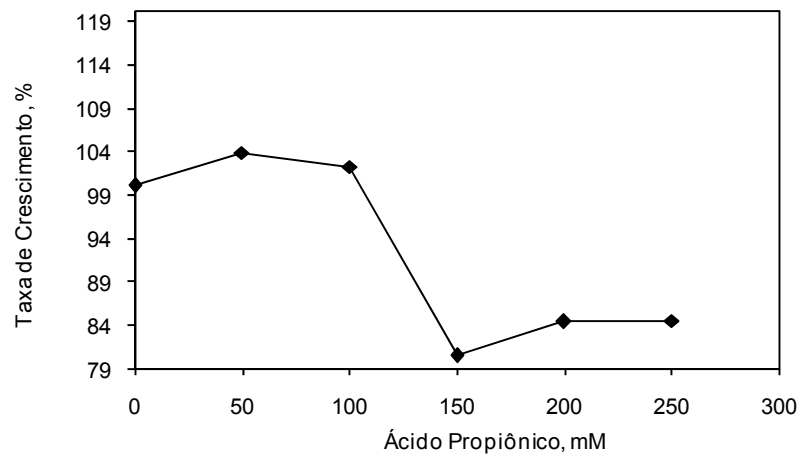


Figura 3 – Velocidade específica de crescimento (μ) de cultura mista de bactérias ruminais em diferentes concentrações de ácido propiônico no meio. As velocidades específicas de crescimento apresentam-se em valores relativos, considerando o controle igual a 100.

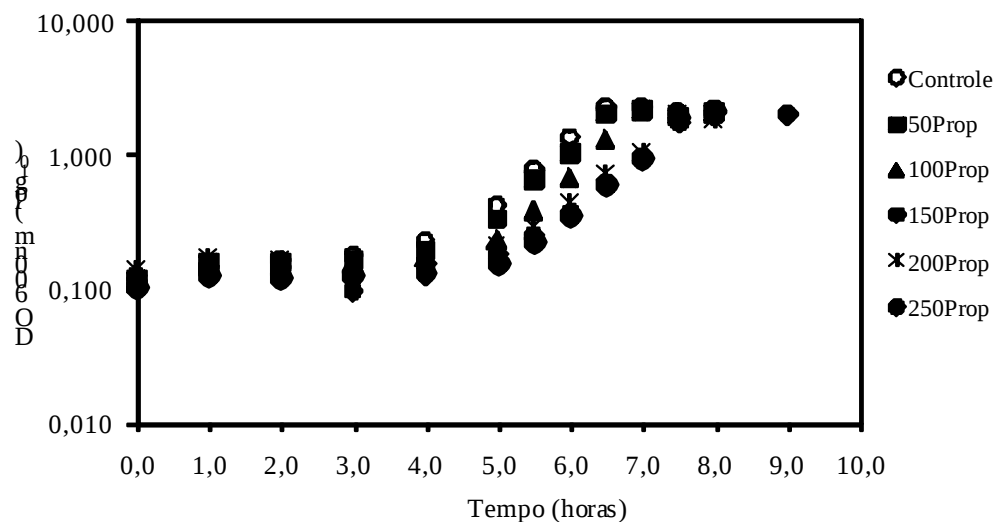


Figura 4 – Crescimento de cultura mista de bactérias ruminais em diferentes concentrações de ácido propiônico no meio, expresso na forma logarítmo da DO_{600nm} . As bactérias do rúmen foram cultivadas em meio basal adicionado de diferentes concentrações de ácido propiônico (Controle = 0 mM de ácido propiônico; 50 Prop = 50 mM de ácido propiônico; 100 Prop = 100 mM de ácido propiônico; 150 Prop = 150 mM de ácido propiônico; 200 Prop = 200 mM de ácido propiônico; e 250 Prop = 250 mM de ácido propiônico).

O ácido propiônico em níveis maiores que 50 mM, no meio, parece inibir parte da população de bactérias ruminais, favorecendo, somente bactérias resistentes a altas concentrações deste ácido, as quais têm taxas de crescimento relativamente mais lentas com maiores fases lag. Bello & Escobar (1997) verificaram que o aumento de propionato no meio tem um efeito seletivo sobre grupos de bactérias.

Segundo Merchen et al. (1993), propionato e butirato somente reduzem a multiplicação microbiana quando suas concentrações superam consideravelmente os níveis fisiológicos. Em média, a concentração de ácido propiônico no rúmen é de 30 mM, considerando dados de média de concentração de ácidos graxos voláteis totais no rúmen e a porcentagem molar de ácido propiônico ruminal (Dijkstra et al., 2005). As concentrações de ácido propiônico (50, 100, 150, 200 e 250 mM) testadas nesse trabalho foram superiores aos existentes geralmente no rúmen, sendo capazes, então, de inibir os microrganismos ruminais, em experimentos *in vitro* em sistema fechado. Vale ressaltar, que a concentração de 50 mM de ácido propiônico no meio não inibiu o crescimento microbiano.

Parece, que os microrganismos resistentes a altas concentrações de ácido propiônico apresentaram crescimento mais lento, mas alcançaram a mesma densidade óptica no meio que os microrganismos contidos no tratamento controle (Tabela 1), demonstrando que ácido propiônico não os impediu de crescer.

Por ser um produto da fermentação, como o ácido láctico, o ácido propiônico possui a capacidade de migrar na forma não dissociada no interior celular. Assim, como discutido anteriormente, o ácido propiônico em altas concentrações no meio pode agir da mesma forma que o ácido láctico, diminuindo o pH intracelular bacteriano.

Apesar de tanto o ácido láctico quanto o ácido propiônico inibirem o crescimento microbiano ruminal, o poder de inibição dos mesmos difere. O ácido propiônico proporcionou maior inibição em menores concentrações no meio do que o lactato. As espécies bacterianas resistentes a esses ácidos, também, parecem ser distintas, devido ao comportamento dos microrganismos na presença desses ácidos. Os microrganismos que cresceram no meio com a maior concentração de ácido propiônico alcançaram concentrações nos meios

(medidas via DO_{600nm} máxima) similares ao tratamento controle, o que não foi observado no meio com altas concentrações de ácido láctico (Tabela 1).

Diante desses resultados, percebe-se que o ácido propiônico e, principalmente, o ácido láctico em baixas concentrações, estimulam o crescimento microbiano. Entretanto, em concentrações elevadas, esses ácidos inibem o crescimento de determinadas espécies de bactérias ruminais.

Na Figura 5 observam-se as concentrações de ácido propiônico, ácido acético, ácido láctico e ácido butírico durante 48 horas de incubação por microrganismos ruminais em meios contendo diferentes concentrações de ácido propiônico e glicose.

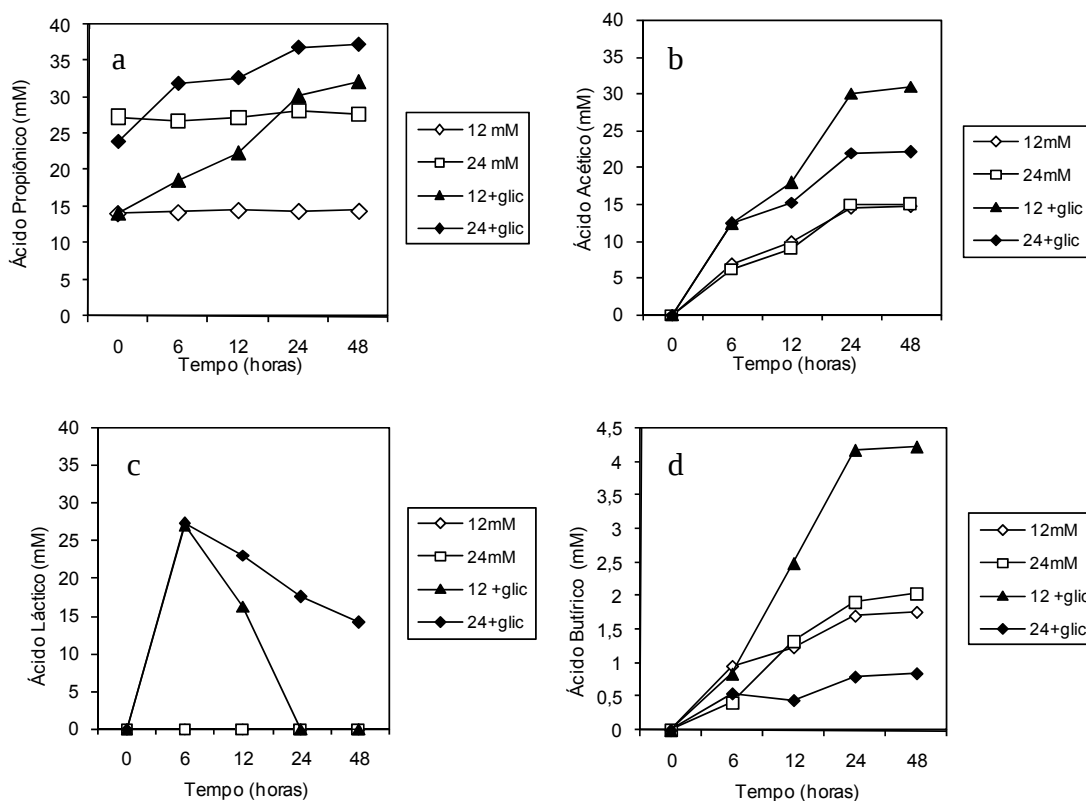


Figura 5 – Concentração de ácido propiônico (a), ácido acético (b), ácido láctico (c) e ácido butírico (d) ao longo do tempo, em meio contendo bactérias ruminais. As bactérias do rúmen foram cultivadas em meio basal adicionado de diferentes concentrações de ácido propiônico e glicose (12mM = 12 mM de ácido propiônico e 0 mg de glicose; 24 mM = 24 mM de ácido propiônico e 0 mg de glicose; 12 + glic = 12 mM de ácido propiônico e 40 mg de glicose; e 24 + glic = 24 mM de ácido propiônico e 40 mg de glicose)

O ácido propiônico não foi metabolizado pelos microrganismos ruminais, independente da concentração do mesmo no meio e da presença ou ausência de glicose. Isso pode ser visualizado pela manutenção (12 mM e 24 mM) ou aumento das concentrações de ácido propiônico (12 + glic e 24 + glic) no meio durante as 48 horas de incubação (Figura 5-a). Quando no meio havia glicose como fonte de energia observou-se aumento na concentração de ácido propiônico, ao longo do tempo, uma vez que os microrganismos utilizaram a glicose do meio para produzirem ácido propiônico.

Quando no meio não havia glicose, a produção de ácido acético durante a incubação foi similar nos meios que continham 12 e 24 mM de ácido propiônico. Nos meios que continham glicose observou-se maior produção de

ácido acético que nos meios que não continham esse açúcar. O tratamento com glicose e 12 mM de ácido propiônico apresentou maior produção de ácido acético do que o meio que continha glicose e 24 mM de ácido propiônico. A concentração de 24 mM de ácido propiônico parece ter inibido a produção de ácido acético em meio com glicose (Figura 5-b).

A produção de ácido butírico também foi afetada pela concentração de ácido propiônico no meio. As concentrações de 24 mM de ácido propiônico no meio inibiram a produção de ácido butírico, principalmente no meio que continha glicose (figura 5-d).

Nos meios que não continham glicose não foi detectado ácido láctico no sobrenadante das culturas. Nos meios adicionados de glicose houve produção de ácido láctico durante seis horas de incubação. Entretanto, após seis horas de incubação, houve queda na concentração de ácido láctico no meio, sendo esta mais abrupta no meio contendo 12 mM de ácido propiônico (figura 5-c). A queda na concentração de ácido láctico se deve a utilização desse ácido orgânico pelos microrganismos ruminais e sua conversão em outros produtos.

Na Tabela 2 observam-se os valores médios de pH após 48 horas de incubação por microrganismos ruminais em meios contendo diferentes concentrações de ácido propiônico e glicose. A adição de concentrações maiores de ácido propiônico diminuiu o pH do meio, independente da presença ou não de glicose. Nos meios que continham glicose o pH foi inferior ao dos meios em que a glicose era ausente.

Tabela 2 – Valores médios de pH em meio contendo bactérias ruminais após 48 horas de incubação. As bactérias do rúmen foram cultivadas em meio basal adicionado de diferentes concentrações de ácido propiônico e glicose

Parâmetro	Níveis de Propionato			
	12 mM ¹	24 mM ¹	12 + glic ¹	24 + glic ¹
pH	6,22a	6,02b	5,71c	5,53d

¹/12mM = 12 mM de ácido propiônico e 0 mg de glicose; 24 mM = 24 mM de ácido propiônico e 0 mg de glicose; 12 + glic = 12 mM de ácido propiônico e 40 mg de glicose; e 24 + glic = 24 mM de ácido propiônico e 40 mg de glicose). *Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). CV=0,6170%.

Apesar do ácido propiônico não ser utilizado como fonte de energia pelos microrganismos ruminais, observou-se efeito sobre o crescimento dos mesmos. Na Figura 5, observa-se a mudança ocorrida no metabolismo das

bactérias ruminais devido à presença de ácido propiônico. As diferentes concentrações de ácido propiônico no meio proporcionaram diferenças na produção de ácido acético, ácido butírico e ácido láctico, demonstrando que o perfil fermentativo foi alterado. Russell & Wilson (1996) também verificaram que ácidos graxos voláteis em altas concentrações inibem o crescimento de bactérias.

A fermentação ruminal constitui um processo exergônico que converte matérias-primas fermentáveis em ácidos graxos voláteis, metano, amônia e, ocasionalmente ácido láctico (Kozloski, 2002). Ao longo dessas reações, parte da energia liberada é utilizada para o crescimento microbiano. A concentração de 24 mM de ácido propiônico em meio basal contendo glicose como fonte de carbono proporcionou menor produção de ácido acético e ácido butírico ao longo do tempo do que o meio que continha 12 mM de ácido propiônico. Menores concentrações, então, de ácidos graxos voláteis como o ácido acético e o ácido butírico, podem ser reflexo da menor atividade de fermentação e consequentemente de produção de energia para célula bacteriana e menor crescimento microbiano. Assim, o ácido propiônico age, possivelmente, sobre as bactérias ruminais inibindo seu crescimento quando está no meio em concentrações que modificam o metabolismo celular possivelmente pela queda de pH intracelular. Nas Tabelas 1 e 2 e nas Figuras 3 e 5 pode-se visualizar esses acontecimentos, em que ocorreu, nas maiores concentrações de ácido propiônico no meio, um menor crescimento microbiano, pHs menores (Tabela 2) e menores produções de ácido acético e ácido butírico (Figura 5).

O ácido láctico pode ser utilizado por algumas bactérias ruminais para a produção de energia (Russell, 2002). Nos meios com presença de glicose, após seis horas de incubação, a concentração de ácido láctico no meio diminuiu gradativamente devido, possivelmente, à fermentação do ácido láctico por bactérias fermentadoras desse ácido. No meio em que a concentração de ácido propiônico era de 12 mM, todo o ácido láctico foi fermentado, o que não aconteceu no meio com concentração de 24 mM de ácido propiônico. A concentração de 24 mM ácido propiônico no meio pode ter inibido as bactérias fermentadoras de ácido láctico, e o acúmulo de ácido láctico no meio pode ter afetado o metabolismo das bactérias ruminais. Esse efeito pode ser visualizado pelo menor coeficiente angular, nos demais gráficos da Figura 5, após seis

horas de incubação, que é resultante da menor taxa de produção do ácido propiônico, ácido acético e ácido butírico.

Na Figura 5, também se visualiza que as bactérias utilizadoras de lactato têm a capacidade de impedir o acúmulo de lactato no meio. Isso confirma que os microrganismos ruminais fermentadores de lactato do experimento 1 foram capazes de fermentar o ácido láctico, impedindo que o acúmulo do mesmo iniba-se o crescimento de outros microrganismos ruminais nos meios com menores concentrações de ácido láctico (50, 100 e 150 mM).

As bactérias ruminais, por não serem capazes de metabolizar o ácido propiônico, não conseguem amenizar o efeito inibitório desse ácido, como ocorre com o lactato. O ácido propiônico proporcionou maior inibição em menores concentrações no meio do que o lactato, no experimento 1, possivelmente devido a incapacidade das bactérias ruminais de amenizar os efeitos inibitórios do ácido propiônico, diferentemente do ácido láctico.

Conclusões

O ácido láctico e o ácido propiônico, em baixas concentrações, estimularam o crescimento microbiano *in vitro*. Entretanto, em concentrações elevadas, esses ácidos inibiram o crescimento microbiano.

Os microrganismos ruminais não foram capazes de utilizar o ácido propiônico como fonte de energia.

O ácido propiônico apresentou efeito inibitório na velocidade de crescimento de microrganismos ruminais em baixas concentrações mais acentuadamente do que o ácido láctico.

Literatura Citada

- BELLO, M.G.D.; ESCOBAR, A. Rumen manipulation for improved utilization of tropical forages. **Animal Feed Science Technology**, v.69, p.91-102, 1997.
- CASTILLO, C.; BENEDITO, J.L.; MÉNDEZ, J. et al. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**. V.115, p.101-116, 2004.
- DIJKSTRA, J.; FORBES, J.M.; FRANCE, J. **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. 2.ed. Cambridge: CABI Publishing, 2005. 734p.
- HOBSON, P.N., STERWART, C.S. **The rumen microbial ecosystem**. 2.ed. London. 1997. 719p.
- KOZLOSKI, V.K. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: UFSM, 2002. 140p.
- MERCHEN, N.R. Digestion, absorcion y excrecion en los ruminantes. In: CHURCH, D.C (ed). **El ruminante fisiología digestive y nutrición**. 4. ed. Zaragoza: Acríbia, 1993. 641p.
- MARTIN, S.A. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. **Journal of Animal Science**, v.76, p.3123-3132, 1998.
- RUSSELL, J.M.; STROBEL, H.J. Effects of additives on *in vitro* ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, v.66, n.2, p.552-558, 1989.
- RUSSELL, J.M. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. New York: Ithaca, 2002. 119p.
- RUSSELL, J.M.; WILSON, D.B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal Dairy Science**, v.79, p.1503-1509, 1996.

Capítulo 2

Efeito do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* sobre as bactérias ruminais *in vitro*

Introdução

Os ruminantes possuem a capacidade de utilizar grande variedade de alimentos como fonte de nutrientes. Isso se deve à relação simbiótica do hospedeiro (animal) com os microrganismos ruminais, o que possibilita a utilização de compostos complexos e inutilizáveis para a maioria dos outros animais. A relação simbiótica se dá da seguinte maneira: o animal fornece alimento e ambiente (rúmen) para o crescimento dos microrganismos que, por sua parte, suprem o animal com ácidos resultantes da fermentação e com proteína microbiana. Assim, modificações no ecossistema microbiano do rúmen proporcionam modificações na disponibilidade de nutrientes para serem utilizados pelo ruminante.

Há, então, muito interesse sobre alternativas para manipular a microbiota ruminal. O rúmen pode ser manipulado para melhorar a utilização de substrato e a eficiência de fermentação e de uso dos nutrientes dos alimentos (Bello & Escobar, 1997). Entre os manipuladores ruminais estudados para ruminantes, tem-se dado destaque para os ácidos orgânicos e os *direct-fed microbials*. Esses aditivos alimentares agem de diferentes formas sobre a fermentação ruminal melhorando o desempenho animal, sem deixar resíduo nos produtos de origem animal.

Os ácidos orgânicos no rúmen podem estimular o consumo de lactato por *Selenomonas ruminantium* por prevenir ou corrigir a queda do pH ruminal associado à acidose ruminal; reduzir a metanogênese, reduzindo a perda de energia associada com produção de metano no rúmen; podendo apresentar efeito complementar como tampão sobre o pH ruminal (Castillo et al., 2004).

O mecanismo de ação dos *direct-fed microbials* (DFM) ainda não é bem entendido; mas, se acredita que esses microrganismos possuam atributos que melhoram a funcionalidade do rúmen (Weinberg et al., 2002). Demonstrou-se efeitos benéficos de DFM no rúmen, ajudando a prevenir a acidose ruminal

(Krehbiel et al., 2003), melhorando a digestibilidade da matéria seca e o ganho de peso do animal (Weinberg et al., 2003).

Uma fonte de ácido propiônico e de DFM pode ser produzida a partir da fermentação do soro de leite por dois microrganismos ruminais: *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula*. A lactose é substrato para o gênero *Enterococcus* sp que tem como produto final da fermentação o lactato. O lactato é utilizado como fonte de energia por bactérias do gênero *Veilonella* sp que tem entre os seus produtos finais da fermentação o ácido propiônico. O soro fermentado pode então constituir fonte de ácido propiônico e de microrganismos utilizadores de lactose e lactato e produtores de propionato (*Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula*).

Entretanto, são poucas as pesquisas sobre o comportamento dos microrganismos ruminais submetidos a diferentes níveis do soro de leite fermentado por microrganismos isolados do rúmen e produtores de lactato e propionato. Assim, é necessário verificar os possíveis efeitos do soro fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* sobre os microrganismos ruminais.

Objetivou-se avaliar o efeito do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* sobre os microrganismos ruminais *in vitro*.

Material e Métodos

O trabalho foi dividido em dois experimentos com o intuito de esclarecer os efeitos isolados ou em conjunto dos constituintes do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula*.

Os dois experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbicos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa - UFV, em Viçosa, Minas Gerais. Foi utilizado um novilho fistulado no rúmen, mantido em pastagem de capim *Brachiária decumbens*, como doador de líquido de rúmen. O novilho estava alojado no Laboratório de Animais do Departamento de Zootecnia da UFV.

Utilizou-se nos ensaios o mesmo soro de leite fermentado. O soro de leite inicialmente estava desidratado e foi re-suspenso em água para que contivesse 40 g/L de lactose. Em seguida ajustou-se o pH para 7,0 com NaOH a 1,0 M. O soro foi, então, autoclavado, saturado com dióxido de carbono e inoculado com *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* (3% do meio). O soro foi mantido por 48 horas a 39° C com borbulhamento de CO₂ constante, e com o pH constantemente corrigido para 7,0 por meio da adição de NaOH, após, foi congelado para posterior utilização nas incubações.

Experimento 1 - Efeito do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* sobre a fermentação de diferentes fontes de carbono por microrganismos ruminais

O líquido ruminal foi coletado de um bovino fistulado no rúmen e imediatamente transportado para o laboratório, em garrafa térmica. Em seguida, foi colocado em repouso durante 30 minutos, a 39°C, e após formação das interfaces do líquido, retirou-se o líquido intermediário que foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado, para obtenção de inóculo contendo população microbiana ativa (*pellet*). O *pellet* formado, o qual continha microrganismos predominantes no líquido ruminal, foi re-suspenso em solução salina 0,9% (p/v) autoclavada e saturada com dióxido de carbono. Procedeu-se a nova centrifugação a 5000 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado novamente. O *pellet* formado na última centrifugação foi, então, re-suspenso em solução salina 0,9% autoclavada e saturada com dióxido de carbono (inóculo).

O soro de leite fermentado foi centrifugado a 5.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante da centrifugação que foi utilizado nos tratamentos (soro). O procedimento de centrifugação foi utilizado para que os microrganismos inoculados no soro não fizessem parte do soro fermentado utilizado no experimento, e com isso fossem contabilizados como microrganismos ruminais nas unidades experimentais que continham soro fermentado, ou fossem usados como fonte de proteína.

O delineamento foi o inteiramente casualizado, em fatorial 6 x 3 (seis substratos e três níveis de soro) com duas repetições. Os tratamentos foram os seguintes:

- 1) Sem fonte de carbono (controle);
- 2) Sem fonte de carbono + 10% de soro no meio;
- 3) Sem fonte de carbono + 20% de soro no meio;
- 4) Trypticase;
- 5) Trypticase + 10% de soro no meio;
- 6) Trypticase + 20% de soro no meio;
- 7) Amido;
- 8) Amido + 10% de soro no meio;
- 9) Amido+ 20% de soro no meio;
- 10) Carboximetil celulose (CMC);
- 11) CMC + 10% de soro no meio;
- 12) CMC + 20% de soro no meio;
- 13) Pectina;
- 14) Pectina + 10% de soro no meio;
- 15) Pectina + 20% de soro no meio;
- 16) Glicose;
- 17) Glicose + 10% de soro no meio;
- 18) Glicose + 20% de soro no meio;

Todos os tubos de incubação contiveram 0,2 ml de inóculo, 40 mg do determinado substrato de cada tratamento e meio de cultura sintético (40 ml de solução salina A – que contém por litro: 7,3 g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 40 mL de solução salina B – que contém por litro: 6,0 g de K_2HPO_4 , 12,0 g de $(NH_4)_2SO_4$, 12,0 g de NaCl, 2,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 1,6 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,50 g de extrato de levedura; 1,0 g de trypticase – Trypticase, BBL Microbiology Systems, Cockesville, MD; 0,60 g de hidrocloreto de cisteína; 1,0 mL de resazurina; 4,0 g de carbonato de sódio; e 870 mL de água) autoclavado e saturado com dióxido de carbono em quantidades necessárias para atingir 10 mL de meio no total em todos os tratamentos. As incubações foram feitas em tubos anaeróbios, em que o meio foi saturado com dióxido de carbono, os tubos lacrados e mantidos a temperatura de 39°C.

Após 24 horas de incubação foi determinada a densidade óptica de cada unidade experimental em espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron, Waltham, MA, USA), com comprimento de onda de 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$).

Antecipa-se que foi verificado efeito de interação entre substrato e nível de soro ($P < 0,05$). Desta forma, os dados foram avaliados por análise de regressão em função da concentração de soro fermentado no meio de cultura em cada substrato. Para escolha dos modelos foi tomado como critério a significância dos efeitos quantitativos ($\alpha = 0,10$).

Experimento 2 – Efeito do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* sobre o crescimento microbiano ruminal.

Objetivou-se por meio desse ensaio avaliar o efeito do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* sobre o crescimento de microrganismos ruminais em meio sem restrição de energia e nitrogênio.

O líquido ruminal foi coletado de um bovino fistulado no rúmen, e imediatamente transportado para o laboratório, em garrafa térmica. Em seguida, foi colocado em repouso durante 30 minutos, a 39°C, e após formação das interfaces do líquido, retirou-se o líquido intermediário que foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado, para obtenção de inóculo contendo população microbiana ativa (*pellet*). O *pellet* formado, o qual continha microrganismos predominantes no líquido ruminal, foi re-suspenso em meio sintético autoclavado e saturado com dióxido de carbono. Procedeu-se a nova centrifugação a 5000 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado novamente. O *pellet* formado na última centrifugação foi, então, re-suspenso em meio sintético autoclavado e saturado com dióxido de carbono (células ruminais).

O delineamento foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram os seguintes:

- 1) Células ruminais + Meio de cultura sintético + Glicose;
- 2) Células ruminais + Soro inativo + Meio de cultura sintético + Glicose;
- 3) Células ruminais + Soro ativo + Meio de cultura sintético + Glicose; e

4) Soro ativo + Meio de cultura sintético + Glicose.

No tratamento 2, utilizou-se o mesmo soro do experimento 3 (soro inativo), em que o soro de leite foi fermentado durante 48 horas a 39° C por bactérias produtoras de lactato e ácido propiônico, após, foi congelado para posterior utilização nas incubações .

Nos Tratamentos 3 e 4 foi utilizado o soro de leite fermentado pelo mesmo procedimento do tratamento 2. Porém, após incubação, esse soro foi imediatamente utilizado nos respectivos tratamentos. Assim, o soro de leite continha células vivas de *Enterococcus faecium* e *Veillonella parvula* (soro ativo).

Os tubos de incubação do tratamento 1 continham 9,0 mL de células ruminais, 120 mg de glicose, e meio de cultura sintético puro autoclavado e saturado com dióxido de carbono em quantidades necessárias para atingir 30 mL de meio no total. Os tubos de incubação dos tratamentos 2 e 3 continham 9,0 mL de células ruminais, 7,5 mL de soro inativo ou ativo, 120 mg de glicose, e meio de cultura sintético puro autoclavado e saturado com dióxido de carbono em quantidades necessárias para atingir 30 mL de meio no total. Os tubos de incubação do tratamento 4 contiveram 7,5 mL de soro ativo, 120 mg de glicose, e meio de cultura sintético puro autoclavado e saturado com dióxido de carbono em quantidades necessárias para atingir 30 mL de meio no total.

As incubações foram realizadas em seringas de vidro calibradas, com capacidade de 100 ml (HÄBERLE Labortechnik – FORTUNA® Germany), e mantidas a temperatura de 39°C, em agitação (70 rpm), por 48 horas. Nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8 12, 24, 32 e 48 horas foram efetuadas as leituras do volume do gás produzido na incubação.

Além disso, no tempo 0 e 24 horas foram coletados 1,0 ml de amostra de cada unidade experimental colocado em tubo *ependorf* e centrifugado a 5200 x *g*, por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* re-suspenso em solução salina (0,9% de NaCl), sendo centrifugado novamente e separado do sobrenadante, e então re-suspenso em solução salina (0,9% de NaCl) e congelado para a posterior quantificação de proteína microbiana pelo método de Bradford (1976).

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 encontram-se os valores médios de crescimento microbiano em diferentes substratos e em diferentes concentrações de soro de leite fermentado.

Tabela 1 – Valores médios de crescimento em diferentes substratos e em diferentes concentrações de soro de leite fermentado por *Enterococcus faecium* e *Veillonella parvula* expressos como densidade óptica (DO_{600 nm}) após 24 horas de incubação

Substrato	Soro, %			Média
	0	10	20	
Sem substrato	0,107	0,175	0,211	0,164
Trypticase	0,105	0,231	0,288	0,208
Amido	0,510	0,560	0,488	0,519
*CMC	0,163	0,175	0,190	0,176
Pectina	0,489	0,572	0,489	0,517
Glicose	0,283	0,429	0,502	0,405
Média	0,276	0,357	0,361	—

*CMC= carboximetilcelulose.

Na Tabela 2 encontram-se as equações de regressão do crescimento microbiano de cada substrato em função dos níveis de soro de leite fermentado.

Tabela 2 - Equações de regressão para crescimento microbiano na forma de absorbância da DO_{600 nm}, em diferentes substratos, em função dos níveis de soro de leite fermentado por *Enterococcus faecium* e *Veillonella parvula*

Substrato	Efeito		r ² /R ²	Equação Ajustada
	Linear	Quadrática		
Sem substrato	0,0068	0,6084	0,9386	Y = 0,1117 + 0,0053X
Trypticase	<0,0001	0,2511	0,8767	$\hat{Y} = 0,1168 + 0,0091X$
Amido	0,5296	0,0550	0,5073	$\hat{Y} = 0,5100 + 0,0111X - 0,000610X^2$
*CMC	0,4417	0,9471	—	$\hat{Y} = 0,176$
Pectina	>0,9999	0,0120	0,9292	$\hat{Y} = 0,489 + 0,0166X - 0,000830X^2$
Glicose	<0,0001	0,2322	0,8178	$\hat{Y} = 0,2947 + 0,0110X$

*CMC= carboximetilcelulose.

Houve aumento linear ($P < 0,01$) da densidade óptica nos meios sem substrato e que continham trypticase e glicose em função da adição de soro de leite fermentado no meio. O aumento linear na concentração de microrganismos ruminais, no meio, em função do soro de leite fermentado pode ser atribuído aos ácidos orgânicos contidos no soro que proporcionaram condições para uma fermentação mais adequada aos microrganismos proteolíticos e fermentadores de carboidratos não estruturais.

No soro de leite fermentado, os principais ácidos orgânicos contidos são o ácido propiônico, ácido láctico e ácido acético. Como visto no capítulo 1, o ácido propiônico e o ácido láctico estimulam o crescimento de determinadas estirpes de bactérias ruminais.

O soro de leite fermentado estimulou o crescimento das bactérias em meio contendo trypticase ou glicose, devido, talvez, à parte da população dos microrganismos proteolíticos e fermentadores de carboidratos não estruturais serem mais resistentes a níveis maiores dos ácidos orgânicos (ácido propiônico e lactato) no meio, diminuindo a competição pelo substrato entre esses microrganismos e outros sensíveis aos ácidos orgânicos. Além disso, o soro pode ter proporcionado substrato adicional (lactato) para ser fermentado por grupos de bactérias, favorecendo o crescimento microbiano.

Várias bactérias ruminais são capazes crescer em meios de baixo pH e de utilizar como fonte de energia tanto a glicose quanto o lactato, como por exemplo a *Selenomonas ruminantium*, que está presente em grande número

no rúmen dos animais, e a *Megasphaera elsdenii*. As estirpes de *Selenomonas ruminantium* utilizadoras de lactato crescem em meio rico em glicose, acumulando lactato que pode ser utilizado pela mesma para formar acetato e propionato (Hobson & Sterwart, 1997). A *Megasphaera elsdenii* é outra bactéria que fermenta uma variedade de açúcares simples, mas tem alta afinidade pelo ácido láctico (Russell, 2002) e também é resistente a queda de pH.

As bactérias fermentadoras obrigatórias de aminoácidos utilizam aminoácidos como principal substrato energético, degradando proteínas mais intensamente que as demais (Russell, 2002). Todavia, o excesso de desaminação de aminoácidos decorrente da fermentação dessas bactérias, causa perda de nitrogênio na forma de amônia, diminuindo a eficiência de utilização do nitrogênio e crescimento microbiano. Segundo Webel et al. (2005) a acidez reduz a produção de amônia, por meio da inibição do crescimento da população de bactérias proteolíticas.

Quando o substrato no meio era o amido ou a pectina houve um comportamento quadrático ($P < 0.01$) da curva de crescimento microbiano em função dos níveis de soro de leite fermentado. A máxima resposta do crescimento microbiano com o substrato amido ou pectina, segundo as equações de regressão, foi quando se tinha no meio 9,09% e 10,00% de soro, respectivamente. O aumento inicial do crescimento microbiano pode ser decorrente também da presença dos ácidos orgânicos do soro que melhoraram a fermentação microbiana. Entretanto, adição de maiores quantidades de soro de leite fermentado no meio pode proporcionar níveis tóxicos de lactato e ácido propiônico aos microrganismos amilolíticos e pectinolíticos, inibindo o crescimento desses microrganismos, explicando o comportamento quadrático da curva de crescimento.

O efeito tóxico do ácido propiônico e ácido láctico a partir de 50 mM e 150 mM no meio, respectivamente foi verificado no capítulo 1. A adição de soro de leite fermentado ao meio pode ter aumentado as concentrações desses ácidos. Os microrganismos amilolíticos e pectinolíticos podem ser mais sensíveis ao lactato e ao ácido propiônico que os microrganismos proteolíticos e outros fermentadores de carboidratos não estruturais.

No meio que continha como substrato carboximetilcelulose não houve efeito significativo ($P < 0,10$) do soro fermentado sobre o crescimento

microbiano. Isso pode ser devido ao fato dos microrganismos celulolíticos não serem afetados pelos constituintes do soro de leite fermentado, mais precisamente pelos ácidos orgânicos. Entretanto, como já citado, estudos demonstram que bactérias celulolíticas são um dos grupos mais sensíveis à queda de pH (Russell & Strobel, 2005). Como um dos principais efeitos do ácido propiônico e o lactato é o abaixamento do pH, os resultados desse ensaio contradizem os resultados obtidos por Russell & Strobel (2005).

Pode-se inferir então, que o soro de leite fermentado por *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* afetam o crescimento de diferentes grupos de bactérias ruminais devido, possivelmente a presença de ácido propiônico e lactato em sua composição. Esses ácidos orgânicos contidos no soro de leite fermentado estimulam o crescimento de bactérias proteolíticas e fermentadoras de carboidratos não estruturais, e em altas concentrações inibem o crescimento de bactérias amilolíticas e pectinolíticas. Entretanto, esses compostos não afetam o crescimento de microrganismos celulolíticos.

Na Tabela 3 encontram-se os valores médios de concentração de proteína microbiana inicial, concentração de proteína microbiana após 48 horas de incubação, a diferença entre a concentração de proteína microbiana após 48 horas de incubação e inicial, a produção de gás acumulado em 48 horas de incubação e a produção de gás por hora das culturas mistas de bactérias ruminais em diferentes tratamentos. Na Figura 1 observa-se a produção de gás durante 48 horas de incubação de microrganismos ruminais mistos com os diferentes tratamentos.

Tabela 3 – Valores médios de proteína microbiana em zero hora de incubação (Ptn 0h), proteína microbiana após 48 horas de incubação (Ptn 48h), crescimento microbiano entre zero hora e 48 horas de incubação (Δ), produção de gás acumulado em 48 horas de incubação (Gás) e produção de gás por hora dos tratamentos

Itens	Bact ¹	Bact+Soro inat. ²	Bact+Soro ativ. ³	Soro ativ. ⁴	CV, %
Ptn 0h, mg/L	298,9b	765,6a	821,1a	707,2a	25,7
Ptn 48h, mg/L	787,8b	1798,9a	1634,1a	1332,2ab	21,8
Δ , mg/L	488,9b	1033,3a	813,0ab	625,0b	30,6
Gás, ml	118,50b	126,50b	166,75a	159,25a	7,9
Gás, ml/hora	2,47b	2,65b	3,47a	3,35a	7,8

^{1/} = meio apenas com bactérias ruminais; ^{2/} = meio com bactérias ruminais e soro de leite com *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* inativas; ^{3/} = meio com bactérias ruminais e soro de leite com *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* ativas; e ^{4/} = meio apenas com soro de leite com *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* ativas. Médias seguidas por letras minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

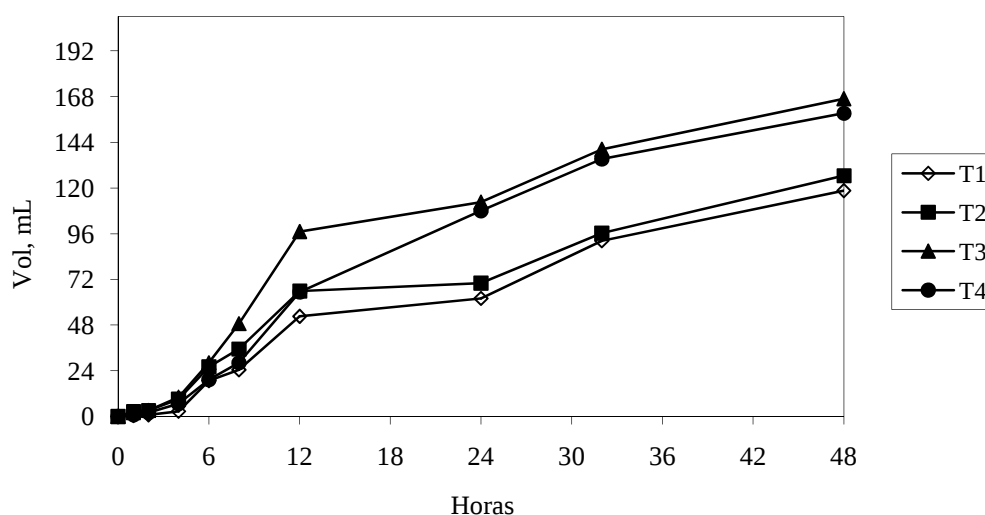


Figura 1 – Produção de gás dos diferentes tratamentos, expresso em mililitros. Os tratamentos constituíram em T1 = bactérias ruminais; T2 = bactérias ruminais e soro de leite com *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* inativas; T3 = bactérias ruminais e soro de leite com *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* ativas; e T4 = soro de leite com *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* ativas

A inclusão de soro de leite fermentado no meio aumentou significativamente a concentração de proteína microbiana no tempo zero e 48 horas de incubação, exceto quando se tinha no meio somente soro com *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* ativas, em que após 48 horas de incubação a concentração de proteína microbiana no meio somente com soro

ativo não diferiu significativamente do tratamento que continha apenas bactérias ruminais.

A maior concentração de proteína microbiana no tempo zero nos tratamentos que continham o soro de leite fermentado por *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* pode ser devido à presença destas bactérias no soro. Assim, nos tratamentos que contém o soro de leite se contabilizou também como proteína microbiana as bactérias *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* contidas no soro.

Houve crescimento microbiano durante 48 horas de incubação no meio que continha apenas soro de leite com *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* ativas demonstrando que esses microrganismos continuam os processos de fermentação e consequentemente, de crescimento microbiano após serem adicionados em outro meio, que não o soro de leite.

O termo *direct-fed microbials* (DFM) é definido como uma fonte de microrganismos vivos que ocorrem naturalmente (Krehbiel et al., 2003) e que tem efeito benéfico ao animal que será o hospedeiro. O soro de leite fermentado por *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* quando adicionado no rúmen logo após ser fermentado pode atuar como DFM. O soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* (que utiliza a lactose transformando-a em ácido láctico) e *Veilonella parvula* (que fermenta o ácido láctico até o ácido propiônico e acetato) quando adicionado na dieta e ingerido pelo ruminante pode continuar o processo de fermentação da lactose, outros carboidratos e do lactato aumentando a produção de ácido propiônico no rúmen. Como visto no capítulo 2 e no ensaio anterior, o ácido propiônico pode atuar estimulando o crescimento de bactérias proteolíticas, fermentadoras de carboidratos não estruturais, amilolíticas e pectinolíticas.

A concentração de proteína microbiana no tempo zero influenciou a concentração de proteína microbiana após 48 horas de incubação. Sendo que, nos tratamentos que tinham maior concentração de proteína microbiana inicial houve maior concentração de proteína microbiana às 48 horas de incubação.

Quando se verifica os valores de crescimento microbiano entre zero hora e 48 horas de incubação, o meio que continha bactérias ruminais e soro inativo apresentou maior crescimento microbiano que os meios apenas com bactérias ruminais ou soro ativo. O soro de leite fermentado pelo consórcio de

Enterococcus faecium e *Veilonella parvula* contendo esses microrganismos inativos pode ter estimulado o crescimento das bactérias ruminais. O efeito de estímulo do soro de leite fermentado sobre as bactérias ruminais reafirma os resultados do capítulo 1, em que os ácidos orgânicos estimulam o crescimento de microrganismos ruminais.

O crescimento microbiano entre zero hora e 48 horas de incubação, no meio com bactérias ruminais e soro ativo, não diferiu significativamente do tratamento que continha apenas bactérias ruminais. As espécies bacterianas *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* parecem competir com as bactérias ruminais pelos substratos contidos no meio de cultura. Essa competição pode ter inibido o crescimento de toda a massa microbiana contida no meio de cultura.

Houve maior produção de gás acumulado em 48 horas de incubação e produção de gás por hora no tratamento com bactérias ruminais e soro ativo e no tratamento com apenas soro ativo.

As espécies bacterianas *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* parecem fermentar mais rapidamente os substratos do meio que as bactérias ruminais, considerando-se que no meio que continha apenas *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* houve maior produção de gás ao longo do tempo e por hora que o tratamento que continha somente bactérias ruminais ou que continha além das bactérias ruminais o soro de leite com *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* inativas. Essa característica desses microrganismos pode ser benéfica ao considerar que os tornam totalmente viáveis no meio ruminal, ou negativa ao considerar que esses microrganismos, por subtrair fonte de nutrientes dos outros microrganismos ruminais, podem inibi-los.

A falta de significância na produção de gás entre o tratamento que continha no meio apenas soro ativo e o tratamento que continha bactérias ruminais e soro ativo confirma a competição pelo substrato que ocorre entre as bactérias contidas no soro e as bactérias ruminais. Como consequência dessa competição, o soro ativo provavelmente não estimulou o crescimento das bactérias ruminais.

O mesmo não aconteceu no tratamento que continha, no meio, bactérias ruminais e soro inativo. Devido às espécies bacterianas *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* não possuírem mais a capacidade de fermentar os

substratos e crescer, no tratamento com bactérias ruminais e *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* inativas não ocorreu competição por substrato, sobressaindo o efeito de estímulo dos ácidos orgânicos sobre os microrganismos ruminais.

Apesar do *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* do soro de leite fermentado possuir a capacidade de continuar o processo de fermentação da lactose, outros carboidratos e do lactato e produzir ácido propiônico no rúmen, podendo então ser classificado o soro fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* como DFM, esses microrganismos não propiciaram benefícios a microbiota ruminal nas concentrações de soro de leite fermentado utilizado nos meios do experimento dois.

Conclusões

O soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* afeta o crescimento *in vitro* de diferentes grupos de bactérias ruminais.

O soro de leite fermentado estimula o crescimento *in vitro* de bactérias proteolíticas e fermentadoras de carboidratos não estruturais, e em altas concentrações inibe o crescimento *in vitro* de bactérias amilolíticas e pectinolíticas. Entretanto, o soro não afeta o crescimento *in vitro* de microrganismos celulolíticos.

O soro de leite fermentado contendo culturas ativas de bactérias aumenta a concentração de proteína microbiana *in vitro*.

A adição de altas concentrações de soro de leite fermentado juntamente com bactérias ruminais em meio sem restrição de energia e proteína não estimula o crescimento das bactérias fibrolíticas ruminais *in vitro*.

Literatura Citada

- BELLO, M.G.D.; ESCOBAR, A. Rumen manipulation for improved utilization of tropical forages. **Animal Feed Science Technology**, v.69, p.91-102, 1997.
- BRADFORD, M. M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CASTILLO, C.; BENEDITO, J.L.; MÉNDEZ, J. et al. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**. V.115, p.101-116, 2004.
- HOBSON, P.N., STERWART, C.S. **The rumen microbial ecosystem**. 2.ed. London. 1997. 719p.
- KREHBIEL, C.R.; RUST, S.R.; ZHANG, G. et al. Bacterial direct-fed microabials in ruminant diets: performance response and mode of action. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.1, p.E120-E132, 2003.
- RUSSELL, J.M.; STROBEL, H.J. Effects of additives on *in vitro* ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, v.66, n.2, p.552-558, 1989.
- RUSSELL, J.M. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. New York: Ithaca, 2002. 119p.
- WEBEL, W.M.; LANA, R.P. et al. Efeito do pH *in vitro* sobre a resistência de bactérias do rúmen à perda de potássio intracelular e efeito do pH e de ionóforos sobre a produção de amônia e proteína microbiana. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v.57, n.6, p.777-783, 2005.
- WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E.; WELMER, P.J. The survival of silage inoculant lactic acid bacteria in rumen fluid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 1066-1071, 2003.

Capítulo 3

Avaliação do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* na alimentação de ruminantes

Introdução

Os custos com alimentação, nas propriedades produtoras de leite ou corte, correspondem por mais da metade do custo total. Com isso, métodos que melhorem a eficiência de utilização dos nutrientes dos alimentos pelos ruminantes são de grande valia na produção comercial desses animais. A manipulação da fermentação ruminal tem sido empregada para aumentar a produtividade animal. Em vários trabalhos observaram-se tentativas de melhorar o desempenho animal, por meio de alterações na composição da dieta ou pelo uso de aditivos alimentares, a exemplo dos ionóforos poliéster carboxílicos, antibióticos não-ionóforos, lipídeos insaturados, ácidos orgânicos, e probióticos.

Dentre os manipuladores ruminais para ruminantes tem-se dado destaque para os ácidos orgânicos e os *direct-fed microbials*. Esses aditivos alimentares agem de diferentes formas sobre a fermentação ruminal melhorando o desempenho animal, sem deixar resíduo nos produtos de origem animal. Como o mercado internacional de alimentos demanda produtos isentos de qualquer substância tóxica (Stradiotti Jr et al., 2001), os ácidos orgânicos e os *direct-fed microbials* constituem possíveis alternativas para melhoria da produtividade de ruminantes.

Apesar dos poucos trabalhos, os estudos *in vivo* têm mostrado efeitos positivos dos ácidos orgânicos sobre o desempenho de bovinos (Khampa & Wanapat, 2007). Os ácidos orgânicos têm proporcionado efeitos sobre o desempenho animal, aumentando a produção e porcentagem de constituintes do leite e melhorando a eficiência alimentar e o ganho de peso dos animais (Khampa & Wanapat, 2007; Kung et al., 1982; Stallcup, 1979).

Um dos ácidos orgânicos estudados é o ácido propiônico. Seu efeito é direto sobre as mudanças na proporção e concentração de acetato, propionato,

e butirato no rúmen e, conseqüentemente, a absorção e utilização desses ácidos orgânicos pelos ruminantes. Soma-se a isso, o possível efeito antibacteriano desse ácido (Ricke, 2003), que pode modificar a população microbiana ruminal.

Em relação aos *direct-fed microbials*, em vários trabalhos demonstrou-se a ação dos mesmos prevenindo a acidose ruminal; aumentando a produção, e a porcentagem de gordura e proteína do leite de vacas leiteiras; melhorando a eficiência alimentar e o ganho de peso de bovinos; e reduzindo o uso de antibióticos em bezerros no período neonatal e logo após o desmame (Khampa & Wanapat, 2007 e Kung et al., 1982).

Dois microrganismos ruminais, *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula*, foram isolados e quando inoculados no soro de leite aumentaram os teores de ácidos orgânicos (acetato, propionato e succinato) (Ribeiro, 2007). Com isso, o soro de leite que *in natura* tem uso limitado na alimentação animal devido às excessivas proporções de água e minerais, quando fermentado por esses microrganismos poderia melhorar o desempenho animal por atuar como manipulador ruminal, por ser fonte de ácido orgânico e microrganismos vivos utilizadores de lactose, lactato e produtores de propionato. Além disso, o mesmo pode conter quantidades elevadas de ácido propiônico, constituindo-se fonte de energia prontamente disponível para o animal ruminante.

Poucos estudos foram realizados utilizando o soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* na alimentação animal. Assim, não estão definidos os efeitos desse produto sobre o metabolismo dos ruminantes. Para que se possa realmente recomendar o processo de fermentação do soro de leite pelo consórcio de bactérias *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* é importante obter informações sobre o efeito real do produto da fermentação sobre os aspectos fisiológicos dos ruminantes quando incluso na alimentação do mesmo.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito do soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* na dieta de novilhas fistuladas, sobre o consumo de matéria seca e nutrientes, pH e amônia ruminal, as concentrações séricas de uréia e glicose, as excreções urinárias de uréia, a produção de proteína microbiana, o balanço de compostos nitrogenados e a digestibilidade aparente total.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no período de outubro a dezembro de 2007 nas dependências do Departamento de Zootecnia da UFV, em Viçosa-MG.

Foram utilizadas cinco novilhas mestiças Holandês X Zebu, fistuladas no rúmen, com peso vivo médio de 350 kg, distribuídas em quadrado latino 5 x 5. Cada animal foi alojado em baia individual, provida de comedouro e bebedouro.

Foi utilizada uma dieta isoproteica, à base de feno de capim tifton 85, com relação volumoso concentrado de 70:30, na base da matéria seca, e formuladas para atender as exigências, segundo o NRC (1996), de novilhas pesando, em média 350 kg e com ganho de peso vivo de aproximadamente 0,70 kg.

O delineamento utilizado foi o quadrado latino, arranjado em esquema fatorial $2 \times 2 + 1$ (dois níveis de soro não-fermentado, dois níveis de soro fermentado e tratamento sem adição de soro). Os tratamentos constituíram da não adição de soro de leite (controle), da adição de dois níveis de soro de leite não-fermentado (2,5 e 5 L/dia) e dois níveis de soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* (2,5 e 5 L/dia). A definição dos níveis de soro de leite foi feita a partir de experimentos *in vitro* (Cap. 2) realizados para determinar o efeito dos níveis do soro do leite sobre os microrganismos ruminais.

O soro de leite não-fermentado que inicialmente estava em pó, foi re-suspenso em água para que contivesse 40 g/L de lactose. O soro de leite fermentado pelo consórcio de bactérias produtoras de lactato e ácido propiônico, foi também advindo do mesmo soro em pó utilizado no soro não-fermentado, que foi re-suspenso em água para que contivesse 40 g/L de lactose. Em seguida o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH a 1,0 M. O soro foi, então, saturado com dióxido de carbono e inoculado (3% do meio) com *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* crescido em meio anaeróbico em laboratório. O soro foi mantido por 72 horas a 39° C com constante borbulhamento de dióxido de carbono, com o pH constantemente corrigido para 7,0 por meio da adição de NaOH. Após incubação, foi imediatamente utilizado para a alimentação das novilhas. O soro de leite fermentado apresentou como

principais produtos finais da fermentação o propionato, lactato, acetato e succinato, com concentração média (mM) de 226,97; 158,30; 153,37 e 14,75, respectivamente.

Tabela 1 – Teores médios de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDN_{cp}), carboidratos não fibrosos (CNF), fibra em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína (FDA), e lignina do concentrado, feno, soro de leite não-fermentado e soro de leite fermentado utilizado nos cinco tratamentos

Itens	Concentrado	Feno Tifton 85	Soro de leite não-fermentado	Soro de leite fermentado
MS ¹	88,41	87,26	5,20	5,25
MO ²	98,54	94,05	92,31	92,30
PB ²	18,22	9,47	11,10	25,50
EE ²	0,99	1,68	21,65	21,87
FDN ²	20,81	70,83	----	----
FDN _{cp} ²	17,20	67,59	----	----
CNF ^{2 3}	58,27	15,35	59,33	44,71
FDA _{cp} ²	3,20	34,60	----	----
Lignina ²	0,09	2,14	----	----

¹ / % da matéria natural; ² / % da matéria seca; e CNF = MO – (PB + EE + FDN_{cp}).

O experimento constituiu de cinco períodos, cada período teve 12 dias de duração, sendo cinco dias de adaptação à dieta e sete dias para coleta de dados. Os animais foram mantidos confinados e alimentados duas vezes ao dia (08:00h e 16:00h) em igual proporção, sendo a alimentação fornecida individualmente. As dietas foram fornecidas *ad libitum*, de maneira que houvesse pelo menos 10% de sobras. O soro foi fornecido na ração dos animais, nas duas alimentações diárias, em igual proporção, em que esse era homogeneizado com a ração. Para que o nível de oferta de alimento fosse corretamente ajustado, as sobras foram pesadas diariamente.

Entretanto, foram utilizadas, para efeito de quantificação e avaliação do consumo voluntário, as sobras computadas entre o sétimo e o décimo dia de cada período experimental, e os alimentos fornecidos entre o sexto e o nono

dia. Desses foram feitas amostras compostas referentes a cada período experimental, para quantificações do teor de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidratos não fibrosos (CNF), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina em que as análises seguiram as especificações descritas em Silva & Queiroz (2002) com exceção do FDN e FDA. Os teores de FDN foram estimados segundo recomendações de Mertens (2002) e com correções no tocante aos teores de cinzas e proteína contidos no FDN e FDA conforme recomendações de Mertens (2002) e Licitra et al. (1996). A composição química dos alimentos está expressa na Tabela 1.

Foram realizadas coletas de fezes no 7º dia (6h00 e 14h00), no 8º dia (8h00 e 16h00), 9º dia (10h00 e 18h00), e 10º dia (12h00 e 20h00). A quantidade de matéria seca fecal excretada foi estimada pela concentração de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), obtida após incubação *in situ* dos alimentos, sobras e fezes por um período de 240 horas. Nas amostras de fezes foram determinados os teores de MS, MO, PB, EE e FDN pelos mesmos métodos que foram utilizados nas análises das sobras e alimentos.

No sexto dia do período experimental, 4h00, 8h00, 12h00, 16h00, 20h00 e 24h00 foram feitas coletas de amostras do líquido ruminal. Foi estimado o pH e a concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) de todos os horários. Foi feita a leitura imediata do pH no líquido ruminal, utilizando-se o potenciômetro. As amostras do líquido ruminal foram colocadas em tubos eppendorf de 1,5 ml e centrifugadas a 5.200 x g por 10 minutos, retirando-se o sobrenadante, e transferindo para outro tubo eppendorf, para análise de NAR. Todas as amostras foram congeladas para posteriores análises. A concentração de amônia foi determinada pelo método colorimétrico de Chaney & Marbach (1962). Os resultados das análises de cada horário foram utilizados para o cálculo da média de pH ruminal e NAR dos tratamentos.

No décimo primeiro dia, foi realizada coleta de conteúdo ruminal com o objetivo de se isolarem microrganismos ruminais. Amostras foram tomadas imediatamente antes da alimentação matinal, conforme técnica descrita por Cecava et al. (1990). Posteriormente, foram centrifugadas e secas em estufa com ventilação forçada (60°C), processadas em moinho tipo bola e

armazenadas para posteriores análises de MS e bases púricas (Ushida et al., 1985).

Amostras spot de urina foram obtidas de todas as novilhas no oitavo, décimo e décimo segundo dia de cada período experimental, no horário de 12h00, por micção espontânea. A urina de cada animal foi filtrada e uma alíquota de 10 ml foi retirada, diluída em 40 ml de ácido sulfúrico a 0,036N e congelada para posteriores análises de uréia, nitrogênio total, creatinina, alantoína, e ácido úrico (derivados de purina). As concentrações de creatinina e ácido úrico na urina foram estimadas pelo método de Jaffé modificado (Bioclin K016-1), a concentração de uréia na urina pelo método colorimétrico (UOD-PAP, Bioclin K052), os teores urinários de alantoína pelo método colorimétrico, conforme Chen & Gomes (1992) e o teor de nitrogênio total foi estimado pelo método de Kjeldhal (Silva & Queiroz, 2002). A conversão dos valores de uréia em nitrogênio uréico foi realizada pela multiplicação dos valores obtidos pelo fator 0,466.

O volume total urinário foi estimado por intermédio da relação entre concentração de creatinina na urina e sua excreção por unidade de peso vivo, valendo-se da seguinte equação (Chizzotti, 2004):

$$EC = 32,27 - 0,011093 \times PV$$

Em que: EC = excreção diária de creatinina (mg/kg PV) e PV = peso vivo (kg).

A excreção de derivados de purinas foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretadas na urina.

As purinas absorvidas foram calculadas a partir da excreção de derivados de purinas por intermédio da equação (Verbic et al., 1990):

$$PA = \frac{DP - 0,385 \times PV^{0,75}}{0,85}$$

Em que: PA = purinas absorvidas (mmol/dia); DP= excreção de derivados de purinas (mmol/dia); 0,85 = recuperação de purinas absorvidas como derivados de purina na urina; e 0,385 = excreção endógena de derivados de purina na urina (mmol/kg PV^{0,75}).

A síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen foi estimada em função das purinas absorvidas e da relação $N_{RNA}:N_{TOTAL}$ nas bactérias, segundo Chen & Gomes (1992):

$$N_{mic} = \frac{70 \times PA}{0,83 \times R \times 1000}$$

Em que: N_{mic} = fluxo de compostos nitrogenados microbianos no intestino delgado (g/dia); R= relação $N_{RNA}:N_{TOTAL}$ nas bactérias; 70 = conteúdo de nitrogênio nas purinas (mg/mol); e 0,83 = digestibilidade intestinal das purinas microbianas.

A coleta de sangue de todas as novilhas foi realizada às 12:00 horas, no décimo segundo dia de cada período experimental, utilizando tubos de vacutainer. Após a coleta, as amostras foram imediatamente centrifugadas (2500 x g por 15 minutos) e o soro sanguíneo congelado, para posterior análise de uréia e glicose através de Kits comerciais.

Os dados foram submetidos à análise de variância e os valores médios comparados ao nível de 10% de significância por intermédio de contrastes ortogonais.

Resultados e discussão

As estimativas de consumo médio diário em kg/dia e g/kg de peso vivo (PV) são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Médias de mínimos quadrados, coeficiente de variação (CV) e indicativos de significância dos contrastes para os consumos de matéria seca (MS), de matéria orgânica (MO), de proteína bruta (PB), de extrato etéreo (EE), de carboidratos não fibrosos (CNF), de fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína (FDN_{cp}), e de nutrientes digestíveis totais (NDT) em função da suplementação com diferentes níveis de soro de leite não-fermentado (S) e soro de leite fermentado (SF)

Tratamento							Contraste			
Item	Cont ¹	S2,5 ¹	S5,0 ¹	SF2,5 ₁	SF5,0 ₁	CV (%)	Cont ²	Ferm ²	Nível ²	Int ²
Kg/dia										
MS	7,684	7,140	8,194	8,724	8,664	13,1	0,3654	0,0503	0,3131	0,2609
MO	7,338	6,810	7,812	8,322	8,262	13,1	0,3757	0,0502	0,3162	0,2615
PB	0,969	0,903	1,025	1,111	1,115	12,4	0,2959	0,0227	0,2885	0,3234
EE	0,114	0,135	0,175	0,158	0,184	10,2	<,0001	0,0464	0,0005	0,3293
CNF	2,303	2,138	2,511	2,639	2,607	11,0	0,2289	0,0289	0,1809	0,1181
FDN _{cp}	3,859	3,547	4,005	4,313	4,256	14,9	0,5760	0,0808	0,4657	0,3525
NDT	4,311	4,127	4,644	4,997	4,836	15,8	0,3658	0,1272	0,5930	0,3163
g/kg PV										
MS	23,2	22,6	23,9	25,6	25,9	18,0	0,5676	0,2305	0,6860	0,8064
MO	22,2	21,6	22,8	24,4	24,7	18,1	0,5842	0,2324	0,6875	0,8219
FDN _{cp}	13,5	12,9	13,2	14,4	14,2	17,9	0,8726	0,2638	0,9428	0,8297
NDT	12,9	13,1	13,5	14,6	14,5	17,9	0,4215	0,2696	0,9088	0,8255

^{1/} Cont = sem soro de leite; S2,5 = com 2,5 L de soro de leite não-fermentado; S5,0 = com 5,0 L de soro de leite não-fermentado; SF2,5 = com 2,5 L de soro de leite fermentado; e SF5,0 = com 5,0 L de soro de leite fermentado. ^{2/} Cont = contraste entre com ou sem o soro de leite não-fermentado ou fermentado; Ferm = contraste entre soro de leite não-fermentado e soro de leite fermentado; Nível = contraste entre os níveis de soro de leite; e Interação = contraste entre soro de leite não-fermentado e fermentado nos diferentes níveis.

Verificou-se efeito ($P < 0,10$) da suplementação com soro de leite sobre o consumo de EE, em kg/dia. Quando os animais foram suplementados com soro de leite, houve maior consumo de extrato etéreo em relação aos animais não suplementados. O soro de leite *in natura* e o fermentado apresentam um alto teor de extrato etéreo (21,87% na MS). A adição de soro de leite na alimentação das novilhas aumentou o teor de extrato etéreo da dieta, consequentemente os animais consumindo soro de leite ingeriram maior conteúdo de EE em kg/dia em relação aos animais do tratamento controle, devido, provavelmente, apenas à maior concentração de EE da dieta.

Vários estudos têm verificado benefícios de maior consumo de lipídeos na dieta de ruminantes. Os lipídeos, quando não estão em excesso, exercem impactos positivos sobre a função do rúmen, reduzindo a degradação de carboidratos disponível e estimulando a utilização da fibra (Merchen et al., 1993).

Houve efeito ($P < 0,10$) da fermentação do soro de leite sobre o consumo de MS, MO, PB, EE, CNF e FDN_{cp}, em kg/dia. Em que o consumo de MS, MO, PB, EE, CNF e FDN_{cp} foi maior nos animais suplementados com o soro fermentado em comparação ao soro não-fermentado.

O maior consumo de MS e MO pelas novilhas recebendo soro de leite fermentado se deve, possivelmente, à melhor palatabilidade do soro de leite fermentado em relação ao não-fermentado. Durante o ensaio de campo observou-se que os animais apresentavam preferência mais pelo soro de leite fermentado que o soro de leite não-fermentado. Como o soro de leite foi fornecido misturado na ração dos animais, isso estimulou o consumo da dieta total das novilhas suplementadas com soro de leite fermentado.

Os maiores consumos de PB, EE, CNF e FDN_{cp} dos animais recebendo soro de leite fermentado pode ser consequência dos maiores consumos de MS e MO. A dieta basal fornecida às novilhas era a mesma para todos os tratamentos. Assim, como as diferenças nos teores desses nutrientes, nos soros, não eram representativas (exceto CNF), não havia diferenças no valor nutritivo da dieta fornecida aos animais dos diferentes tratamentos com soro de leite. Quando se fornece aos animais uma mesma dieta, o maior consumo de

nutrientes se deve ao maior consumo da MS ou MO, que correspondem ao somatório dos nutrientes contidos na própria dieta.

Verificou-se efeito ($P < 0,10$) dos níveis de soro de leite fermentado e não-fermentado sobre o consumo de EE, em kg/dia. O consumo de EE foi maior quando se adicionou na dieta maiores níveis de soro de leite. Como já foi dito o soro de leite não-fermentado e o fermentado apresentam um alto teor de extrato etéreo. A adição do soro de leite em níveis maiores na alimentação das novilhas proporciona um maior teor de extrato etéreo na dieta basal do que níveis menores, consequentemente os animais consumindo 5,0 L de soro de leite consumiram maior conteúdo de EE em kg/dia do que os animais recebendo 2,5 L de soro de leite, devido apenas ao maior concentração de EE da dieta.

Não se observou efeito da interação entre níveis de soro de leite fermentado e não-fermentado sobre as variáveis de consumo dos nutrientes ($P < 0,10$).

Apesar de que, na literatura, tem sido reportado efeito hipofágico do ácido propiônico em ruminantes (Anil & Forbes, 1980), a concentração de ácido propiônico contido no soro de leite fermentado parece não ter influenciado o consumo de MS das novilhas. DeFrain et al. (2005) também não verificaram efeito de ácido propiônico sobre o consumo de MS e nutrientes quando vacas leiteiras foram alimentadas com 120 e 178 g/dia de ácido propiônico. O mesmo resultado foi verificado por Majdoub et al. (2003) quando foram infundidos no rúmen soluções de 0,23 e 0,41 M de propionato em cordeiros.

Segundo Oba e Allen (2002), o metabolismo do propionato no fígado gera sinais de satisfação devido ao aumento na concentração de ATP hepático. Entretanto, os mesmos autores afirmam que a inconsistência do efeito hipofágico do propionato talvez seja explicado pela pequena contribuição do propionato na regulação do consumo. A infusão de propionato só afeta o consumo de matéria seca e o comportamento ingestivo quando se excede grandemente o fluxo de propionato no fígado (Oba e Allen, 2002). Provavelmente, a dose de ácido propiônico contida nos tratamentos com soro de leite fermentado não foi o bastante para exceder o fluxo de propionato no fígado.

As estimativas de coeficientes de digestibilidade da MS, MO, PB, EE, CNF, FDN_{cp} , e teor de NDT da dieta são apresentadas na Tabela 3. Não foram verificados efeitos do soro de leite fermentado e não-fermentado sobre os coeficientes de digestibilidade da MS, MO, PB, EE, CNF, FDN_{CP} ($P < 0,10$). Todavia, houve efeito dos níveis de soro de leite fermentado e não-fermentado sobre o coeficiente de digestibilidade do NDT dietético.

O teor de NDT foi menor quando se adicionou na dieta maiores níveis de soro de leite. O que se deve, possivelmente, ao somatório dos pequenos efeitos negativos sobre os coeficientes de digestibilidade de todos os nutrientes, que separadamente não foram significantes ($P < 0,10$).

Como já dito anteriormente, vários estudos tem verificado benefícios do maior consumo de lipídeos na dieta de ruminantes. Entretanto, as gorduras, quando em excesso, podem influir negativamente, por meio do recobrimento da fibra e efeitos tóxicos sobre os microrganismos (Merchen et al., 1993). Assim, o maior conteúdo de soro de leite na dieta dos animais, talvez proporcionou níveis de extrato etéreo na dieta que modificou a fermentação microbiana ruminal influenciando negativamente a digestibilidade de alguns componentes.

Tabela 3 – Médias de mínimos quadrados, coeficiente de variação (CV) e indicativos de significância dos contrastes para os coeficientes de digestibilidade da matéria seca (MS), da matéria orgânica (MO), da proteína bruta (PB), de extrato etéreo (EE), dos carboidratos não fibrosos (CNF), da fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína (FDN_{cp}), e dos nutrientes digestíveis totais (NDT) em função da suplementação com diferentes níveis de soro de leite não-fermentado (S) e soro de leite fermentado (SF)

Item	Tratamento					CV (%)	Contraste			
	Cont	S2,5	S5,0	SF2,5	SF5,0		Cont	Ferm	Nível	Int
MS	56,5	58,2	56,6	57,2	55,1	8,9	0,9230	0,6057	0,4322	0,9242
MO	58,5	60,3	58,6	59,3	57,3	8,1	0,8822	0,6083	0,4142	0,9413
PB	66,4	69,1	65,1	66,3	65,3	8,4	0,9705	0,6186	0,3399	0,5704
EE	70,9	73,8	76,8	83,0	87,0	15,8	0,1598	0,1045	0,5343	0,9251
CNF	81,0	82,5	80,6	81,4	78,1	4,4	0,8537	0,2824	0,1190	0,6633
FDN _{cp}	41,8	43,0	41,3	42,0	40,1	15,0	0,9600	0,6957	0,5273	0,9609
NDT	66,1	65,0	57,8	62,5	56,6	12,0	0,1581	0,5789	0,0707	0,8477

^{1/} Cont = sem soro de leite; S2,5 = com 2,5 L de soro de leite não-fermentado; S5,0 = com 5,0 L de soro de leite não-fermentado; SF2,5 = com 2,5 L de soro de leite fermentado; e SF5,0 = com 5,0 L de soro de leite fermentado. ^{2/} Cont = contraste entre com ou sem o soro de leite não-fermentado ou fermentado; Ferm = contraste entre soro de leite não-fermentado e soro de leite fermentado; Nível = contraste entre os níveis de soro de leite; e Interação = contraste entre soro de leite não-fermentado e fermentado nos diferentes níveis.

As estimativas de pH ruminal, nitrogênio amoniacal ruminal (NAR – mg/dL), balanço nitrogenado aparente (BNA – g/dia), concentração de nitrogênio uréico na urina (NUU – mg/dL), concentração de nitrogênio uréico no soro (NUS – mg/dL), fluxo intestinal de nitrogênio microbiano (Nmic – g/dia), eficiência de síntese microbiana (EFM – g PB microbiana/Kg NDT) e concentração de glicose no soro são apresentadas na Tabela 4. Não foram verificados efeitos ($P < 0,10$) dos tratamentos sobre o pH ruminal, NAR, EFN, NUU, NUS e glicose.

Tabela 4 – Médias de mínimos quadrados, coeficiente de variação (CV) e indicativos de significância dos contrastes para o pH ruminal (pH), nitrogênio amoniacal ruminal (NAR – mg/dL), balanço nitrogenado aparente (BNA – g/dia), concentração de nitrogênio uréico na urina (NUU – mg/dL), concentração de nitrogênio uréico no soro (NUS – mg/dL), fluxo intestinal de nitrogênio microbiano (Nmic – g/dia), eficiência de síntese microbiana (EFM – g PB microbiana/Kg NDT) e concentração de glicose no soro (Glicose – mg/dL) em função da suplementação com diferentes níveis de soro de leite não-fermentado (S) e soro de leite fermentado (SF)

Item	Tratamento						Contraste			
	Cont	S2,5	S5,0	SF2,5	SF5,0	CV (%)	Cont	Ferm	Nível	Int
pH	6,43	6,34	6,41	6,32	6,47	4,9	0,7685	0,8885	0,4461	0,8226
NAR	11,85	12,80	13,21	13,90	13,90	27,8	0,3937	0,5928	0,9022	0,9012
BNA	-53,50	16,65	-7,56	8,53	-13,78	-110,0	0,0858	0,7878	0,3889	0,9715
NUU	209,70	200,38	205,97	235,80	207,84	30,3	0,9321	0,5290	0,7041	0,5704
NUS	17,01	14,63	15,38	15,98	16,03	17,9	0,3101	0,4443	0,7596	0,7890
Nmic	146,38	142,92	172,09	76,85	96,50	35,3	0,3002	0,0041	0,2472	0,8166
EFM	174,62	190,93	224,20	114,54	119,51	21,0	0,4894	<,0001	0,2396	0,3780
Glicose	64,00	71,60	60,40	61,70	62,30	18,1	1,0000	0,4563	0,3278	0,2783

^{1/} Cont = sem soro de leite; S2,5 = com 2,5 L de soro de leite não-fermentado; S5,0 = com 5,0 L de soro de leite não-fermentado; SF2,5 = com 2,5 L de soro de leite fermentado; e SF5,0 = com 5,0 L de soro de leite fermentado. ^{2/} Cont = contraste entre com ou sem o soro de leite não-fermentado ou fermentado; Ferm = contraste entre soro de leite não-fermentado e soro de leite fermentado; Nível = contraste entre os níveis de soro de leite; e Interação = contraste entre soro de leite não-fermentado e fermentado nos diferentes níveis.

Verificou-se efeito ($P < 0,10$) da suplementação com soro de leite sobre o BNA. A suplementação com soro de leite melhorou o balanço nitrogenado aparente.

A assimilação de nitrogênio pelos microrganismos só é possível quando se tem energia suficiente, do contrário, o excesso de nitrogênio é perdido (Marini & Amburgh, 2005). O melhor balanço nitrogenado aparente dos animais recebendo soro de leite deve-se possivelmente a maior disponibilidade de energia para assimilação do nitrogênio do alimento pelos microrganismos ruminais, diminuindo as perdas de nitrogênio na forma de urina.

Houve efeito ($P < 0,10$) da fermentação do soro de leite sobre Nmic e EFM. A suplementação com soro de leite fermentado diminuiu o fluxo intestinal de nitrogênio microbiano e eficiência de síntese microbiana em relação ao soro não-fermentado.

O soro de leite não-fermentado por apresentar um alto teor de lactose, é uma fonte de energia para os microrganismos ruminais assimilarem o nitrogênio altamente degradável da dieta. O soro de leite fermentado, por já ter sofrido um processo de fermentação, teve sua lactose, que poderia servir como fonte de energia pelos microrganismos ruminais, transformada em ácidos orgânicos.

As estirpes bacterianas *Enterococcus faecium* e *Veillonella parvula* produzem ácido propiônico a partir da lactose do soro de leite (Melo, 2007). Os ensaios *in vitro* do capítulo 1, que foram discutidos anteriormente, verificaram que o ácido propiônico não é utilizado pelos microrganismos ruminais, no processo de fermentação, como fonte de energia.

Assim, o soro de leite não-fermentado proporcionou maior eficiência de síntese microbiana em relação ao soro fermentado, possivelmente, por proporcionar melhor relação entre compostos nitrogenados e energia prontamente disponível para os microrganismos ruminais, o que não aconteceu quando se tinha na dieta soro fermentado, em que grande parte da fonte de energia já tinha sido transformada em ácido propiônico e consequentemente não pôde ser utilizada pelos microrganismos ruminais, e o conteúdo de bactérias contidas no soro fermentado não foi grande o suficiente para balancear a menor produção microbiana ruminal. Como a maior eficiência de

síntese microbiana propicia maior produção de massa microbiana, ocorre como consequência, um maior fluxo intestinal de nitrogênio microbiano.

Os animais, então, que eram alimentados com soro de leite não-fermentado tiveram maior fluxo intestinal de nitrogênio microbiano que os animais alimentados com soro de leite fermentado devido a maior disponibilidade de energia para o crescimento microbiano ruminal.

O processo de fermentação conduzido no soro de leite desse ensaio *in vivo* foi diferente do processo de fermentação ocorrido no soro de leite utilizado nos experimentos *in vitro* visto anteriormente. Devido, a grande quantidade de soro de leite fermentado necessário para o ensaio *in vivo*, alguns procedimentos foram modificados para melhorar o manejo durante a realização do experimento de campo. Assim, o soro de leite no ensaio de campo, diferentemente, dos ensaios laboratoriais, não foi autoclavado antes da fermentação, podendo ter sofrido contaminação por outros microrganismos ruminais; o tempo de incubação foi maior (72 horas); e depois de terminada a fermentação, o soro foi imediatamente utilizado nos respectivos tratamentos, contendo, assim, *Enterococcus faecium*, *Veilonella parvula* e outros microrganismos, que cresceram no soro, ativos. Isso pode ter influenciado nos resultados discrepantes que ocorreu entre os experimentos *in vitro* e esse experimento *in vivo*.

No capítulo 2 foi verificado estímulo no crescimento de bactérias ruminais *in vitro* quando se tinha no meio soro de leite fermentado. Como consequência de maior estímulo no crescimento microbiano, se espera uma maior eficiência de síntese microbiana. Entretanto, quando se comparou os resultados de eficiência de síntese microbiana dos animais recebendo soro fermentado em relação aos animais recebendo soro não-fermentado, verificou-se uma menor eficiência quando se incluiu, na dieta dos bovinos, o soro de leite na forma fermentada.

Apesar do soro de leite fermentado *in vitro* ter estimulado o crescimento microbiano, o mesmo ensaio demonstrou que, quando se adicionava, no meio de cultura, o soro de leite fermentado contendo culturas ativas, o mesmo não estimulou o crescimento microbiano *in vitro*. O soro de leite fermentado utilizado nesse experimento, como já dito, continha os microrganismos em sua forma ativa. Assim, a menor eficiência de síntese microbiana e menor fluxo

intestinal de nitrogênio microbiano dos animais recebendo soro de leite fermentado em relação ao soro não-fermentado podem ser devido a combinação de microrganismos ativos e a menor concentração de fonte de energia (lactose) no soro de leite fermentado, o que explica os resultados contraditórios em relação aos experimentos *in vitro*. Esses dois fatores podem ter sobressaído sobre o efeito de estímulo dos componentes do soro de leite fermentado, como os ácidos orgânicos vistos no capítulo 1, sobre a produção de proteína microbiana.

As modificações, então, ocorridas no processo de fermentação do soro de leite nesse ensaio podem ter causado mudanças no perfil dos componentes do soro de leite fermentado que causou mudanças contundentes nos efeitos esperados desse soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula*.

Conclusões

A suplementação de bovinos com soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* implica em efeitos positivos sobre o consumo de alimentos, e efeitos negativos sobre a utilização do nitrogênio pelos microrganismos ruminais, quando comparado ao soro de leite não-fermentado. Assim, o processo de fermentação do soro de leite, nas condições avaliadas, não melhorou as respostas fisiológicas de novilhas suplementadas com 2,5 e 5,0 L litros de soro de leite.

Literatura citada

- ANIL, M.H.; FORBES, J.M. Feeding in sheep during intraportal infusions of short-chain fatty acids and the effect of liver denervation. **Journal Physiology**, v.298, p.407-414.
- CECAVA, J.M.; MERCHEN, N.R.; GAY, L.C. et al. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2480-2488, 1990.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.
- CHEN, X.B.; GOMES, M.J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of the technical details**. Buchsburnd Aberdeen: Rowett Research Institute, 1992. 21p.
- CHIZZOTTI, M.L. **Avaliação da casca de algodão para novilhos de origem leiteira e determinação da excreção de creatinina e produção de proteína microbiana em novilhas e vacas leiteiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 141p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- DEFRAIN, J.M.; HIPPEN, A.R. et al. Effects of feeding propionate and calcium salts of long-chain fatty acids on transition dairy cow performance. **Journal Dairy Science**, v.88, p.983-993, 2005.
- KHAMPA, S.; WANAPAT, M. Manipulation of rumen fermentation with organic acids supplementation in ruminants raised in the tropics. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.6, supl.1, p.20-27, 2007.
- KUNG, L.; HUBER, J.T.; KRUMMREY, J.D. et al. Influence of adding malic acid to dairy cattle rations on milk production, rumen volatile acids. **Journal of Dairy Science**, v.65, p.1170-1174, 1982.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; Van SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, n.57, p.347-358, 1996.
- MERCHEN, N.R. Digestion, absorcion y excrecion en los ruminantes. In: CHURCH, D.C (ed). **El ruminante fisiología digestiva y nutrición**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 641p.

- MAJDOUB, L.; BEYLOT, M. et al. Propionate supplementation did not increase whole body glucose turnover in growing lambs fed rye grass. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.43, p.357-370, 2003.
- MARINI, J.C.; VAN AMBURGH, M.E. Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. **Journal of Animal Science**, v.81, p.545-552, 2003.
- MELO, M.R. **Produção de ácido propiônico em soro de leite por bactéria do rúmen bovino**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 54p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217-1240, 2002.
- NRC. **Nutriente Requeriments of Beef Cattle**, Washington, 1996. 232p.
- OBA, M.; ALLEN, M.S. Dose-response effects of propionate infusion on feeding behavior and plasma metabolites in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, supl.1, p.1094-1099, 2002.
- RIBEIRO, M. D. **Desempenho e digestão em bezerros, com adição de acidificante ou ácido propiônico na ração**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007.87p. Tese de doutorado – Universidade federal de Viçosa, 2007.
- RICKE, S.C. Perspective on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v.81, p.632-639, 2003.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.
- STRADIOTTI Jr, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA; R.P. et al. Ação de extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Recife. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [2001]. CD-ROM. Nutrição de ruminantes. TECHNOMEDIA.
- USHIDA, K.; LASSALAS, B.; JOUANY, J.P. Determination of assay parameters for RNA analysis in bacterial and duodenal samples by spectrophotometry. Influence of treatment and preservation. **Reproduction Nutrition Development**, v.25, p.1037- 1046. 1985.
- VERBIC, J.; CHEN, X.B.; MACLEOD, N.A. et al. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v.114, p.243-248, 1990.

CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos nos experimentos realizados pode-se concluir que:

- a) O ácido láctico e o ácido propiônico, em baixas concentrações, estimulam o crescimento microbiano *in vitro*. Entretanto, em concentrações elevadas, esses ácidos inibem a velocidade de crescimento de determinadas espécies de bactérias ruminais.
- b) O soro de leite fermentado pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* afetam o crescimento *in vitro* de diferentes grupos de bactérias ruminais.
- c) A adição de altas concentrações de soro de leite fermentado contendo culturas ativas de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula* não estimula o crescimento das bactérias ruminais *in vitro*.
- d) O processo de fermentação do soro de leite pelo consórcio de *Enterococcus faecium* e *Veilonella parvula*, nas condições avaliadas, não otimiza as respostas fisiológicas de novilhas suplementadas com 2,5 e 5,0 L litros de soro de leite.