



EFEITO DE ADITIVOS ALIMENTARES SOBRE A CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE PROTOZOÁRIOS RUMINAIS

EFFECT OF FEED ADDITIVES ON TOTAL AND RELATIVE COUNTS OF RUMINAL PROTOZOA

Diana Carolina Zapata Vasquez¹, Flavio Perna Junior², Laura Alexandra Romero Solorzano², Lerner Arévalo Pinedo³, Carolina Tobias Marino³, Paulo Henrique Mazza Rodrigues⁴

¹Aluna especial do Departamento de Nutrição e Produção Animal - FMVZ/USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP:13635-900, Campus de Pirassununga-SP/Brasil. e.mail: dianazapatavasquez@hotmail.com

²Aluno de Mestrado do Departamento de Nutrição e Produção Animal - FMVZ/USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP:13635-900, Campus de Pirassununga-SP/Brasil. email: fpernaja@usp.br, laurazootec@hotmail.com

³Pós-Doutorando do Departamento de Nutrição e Produção Animal – FMVZ/USP. Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP:13635-900, Campus de Pirassununga-SP/Brasil. Bolsista da FAPESP. e.mail: lernerpinedo@gmail.com, caroltobias@hotmail.com

⁴Professor do Departamento de Nutrição e Produção Animal e Bolsista em Produtividade de Pesquisa do CNPq – VNP/FMVZ/USP, Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP:13635-900, Campus de Pirassununga-SP/Brasil. email: pmazza@usp.br

INTRODUÇÃO

O rúmen apresenta características morfofisiológicas que fornecem as condições necessárias à fermentação de nutrientes realizada pela microbiota ruminal, constituída por bactérias, fungos e protozoários flagelados e ciliados (KOZLOSKI, 2002). Os protozoários ciliados são os maiores microrganismos no rúmen de animais ruminantes, constituindo uma importante fração da comunidade no ecossistema ruminal (RYLE e ORSKOV, 1987), cerca de 40 a 80% da massa microbiana ruminal (VEIRA, 1986). A dieta oferecida aos ruminantes vem sendo alterada com a suplementação de concentrados, de diferentes tipos de fontes energéticas ou aditivos, deixando de ser constituída apenas por forrageiras. Entretanto, essa prática pode causar alterações em todo o ecossistema ruminal, incluindo a população de ciliados, o que significa que o tipo de dieta influencia diretamente a concentração e composição da população de protozoários ciliados no rúmen (RUSSEL e RYCHLIK, 2001). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de aditivos alimentares (monensina e tanino) sobre a contagem total e diferencial de protozoários ruminais.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga, nas instalações do Estábulo Experimental e do Laboratório de Nutrição Animal e Bromatologia. Foram utilizadas seis vacas não gestantes e não lactantes, com peso vivo médio de 783 ± 86 kg e portadoras de cânula ruminal com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Seis vacas foram distribuídas a uma das três dietas experimentais, sendo: 1) Controle (CON): Dieta sem nenhum aditivo; 2) Monensina (MON): Dieta adicionada de 300 mg de monensina sódica (3,0g de Rumensin®, Elanco) por animal por dia; 3) Tanino (TAN): Dieta adicionada de 100g de tanino (extrato concentrado de tanino condensado obtida da acácia-negra) por animal por dia. Os alimentos foram oferecidos duas vezes ao dia, às 08:00 e 16:00 h, na forma de ração completa. O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 3x3 replicado, havendo, então, dois quadrados latinos contemporâneos, sendo que a unidade experimental foi o animal dentro de cada período. Logo, o experimento contou com 18 unidades experimentais referentes a 3 animais, 3



períodos e 2 quadrados. Cada período experimental foi constituído de 21 dias, sendo o último dia destinado às coletas para contagem total e diferencial de protozoários. As coletas foram realizadas antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matinal. O conteúdo ruminal foi coletado manualmente por varredura do assoalho ruminal e 10 mL deste material foram armazenados em frasco contendo 20 mL de formaldeído 50% (v/v). Para posterior realização da contagem diferencial dos protozoários foi utilizado 1,0 mL da amostra diluída em formol e, nesta foram, adicionadas 2 gotas de verde brilhante a 2 %, deixando repousar por 4 horas. Em seguida, foram adicionados 9,0 mL de glicerol a 30% e homogeneizada a mistura, tornando a alíquota do líquido ruminal diluída 30 vezes. Antes de utilizar 1,0 mL da amostra diluída, o frasco foi agitado a fim de homogeneizar a amostra.

Para as contagens diferenciais dos protozoários foi utilizada uma câmara de contagem “Sedgwick-Rafter” composta por retículo de 0,5 mm x 0,5 mm de área, com subdivisões de 25 quadrículos. Esta câmara foi acoplada à ocular de um microscópio da marca Olympus modelo CH2, conforme técnica descrita por DEHORITY (1993). Com a câmara acoplada ao microscópio, foram contados 100 campos óticos através do retículo, com aumento de 100 x, onde as identificações das espécies dos protozoários foram estabelecidas, bem como suas proporções na amostra. Do total de protozoários, foram diferenciados cinco gêneros, *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Epidinium* e *Diplodinium* (incluem *Eudiplodinium*, *Ostracodinium* e *Polysplatron*).

Os dados de protozoários foram analisados através do programa Statistical Analysis System (Versão 9.2, 2010) utilizando o procedimento MIXED, sendo a normalidade dos resíduos verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Estes dados foram submetidos à análise de variância e seus efeitos avaliados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O modelo incluiu o efeito de tratamento como fator fixo e os efeitos de animal dentro de quadrado, quadrado e período como fatores aleatórios. A análise por tempo foi realizada quando as interações entre efeito de tempo e tratamento foram significativas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento com monensina diminuiu ($P < 0,05$) a população do gênero *Isotricha* em relação ao tratamento controle e não diferindo destes dois tratamentos o tratamento com tanino (Tabela 1). Para a população do gênero *Dasytricha*, apesar de ter apresentado interação entre tempo e tratamento, no momento em que foi realizado o teste de Tukey não foi possível demonstrar diferença estatística ($P > 0,05$) entre os diferentes tratamentos. Não houve efeito de tratamento ($P > 0,05$) sobre a contagem total de protozoários, assim como nas contagens diferenciais dos outros gêneros analisados.

Em relação à porcentagem dos protozoários, os resultados foram condizentes ao tipo de substrato para fermentação ruminal de cada dieta. Efeito de aditivo alimentar foi observado para a porcentagem do gênero *Diplodinium*, sendo que o tratamento com monensina diminuiu a proporção deste gênero em relação ao tratamento com tanino, não diferindo destes dois tratamentos o tratamento controle. Entretanto, para a proporção dos demais ciliados não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os diferentes tratamentos. Por outro lado, o gênero *Entodinium* predominou entre os protozoários para todas as dietas estudadas, com uma porcentagem total que variou de 91,87 a 93,29%, valores similares ao mencionado por DEHORITY (1991) e MARTINELE (2008), de que, em geral, cerca de 90% da fauna de ruminantes é formada de entodínios. Em média, a população dos gêneros *Diplodinium* e *Isotricha* diminuiu sua proporção quando fornecida a monensina. Esse resultado sugere que esses protozoários são sensíveis à monensina.

Tabela 1. Efeito de aditivos alimentares sobre a contagem total e diferencial de protozoários.

Treatamentos	Valor de P
--------------	------------



Variável	Controle	Monensina	Tanino	EPM ¹	Tratamento	Hora	Trat. x Hora
Protozoários x10³/mL							
<i>Dasytricha</i>	7,76	6,80	7,12	0,74	0,8388	<0,0001	0,0272
<i>Diplodinium</i>	7,40	5,20	8,48	0,59	0,0536	0,7532	0,5741
<i>Entodinium</i>	333,52	299,88	328,44	9,70	0,4990	<0,0001	0,8238
<i>Isotricha</i>	8,84 ^a	6,08 ^b	6,20 ^{ab}	0,51	0,0263	0,1170	0,3469
<i>Polyplastron</i>	2,52	2,68	2,40	0,21	0,8559	0,2290	0,7800
Total	360,04	320,64	352,64	9,45	0,3844	<0,0001	0,4542
Protozoários, %							
<i>Dasytricha</i>	2,34	2,23	2,13	0,23	0,9157	0,0068	0,1716
<i>Diplodinium</i>	2,41 ^{ab}	1,67 ^b	2,71 ^a	0,20	0,0207	0,6622	0,6089
<i>Entodinium</i>	91,87	93,29	92,55	0,43	0,1676	<0,0001	0,4866
<i>Isotricha</i>	2,62	1,92	1,83	0,16	0,0709	0,1216	0,6138
<i>Polyplastron</i>	0,75	0,87	0,77	0,07	0,7291	0,1623	0,7215

^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente (P<0,05) pelo teste de Tukey.

CONCLUSÕES

A utilização de monensina diminui a população de protozoários do gênero *Diplodinium* comparada ao tanino e também reduziu o gênero *Isotricha* quando comparado com o tratamento controle. Portanto, demonstra-se que a utilização de aditivos influenciou a contagem total e diferencial de protozoários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DEHORITY, B.A. Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. Florida: CRC press Inc. 96p. 1993.
- DEHORITY, B.A. Rumen microbiology. Wooster: OARDC/ OSU, 1991. 87p.
- KOZLOSKI, G.V. Bioquímica dos ruminantes. 1.ed. Santa Maria: UFSM. 140p. 2002.
- MARTINELE, I.; EIFERT, E.C.; LANA, R.P. et al. Efeito da monensina e do óleo de soja sobre os protozoários ciliados do rúmen e correlação dos protozoários com parâmetros da fermentação ruminal e digestivos. Revista Brasileira de Zootecnia, v.37, p.1129-1136, 2008.
- RUSSEL, J.B.; RYCHLIK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. Science, v.292, p.1119-1122, 2001.
- RYLE, M.; ORSKOV, E.R. Rumen ciliates and tropical feeds. World Animal Review, v.64, p.21-30, 1987
- VEIRA, D.M. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. Journal of Animal Science, v.63, p.1547-1560, 1986.