

ARTUR ARMANDO DE MOURA MARINHO

Nutrição animal

Ovinos

**ECOMICROBIOLOGIA E FERMENTAÇÃO NO
RETÍCULO-RUMEN DE OVINOS, COM
DIETAS À BASE DE BOLOTA**

Dissertação apresentada à Universidade de Évora
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências
Agrárias, especialidade de Nutrição e Alimentação
Animal.



ÉVORA

1989



636.084
MAR e

O AUTOR AGRADECE

- Ao Prof. Dr. João Ramalho Ribeiro o ter aceitado orientar este trabalho, e pelas inúmeras sugestões ao longo da sua realização.

- Ao Prof. Dr. Humberto Penha Gonçalves, por ter incentivado em mim o gosto pela Microbiologia, na qualidade de professor da disciplina de Microbiologia e Imunologia na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Luanda e, posteriormente, na qualidade de orientador de um breve estágio realizado no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária.

- Prof. Dr. José Afonso de Almeida, orientador do Departamento de Zootecnia e a todos os meus colegas pelos constantes incentivos no decurso da realização deste trabalho. Um agradecimento muito especial para o Eng. José Jerónimo Avó, sempre disponível para encontrar as mais adequadas soluções, no processamento de texto e tratamento de dados por computador.

- Ao Doutor Milton J. Allison e a Isadore Robinson, do National Animal Disease Center, Ames - Iowa, pelos inestimáveis ensinamentos no domínio das técnicas desenvolvidas por Hungate, sem as quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

- Ao Prof. Dr. Joaquim Manuel Serrano nas sugestões para o título do trabalho

- Ao Doutor António Horta do Departamento de Reprodução da Estação Zootécnica Nacional pela implantação cirúrgica das cânulas do rumen, nos animais utilizados na experimentação.

- Ao Dr. Portugal do Sector de Virologia do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, por nos ter facultado a utilização do equipamento de centrifugação de alta velocidade.

- A Maria João Martins do Lab. de Parasitologia da Universidade de Évora pela sua incansável colaboração no tratamento gráfico por computador de uma parte importante deste trabalho.

- Ao Carlos Alberto Raposo, no desenho e preparação de muitas das ilustrações apresentadas neste trabalho.

- Ao Eng. Carlos Silva Carvalho, responsável pelo sector de reprografia da Universidade de Évora, e aos funcionários José António Barradas, Joaquim Maria Neixa e Joaquim Francisco Eduardo, incansáveis na impressão final do texto.

- Ao Eng. Fernando Capela e Silva, pela participação no arranjo de algumas partes do texto final.

- Aos meus filhos Bruno e Filipe, permitindo que algum do tempo que lhes era devido pudesse ser dedicado à preparação deste trabalho.

INDICE

RESUMO.....	XII
SITUAÇÃO DO PROBLEMA.....	XV

PARTE I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1: A BOLOTA NA NUTRIÇÃO DOS RUMINANTES.....	2
1.1. Composição química da bolota.....	2
1.2. A bolota na alimentação de ruminantes.....	4
1.2.1. Modificações microbiológicas.....	9
1.3. Os polifenóis e a alimentação dos ruminantes.	9
1.3.1. Introdução.....	9
1.3.2. Compostos fenólicos e selecção de alimentos..	10
1.3.3. Efeitos antinutricionais dos fenóis.....	12
1.4. Taninos.....	14
1.4.1. Estrutura e distribuição dos taninos.....	14
1.4.2. Adstringência e maturação.....	18
1.4.3. Inibição enzimática.....	18
1.4.4. Acção dos taninos sobre os microorganismos...	20
1.4.5. Taninos e fermentação no reticulo-rumen.....	21
1.4.6. Taninos e protecção das proteínas contra a fermentação no reticulo-rumen.....	24
1.4.7. Adaptação dos animais aos taninos.....	27
1.5. Decomposição dos fenóis.....	28
1.5.1. Introdução.....	28
1.5.2. Taninólise e anaerobiose.....	29

1.6.	A inactivação dos taninos.....	32
1.7.	Conclusões.....	35
CAPÍTULO 2 : ECOMICROBIOLOGIA DO RETÍCULO-RUMEN.....		37
2.1.	Introdução.....	37
2.2.	A biocenose retículo-ruminal.....	38
2.2.1.	Bactérias.....	38
2.2.2.	Protozoários.....	41
2.2.3.	Outros microorganismos.....	61
2.3.	Localização dos microorganismos no retículo- -rumen.....	64
2.3.1.	Bactérias.....	65
2.3.2.	Ciliados.....	73
2.3.3.	Fungos.....	74
2.4.	A degradação dos glúcidos.....	74
2.5.	Degradação dos compostos de azoto.....	77
2.5.1.	Introdução.....	77
2.5.2.	Mecanismo de degradação.....	78
2.5.3.	A amónia.....	80
2.6.	Proteossíntese microbiana.....	81
2.6.1.	Introdução.....	81
2.6.2.	Factores que influenciam a proteossíntese....	82
2.7.	Metabolismo dos lípidos.....	90
2.7.1.	Introdução.....	90
2.7.2.	Digestão dos lípidos.....	92
2.7.3.	Efeito dos lípidos da dieta.....	94
2.7.4.	Influência do tipo de gordura.....	97
2.8.	Os minerais na digestão no retículo-rumen....	97

2.8.1.	Macrominerais.....	97
2.8.2.	Microminerais.....	98
2.9.	Conclusões.....	99

PARTE II - ESTUDOS "IN VIVO"

CAPÍTULO 1 :	O MODELO EXPERIMENTAL "IN VIVO".....	102
1.1.	Introdução.....	102
1.2.	Os animais.....	102
1.3.	Alimentação dos animais.....	102
1.4.	Cirurgia - Fistulação dos animais.....	106
1.5.	As experiências.....	106
1.6.	Descrição de algumas técnicas utilizadas nas experiências "in vivo".....	107
1.6.1.	Determinação da osmolalidade.....	107
1.6.2.	Separação das fracções microbianas no fluido reticulo-ruminal.....	107
1.6.3.	Análise qualitativa e quantitativa dos AGVs..	108
1.6.4.	Bacteriologia.....	110
1.7.	Análise estatística dos resultados.....	111
ANEXOS	112

CAPÍTULO 2:	ALTERAÇÕES NO RETÍCULO-RUMEN DE OVINOS NO DECURSO DA ADAPTAÇÃO PROGRESSIVA A INGES- TÃO DE NÍVEIS ELEVADOS DE BOLOTA.....	121
2.1.	Introdução.....	121

2.2.	Materiais e métodos.....	126
2.2.1.	Animais e dietas.....	126
2.2.2.	Amostragem do conteúdo retículo-ruminal.....	127
2.2.3.	Microbiologia.....	128
2.2.4.	Análises químicas.....	128
2.2.5.	Osmolalidade.....	128
2.2.6.	Biomassa microbiana.....	129
2.2.7.	Fenóis totais e taninos.....	129
2.3.	Resultados.....	129
2.4.	Discussão.....	134
	ANEXOS.....	141

**CAPÍTULO 3: INFLUENCIA DA SUPLEMENTAÇÃO PROTEICA E DA
 INCORPORAÇÃO DE PEG NA FERMENTAÇÃO NO RE-
 TÍCULO-RUMEN DE OVINOS ALIMENTADOS COM BO-
 LOTA.....**

3.1.	Introdução.....	156
3.1.1.	Influência da suplementação proteica.....	157
3.2.	Materiais e métodos.....	158
3.2.1.	Animais e dietas.....	158
3.2.2.	Amostragem do conteúdo retículo-ruminal.....	158
3.2.3.	Microbiologia.....	159
3.2.4.	Análises químicas.....	159
3.2.5.	Osmolalidade.....	160
3.2.6.	Biomassa e azoto microbiano.....	160
3.2.7.	Volume do conteúdo retículo-ruminal e taxas de "out-flow".....	161

3.2.8.	Testes de fermentação "in vitro".....	161
3.2.9.	Taxas de produção de gás pelo conteúdo retículo-ruminal "in vivo".....	162
3.2.10.	Análise estatística.....	162
3.3.	Resultados.....	162
3.3.1.	Os ciliados.....	162
3.3.2.	As bactérias.....	164
3.3.3.	Análises químicas.....	166
3.3.4.	Osmolalidade.....	169
3.3.5.	Biomassa e azoto microbiano.....	170
3.3.6.	Volume do conteúdo retículo-ruminal e taxas de "out-flow".....	172
3.3.7.	Taxas de produção de gás pelo conteúdo retículo-ruminal "in vivo".....	172
3.3.8.	Testes de fermentação de substractos purifica- dos pelo conteúdo retículo-ruminal "in vitro".	174
3.4.	Discussão.....	175
	ANEXOS.....	182

CAPÍTULO 4: ESTUDOS RELATIVOS A REIMPLANTAÇÃO DE <u>POLY-</u> <u>PLASTRON</u> , <u>DIPLOPLASTRON</u> , <u>OPHRYOSCOLEX</u> , <u>ISO-</u> <u>TRICHA</u> E <u>DASYTRICHA</u>		204
4.1.	Introdução.....	204
4.2.	Materiais e métodos.....	208
4.3.	Resultados.....	208
4.4.	Discussão.....	211

ANEXOS.....	214
CAPÍTULO 5: COMPORTAMENTO DOS MICROORGANISMOS DO RE-	
TÍCULO-RUMEN DE OVINOS ALIMENTADOS COM	
BOLOTA, NA PRESENÇA DE TANINOS.....	
220	
5.1. Introdução.....	220
5.2. Materiais e métodos.....	223
5.3. Resultados.....	224
5.4. Discussão.....	227
ANEXOS.....	229

PARTE III - ESTUDOS "IN VITRO"

CAPÍTULO 1: A ADAPTAÇÃO DO MODELO "IN VITRO".....	233
1.1. Técnica de cultura "in vitro".....	234
1.2. O método do gás-teste.....	236
1.2.1. A fixação do tempo de incubação.....	237
1.2.2. A fixação do tempo de amostragem.....	238
1.2.3. Alimentação dos animais dadores de inóculo....	240
1.3. As experiências.....	241
1.4. Análise estatística.....	242
ANEXOS.....	243

CAPÍTULO 2: ESTUDOS RELATIVOS AO EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE BOLOTA NA FERMENTAÇÃO DO CONTEÚDO

RETÍCULO-RUMINAL "IN VITRO".....	247
2.1. Introdução.....	247
2.2. Materiais e métodos.....	249
2.2.1. Substractos.....	249
2.2.2. Análises laboratoriais.....	249
2.3. Influência da percentagem de incorporação de bolota, do seu estado de maturação e da incorporação de PEG na fermentação do conteúdo retículo-ruminal.....	250
2.3.1. Introdução.....	250
2.3.2. Resultados.....	251
2.4. Influenciado estado de maturação da bolota e da incorporação de PEG, nas bactérias e ciliados do retículo-rumen.....	260
2.4.1. Introdução.....	260
2.4.2. Resultados.....	260
2.5. Influência da suplementação proteica, da incorporação de PEG e do estado de maturação bolota incorporada a 70%, na fermentação pelo conteúdo retículo-ruminal.....	262
2.5.1. Introdução.....	262
2.5.2. Resultados.....	264
2.6. Efeito da bolota na fermentação de amostras esofágicas colhidas em ovinos na pastagem de montado.....	269
2.6.1. Introdução.....	269

2.6.2.	Resultados.....	270
2.7.	Discussão.....	275
	ANEXOS.....	279

CAPÍTULO 3: ESTUDO DO EFEITO DA FRACÇÃO LIPÍDICA DA
BOLOTA NA FERMENTAÇÃO DO CONTEÚDO RETÍ-
CULO-RUMINAL "IN VITRO".....

		290
3.1.	Introdução.....	290
3.2.	Materiais e métodos.....	291
3.3.	Resultados.....	293
3.3.1.	Efeito do EE da bolota.....	293
3.3.2.	Efeito da incorporação de AGCL.....	299
3.3.3.	Substractos purificados.....	303
3.4.	Discussão.....	304
	ANEXOS.....	307

CAPÍTULO 4: EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO GRADUAL DE PALHA POR
FOLHAS DE AZINHEIRA (Q. ILEX), SOBREIRO (Q.
SUBER) E OLIVEIRA (OLEA EUROPEA) NA FERMEN-
TAÇÃO RETÍCULO-RUMINAL.....

		322
4.1.	Introdução.....	322
4.2.	Materiais e métodos.....	325
4.3.	Resultados.....	326
4.4.	Discussão.....	331
	ANEXOS.....	336

PARTE IV - DISCUSSÃO GLOBAL E CONCLUSÕES

1. Discussão global e conclusões..... 343

BIBLIOGRAFIA..... 349

RESUMO

Este trabalho reporta-se a uma série de estudos realizados "in vivo" e "in vitro", com o objectivo de seguir e caracterizar as modificações operadas no ecossistema retículo-ruminal de ovinos alimentados com bolota, nas condições da pastagem de montado em anos de baixa precipitação pluviométrica.

Durante a adaptação a que os animais foram sujeitos no intervalo de 1 mês, Diploplastron affine, Polyplastron multivesiculatum, Diplodinium sp., Ophryoscolex sp., Isotricha sp. e Dasytricha ruminantium desapareceram da dotação que os animais apresentavam antes do início do período da adaptação. Os Entodiniinae sofreram profundas alterações no seu espectro específico. Assim, as formas de pequena dimensão (Entodinium exiguum, E. nanellum, E. brevispinum) foram gradualmente diminuindo a sua população e em contrapartida as formas de maiores dimensões (E. longinucleatum e E. bursa) foram gradualmente ganhando expressão populacional.

A incorporação de 70% de bolota nas dietas contendo 8,5% PB, baixou expressivamente a população bacteriana e a população de ciliados.

A suplementação destas dietas com níveis mais elevados de PB (11 % e 14%) provocou um aumento significativo ($P < 0,01$) da população de ciliados e das bactérias, e a subida de todos os parâmetros fermentativos. A inclusão de PEG nas dietas

diminui significativamente ($P < 0,01$) as populações de ciliados, nas suplementações azotadas de 11 e 14% PB.

Foi possível reimplantar no retículo-rumen dos animais algumas espécies de ciliados desaparecidos no período em que os animais foram sujeitos à adaptação com bolota. Foi possível reimplantar Diploplastron affine, Polyplastron multivesiculatum e Isotricha sp. Porém, Dasytricha ruminantium e Ophryoscolex sp. não tiveram capacidade para recolonizarem o retículo-rumen. A reimplantação no retículo-rumen de Diploplastron affine e Polyplastron multivesiculatum, aumentou a capacidade fermentativa do conteúdo retículo-ruminal relativamente à degradação da celulose. No entanto, a fermentação do substrato que os animais estavam a ingerir foi fermentado a uma taxa mais baixa.

O inóculo proveniente dos animais adaptados à bolota é mais refractário relativamente à acção deletérea dos taninos, quando comparado com inóculos provenientes de animais não ingerindo bolota. Parece por conseguinte, que os animais alimentados com bolota durante muito tempo, seleccionam uma população bacteriana que tolera grandes quantidades de taninos na solução onde se encontram, e que podem representar até cerca de 4% da população bacteriana total.

O estado de maturação da bolota é determinante nos efeitos deletéreos que exercem sobre as bactérias e ciliados do retículo-rumen, como também sobre o desenvolvimento do processo fermentativo global. Assim, a incorporação de 5% de

PEG₄₀₀₀ provocou um aumento muito significativo no número de bactérias viáveis e no número de ciliados em processo de divisão, tendo a interacção com estado de maturação sido muito significativa ($P < 0,01$). As interacções % de incorporação de bolota x estado de maturação e estado de maturação da bolota x PEG influenciaram significativamente ($P < 0,01$) as produções de gás às 6 h de fermentação. Às 24 h as diferenças não foram significativas.

Níveis de PB superiores a 8,5 % não permitiram evidenciar qualquer acção por parte dos taninos na bolota em estado de maturação mais avançado. No entanto, com a bolota em estado verde o efeito é perfeitamente manifesto.

A fermentação dos componentes da fibra vegetal, particularmente a celulose foram significativamente ($P < 0,01$) afectados com a incorporação de EE de bolota nas percentagens ingeridas pelos animais alimentados com dietas integrando 70% de bolota.

A substituição da palha por folhas de Quercus ilex, aumentou significativamente as produções de gás ($P < 0,001$) às 6 h de incubação e aumentou significativamente ($P < 0,01$) o número de ciliados. A substituição por folhas de Q. suber teve um efeito negativo tanto nas produções de gás como nas populações de ciliados. A substituição por folhas Olea europea, aumentou a produção de gás às 6 h de incubação. Porém às 24 h a tendência foi exactamente a oposta, tendo baixado as produções com a substituição.

A SITUAÇÃO DO PROBLEMA

As Quercíneas constituem uma vasta comunidade vegetal fortemente implantada nas áreas de montado no nosso País, 535.000 ha de azinheira (Quercus ilex L.) e 64.000 ha de sobreiro (Q. suber L.) (ALMEIDA, 1986). Os frutos da azinheira (bolota) e do sobreiro (glande), constituem uma fonte energética importante para os animais em pastoreio, na época de Outono-Inverno, para além de que estas quercíneas colocam também à disposição dos animais na pastagem, as suas estruturas foliares, importante recurso principalmente em alturas do ano em que a pastagem é escassa (MARINHO, 1984).

Apesar do seu valor como fonte energética, a glande e a bolota possuem na sua composição valores relativamente baixos de proteína, são ricos em polifenóis do tipo tanino, e a sua fracção lipídica, particularmente a bolota, é bastante expressiva (CARVALHO, 1979).

O desequilíbrio manifesto entre os vários elementos da sua composição, podem criar, em determinadas circunstâncias, várias perturbações fisiológicas nos animais, particularmente problemas de ordem nutricional. Observações perliminares por nós efectuadas ao longo de alguns estudos efectuados com bolota no Laboratório de Nutrição da Universidade de Évora, permitiu-nos constatar importantes modificações quantitativas e qualitativas na micropopulação retículo-ruminal.

Foi sempre a nossa preocupação desde início ajustar, o mais proximamente possível, as nossas condições experimentais às condições do montado seco, onde o

desequilíbrio nutricional dos animais é evidente, e onde normalmente as consequências negativas se têm manifestado com o elevado consumo de bolota pelos animais em pastagem.

O facto de os polifenóis - tanino exibirem o seu maior efeito deletéreo quando a ingestão de proteína é baixa, colocou-nos o imperativo de verificar também, o nível mínimo de proteína que os animais deveriam ingerir, para que o seu efeito não se fizesse sentir, utilizando vários níveis de suplementação proteica com bagaço de soja. Todavia, a quantidade de bolota disponível apenas nos permitiu explorar três níveis de suplementação, ficando em aberto a solução para esta questão que nos parece da maior importância. Estava inicialmente previsto tratar os animais também sem qualquer suplementação azotada, a fim de provocar a depleção do azoto nos animais, por forma a diagnosticar mais claramente o "síndrome" intoxicação-pela-bolota.

Nas explorações agrícolas com áreas importantes de montado, os agricultores tradicionalmente colocam à disposição dos seus efectivos animais as folhagens das quercíneas, principalmente em anos de penúria forraginosa, não sendo conhecidas as verdadeiras consequências para o equilíbrio fisiológico dos animais com esta prática. Perante tal situação, pareceu-nos importante fazer uma abordagem ao problema, pelo que dedicámos uma parte do nosso estudo à caracterização do seu valor nutritivo, se bem que com todas as limitações inerentes aos modelos "in vitro".

ABREVIATURAS

AC	- Actividade celulolítica das bactérias
ADF	- "Acid Detergent Fiber" (Fibra insolúvel em detergente neutro)
AGV	- Ácidos gordos voláteis
A.P.	- Azoto dos ciliados
A.T.M.	- Azoto microbiano total
B.P.	- Biomassa dos ciliados
B.T.M.	- Biomassa total microbiana
Cr.EDTA	- Quelato de crómio e etilenodiaminotetraacético
CUD	- Coeficiente de utilização digestiva da lenhinacelulose
DMSIV	- Digestibilidade da matéria seca "in vitro"
ENA	- Extractivos não azotados
EE	- Extracto etéreo
FB	- Fibra bruta
MET	- Microscópio Electrónico de Transmissão
MEE	- Microscópio Electrónico de Exploração
MJ	- MegaJoule
MO	- Matéria orgânica
MS	- Matéria seca
N-RNA	- azoto no ácido ribonucleico
N-DNA	- azoto no ácido deoxiribonucleico
N-NH ₄ ⁺	- Azoto amoniacal

PEG - Polietilenoglicol, peso molecular 4000

PB - Proteína bruta

$\bar{X} \pm \text{e.p.m.}$ - Média \pm erro padrão da média

PARTE I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPITULO 1

A BOLOTA NA NUTRIÇÃO DOS RUMINANTES

A literatura científica é muito escassa, no que respeita a estudos efectuados com bolota de azinho ou sobro, resumindo-se a alguns trabalhos realizados pelos nossos vizinhos espanhóis, utilizando monogástricos, e em Portugal na Universidade de Évora (FERREIRA, 1983; MARINHO, 1983; LUCAS, 1984; ALMEIDA, 1986).

1.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BOLOTA

Os valores relativos à composição química e valor nutritivo citados pelos autores, raramente se referem à sua origem (Q. ilex ou Q. suber) e representam, normalmente, valores médios (Quadro 1.1.)

Observando a constituição química da bolota, é de facto notório o baixo nível nos teores em proteína e o seu teor apreciável em polifenóis do tipo tanino, em lípidos e glúcidos.

PICCIONI (1960 - cit. por LUCAS, 1984) refere que de uma maneira geral, a bolota é deficiente não só em minerais, com especial destaque para o cálcio, como também nas vitaminas A e D.

A baixa composição em PB é complicada pela baixa digestibilidade da mesma (IWATA e HIROUCHI, 1941; MAYMONE e DURANTE, 1954; EUREINOVA, 1956; VARELA et al., 1965; BLANCO e MACARRO, 1965; VIDAL e VARELA, 1967; FERREIRA e CASTRO, 1966;

Quadro 1.1 Valor nutritivo da bolota

FRUTO	Digestibilidade (% MS)					Energia metabolizável (MJ/Kg)	TDN	Referências	
	MO	PB	EE	FB					ENA
				NDF	ADF				
<u>Quercus ilex</u>	71,7	18,2	87,3	47,3		77,1	11,9	79,3	BOZA et al., (1966)
<u>Quercus serrata</u>	80,0						10,7	71,0	IWATA e HIROUCHI (1941) - cit. por BOZA et al., (1966)
<u>Quercus ilex</u> + <u>Quercus suber</u> Integral							10,6 12,1 12,7	61,8 70,6 74,2	E.Z.N. (1956) TORRENT et al., (1961)
	68,7	59,7	83,8	18,3		75,3	12,4	72,4	VARELA et al., (1965)
Sem casca	65,7	-	-	23,8	12,2	-	10,4 11,7	- 74,2	FERREIRA (1984) CATYD (1979)
Torrada	76,1	8,6	89,0	26,6		82,8	14,3	85,5	VARELA et al., (1965)
50:50 - Mistura de milho e bolota integral	79,8	68,3	72,6	34,5		85,6	13,9	82,8	VARELA et al., (1965)
50:50 - Mistura de milho e bolota descascada e torrada	81,7	44,2	88,8	38,2		86,5	14,5	86,7	VARELA et al., (1965)

VARELA, 1968; BALABANIAN, 1980).

Os valores relativos à percentagem de proteína e composição da bolota e farinha de bolota em aminoácidos são apresentados no Quadro 1.2.. Relativamente à composição em aminoácidos, VARELA (1968) considera o conteúdo em

Quadro 1.2. Composição da bolota em aminoácidos da bolota (g/16gN)
(Adaptado de FERREIRA e CASTRO, 1966; CATYD, 1979).

Aminoácidos	Bolota	Bolota parcialmente descorticada
Arginina	11,3	4,87
Fenilalanina	8,4	4,17
Glicina	7,4	-
Histidina	3,6	-
Isoleucina	10,4	2,96
Leucina	9,6	4,52
Lisina	7,8	3,30
Metionina	2,1	1,74
Treonina	9,1	2,26
Triptofano	1,9	0,70
Valina	7,7	3,30
Cistina	-	2,43

aminoácidos da farinha de bolota (*Q. ilex*) aceitável, apesar da deficiência em lisina.

A composição glucídica da bolota é bastante importante, particularmente no que respeita à fracção amido, conferindo a este fruto as características de um bom concentrado energético. Esta particularidade é acentuada pela sua composição em lípidos bastante importante, fortemente amplificada, quando pastoreada tardiamente no solo, onde se pode apresentar parasitada por lagartas (FERREIRA, 1984).

1.2. A BOLOTA NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES

Se bem que os ruminantes na pastagem de montado utilizem a bolota disponível com muita apetência, existem observações sobre o efeito negativo exercido pela bolota, quando ingerida acima de determinados níveis, especialmente quando o nível de proteína e fibra são baixos. Consideram-se como níveis de incorporação aceitáveis, 15% para borregos;

25% para ovelhas lactantes; 15% para vitelos até 150 Kg; e 25% para vacas leiteiras (C.O.C.SA., 1976 - cit. por ALMEIDA, 1986) (Quadro 1.3.).

Quadro 1.3. Níveis de incorporação de farinha de bolota recomendados para dietas de ruminantes (C.O.C.SA., 1967)

Animais	Farinha de bolota integral	Farinha de bolota descortificada
Borregos	Até 15% do total da dieta, sem diferenças significativas no ganho médio diário	Desaconselhável o seu uso na alimentação dos ruminantes, porque estes só têm a beneficiar com a fibra da casca, e também pela diferença de preço dos dois tipos de farinha
Ovelhas lactantes	A aveia e a cevada na dieta podem ser substituídas até 25% sem alterações no ganho médio diário e peso do borrego, e da produção de leite na ovelha, desde que o "deficit" proteico seja corrigido	
Novilhos de engorda até 150 Kg	Substituição até 15% de aveia e cevada, sem alterações no ganho médio diário e na ingestibilidade	
Novilhos de engorda acima de 150 Kg	Até 25% da dieta. Recomenda-se a correção com bagaço, quando o "deficit" atinge 0,5%	
Vacas em lactação	Até 20 - 25% da dieta, sem que se verifique qualquer alteração na quantidade e qualidade do leite	

é sobejamente conhecido que os ruminantes mantidos em pastoreio de montado, em anos de fraco ou nulo crescimento de erva outonal, não crescem de acordo com o seu potencial, como inclusivamente estão sujeitos a uma taxa de mortalidade muito elevada (ALMEIDA, 1986). Em anos em que a pluviosidade outonal é manifesta, a bolota não exerce qualquer efeito tóxico aparente. O crescimento exuberante de erva, é suficiente para compensar o grande "déficit" em proteína da bolota, apesar do seu baixo teor em matéria seca (MS) e energia metabolizável (EM). Nas regiões de montado, o teor

médio em PB da erva de Outono é da ordem de 26%. O nível proteico expressa, por assim dizer, a acção deletéria dos polifenóis-tanino (SCHAFFERT et al., 1974; FORD e HEWITT, 1979; COMBS e WALLACE, 1976).

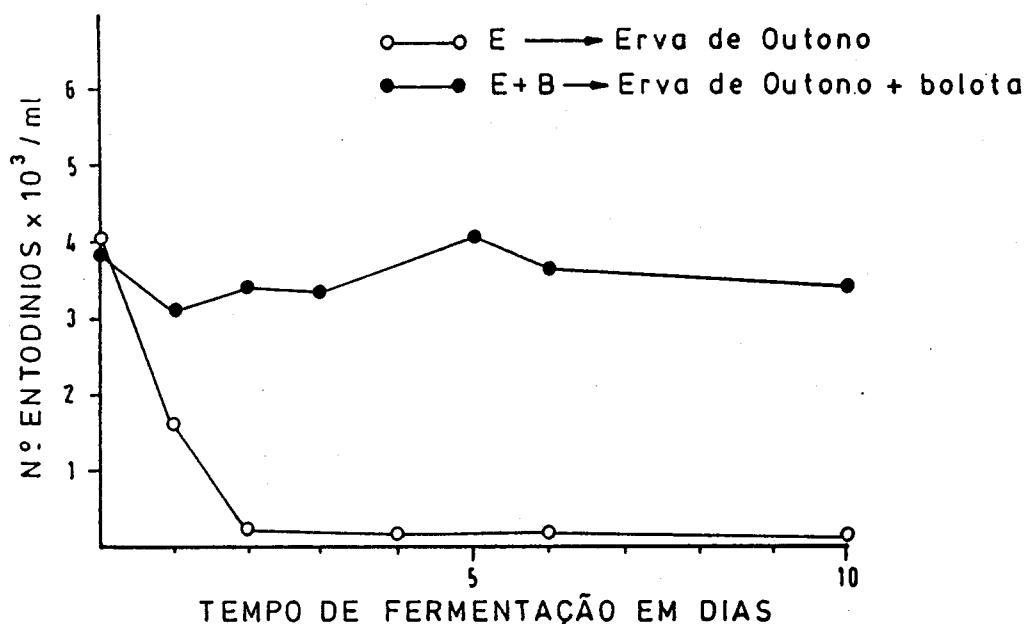
FERREIRA (1984) apresenta valores da digestibilidade da bolota da ordem de 65,7 , 23,8 e 12,2 , respectivamente para a Matéria Orgânica (MO), fibra total (NDF) e lenhinacelulose (ADF), e 10,4 MJ/Kg para a energia metabolizável. Estes valores situam-se ligeiramente abaixo daqueles encontrados na literatura científica. ALMEIDA (1986) comparando erva de Outono versus erva de Outono + bolota (50:50), encontrou valores semelhantes para a digestibilidade da MO nas duas situações. Contudo, as digestibilidades do NDF e ADF foram claramente superiores nos animais alimentados com erva de Outono apenas. LUCAS (1986), verificou que a suplementação de dietas com a incorporação de 70% de bolota melhorava a digestibilidade da MS e da MO, confirmando as observações anteriormente efectuadas (FERREIRA, 1984). Curiosamente, a digestibilidade da MO digerida no intestino foi bastante superior para a erva + bolota (ALMEIDA, 1986), devido ao facto de no retículo-rumen os taninos terem feito sentir a sua acção, ou talvez os ácidos orgânicos libertados na lipólise (BROOKS et al., 1954) da fracção lipídica da bolota. Outros autores, verificaram situação semelhante, trabalhando com Lotus pedunculatus, muito rico em taninos (BARRY e MANLEY, 1984), silagem de sorgo (BEN-GHEDALIA e TAGARI, 1977), Sericea lespedeza (DONNELLY e ANTHONY, 1970), Coronila varia (BURNS e COPE, 1974), grão de sorgo (HIBBERD

et al., 1982), milho miúdo (RAMACHANDRA et al., 1977), fava (BOND, 1976; BUCKLEY et al., 1983) e folhagens de arbustos (VAN HOVEN, 1984).

A digestibilidade aparente do N é fortemente influenciada com a presença na dieta de componentes ricos em taninos. Em ovinos, a digestibilidade aparente do N foi inferior, quando a dieta ingerida pelos animais incluiu bolota na sua composição (ALMEIDA, 1986). Ovinos alimentados com feno + bolota (70:30), também forneceram valores mais baixos para a digestibilidade aparente do N, do que quando ingeriram apenas feno (FERREIRA, 1984).

A menor degradabilidade do N na dieta erva + bolota, não pode ser atribuída apenas ao N daquele fruto, pois que é possível que os taninos tenham inibido a degradação do N da dieta, situação perfeitamente constatada em trabalhos realizados "in vitro" (ALMEIDA, 1986). Se a digestibilidade aparente do N diminuiu com a incorporação de bolota, o mesmo já não se poderá dizer da proteossíntese microbiana no retículo-rumen. Assim a eficiência da síntese proteica microbiana foi incrementada com a incorporação de bolota (ALMEIDA, 1986). A maior eficiência da proteossíntese, nas dietas com incorporação de bolota, segundo o mesmo autor, pode ser atribuível a vários factores em simultâneo: os taninos da bolota podem ter exercido um efeito depressivo sobre populações microbianas menos adaptadas ou menos eficientes; pode ter-se verificado uma melhor sincronização entre disponibilidade de energia e azoto, já que a taxa de

degradação da MS da bolota é superior à da erva; finalmente a riqueza em matérias lipídicas da bolota utilizada poderia, de alguma forma, ter afectado a digestão e síntese proteica microbiana no retículo-rumen, uma vez que os lípidos podem deprimir a digestão dos glúcidos estruturais e diminuir os níveis de amónia no rumen (TAMMINGA, 1980) através da inibição dos protozoários. Esta última hipótese parece pouco provável, uma vez que "in vitro" e nas mesmas condições de substrato (Fig.1.1.) não só o número de ciliados foi



Nota: Inóculo proveniente de cultura "in vitro"

Fig. 1.1. Efeito da incorporação de 50% de bolota no desenvolvimento "in vitro" de uma população de ciliados (MARINHO, 1984).

significativamente maior, como também os níveis de $N - NH_4^+$ baixaram claramente (MARINHO, 1984 - não publicado).

O perfil do $N - NH_4^+$ no retículo-rumen foi completamente distinto nos animais ingerindo apenas feno, e feno + 30% de bolota, dietas isoazotadas.

1.2.1. Modificações microbiológicas: A incorporação de bolota na dieta dos ruminantes, parece provocar grandes modificações qualitativas e quantitativas importantes no ecossistema retículo-ruminal. Assim, foi possível verificar que quando a bolota foi associada a feno não traçado, mesmo a um nível de incorporação de 30%, provocou o desaparecimento das pequenas formas de Entodinium sp., sendo substituídas por formas de maior dimensão, metabolicamente menos activas (MARINHO, 1983). Tal situação já não se verificou quando o feno foi fornecido traçado.

As alterações parecem, no entanto, ser mais pronunciadas quando se eleva o nível de incorporação de bolota. Com efeito, foi possível constatar o desaparecimento das pequenas formas de Entodinium, Isotrichidae e Diplodiniinae em ovinos alimentados com 70% de bolota nas suas dietas (MARINHO, 1984).

1.3. OS POLIFENÓIS E A ALIMENTAÇÃO DOS RUMINANTES

1.3.1. Introdução : Os herbívoros em ecossistemas estáveis, manifestam um perfeito conhecimento em relação às plantas locais, comem o que necessitam ou podem, e rejeitam as plantas nefastas. Em algumas regiões do Globo, os caprinos ignoram as viçosas folhas de Crotalaria mesmo quando pouco mais existe para comer, a não ser pastagem seca (TELEK, 1983). Porém em ecossistemas mais " artificiais", estas preferências e constrangimentos podem ser ignorados por vezes. Ovinos domesticados, ao contrário dos cangurus nativos no Oeste australiano, ingerem espécies de plantas que contêm

quantidades letais de fluoracetato (ARNOLD e HILL, 1972); efectivos zootécnicos no valor de aproximadamente 50 milhões de dólares são anualmente intoxicados por "browsing" imprudentes em pastagens dos Estados Unidos da América (TELEK, 1980).

Tais prazeres e dissabores são determinados em parte por componentes do grupo dos fenóis (PIERPOINT, 1985). Existem, por conseguinte, muito boas razões para tomar em consideração os efeitos dos fenóis na alimentação dos ruminantes e dos animais herbívoros em geral (PIERPOINT, 1985).

Nas plantas comestíveis em crescimento, os compostos fenólicos e os seus derivados glicosilados acumulam-se provavelmente em compartimentos especializados intra ou extracelulares, e podem aparecer também em células especializadas como as células tanínicas das bananas (Pierpoint, 1985). Nas plantas são o grosso dos compostos fenólicos estão provavelmente separados dos componentes citoplasmáticos susceptíveis, e dos enzimas que os convertem em componentes quinonóides reactivos, radicais livres e polímeros (PIERPOINT, 1985). Estas reacções apenas ocorrem quando as células das plantas ingeridas são danificadas por patógenos, maquinaria agrícola ou a pela mastigação dos animais.

1.3.2. Compostos fenólicos e selecção de alimentos: Os herbívoros que são móveis e estão equipados com um sofisticado sistema de percepção sensorial, podem seleccionar

entre as plantas disponíveis. Embora esta capacidade de seleccionar esteja concertada alicerçada em razões de ordem evolucionária e bioquímica (HARBORNE, 1972 e 1979), é por vezes difícil identificar os sinais de reconhecimento, que determinam a escolha pelo organismo individualizado (PIERPOINT, 1985). Os compostos fenólicos têm, todavia, um papel entre os inúmeros sinais químicos que estruturam uma planta e o seu meio ambiente. Alguns fenóis, naringina e oleuropeina por exemplo, conferem sabores amargos. A adstringência é uma característica dos taninos, e embora agradáveis em pequenas quantidades, podem "ofender" o paladar humano (PIERPOINT, 1985). A sobrevivência dos herbívoros na selva, ou em situações onde possuem alguma capacidade de escolha (Tabela 1.1.) sugere que os taninos também condicionam a selecção alimentar; as folhas com baixo teor em

TABELA 1.1

Taninos como impedientes alimentares

Correlação entre a ingestão e teor em taninos		
Gafanhoto (<u>S. gregaria</u>)	fetos	Negativa (COOPER-DRIVER et al., 1977)
Tartaruga gigante (<u>G. gigantea</u>)	folhas	Negativa (SWAIN, 1977)
Aves	sorgo	Negativa (GREEN, 1974)
Bovinos	<u>Sericea</u>	Negativa (DONELLY, 1954)
Macacos (<u>C. quereza</u>)	folhas	Negativa (DATS et al., 1977)

taninos sendo usualmente, mas não invariavelmente, as preferidas. Taninos fornecidos a animais, diminuíram a ingestão alimentar ou a ingestão de água, em níveis tão baixos como 0,05 - 0,3% (ARNOLD e HILL, 1972; SWAIN, 1977).

1.3.2. Efeitos antinutricionais dos fenóis: Os fenóis simples interferem na fisiologia do retículo-rumen em maior ou menor grau, variando de intensidade de acordo com o tipo de fenóis simples. A digestibilidade da MS "in vitro" (DMSIV) da ervilhaca está correlacionada negativamente com o conteúdo em fenóis totais da forragem (BURNS e COPE, 1974 e 1976). Extractos metanólicos de fenóis da mesma forragem, deprimiram a DMSIV (BURNS et al., 1976). A remoção dos fenóis solúveis da luzerna aumentou a fermentação "in vitro" da celulose e proteína, pelos microorganismos do retículo-rumen (JUNG e FAHEY, 1981). A inclusão de fibra de repolho e luzerna na dieta de cobaias, diminuiu o crescimento de uma bactéria anaeróbia celulolítica do cego destes animais (JOHANNING e O'DELL, 1981). SCOTT e AKIN (1985) utilizando culturas puras de estirpes bacterianas do retículo-rumen (Ruminococcus albus 7, R. flavefaciens FD - 1, Butyrivibrio fibrisolvens 49 e Lachnospira multiparusD - 32), testaram 10 fenóis simples nas concentrações de 1, 5, e 10 mM, tendo verificado que especialmente tóxicos foram os ácidos p - cumárico e p - hidroxibenzaldeído, os ácidos siríngico, p - hidroxibenzóico e hidróxicinâmico estimularam o crescimento da maior parte das estirpes, e os dois primeiros particularmente a degradação de papel de filtro por R. flavefaciens.

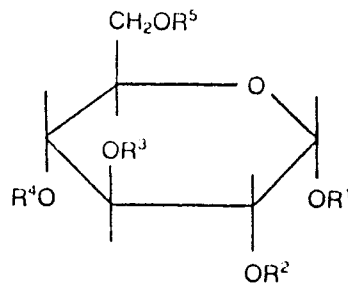
Efeitos antimicrobianos também foram observados com fenóis extraídos da madeira (JURD et al., 1971). As bactérias quando são expostas aos fenóis aparentemente sofrem danificações na membrana e lise celular (JUNG e FAHEY, 1983). HARRIS e HARTLEY (1976), sugerem que os ácidos ferúlico e p-cumárico, dois fenóis presentes nas forragens em concentrações relativamente elevadas, podem ser importantes, influenciando a degradação da matéria orgânica vegetal no retículo-rumen. Os monómeros fenólicos constituintes da lenhina, funcionam como inibidores na digestão da celulose "in vitro" (AKIN, 1982; JUNG e FAHEY, 1983), apresentando os vários fenóis diferentes graus de inibição.

A lenhina é um componente da fibra da dieta, associado normalmente com a baixa digestibilidade dos alimentos (VAN SOEST, 1963 e 1982; MOORE e MOTT, 1973; AKIN et al., 1977). A lenhina interfere na utilização dos glúcidos parietais vegetais pelo animal, e embora as leguminosas frequentemente possuam mais lenhina do que as gramíneas, a sua digestibilidade não difere (JUNG e FAHEY, 1983). GHOSE e KING (1963) utilizando bactérias anaeróbias, verificaram que os talos da luzerna eram cinco vezes mais digestíveis do que as fibras da juta, embora ambas apresentem o mesmo teor em lenhina. CRAMPTON e MAYNARD (1938) postularam que a refractariedade da lenhina à degradação microbiana no tubo digestivo, tinha a ver com a acção antiséptica dos núcleos fenólicos. Sem dúvida que os dados de que actualmente dispomos dão suporte a esta teoria.

1.4. TANINOS

Os taninos são compostos químicos que ocorrem na natureza, com peso molecular elevado (500 - 3000 Daltons) contendo um número suficientemente grande de radicais OH - fenólicos, ou outros grupos apropriados (1 - 2 por 100 PM), que os habilitam a formar complexos com as proteínas e outras macromoléculas. Estes compostos, com uma distribuição ubiqüitária no Reino Vegetal, constituem o 4º mais abundante constituinte das plantas depois da celulose, hemicelulose e lenhina e, juntamente com a lenhina, são os mais abundantes e largamente distribuídos polímeros fenólicos das plantas superiores (LEWIS, et al. 1968).

1.4.1. Estrutura e distribuição dos taninos: Os taninos são classificados em dois grupos: taninos hidrolizáveis e taninos condensados (HASLAM, 1966). Apesar de normalmente diferirem de uma forma considerável na distribuição botânica, nos produtos de hidrólise e em outras propriedades, apresentam, no entanto em comum a particularidade de formarem complexos com as proteínas (MARINHO, 1984). Os taninos hidrolizáveis exemplificados pelo ácido tânico, apresentam na sua estrutura química um núcleo de álcool polihídrico, normalmente glucose, cujos grupos -OH estão parcial ou totalmente esterificados com ácido gálgico e /ou um seu congénere (PIERPOINT, 1985). A estrutura geral pode ser assim apresentada

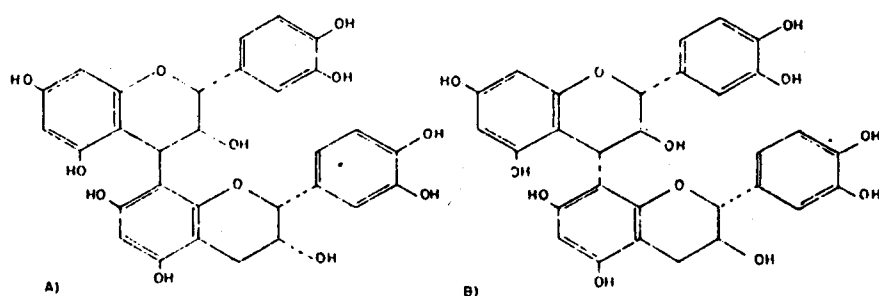


R pode ser um galhoil (2) ou vários resíduos galhoil ligados como dépsidos (3), tal como sucede nos galhotaninos ou, como nos elagitaninos, resíduos galhoil ligados oxidativamente (4 e 5), que por vezes são libertados na hidrólise sob a forma de ácido elágico (PIERPOINT, 1985). O ácido tânico cristalizado, utilizado em alguns trabalhos (GOLDSTEIN e SWAIN, 1965) são derivados da glucose octa - ou nona - galhoil, mas provavelmente possuem alguns polímeros de ácido gálgico (KING e PRUDEN, 1970). Os galhotaninos, por vezes possuem moléculas de configuração planar ou em forma de disco, com grupos - OH dispostos em torno da periferia do disco. Os elagitaninos, pensa-se que sejam mais esféricos, apresentando também os grupos - OH distribuídos à superfície da molécula (HASLAM, 1978).

Os taninos hidrolizáveis estão confinados a umas poucas de ordens de plantas cotiledóneas como Rosales, que incluem as Leguminosae, as Spindales, Geraniales, Parietales e Myrtales (PIERPOINT, 1985). Tal como o seu nome indica, são hidrolizados pela acção de ácidos, álcalis e tanases de origem fúngica, como as produzidas por Aspergillus e Penicillium (LEWIS et al., 1969). São hidrolizados no tubo digestivo dos herbívoros não ruminantes e no retículo-rumen

de bovinos e caprinos (BEGOVIC e DURZIC, 1977; BEGOVIC et al., 1979), apesar de não ter sido possível ainda detectar tanases na mucosa do tubo digestivo, ou nas bactérias intestinais (GLICK e JOSLYN, 1970). Os produtos são absorvidos e a fracção glucídica metabolizada, enquanto os fenóis são hidroxilados, metilados, ou conjugados antes da sua excreção (MILIC e STOJANOVIC, 1972; McLEOD, 1974).

Os taninos condensados e os membros mais comuns deste grupo, são melhor descritos como procianidinas; em virtude das antocianidinas vermelhas que libertam quando tratadas em meio ácido a quente (HASLAM, 1977 e 1978). Estes são oligómeros de flavanos - 3 - ol e flavanos - 3 - 4 - diol, sem núcleo glucídico (PIERPOINT, 1983). Dímeros e trimeros baseados nos estereoisómeros de (+) catequina têm sido extraídos de frutos e partes vegetativas de algumas espécies de plantas bem caracterizadas (PIERPOINT, 1983). Os dímeros



de (-) - epicatequina (A) têm sido extraídos de maçãs, cerejas e castanhas - da - índia, enquanto os transisómeros (+) - catequina (B), estão presentes nos amentilhos de salgueiro, morangos, frutos das roseiras - bravas e lúpulos

(PIERPOINT, 1983).

Os taninos condensados são por vezes considerados menos reactivos do que os taninos hidrolizáveis relativamente à precipitação das proteínas. A capacidade que algumas procianidinas possuem para precipitar sangue hemolisado é da ordem de 10 - 15% da correspondente a igual peso de ácido tânico (BATE-SMITH, 1973).

Os taninos condensados estão mais amplamente difundidos na natureza que os taninos hidrolizáveis. Aparecem em fetos, gimnospérmicas e angiospérmicas. Nas angiospérmicas, estão presentes em 45% das dicotiledónias testadas e 30% das monocotiledónias (PIERPOINT, 1983). Os taninos condensados estão normalmente associados com as plantas lenhificadas, mas também ocorrem em alguns cereais, tal como cevada e sorgo (RAMACHANDRA et al., 1977) e, juntamente com os taninos hidrolizáveis, em forragens como luzerna, sanfeno (McLEOD, 1974) e nos capítulos do trevo branco (BATE-SMITH, 1975).

Os taninos condensados não são clivados por enzimas, quer "in vivo", quer "in vitro", e é improvável que sejam digeridos ou, em condições normais, absorvidos pelo intestino (MILIC e STOJANOVIC, 1972). Grandes quantidades podem entretanto, tal como grandes quantidades de taninos hidrolizáveis, produzir lesões intestinais (TEXL e KOWECNY, 1968 - cit. por PIERPOINT, 1985), permitindo a sua absorção com algumas consequências tóxicas (McLEOD, 1974).

O conteúdo em taninos é variável nos arbustos e forragens que os contêm, possivelmente em consequência das respostas às agressões por fungos e outros patógenos das

plantas (MANDELS e REESE, 1963 - cit. por VAN SOEST, 1982).

1.4.2. Adstringência e maturação: A maior parte da adstringência dos frutos, conforme anteriormente referido, é atribuível aos taninos (PIERPOINT, 1985), e é assumido como sendo o reflexo da capacidade dos taninos complexarem as proteínas e glicoproteínas da cavidade bucal, comprometendo a sua capacidade lubrificante. O ciclo de maturação dos frutos é normalmente acompanhado por uma diminuição da sua adstringência, que se traduz por uma perda gradual de taninos extractáveis, provavelmente devido à sua polimerização a formas menos reactivas e menos solúveis (GOLDSTEIN e SWAIN, 1963).

1.4.3. Inibição enzimática: Uma das formas sob a qual se manifesta a acção deletérea dos taninos sobre os sistemas biológicos, é a inibição da actividade enzimática pela formação de complexos tanino + substracto ou tanino + enzima.

Estudos efectuados "in vitro" demonstraram a inibição da tripsina (FEENEY, 1969; ROMERO e RYAN, 1978; ALMEIDA, 1986), pepsina (OH, 1978; ALMEIDA, 1986) e α -amilase (TAMIR e ALUMOT, 1969). Taninos purificados de Acácia sp. não só reduziram a actividade da poligalacturonidase, celulase e urease, como bloquearam quase completamente a sua actividade quando em certas concentrações (BENOIT et al., 1968). Os mesmos autores sugerem que uma parte importante do efeito inibitório dos taninos na decomposição microbiana dos resíduos vegetais, se deve à inactivação, pelos taninos, dos exoenzimas microbianos envolvidos na degradação de polímeros

de elevado peso molecular como o são as celulosas, hemicelulosas e pectinas. Com efeito, a fracção tanino tendo-se complexado com a celulose, tornou o produto resistente à decomposição. Compostos como amido, quitina e saponinas são bloqueados na sua decomposição por acção dos taninos (BASARABA e STARKEY, 1966; LEWIS e STARKEY, 1968).

No tubo digestivo dos animais os taninos também fazem sentir a sua acção, particularmente no que refere à digestão das proteínas. A adição de bolota ou alfarroba às misturas alimentares "in vitro", incrementou a percentagem de azoto não solubilizado pela pepsina, ao fim de 4 h de incubação (ALMEIDA, 1986). Com a tripsina a inibição foi mais pronunciada, 1,5 X com a bolota e 1,4 X com a alfarroba (ALMEIDA, 1986), devido talvez ao pH. GUSTAVSON (1954 e 1956) constatou que a reactividade dos taninos hidrolizáveis e taninos condensados era diferente consoante os valores de pH. Os taninos condensados na sua reactividade seriam mais refractários às variações de pH, mas a reactividade dos taninos hidrolizáveis era mais forte a pH 3 - 4, diminuindo a valores superiores a 5. O pH, no entanto, é factor condicionante para o desenvolvimento do complexo tanino + proteína (GOLDSTEIN e SWAIN, 1965; LOOMIS e BATAILE, 1966), com destaque para o ponto isoeléctrico das proteínas (HAGERMAN e BUTLER, 1978; OH, 1978) onde a força de ligação é máxima.

Em condições naturais, os efeitos dos taninos presentes nos diferentes alimentos sobre os sistemas enzimáticos, estão

dependentes das solubilidades desses mesmos taninos nas soluções em que se encontram os enzimas e os substractos (ALMEIDA, 1986).

1.4.4. Acção dos taninos sobre os microorganismos: A tolerância dos microorganismos em presença dos taninos é extremamente variável. Se alguns microorganismos são bastante susceptíveis à sua presença, outros, contudo, estão habilitados a suportar concentrações elevadas e mesmo processar a sua degradação (BASARABA, 1966; GRANT, 1976; MAHADEVAN et al., 1980).

A actividade inibitória dos taninos está também relacionada com o tipo de tanino e com a sua concentração (HENIS et al. 1964; BASARABA, 1966). Os taninos de tipo condensado manifestam menos efeitos inibitórios que os de tipo hidrolizável (SINGLETON e KRATZER, 1969 e 1973). Os taninos hidrolizáveis são, no entanto, mais susceptíveis de serem degradados do que os de tipo condensado (MAHADEVAN et al., 1980), talvez pelo facto de os taninos de tipo condensado apresentarem moléculas num estado muito baixo de óxido-redução, exigindo para a sua degradação grande quantidade de energia, que só o metabolismo de aeróbio pode proporcionar.

A acção dos taninos sobre a parede celular dos microorganismos tem sido constatada por vários. Sugere-se mesmo que a parede celular constitui o alvo principal dos taninos, nos microorganismos susceptíveis, uma vez constitui a interface com o meio ambiente.

Acido tânico e a fracção tanino do extracto aquoso de

tegumentos de alfarroba, modificaram fortemente a morfologia de alguns microorganismos (HENIS et al., 1964). A formação de protoplastos, ou a modificação na sua morfologia de associação, é por vezes consequência da acção dos taninos. Cellvibrio fulvus apresentou a formação de protoplastos na presença de ácido tânico ou fracção tanino de extracto de alfarroba (McQUILLEN, 1960). Concentrações subinibitórias de taninos, provocaram a formação de cadeias e filamentos, quando em condições normais os não apresentam (HENIS et al., 1964).

As bactérias Gram - são menos susceptíveis à acção dos taninos. Com efeito, ensaios com espectro bastante amplo de microorganismos Gram + e Gram - , demonstraram a refractariedade destes em presença de concentrações de 0,02 % de ácido tânico (SMITH, 1974). A menor susceptibilidade dos microorganismos Gram - é provável que seja consequência da complexa organização da parede celular que apresentam (CHENG e COSTERTON, 1980). Os taninos também apresentam propriedades quelantes, particularmente os taninos hidrolizáveis, em relação aos catiões cálcio (SHRAGER et al. 1969), fundamental na estabilidade das membranas da parede celular das bactérias Gram - (HAQUE et al., 1974).

1.4.5. Taninos e fermentação no retículo-rumen: Os taninos, quando introduzidos no retículo-rumen, provocam modificações importantes no seu funcionamento.

Ensaio "in vitro" evidenciaram uma correlação negativa muito elevada entre a produção de gás, digestibilidades da

MS e PB, e a presença de taninos (DONNELLY et al., 1969; SABA et al., 1972; BURNS et al., 1974; SCHAFFERT et al., 1974; GREEN, 1974; RAMACHANDRA et al., 1977; WATERMAN et al., 1980).

A actividade desidrogenásica, representando a actividade microbiana geral do rumen, e a concentração de amónia foram bastante menores em alimentados com silagem de sorgo, quando comparados com animais alimentados com silagem de milho (BEN-GHEDALIA et al., 1977). TAGARI et al. (1965), utilizando um rumen artificial, verificaram que os taninos de alfarroba inibiam a proteólise e a síntese proteica microbiana. A degradação da proteína de amendoim, no retículo-rumen de caprinos, foi inibida com a inclusão de ácido tânico ou tanino de Shorea robusta (TRIPATHI, 1978). A fracção tanino de Ziziphus mummularia inibiu a degradação da caseína, no rumen "in vitro" (KUMAR e SINGH, 1984). A fracção tanino extraída de "sal-seed" (Shorea robusta) e ácido tânico, manifestaram forte acção inibitória sobre a degradação da proteína (TRIPATHI, 1975). Estudos feitos "in vitro" para verificar o efeito inibidor dos taninos extraídos de folhas de "pipal" (Ficus religiosa) e ácido tânico, na produção de AGVs, mostraram que, nos níveis de concentração das folhas de F. religiosa (1,2%) bem como ácido tânico em níveis dez vezes superiores, não possuíam qualquer efeito na produção de AGVs (SINGH, 1977). Taninos extraídos de S. robusta, na concentração em que naturalmente se encontram (13,3% - 2,66 mg/ml) e ácido tânico na mesma concentração não inibiram a produção de AGVs. No entanto, em concentrações 10

vezes superiores àquela (26,6 mg/ml), o ácido tânico inibiu a produção de AGVs (SINGH, 1978). A utilização de P¹³-fosfato pelos microorganismos do reticulo-rumen diminuiu com o incremento nos níveis de ácido tânico de 1,25 a 7,5%, denotando uma supressão na fermentação microbiana (SADANANDAN et al., 1976). SADANANDAN et al. (1979), trabalhando com búfalos-de-água (Bos bubalus) alimentados com farinha de "sal-seed", com vários níveis de incorporação de ácido tânico (0 - 5%), referem um decréscimo nos níveis de N - RNA, N - DNA e AGVs, bem como do N proteico total bacteriano e protozoário, acompanhados de um aumento nos níveis de N - proteico no líquido reticulo-ruminal filtrado, à medida que se incrementava a incorporação de ácido tânico.

TAGARI et al.(1965) verificaram que o efeito inibitório do extracto de casca de alfarroba sobre a celulólise e actividade desaminásica, estava mais correlacionado com o seu conteúdo em glúcidos, do que com a fracção tanino. Em contraste com a fracção tanino do extracto, o ácido galotânico inibiu a actividade celulolítica.

A actividade ureásica do conteúdo reticulo-ruminal, foi inibida por extractos aquosos de folhas de carvalho (Quercus incana), tendo a inibição sido proporcional ao teor em taninos presente (LOHAN et al., 1981). No entanto, SINGH e ARORA (1980) demonstraram que o tanino das sementes de S. robusta não afectava a actividade ureásica.

VAN HOVEN (1984) observou em 40 espécies de arbustos, uma elevada correlação entre o teor em polifenóis e a

digestibilidade da MS "in vitro".

1.4.6. Taninos e protecção das proteínas contra a fermentação no retículo-rumen: A capacidade que os taninos manifestam para a formação de complexos com proteínas, tem sido utilizada experimentalmente com a finalidade de proteger os suplementos proteicos da actividade degradativa ruminal. A evidenciação de uma maior retenção azotada, maior crescimento de lã e maior produção de leite, quando proteínas de elevada qualidade (caseína) foram infundidas via abomaso (REIS e SCHINCKEL, 1964; EGAN, 1965 e 1970; SCHELLING e HATFIELD, 1968; COLEBROOK e REIS, 1969; ORSKOV e FRASER, 1969; REIS e COLEBROOK, 1972; BLACK e TRIBE, 1973; DERRIG et al., 1974 - cit. por CHURCH, 1979), justifica todo o esforço que tem vindo a ser feito na procura de meios para maximizar a utilização dos componentes proteicos da dieta.

Teoricamente, os taninos deveriam ser capazes de aumentar o fornecimento de aminoácidos nos ruminantes ingerindo forragens verdes, uma vez que a margem onde os complexos tanino + proteína são insolúveis coincide com a margem de pH onde o retículo-rumen funciona; o pH onde a proteína é libertada dos complexos corresponde aos valores de pH passíveis de encontrar no abomaso e no intestino delgado.

A solubilidade do leite em pó desnatado foi reduzida em 89%, quando tratado com tanino de castanheiro, e o tratamento de bagaços de amendoim, soja, linhaça, colza e girassol com tanino de acácia, preveniu a sua degradação por acção dos microorganismos do retículo-rumen (ZELTER et al., 1970; DONNELLY e ANTHONY, 1969 - cit. PRICE e BUTLER, 1980).

Embora a proteína sofra um certo grau de protecção relativamente à sua degradação no retículo-rumen, as eventuais benéficas consequências para a nutrição do ruminante, dependem da sua disponibilidade para a digestão para o animal. Com efeito, os dados experimentais mostram que os concentrados proteicos vegetais fortemente protegidos (90% de protecção), trazem também consigo uma redução da sua digestibilidade pelo animal (CHURCH, 1979).

A quantidade de azoto no duodeno foi inferior à quantidade de azoto ingerida com as forragens que não possuem taninos na sua composição (trevo branco e azevém), em consequência da elevada taxa de degradação das proteínas da forragem verde (70%; ULYATT et al., 1975), e a consequente absorção de amónia a partir do retículo-rumen. Contrariamente, o aumento no teor em taninos condensados de 0,25% - 10,6% MS para Lotus pedunculatus e L. corniculatus, produziu um incremento linear no azoto duodenal, tendo o fluxo do azoto não amoniacal sido igual ao total ingerido quando a concentração de taninos condensados foi de 4,1% MS (BARRY e REID, 1984), conforme pode ser observado no gráfico da Fig.1.3. Segundo os mesmos autores, em concentrações constantes de taninos condensados da dieta, os taninos condensados no sanfeno foram menos efectivos do que os do lotus no incremento do fluxo do azoto proteico duodenal.

A absorção de aminoácidos a partir do intestino delgado, estimada como proporção da energia metabólica EM ingerida, foi maior para L. pedunculatus de baixo e elevado

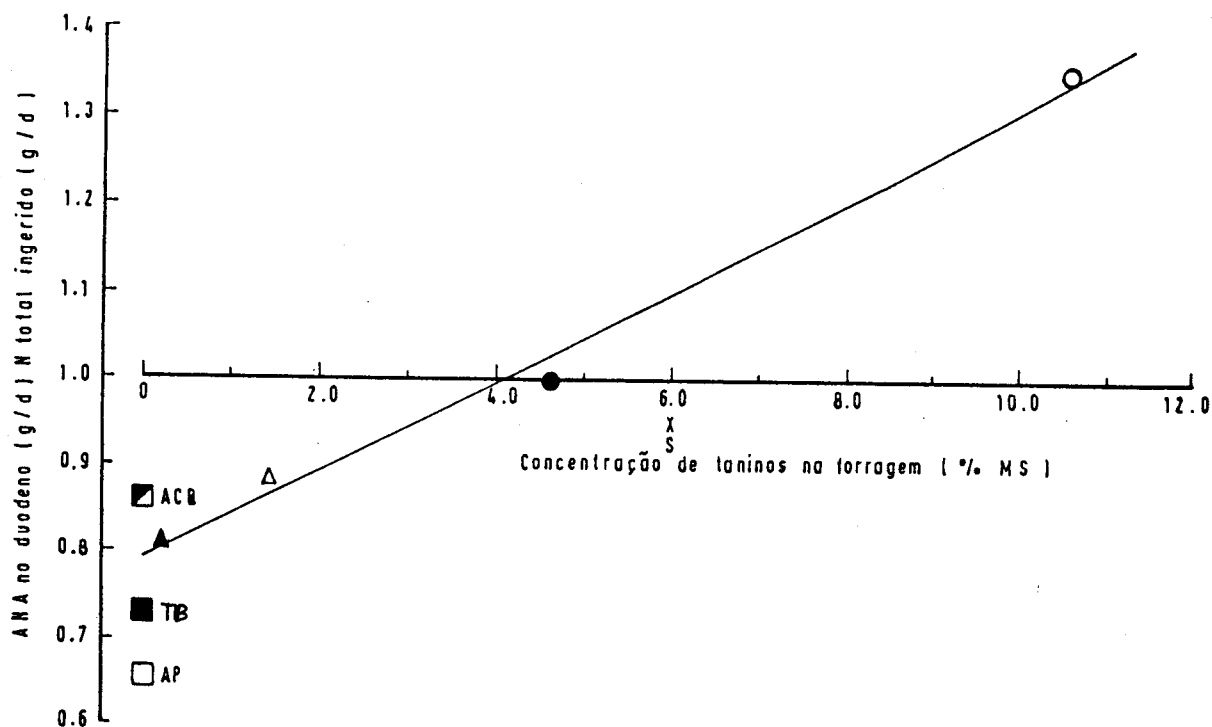


Fig. 1.2. Quantidade de de azoto não amoniacal (NNA) que chega ao duodeno por unidade de N total ingerido por ovinos (28 g N/dia) alimentados numa pastagem na Nova Zelândia. Os dados estão calculados como uma função da concentração de taninos condensados na forragem. ▲ △ cultivares de *L. corniculatus* de baixo e elevado teor em taninos; ● ● *L. pedunculatus* de baixo e elevado teor em taninos; x S sanfeno. A linha de regressão diz respeito apenas às espécies de *Lotus*. Os dados são comparados com espécies de trevo branco (TB ●), azevém perene (AP ○) e azevém de curta rotação (ACR ●), espécies não contendo taninos (BARRY e REID, 1984).

teor em taninos (29%; BARRY e MANLEY, 1984) e sanfeno (25%; ULYATT e EGAN, 1979) do que para o azevém perene e trevo branco (17% e 20% respectivamente; McRAE e ULYATT, 1974). A presença de taninos no grupo controle aumentou a absorção líquida aparente de treonina (57%), valina (89%), isoleucina (94%), leucina (30%), tirosina (41%), fenilalanina (93%), histidina (90%) e lisina (59%) e diminuiu a absorção de

aminoácidos não essenciais (WAGHORN et al., 1987; WAGHORN, 1977). Isto vem confirmar o efeito benéfico dos taninos condensados em aumentar o fornecimento de aminoácidos, e mostra também que os taninos de mais baixo peso molecular de Lotus são mais eficientes que os taninos do sanfeno, de peso molecular mais elevado.

1.4.7. Adaptação dos animais aos taninos: Alguns autores sugerem que a presença dos fenóis em geral, confere às plantas um certo grau de protecção contra os consumidores primários (ROBBINS et al., 1987). Assim se as plantações de sorgo nos Estados Unidos tinham grandes quebras de produção devido à predação pelas aves, a selecção de plantas resistentes a esta predação só foi possível com o incremento na sua fracção tanino (PRICE e BUTLER, 1982).

Os herbívoros adaptados ao consumo de forragens ou folhas ricas em taninos, têm capacidade para se defenderem contra a presença de taninos, produzindo proteínas salivares que complexam os taninos de uma forma altamente específica (ROBBINS et al., 1987_a). A falta de efeito dos taninos na digestão das paredes celulares nos cervídeos (Odocoileus sp.) contrasta de forma marcante com as observações feitas em ovinos domésticos e "in vitro". Comparando a composição salivar dos cervídeos com a dos ovinos e bovinos domésticos, foi possível evidenciar que o elevado potencial apresentado pela saliva dos cervídeos está em estreita relação com os seus hábitos alimentares (ROBBINS et al., 1987_b). As proteínas salivares que complexam preferencialmente os taninos, podem assim minimizar as perdas de azoto fecal através da

maximização da eficiência da complexação dos taninos por unidade de proteína e pode reduzir absorção de taninos hidrolizáveis e prevenir fenómenos de intoxicação (ROBBINS et al., 1987)

A micropopulação retículo-ruminal parece manifestar um certo grau de adaptação à presença de taninos. A actividade digestiva do líquido ruminal proveniente de animais alimentados com vários níveis de alfarroba, não foi muito afectada pela incorporação de ácido tânico nos substractos "in vitro" (SETTINERI et al., 1987). O efeito do ácido tânico foi menos pronunciado nos inóculos provenientes dos animais ingerindo 50% de alfarroba.

Experiências com ovinos estabulados ingerindo L. pedunculatus + PEG como adsorvente específico dos taninos, manifestaram uma relação linear entre a concentração no plasma de hormona do crescimento e a concentração de taninos na forragem (BARRY e REID, 1984). Nenhuma outra hormona foi afectada por qualquer modificação introduzida na concentração de taninos (BARRY e REDEKOPP cit. por BARRY e REID, 1984).

1.5. DECOMPOSIÇÃO DOS FENÓIS

1.5.1. Introdução - Apesar das acções deletéreas sobre os sistemas biológicos de que os polímeros aromáticos são protagonistas, um número limitado de microorganismos tem sido apontado como responsáveis pela sua degradação.

A taxa de oxidação da glucose por Pseudomonas fluorescens não foi modificada pela presença de taninos, tendo mesmo

consumido 15% mais de O_2 , quando incubada com tanino de acácia, do que quando incubada com glucose apenas (BASARABA, 1966). Fungos do género Aspergillus e Penicillium, provenientes de solos florestais, decomposeram taninos hidrolizáveis e taninos condensados, tendo os galotaninos sido degradados a ácido gálico, glucose e ácido oxálico (LEWIS et al., 1969). Segundo os mesmos autores, Achromobacterim sp., fez a utilização de galotaninos como única fonte de energia para o crescimento.

Os ecossistemas aquáticos fornecem normalmente um vasto contingente de microorganismos com capacidade taninolítica. Para além de fungos Aspergillus e Penicillium, os Deuteromycetes desempenham papel importante na taninólise (INGOLD, 1976). As leveduras aparecem fortemente envolvidas na degradação dos taninos, particularmente Pichia pseudopolymer, P. adeyehi, P. monospora, Debaryomyces hansenii e Candida sp. (JACOB e MARIE, 1975).

1.5.2. Taninólise e anaerobiose - A degradação dos compostos aromáticos na ausência de oxigénio, não era concebível até há bem poucos anos. Os núcleos fenólicos caracterizam-se por manifestarem uma grande inércia química, que apenas é vencida pela acção desmolítica de oxigenases, enzimas que incorporam O_2 na estrutura benzénica, primeiro passo para a sua clivagem molecular (STANIER et al., 1977). Algumas bactérias estão, no entanto, habilitadas a degradar estes substractos na ausência de O_2 por fotometabolismo (Athiorhodaceae), respiração nitrato (Pseudomonas sp. e Moraxela sp.), respiração sulfato e fermentação metanogénea (EVANS, 1977;

TAYLOR et al., 1970), em que o núcleo benzénico é primeiro reduzido e clivado posteriormente por hidrólise, produzindo ácidos alifáticos para o crescimento celular (EVANS, 1977).

Não se conhecem, no entanto, evidências de que os taninos possam ser degradados na ausência de oxigénio. Apenas compostos fenólicos mais simples (flavonóis) foram reportados como tendo sido degradados em anaerobiose no solo, em digestores de biogás e no retículo-rumen (EVANS, 1977; SIMPSON et al., 1969; CHENG et al., 1969 e 1970; KRISHNAMURTY et al., 1970; TSAI et al., 1975). Flavonóis extraídos de folhas (quercitina e rutina) foram degradados pela flora retículo-ruminal até AGVs, com a formação de compostos intermediários como ácido p - hidróxifenilacético (SHARMA et al., 1981). Estudos efectuados com culturas de microorganismos intestinais, mostraram que após 1 - 2 meses de adaptação, apresentavam capacidade para degradarem completamente o anel aromático de muitos fenóis simples (MARTIN et al., 1983). Culturas de anaeróbios metanógenos podem degradar completamente o núcleo aromático de catecol via cis - benzenodiol (BALBA e EVANS, 1980). No entanto, culturas de microorganismos não adaptados foram incapazes de utilizar catecol, fenol, quinol, orcinol ou resorcinol, embora floroglucinol tenha sido rapidamente degradado a acetato e dióxido de carbono (TSAI et al., 1976).

A lenhina, um composto polifenólico presente nas dietas vegetais numa quantidade por vezes importante, tem sido referida como sendo degradada em maior ou menor grau no tracto digestivo dos ruminantes. BONDI et al. (cit. por

HUNGATE, 1966), fazem referência ao desaparecimento de uma pequena porção de lenhina na passagem da digesta através do tubo digestivo dos ruminantes, atingindo valores da ordem de 64% em materiais pouco lenhificados. HOBSON (1969 e 1971) referem que a lenhina é o único componente da dieta que não é degradado pelos microorganismos do retículo-rumen, porque a sua degradação constitui uma reacção cujo "input" de energia só a utilização respiratória do O₂ pode garantir. VAN SOEST (1982) refere que o desaparecimento da lenhina, a que alguns autores se referem, se deve única e exclusivamente a erros puramente analíticos inerentes ao seu próprio doseamento. Na opinião do mesmo autor, a degradação biológica da lenhina constitui um processo demasiado lento (demorando semanas e até meses) para ser concebível no tracto digestivo ruminante, não sendo compatível com o tempo de permanência do alimento no tubo digestivo.

Em geral, as bactérias não são consideradas como possuindo capacidade para degradarem a lenhina (BELLAMY, 1977). Contudo, estudos efectuados com o microscópio electrónico permitiram visualizar um microorganismo filamentoso que ataca o esclerênquima (um tecido fortemente lenhificado) nos limbos das folhas na digesta retículo-ruminal, removida a partir de novilhs canulados, o que prova que a lenhina também é degradada em condições anaeróbicas (AKIN, 1980). Esta bactéria, designada provisoriamente como 7 - 1, não apresenta actividade celulolítica e utiliza os ácidos fenólicos sinápico, ferúlico, e p - cumárico, como substractos para o seu crescimento, os ácidos com uma

metoxilação mais elevada sendo utilizados duma maneira mais eficiente (AKIN, 1980).

1.6. A INATIVAÇÃO DOS TANINOS

O facto de os taninos na dieta interferirem negativamente na fisiologia geral dos herbívoros, torna imprescindível a sua inactivação ou remoção.

Em algumas cultivares, como por exemplo o sorgo, é relativamente fácil dirigir geneticamente o fenótipo tanino, pois constitui a expressão de apenas 2 genes (MA e BLISS, 1978; MARSHALL et al., 1979). Nos arbustos e plantas de maior porte, a situação torna-se menos exequível devido ao seu lento crescimento.

A inactivação do efeito tanino pode ser realizado através de 6 vias diferentes (PRICE e BUTLER, 1980):

- remoção física ou química dos taninos;
- adição à dieta de substâncias que se complexam com os taninos;
- tratamento químico do produto alimentar, para alteração da molécula dos taninos;
- adição à dieta de substâncias que auxiliam na sua destoxificação metabólica;
- tratamento hormonal dos frutos;
- selecção de variedades de plantas com teor em taninos mais baixo.

A adição de substâncias complexantes constitui, talvez,

a forma mais elegante e prática para despistar o efeito dos taninos, pelo menos em estudos experimentais. A polivinilpirrolidona (PVP) e o polietilenoglicol (PEG), constituem os adsorventes de eleição, pela sua capacidade de deslocarem os taninos dos complexos tanino-proteína (LOOMIS, 1974). RAYUDU et al. (1970), verificaram esta propriedade "in vivo", tendo o PVP reduzido acentuadamente o efeito depressivo do ácido tânico em galináceos. A diminuição da digestibilidade das proteínas provocada pelos taninos do sorgo, foi atenuada com a adição de PEG (McGINTY, 1968). JUNG e FAHEY (1981) utilizaram PVP para remover o efeito dos fenóis, a fim de estudarem a digestibilidade de forragens "in vitro", tendo observado um aumento nas digestibilidades da celulose e proteína da luzerna (Medicago sativa). A dissociação dos complexos tanino - proteína por acção do PEG, foi demonstrada por JONES e MANGAN (1977), tanto "in vivo" em ovinos, como "in vitro". Vários autores evidenciaram um incremento nos valores da digestibilidade do N, MO e energia em animais alimentados com Lotus pedunculatus e L. corniculatus, com a adição de PEG (BARRY e DUNCAN, 1984; BARRY et al., 1986; WAGHORN et al., 1987; WAGHORN, 1986). Quando o teor em taninos condensados totais reactivos foi reduzido de 6,3% para 0,7% MS com a adição de PEG (Tabela 1.2.), a ingestão voluntária de energia metabolizável EM aumentou 44% e a digestibilidade dos carboidratos estruturais aumentou 13% (BARRY e REID, 1984).

TABELA 1.2.
 Ingestão voluntária e digestibilidade aparente
 de lotus como afectados pela redução dos taninos
 condensados totais reactivos com a adição de PEG (PM 3350)
 (BARRY e DUNCAN, 1984)

	Adição de água	Adição de PEG	SED
TC totais reactivos (% MS)	6,3	0,7	
TC livres	0,54	0,05	
Digestibilidade aparente			
celulose (%)	52,7	57,9	2,62
hemicelulose (%)	50,6	58,9	2,01
Ingestibilidade voluntária (MJ EM/KgW ^{0,75} /dia)	0,48	0,69	0,097

Borregos ingerindo pastagem com uma composição florística importante em L. pedunculatus ou trevo branco, apresentaram taxas de aumento de peso vivo mais baixas (Tabela 1.3.), que foram incrementadas com o fornecimento de garrafadas de PEG (3.350 PM) nos borregos pastando lotus, mas não naqueles pastando trevo branco (BARRY e REID, 1984). Os mesmos autores concluem assim, que concentrações da ordem de 8% MS em lotus podem ser classificadas como antinutricionais.

Contudo é de esperar modificações importantes na taxa de diluição do retículo-rumen, pelo que o aumento na eficiência de utilização de alguns componentes da dieta, possa ser atribuída em parte, também, ao aumento da taxa de diluição (Quadro 2.6. - Cap. 2).

TABELA 1.3.

Respostas de borregos em crescimento pastando lotus ou uma mistura de trevo branco e trevo vermelho, a garrafadas diárias de PEG (3.350 PM) (BARRY e REID, 1984).

Experiência	Legume	Taninos condensados % MS		Ganho de peso vivo (g/d)		
		Total	Livre	água	PEG	SED
1	lotus	7,6	0,8	125	166	1,67
2	lotus	8,9	0,7	27	70	0,92
	trevo	< 0,1	ND ¹	28	26	0,92

¹ Não detectável.

1.7. CONCLUSÕES

A bolota parece constituir um bom suplemento energético para a pastagem de montado no período Outono/Inverno, particularmente em anos de boa distribuição pluviométrica nestas estações, situação em que a massa verde é bastante exuberante. Muito rica em azoto solúvel, mas francamente pobre em MS, o potencial nutritivo da pastagem só terá a beneficiar com a integração da bolota na sua composição. Em anos secos, de muito escassa ou quase nula disponibilidade em forragem o quadro torna-se bastante diferente e adverso para a saúde dos animais e a presença de grande quantidade de bolota no montado parece criar fortes desequilíbrios na sua fisiologia nutritiva. O teor em taninos da bolota, bastante apreciável em algumas variedades, a sua baixa composição em

PB, o teor apreciável em lípidos, glúcidos solúveis e amido, concorrem todos eles para a distorção fisiológica dos animais. Nesta situação os animais evoluem muito rapidamente num estado de caquexia acelerada, entrando em balanço azotado negativo com a excreção de mais azoto pelas fezes relativamente à quantidade ingerida.

O esforço que tem vindo a ser desenvolvido com o objectivo de eliminar ou inactivar os taninos, tem apresentado grandes progressos, porém a sua aplicabilidade no domínio prático, principalmente tendo em conta os custos com a sua utilização, ainda não foi devidamente considerada.

Com o cepticismo de alguns autores, os ruminantes manifestam grandes potencialidades nas suas capacidades para ultrapassarem a presença nefasta dos polifenóis nas suas dietas, quer por adaptação das suas glândulas salivares, quer seleccionando na diversidade da sua micropopulação retículo-ruminal, grupos microbianos com capacidades para a sua degradação. O resultado de alguns estudos têm vindo a confirmar esta possibilidade e dar gradualmente estrutura a tão grande expectativa.

CAPÍTULO 2

ECOMICROBIOLOGIA DO RETÍCULO-RUMEN

2.1. INTRODUÇÃO

O reticulo-rumen constitui um meio de elevada homeostasis, apresentando grandes semelhanças com um reactor em continuo de microorganismos anaeróbios. O seu elevado teor água (85-90%), a temperatura constante oscilando entre 39-40°C, um potencial redox de -350 mV, valores de pH entre 6-7, e pressão osmótica com valores muito próximos dos parâmetros sanguíneos, 250-350 mOsmoles, constituem as características mais marcantes deste ecossistema.

Um aporte mais ou menos regular de nutrientes através da ingestão por um lado, e da ruminação por outro; uma eliminação continua dos metabólitos libertados na degradação fermentativa da ingesta, quer por absorção através das paredes do reticulo-rumen (ácidos gordos voláteis e amónia), quer pela passagem dos detritos alimentares e células microbianas, quer ainda pela eructação de metano e dióxido de carbono; e a mistura continua por acção das contracções periódicas das paredes da viscera, massagem à escala microscópica pela locomoção microbiana (fundamentalmente a acção dos protozoários), e pela evolução dos gases provenientes da fermentação, colocam este ecossistema muito próximo das condições que presidem ao funcionamento de um sistema de cultura continuo. Em suma, o reticulo-rumen apresenta-se perfeitamente ajustado ao desenvolvimento de uma população microbiana de tipo respiratório anaeróbio, fundamentalmente definida por bactérias, pro-

tozoários e fungos.

2.2. A BIOCENOSE RETICULO-RUMINAL

O reticulo-rumen apresenta grandes semelhanças com os ecossistemas tropicais na extrema variedade e heterogeneidade nas suas comunidades biológicas. As grandes transformações fermentativas que decorrem no reticulo-rumen, são protagonizadas fundamentalmente por bactérias, fungos e protozoários ciliados.

2.2.1. Bactérias - A microflora reticulo-ruminal, é caracterizada por um espectro bastante amplo de espécies bacterianas. Apresentando uma densidade populacional da ordem de 10^{10} células /g de conteúdo, concorrem em 50% para a biomassa microbiana, representando a mais importante e complexa categoria de microorganismos. As bactérias anaeróbias estrictas não esporuláveis impõem aqui a sua representatividade maioritária numa grande diversidade.

Foram descritas até à data mais de 200 espécies bacterianas no rumen. No entanto, apenas cerca de trinta géneros são considerados verdadeiros habitantes do rumen, os outros estão reduzidos ao mero estatuto de oportunistas, uma vez que chegam ao sistema com a ingestão alimentar (RUSSEL E HESPELL, 1981).

As bactérias do rumen usualmente são agrupadas de acordo com as suas afinidades em relação aos substratos (ver Quadro 2.1.) que utilizam para o seu desenvolvimento (HUNGATE, 1966): bactérias celulolíticas, hemicelulolíticas, pectinolíticas, amilolíticas, proteolíticas, ureolíticas, lipolíticas,

Quadro 2.1 - Espécies bacterianas do retículo-rumen que degradam os polissacarídeos da parede celular, amido, proteína, lípidos, glicérol e ácido láctico (LATHAM, 1980; CHENG et al., 1984; OGI-MOTO e IMAI, 1982).

Substrato	Espécie bacteriana
Celulose	<u>Ruminococcus flavefaciens</u>
	<u>Ruminococcus albus</u>
	<u>Bacteroides succinogenes</u>
	<u>Butyrivibrio fibrisolvens</u>
	<u>Cillobacterium cellulosolvens</u>
	<u>Clostridium lockheadii</u>
	<u>Cellulomonas fimi</u>
<u>Eubacterium cellulosolvens</u>	
Hemicelulose	<u>Butyrivibrio fibrisolvens</u>
	<u>Ruminococcus flavefaciens</u>
	<u>Ruminococcus albus</u>
	<u>Bacteroides ruminicola</u>
Pectinas	<u>Lachnospira multiparus</u>
	<u>treptococcus bovis</u>
	<u>Succinivibrio dextrinosolvens</u>
Amido	<u>Streptococcus bovis</u>
	<u>Lactobacillus vitulinus</u>
	<u>Lactobacillus acidophilus</u>
	<u>Bifidobacterium sp.</u>
	<u>Bacteroides ruminicola</u>
	<u>Bacteroides succinogenes</u>
	<u>Bacteroides amylophilus</u>
	<u>Succinivibrio dextrinosolvens</u>
<u>Selenomonas ruminantium</u>	
Glicérol	<u>Selenomonas ruminantium</u>
	<u>Anaerovibrio lipolytica</u>
	<u>Megasphaera elsdenii</u>
	<u>Clostridium cellobioparum</u>
Lípidos	<u>Anaerovibrio lipolytica</u>
Proteína	<u>Eubacterium ruminantium</u>
	<u>Bacteroides ruminicola</u>
	<u>Selenomonas ruminantium</u>
	<u>Lachnospira multiparus</u>
	<u>Butyrivibrio dextrinosolvens</u>
ácido láctico	<u>Megasphaera elsdenii</u>
	<u>Selenomonas lactilytica</u>

etc.. Tendo em conta o facto de a capacidade desmolítica em relação a um determinado substracto poder ser repartida por várias espécies bacterianas, salvaguarda de certa forma a estabilidade do ecossistema (HESPELL, 1981), de tal forma que, o desaparecimento de uma determinada espécie bacteriana não provocará qualquer efeito negativo apreciável no conjunto das fermentações.

O grau de especialização apresentado pelas várias espécies bacterianas varia amplamente. As funções numa determinada espécie podem ser muito limitadas ou, contrariamente, muito amplas. Por exemplo, Butyrivibrio fibrisolvens e Selenomonas ruminantium podem utilizar vários substractos como fonte de energia, mas Bacteroides succinogenes e Ruminococcus sp. (espécies celulolíticas) circunscrevem a sua acção à celulose e aos seus produtos de hidrólise. Da mesma forma Bacteroides amilophilus não fermenta senão o amido, dextrinas e maltose (HUNGATE, 1966; BRYANT, 1977).

O grau de especialização é profundamente marcado em outras espécies: Anaerovibrio lypolitica utiliza apenas glicerol como fonte de energia; Veillonella alcalescens utiliza fundamentalmente lactato (HUNGATE, 1966) e Methanobacterium ruminantium deriva energia para o seu crescimento na redução de CO_2 e CH_4 (WOLIN, 1975). Apesar de o retículo-rumen na sua evolução não ter sido dirigido para uma actividade proteoclástica como função principal, existem algumas espécies bacterianas capazes de hidrolisar proteínas, algumas utilizando a fermentação de aminoácidos como fonte de energia, em que espécies como Megasphaera elsdenii (BRYANT,

1977) e Acidaminococcus fermentans (ELIAS, 1971 - cit. por HOBSON, 1972).

As espécies bacterianas de maiores dimensões Oscillospira quillermondii, Quinn's oval e Lampropedia hyalina, de observação microscópica frequente, têm sido pouco ou nada estudadas em cultura pura, desconhecendo-se as suas reais funções e a sua participação no metabolismo global do rumen. Relativamente aos Oval, já foi possível cultivá-los em cultura pura em anaerobiose, mas apenas em condições não axénicas, tendo sido possível demonstrar que utilizam apenas alguns glúcidos simples (ORPIN, 1972 e 1976; BROUGH E HOWARD, 1971). Apesar de estas bactérias ocorrerem no conteúdo ruminal em números relativamente baixos (superiores a $4 \times 10^7 \cdot g^{-1}$ para Lampropedia e Oscillospira - CLARKE, 1977 e 1979; WARNER, 1966) quando comparados com o nº total de bactérias do rumen, podem ainda assim desempenhar uma função bioquímica não negligenciável (CLARKE, 1979).

2.2.2. Protozoários - Os protozoários do rumen são fundamentalmente ciliados, mas a presença de flagelados pode também ser evidenciada com uma observação microscópica mais cuidada. De qualquer forma, a representatividade destes é bastante reduzida no rumen adulto.

2.2.2.1. Flagelados: têm sido objecto de muito pouco estudo não se conhecendo o seu verdadeiro estatuto no funcionamento do ecossistema. Conhecem-se apenas cinco espécies descritas, Monocercomonas ruminantium, Monocercomonoides caprae, Chilomastix caprae, Tetratrichomonas buttreyi e Penta-

trichomonas hominis (OGIMOTO e IMAI, 1981). A concentração de flagelados é elevada, particularmente no retículo-rumen jovem, no período que antecede o estabelecimento dos ciliados (EADIE, 1962). No retículo-rumen adulto, o seu baixo número inferior a 10^5 / ml (EADIE, 1962) e o seu tamanho, 4 - 15 μ m de comprimento (OGIMOTO e IMAI, 1982) não deixa antever um papel significativo no funcionamento do ecossistema, quando comparado com ciliados e bactérias (CLARKE, 1977).

2.2.2.2. Ciliados: Estes protozoários são integrados fundamentalmente em dois grandes grupos, os Holótricos e os Entodiniomórficos. A distribuição taxonómica apresentada

Quadro 2.2. - Protozoários ciliados do retículo-rumen. Géneros pertencentes às famílias Isotrichidae, Buetchliidae e Ophryoscolecidae (OGIMOTO e IMAI, 1981).

<u>Isotrichidae</u>	<u>Ophryoscolecidae</u>
<u>Isotricha</u>	Subfamília <u>Entodiniinae</u>
<u>Oligoisotricha</u>	<u>Entodinium</u>
<u>Dasytricha</u>	<u>Campylodinium</u>
<u>Buetchliidae</u>	Subfamília <u>Diplodiniinae</u>
<u>Buetchlia</u>	<u>Diplodinium</u>
	<u>Eodinium</u>
	<u>Eremoplastron</u>
	<u>Eudiplodinium</u>
	<u>Diploplastron</u>
	<u>Polyplastron</u>
	<u>Elytroplastron</u>
	<u>Metadinium</u>
	<u>Ostracodinium</u>
	<u>Enoploplastron</u>
	Subfamília <u>Ophryoscolecinae</u>
	<u>Ophryoscolex</u>
	<u>Epidinium</u>
	<u>Epiplastron</u>
	<u>Opisthotricum</u>
	<u>Caloscolex</u>

por OGIMOTO e IMAI (1982) para os ciliados do rumen é actualmente a mais reconhecida pela comunidade científica (Quadro 2.2.). Entre os Holótricos os géneros Isotricha e Dasytricha (Família Isotrichidae são os que aparecem mais frequentemente, observando-se também, mas mais raramente Buetchlia (Família Buetchliidae) (MARINHO, 1983; DEHORITY, 1970).

Entodinium, Diplodinium, Polyplastron, Eudiplodinium, Diploplastron, Epidinium e Ophryoscolex constituem os entodiniomórficos (Ophryoscolecidae) mais frequentes (MARINHO, 1983; CLARKE, 1977; COLEMAN, 1980; HUNGATE, 1966; FONTY et al., 1984).

As suas densidades populacionais são baixas em dietas muito fibrosas (inferior a 100.000 /ml), enquanto que em dietas ricas em amido ou glúcidos facilmente fermentáveis podem atingir densidades da ordem de $2 - 5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (PRESTON e LENG, 1986; HUNGATE, 1966) e podem representar, conforme anteriormente referido, 50% da biomassa microbiana do rumen (THIVEND et al., 1985). Devido às dificuldades que têm vindo a ser encontradas na sua cultura "in vitro", o seu verdadeiro estatuto metabólico não está suficientemente esclarecido, ao contrário do que sucede com as bactérias. No entanto, os ciliados são capazes de transformar os constituintes alimentares e bacterianos em metabólitos e componentes celulares que ficam disponíveis para serem utilizados pelo hospedeiro.

Os Holótricos, utilizam preferencialmente glúcidos solúveis embora, os dois géneros que integram este grupo se

diferenciem na sua utilização. Isotricha não fermenta a maltose, mas pode utilizar grãos de amido, enquanto que Dasytricha fermenta a maltose, mas não é capaz de utilizar certos amidos (CLARKE, 1977).

Os ciliados envolvidos na digestão dos glúcidos parietais (celulose, hemicelulose e pectinas) pertencem ao grupo dos Entodiniomórficos (Ohryoscolecidae). Ingerem partículas vegetais ou grãos de amido, à excepção dos pequenos Entodinium. Foi possível evidenciar a produção de α -amilases em vários géneros (CLARKE, 1977); COLEMAM, 1980). Apesar de HUNGATE (1942) ter pela primeira vez demonstrado a digestão da celulose por ciliados "in vitro", este facto manteve-se, contudo, bastante controverso durante muitos anos. Actualmente, sustenta-se que pelo menos alguns géneros possuem propriedades celulolíticas (BONHOMME, 1973; BONHOMME-FLORENTIN, 1975; COLEMAN et al., 1976; DEHORITY, 1981 - inf. pessoal; JOUANY, 1978; COLEMAN, 1980; DEMEYER, 1981; WILLIAMS, 1982; BONHOMME et al., 1983; VANGYLSWIK e SCHWARTZ, 198.) (Quadro 2.3.). Na degradação das hemiceluloses e pectinas aparecem envolvidos vários géneros (CLARKE, 1977; COLEMAN, 1980; WILLIAMS, 1982; ABOU-AKKADA e HOWARD, 1961).

Os ciliados apresentam também uma forte actividade proteolítica (ABOU-AKKADA e HOWARD, 1962). Uma densa população de ciliados está muitas vezes associada a uma elevada concentração de NH_4 no conteúdo ruminal (JOUANY, 1978; JOUANY e SENAUD, 1982, 1983; CHRISTIANSEN et al., 1965). A sua acção proteolítica é particularmente forte sobre a fracção

Quadro 2.3. Os ciliados do retículo-rumen e o seu relacionamento com os substratos de natureza glucídica (adaptado de HUNGATE, 1966)

Família e Género	Substrato	Celulólise	Metabólitos ^a finais	Tempo médio de geração (h)
<u>Isotrichidae</u>				
<u>Isotricha</u>	Amido, açúcares	0	A, B, L, H ₂	48
<u>Dasytricha</u>	Maltose, açúcares	0	A, B, L, H ₂	24
<u>Ophryoscolecidae</u>				
<u>Entodinium</u>	Amido	+ ^b	F, A, P, B, (L)	6 - 15
<u>Diplodinium</u>	Amido	+ ^a		
<u>Ostracodinium</u>		+ ^a		
<u>Eudiplodinium</u>		+	H ₂	
<u>Polyplastron</u>	Amido	+		48

^a A = á. acético; B = á. butírico; L = á. láctico; F = á. fórmico; H₂ = hidrogénico; () = vestígios.

^b HUNGATE, 1978.

^c DEHORITY, 1981 - inf. pessoal.

proteica insolúvel da dieta (USHIDA e JOUANY, 1985) mas as suas necessidades proteicas são em grande parte garantidas pela ingestão de bactérias (COLEMAN, 1975; HUNGATE, 1978).

2.2.2.2.1. Implantação dos ciliados: O retículo-rumen do ruminante recém-nascido, apresenta-se em condições estéreis. Se por um lado as bactérias se desenvolvem e propagam rapidamente no tubo digestivo a partir do meio ambiente (MANN, 1963), os ciliados não surgem a colonizar o retículo-rumen senão na altura em que o animal passa do aleitamento à alimentação sólida com alimentos grosseiros. Contrariamente ao que se supôs durante alguns anos (GUNTHER, 1899; MANGOLD e LENKEIT, 1930; EBERLEIN, 1895; LIEBETANZ, 1910 - cit. por HUNGATE, 1966), os ciliados fazem a sua implantação no retículo-rumen dos jovens animais utilizando como fonte o contacto com os animais adultos (BECKER e HSIUNG, 1929 -

cit. por HUNGATE, 1966; EADIE, 1962; MANGOLD e RADEFF, 1930 - cit. por HUNGATE, 1966; WAELE e GENIE, 1943 - cit. por HUNGATE, 1966), ou através da ingestão de alimentos e água previamente contaminados por outros animais (FANTHAM, 1922 - cit. por HUNGATE, 1966; BONHOMME, 1973). A ruminação proporciona ao animal possuir uma grande quantidade de microorganismos na cavidade bucal (STRELKOW et al., 1933). Não foi possível até à data evidenciar qualquer forma de resistência (quisto ou esporo) nestas formas de ciliados, e também não existem ciliados vivos, quer nos alimentos, quer nas fezes dos animais (EADIE, 1962). Os ciliados que chegam à cavidade bucal no decurso da ruminação, são rapidamente inactivados no contacto com o ar. Por conseguinte, para que a transfaunação se realize, torna-se imprescindível o contacto directo entre os animais. É possível desta forma manter os animais sem a sua dotação de ciliados, mantendo-os fora do contacto uns com os outros (JOUANY, 1978).

Se bem que os ciliados têm imediato acesso ao retículo-rumen do jovem ruminante, a sua implantação não se realiza devido ao pH bastante ácido do conteúdo ruminal (PURSER e MOIR, 1959; EADIE, 1959), produto da intensa fermentação promovida por Lactobacillus sp. sobre o leite que casualmente penetra no retículo-rumen, por qualquer anomalia no desencadeamento do reflexo da goteira esofágica. Assim que o animal inicia a ingestão de forragem, sobem os valores de pH, por um lado devido à menor fermentabilidade deste tipo de substracto, por outro devido ao aumento da se-

creção salivar de características marcadamente alcalinas, tornando as condições gradualmente mais favoráveis para a colonização pelos ciliados. A pH 6,0 todos os Entodiniinae se podem implantar no retículo-rumen (EADIE, 1962; BRYANT e SMALL, 1960), e a pH 6,5 os Isotrichidae e os Diplodiniinae encontram as melhores condições para fazerem a sua implantação.

2.2.2.2.2. Factores que influenciam o nº de ciliados: O pH é factor de extrema importância no desenvolvimento da população de ciliados no retículo-rumen (HUNGATE, 1966). A valores de pH inferiores a 5,5, a população de ciliados é severamente bloqueada nas actividades fisiológicas, com especial relevância para os Isotrichidae e Diplodiniinae. Esta susceptibilidade dos ciliados à acidez do meio está patente nos trabalhos desenvolvidos por vários autores. Não são capazes de sobreviver senão a valores de pH compreendidos entre 5,5 e 8,0 (QUINN et al., 1962; CHRISTIANSEN et al., 1964). Experiências "in vitro" por nós realizadas têm vindo a confirmar aqueles resultados, pois que nunca foi possível manter populações Diplodiniinae em culturas a pH inferior a 5,5. Entre os Ophryoscolecidae são os Entodiniinae que melhor sobrevivem "in vitro" a valores de pH da ordem de 5,6, revelando a maior tolerância deste grupo a valores ácidos de pH, relativamente aos Isotrichidae (ABOU-AKKADA, et al., 1959). Em bovinos ingerindo "ad libitum" rações ricas em concentrado, a maioria dos ciliados desapareceu em virtude das condições desfavoráveis de pH, tendo apenas sobrevivido Entodinium em baixos números populacionais

(EADIE et al., 1970). Se o pH constitui o factor mais importante que condiciona o desenvolvimento das várias fracções da população microbiana do retículo-rumen (BRIGGS et al., 1957), é no entanto difícil estabelecer limites paramétricos para o factor pH. Assim EADIE et al. (1970) encontraram uma densa população de ciliados com valores de pH inferiores a 6,0. PURSER e MOIR (1959), trabalhando com ovinos, encontraram populações de ciliados em números da ordem de 3×10^5 /ml a pH 5,3, e $6,2 \times 10^5$ /ml a pH 5,9. Existem concerteza outros factores (relação N/energia?) a condicionar o desenvolvimento dos ciliados e que interagem com os valores de pH.

A dieta na sua composição química, da dieta pode modificar qualitativamente a população microbiana do retículo-rumen, conferindo valores de pH que podem favorecer ou inibir algumas espécies. Com efeito, os alimentos ricos em glúcidos facilmente fermentáveis, usualmente baixam os valores de pH, contrariamente ao que sucede com as forragens grosseiras em que os glúcidos são fundamentalmente de natureza estrutural, em que a fermentação se desenvolve a uma taxa bastante mais reduzida, fornecendo valores de pH mais elevados (EADIE e HOWARD, 1963). Os alimentos intervêm directamente na selecção das espécies em função da sua natureza e das necessidades nutricionais dos ciliados, ou da sua capacidade para digerir os substractos presentes (JOUANY, 1978). O Quadro 3 expressa as preferências que os ciliados manifestam em relação aos substractos de natureza glucídica.

As variações populacionais determinadas pelo alimento, também podem ser de natureza quantitativa. Normalmente, dietas equilibradas e fornecidas "ad libitum", desenvolvem populações bastante densas. O nível de proteína na dieta é determinante para a manutenção duma densa população de ciliados (FERBER, 1928 - cit. por HUNGATE, 1966; MOWRY e BRCKER, 1930). Os ciliados, conforme já referido, manifestam uma actividade proteolítica importante (WILLIAMS et al., 1961; MAH, 1962; MICHALOWSKI, 1975), mas uma parte importante das suas necessidades em azoto, é assegurada pela predação sobre as bactérias (COLEMAN, 1975).

A disponibilidade em energia sob a forma de glúcidos facilmente fermentáveis, é decisiva para o desenvolvimento de grandes populações de ciliados (NAKAMURA e KANEGASAKI, 1969; ABE et al., 1973; BONHOMME e DURAND, 1974; FAUCONNEAU e GAUSSERES, 1961).

A forma sob a qual o alimento é apresentado, também é importante no desenvolvimento das populações de ciliados. Os ciliados desaparecem do retículo-rumen, ou dificilmente se implantam, quando a dieta é fornecida ao animal sob a forma de aglomerados ou finamente moída (KANE e LAWLOR, 1969), talvez devido ao aumento da taxa de diluição do conteúdo ruminal, que se torna superior ao tempo médio de geração dos ciliados (CHRISTIANSEN, 1963; CHRISTIANSEN et al., 1964). GIESECKE et al. (1966) observaram grandes populações de ciliados no retículo-rumen de animais alimentados sem qualquer restrição, com dietas constituídas

por forragens grosseiras e concentrado sob a forma de aglomerados. Os mesmos autores verificaram também, que os ciliados desapareciam quando os animais eram alimentados com rações semi-sintéticas, à base de celulose, apresentando o retículo-rumen uma baixa taxa de diluição.

Os Entodiniinae desenvolvem a sua máxima expressão populacional, quando os animais ingerem dietas ricas em amido (ABOU-AKKADA et al., 1969; JOUANY, 1978). Contrariamente, as dietas à base de forragem grosseira desenvolvem populações muito pouco expressivas, mesmo quando o teor em N é elevado (GIESECKE et al., 1966; NAKAMURA e KANEGASAKI, 1969). Os Diplodiniinae aparecem normalmente associados com as rações de composição mista, mas onde a componente fibrosa é importante. Os Isotrichidae desenvolvem-se de uma forma exuberante quando os animais ingerem forragens verdes, muito ricas em azoto e glúcidos solúveis (MARINHO, 1983).

A Influência da região geográfica constitui factor na distribuição das espécies de ciliados; senão todas pelo menos algumas, parece estar influenciada pela localização geográfica. Em algumas regiões do Globo tem sido constatado, que o rumen de ovinos não inclui na sua dotação de ciliados o género Isotricha (PURSER e MOIR, 1959), se bem que WARNER (1966) em ovinos na Austrália, conseguiu identificar este género. EADIE (1957, cit. por HUNGATE, 1966) nunca conseguiu observar o género Ophryoscolex nos carneiros do Norte da Escócia, da mesma forma não aparecendo no rumen de animais provenientes de algumas regiões da Nova Zelândia (OXFORD, 1958; CLARKE, 1964) e Austrália (PURSER, 1961; WARNER, 1964).

Buetchlia parva e Charon equi aparecem no rumen de carneiros da Nova Zelândia (CLARKE, 1964). A primeira foi também observada nos Estados Unidos (DEHORITY, 1970) e em Portugal em ovinos Merino Branco do Alentejo (MARINHO, 1983), não constando na literatura científica, que tenha sido observado em outras regiões do Planeta.

A ausência de contacto entre algumas comunidades de ruminantes por afastamento geográfico, talvez constitua a verdadeira explicação para o condicionamento geográfico na distribuição das populações de ciliados. De facto, foi possível identificar Diplodinium dogieli em ovinos Merino Branco do Alentejo (MARINHO, 1983), quando este exemplar apenas foi isolado em ruminantes selvagens no Ártico (LUBINSKY, 1958; DEHORITY, 1974_a e 1974_b). Ophryoscolex sp. foi observado em vacas Holando-Portuguesas, não aparecendo em bovinos da raça Alentejano, coabitando na mesma exploração (MARINHO, 1984 - não publicado). Alguns autores associam as diferenças na nutrição dos animais, com a distribuição dos ciliados. Ophryoscolex sp. é associado com a ingestão de luzerna verde e não com o feno de gramíneas (MAH, 1962 e 1964). Epidinium sp. aparece em quantidades importantes no retículo-rumen de bovinos alimentados com trevo vermelho em verde (OXFORD, 1958).

Se a distribuição geográfica e as diferenças alimentares parecem fornecer indicações justificando a diferente distribuição dos ciliados, parece-nos no entanto, que o contacto entre os animais é o grande determinante dessa

distribuição.

O Tempo decorrido após a ingestão alimentar influencia as várias espécies de ciliados, apresentando cada uma o seu padrão típico de desenvolvimento, que depende de vários factores (JOUANY, 1978):

- ingestão alimentar;
- tempo de geração ou divisão celular;
- taxa de diluição do retículo-rumen;
- competição entre espécies.

Não são muitos os trabalhos publicados versando a evolução postprandial da densidade dos ciliados. Contudo, o padrão de comportamento é diferente para os Isotrichidae e os Ophryoscolecidae (JOUANY, 1978).

Em ovinos alimentados convencionalmente uma só vez ao dia com feno de cereal imaturo e luzerna (50/15), o número de Dasytricha sp. diminuiu regularmente durante as 20 horas após a refeição, aumentando rapidamente nas 4 horas seguintes, atingindo o pico populacional antes da refeição seguinte (PURSER, 1961). Evoluções semelhantes de Dasytricha e em geral para os Isotrichidae foram obtidas com rações da mesma natureza, suplementadas com óleo de linhaça, distribuídas também por uma refeição diária (PURSER e MOIR, 1966; WARNER, 1966). Se bem que WARNER (1962) mostre que o aumento de Dasytricha nas 4 horas que precedem a refeição se deve a uma troca brusca no número de células em divisão, para JOUANY (1978) parece pouco provável que se produzam tantas divisões em tão curto espaço de tempo, aliás opinião sustentada também por WARNER (1962), que sugere a existência de zonas

preferenciais para a concentração destas formas de ciliados, devido à manifesta heterogeneidade do seu conteúdo (LAMPLA e POUTIAINEN, 1966). BYNE et al. (1957) e PURSER e MOIR (1959) testaram esta hipótese e não encontraram qualquer diferença significativa na concentração de ciliados, em amostras colhidas em diferentes zonas do retículo-rumen. DEHORITY e PURSER (1970) fazem referência e evidenciam zonas e mecanismos de sequestração desenvolvidos pelos Isotrichidae, que lhes permite desta forma ajustarem o seu tempo de geração à taxa de diluição do conteúdo ruminal. HARMEYER e MICHALOWSKI (1986 - inf. pessoal) sugerem a eventual participação das diferenças de potencial eléctrico existentes na mucosa do retículo-rumen, no mecanismo de sequestração, uma vez que os ciliados apresentam mobilidade electroforética (NOIROT-THIMOTHÉ, 1962).

Os Ophryoscolecidae, particularmente os Entodiniinae, manifestam um padrão de comportamento diferente. Em ovinos alimentados uma vez ao dia com feno de cereal imaturo e luzerna, a população de Entodinium diminuiu imediatamente após a refeição, atingindo os valores mais baixos 3 - 8 horas após a refeição, para posteriormente aumentar até às 24 horas (WARNER, 1962 e 1966; PURSER e MOIR, 1966; MICHALOWSKI, 1975). Este fenómeno é fundamentalmente consequência das modificações fisiológicas no retículo-rumen, com especial destaque para o volume e diluição do seu conteúdo (PURSER e MOIR, 1959; PURSER, 1961).

O número de refeições provoca na população de cili-

um comportamento diferente, consoante a dieta é fornecida de uma só vez, ou repartida ao longo das 24 horas (MOIR e SOMERS, 1956). Com efeito, ovinos alimentados com uma ração composta por uma mistura de forragem grosseira e concentrado, distribuída por 4 refeições, apresentaram uma população média de ciliados de $3,1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, quando a mesma ração fornecida de uma só vez, produziu uma população média de ciliados de $1,1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$. No entanto, se a ração for demasiado repartida (24 refeições) ou fornecida de uma só vez, a densidade média populacional não apresenta diferenças significativas (GRAIN et al., 1975; SENAUD et al., 1977). Contudo, a distribuição por três refeições, aumenta significativamente a população (JOUANY, 1978).

A compatibilidade entre espécies constitui outro factor que influencia o desenvolvimento das populações de ciliados no retículo-rumen. De facto algumas espécies de ciliados manifestam antagonismo em relação a outras espécies (MARINHO, 1983; OGIMOTO e IMAI, 1982). Foi Eadie (1962 e 1967) quem, pela primeira vez, estudou este tipo de relacionamento na biocenose retículo-ruminal, postulando o agrupamento dos Ophryoscolecidae em dois grandes grupos (A e B), de acordo com as suas afinidades. IMAI et al. (1979), estudando a interrelação dos ciliados apresentada por EADIE, sofisticaram e acrescentaram mais 2 grupos, de acordo com o Quadro 2.4..

Os inóculos dos dois tipos são instáveis, e quando misturados, dão origem a uma população em que o tipo A é dominante. Se bem que a população de tipo A é a que aparece

mais frequentemente associada com o rumem de ovinos (EADIE, 1962), observações realizadas em ovinos Merino Branco do Alentejo, contrariamaquela afirmação, já que o tipo B foi o mais frequente nestes animais (MARINHO, 1983). Em bovinos, a população mais frequente é a de tipo B (EADIE, 1962; ABOU-AKKADA, 1969; MARINHO, 1984 - não publicado).

Quadro 2.4. - Os vários tipos de combinação que os ciliados do reticulo-rumen podem apresentar e espécies neles envolvidos (OGIMOTO e IMAI, 1981)

	Tipo A	Tipo B	Tipo C
Típico	<u>Polyplastron multivesiculatum</u> <u>Diploplastron affine</u>	<u>Epidinium ecaudatum eucaudatum</u> <u>Epidinium ecaudatum caudatum</u> <u>Eudiplodinium maqii</u>	<u>Elytroplastron bubali</u>
Espécies mais relacionadas	<u>Ophryoscolex caudatus</u> <u>Enoploplastron triloricaatum</u> <u>Dasytricha ruminantium</u> <u>Entodinium exiquum</u> <u>Entodinium bursa</u>	<u>Eremoplastron sp.</u>	
Espécies comuns	<u>Isotricha spp.</u> , <u>Charonina spp.</u> , <u>Entodinium spp.</u> , <u>Diplodinium spp.</u> , <u>Eremoplastron rstratum</u> , <u>Eodinium posterovesiculatum</u> , <u>Ostracodinium spp.</u>		

Estas incompatibilidades, ou complementaridades, podem ser explicadas pela competição nutricional, uma vez que os nutrientes necessários ao crescimento dos ciliados são os mesmos entre as espécies (BROWN, 1964 - cit. por JOUANY, 1978), ou através de fenómenos de canibalismo (LUBINSKY, 1957).

2.2.2.2.3. Importância dos ciliados para o ruminante: BRUGGEMANN et al. (1965) em observações efectuadas no conteúdo reticulo-ruminal de ruminantes selvagens (cabrito-montês) constataram a inexistência de protozoários ciliados, o que lhes confere o estatuto de não essenciais, pelo menos em

algumas situações. Existem contudo indicações de que o rumen com ciliados é muito mais estável (HUNGATE, 1978).

Estimativas da quantidade de azoto microbiano contida nos ciliados indicam que os ciliados se equiparam às bactérias, como fonte de azoto para o ruminante (HUNGATE et al., 1971; HUNGATE, 1978). A sua contribuição para a economia proteica do ruminante varia de acordo com as condições da dieta ingerida pelo animal (Quadro 2.5.). O valor biológico da proteína dos ciliados é, no entanto, superior ao das bactérias.

Quadro 2.5. Proporção da biomassa (B.P.) ou do azoto (A.P.) dos ciliados na biomassa (B.T.M.) ou no azoto microbiano total (A.T.M.) ao nível do rumen e do duodeno (JOUANY, 1981).

Animais	Regimes	B.P. no B.T.M. do rumen	B.P. no B.T.M. do duodeno	A.P. no A.T.M. do duodeno
carneiros	semi-purificado	0,50	0,28	0,27
carneiros	luzerna fenada	0,46	-	-
carneiros	forragem fenada	-	0,27	-
carneiros	forragem verde	-	-	0,06
bovinos	forragem fenada	0,49	0,28	0,16
bovinos	cevada	0,78	0,59	0,55
bovinos	concentrado	0,87	-	-

Se isto valoriza a sua presença no ecossistema, também deve ser acentuado que a conversão da proteína bacteriana em proteína protozoária, interpõe mais um elo na cadeia alimentar até ao ruminante, e que em cada passo na cadeia alimentar a quantidade de proteína assimilada pelo predador é inferior à da população total. Isto traduz

exactamente uma perda no rumen, quando as bactérias são ingeridas pelos ciliados. O valor líquido da proteína dos ciliados constitui, provavelmente, o resultado da sua superior qualidade e menor quantidade, e de acordo com as circunstâncias, o efeito líquido dos protozoários pode ser neutro, ligeiramente positivo ou ligeiramente negativo (HUNGATE, 1978).

A presença dos ciliados também se faz sentir quando se trata da digestão dos materiais celulósicos. A actividade celulolítica do conteúdo retículo-ruminal é implementada com a implantação dos ciliados no retículo-rumen desfaunado (JOUANY, 1981). Segundo o mesmo autor este efeito é devido principalmente a um aumento da actividade celulolítica das bactérias nos animais faunados, que ingerem dietas muito celulósicas; no caso em que os animais ingerem alimentos concentrados ou succulentos, o aumento da celulólise é devido à intervenção directa dos ciliados (Quadro 2.6.). Já foi possível evidenciar a existência de uma celulase no endoplasma dos ciliados (JOUANY, 1982). Esta celulase tem um pH óptimo de funcionamento diferente do pH exigido pelas celulases bacterianas. Aquela celulase poderia ser de proveniência bacteriana, bactérias simbiotes que vivem no interior do saco gástrico dos ciliados. A observação microscópica dos protozoários permitiu evidenciar a presença de túbulos fixados às membranas dos vacúolos, no interior das quais vivem as bactérias simbiotes (JOUANY, 1981). Segundo o mesmo autor estes poderiam concentrar as celulases bacterianas, as quais actuariam seguidamente sobre o

substrato celulósico ingerido pelo ciliado. O estado latente deste enzima, apesar da elevada actividade a pH ácido, mostra que provavelmente está localizada numa zona precisa do citoplasma (vacúolos digestivos) e que é secretada por organitos celulares especializados denominados "lisosomas".

Quadro 2.6. Influência dos ciliados do retículo-rumen na digestibilidade (CUD) da lenhinacelulose e actividade celulolítica das bactérias (A.C.) em ovinos ingerindo dietas diferentes (JOUA-NY e SENAUD, 1981).

Animais	Medições	Dieta à base de				
		Celulose	Amido	Inulina	Sacarose	Lactose
desfaunados (sem ciliados)	CUD	68,8 ^a	55,6 ^a	66,4 ^a	62,5 ^a	55,4 ^a
	A.C.	38,3 ^a	27,3 ^a	29,9 ^a	28,4 ^a	28,1 ^a
faunados (com uma fauna convencional)	CUD	71,1 ^b	60,0 ^b	68,7 ^b	69,2 ^b	58,4 ^b
	A.C.	41,0 ^b	21,1 ^b	26,2 ^b	26,8 ^b	23,2 ^b

(Os valores com letras em índice superior diferem significativamente a $P < 0,05$).

Quando os animais ingerem rações ricas em energia, os ciliados podem conferir ao ecossistema retículo-ruminal uma forte acção tamponizante, retardando a taxa de digestão dos glúcidos facilmente fermentáveis (WILLIAMS, 1982). Um terço dos glúcidos consumidos pelo animal são convertidos em amilopectina pelos ciliados, e o nivelamento da actividade fermentativa retículo-ruminal é de todo o interesse para o animal, uma vez que o período da actividade metabólica (WILLIAMS, 1982).

Os ciliados manifestam uma grande contribuição no metabolismo do ácido láctico no retículo-rumen,

independentemente de o ácido ser de natureza endógena ou exógena. Isto sugere que talvez as disfunções digestivas em consequência da acumulação de ácido láctico, podem ser minimizadas através da manutenção de uma população de ciliados bastante activa. Ciliados isolados a partir de animais ingerindo silagem, ingerem 10 a 20 vezes mais ácido láctico que a fracção bacteriana (NEWBOLD et al., 1982). CHAMBERLEIN et al.(1983) referem que a desfaunação provoca uma redução na taxa de desaparecimento do ácido láctico do reticulo-rumen, quando lhes são administradas intrarruminalmente doses de 50 g de ácidos D- e L-láctico. Os animais faunados apresentaram taxas de desaparecimento mais elevadas para o ácido láctico, com doses de 100 g/dia, conforme se pode observar na Fig.2.1.(NEWBOLD et al., 1986). Segundo os mesmos autores a variação nas concentrações de ácido L-láctico variam de acordo com o facto de os animais estarem faunados, desfaunados ou terem sido novamente faunados (Fig.2.2.). Nos animais desfaunados os níveis atingiram um pico 2 h após a ingestão e mantiveram-se elevados durante todo o período de amostragem. Nos animais faunados, no entanto, as concentrações de ácido láctico atingiram um pico dentro de 1 h após a ingestão e rapidamente baixaram.

Na presença de ciliados, as concentrações de AGVs no reticulo-rumen aumentaram com o incremento na dosificação do ácido láctico, não se tendo verificado o mesmo nos animais desfaunados (NEWBOLD et al., 1986). Segundo os mesmos autores

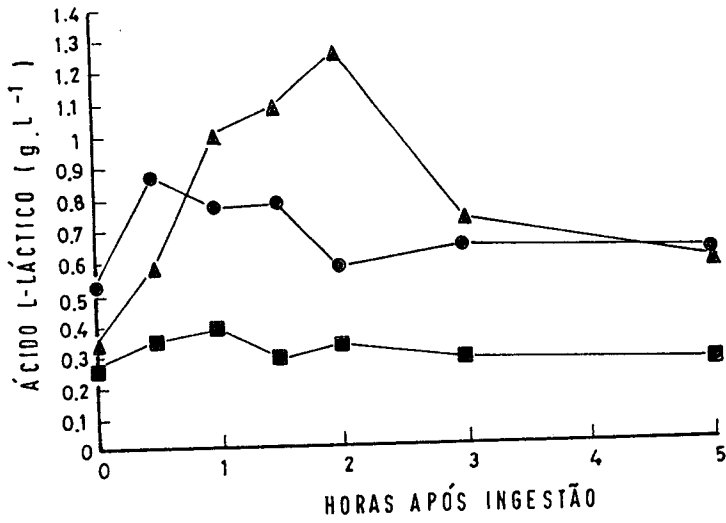


Fig.2.1. Concentrações no reticulo-rumen de ácido L-láctico em ovinos: (■), faunados; (▲), desfaunados e (●), refaunados.

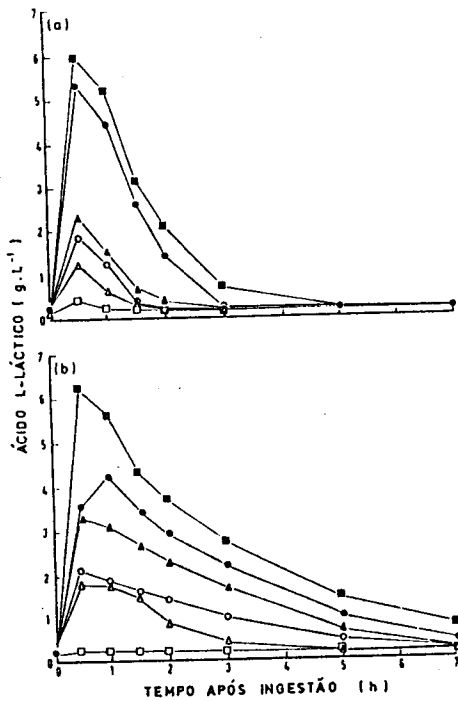


Fig.2.2. Concentrações de ácido L-láctico no reticulo-rumen de (a) ovinos faunados e (b) desfaunados, após a infusão intraruminal com (□), 0; (△), 20; (○), 40; (▲), 60; (●), 80; e (■), 100 g. dia⁻¹ de D, L-lactato de sódio.

a adição de ácido láctico aos animais faunados provocou um aumento nas proporções molares de ácidos propiónico e butírico, o mesmo não acontecendo nos animais desfaunados em que apenas se verificou um ligeiro aumento nas concentrações de ácido butírico, acordando com as observações feitas por outros autores (CHAMBERLAIN et al., 1983; KELLY e THOMAS, 1978; MORGAN e L'ESTRANGE, 1976; SENEL e OWEN, 1966).

A presença ou ausência de ciliados no retículo-rumen pode ser indicador útil do estado nutricional do hospedeiro. A sua ausência constitui, ou pode constituir, manifestação da ocorrência de qualquer perturbação no processo digestivo do hospedeiro ruminante (HUNGATE, 1978).

2.2.3. Outros microorganismos - A biocenose retículo-ruminal não se circunscreve apenas aos protozoários e bactérias. Outros grupos de microorganismos têm vindo a ser identificados que, senão de uma maneira directa, pelo menos indirectamente concorrem para o "pool" metabólico do ecossistema.

2.2.3.1. Fungos - De há muito que se conhecia a existência de leveduras no conteúdo ruminal, nomeadamente espécies pertencentes aos géneros Candida e Trichosporum (HUNGATE, 1966; LUND, 1974). O carácter estritamente aeróbio apresentado pelos fungos em geral, nada faria supor a possibilidade de o retículo-rumen, fortemente anaeróbio, poder reunir condições para o seu desenvolvimento. Foi ORPIN (1975 e 1977) quem, pela primeira vez, demonstrou que alguns flagelados, reconhecidos como protozoários, eram de facto zoósporos de fungos da classe Phycomycetes, de tipo

respiratório anaeróbio. Estes, apresentam-se em grandes populações no retículo-rumen de bovinos e ovinos ingerindo grandes quantidades de fibra (BAUCHOP, 1975, 1979 e 1981; SOETANO et al., 1985; JOBLIN, 1981; PRESTON e LENG, 1986; VAN GYLSWIK e SCHWARTZ, 1986; GULATI et al., 1985). Este grupo de microorganismos exerce um papel não negligenciável na degradação dos poliholósidos parietais (BAUCHOP, 1981; ORPIN, 1984; SOETANO et al., 1986). A erosão das partículas da ingesta pelos fungos, abre caminho à colonização dos materiais celulósicos pelas bactérias, tornando-os importantes iniciadores da clivagem fermentativa dos componentes insolúveis da parede celular, diminuindo desta forma o tempo de latência na digestão da fibra (PRESTON e LENG, 1986). O seu ciclo vegetativo está perfeitamente retratado na Fig.2.3.

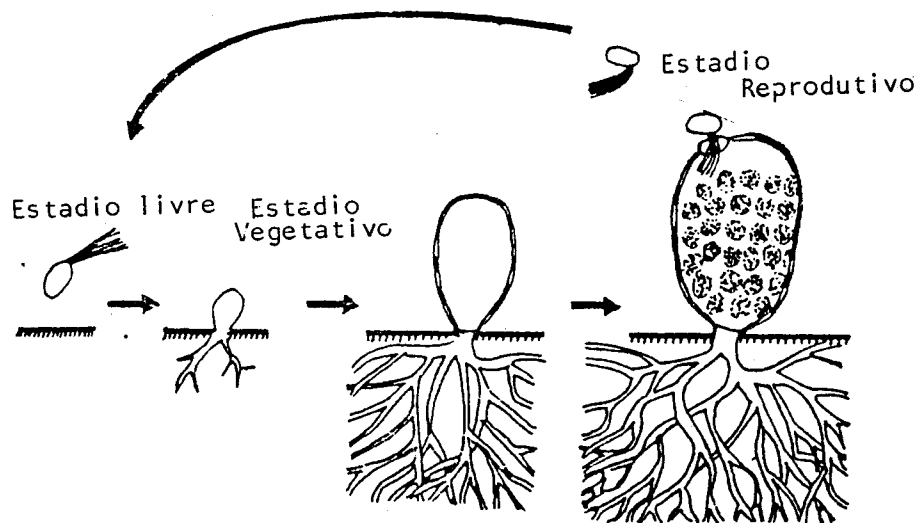


Fig. 2.3. - Ciclo vegetativo de um fungo anaeróbico do retículo-rumen (BAUCHOP, 1981).

As espécies de fungos isoladas no conteúdo retículo-

ruminal de ovinos incluem, Neocallimastix frontalis, Piromonas communis e Sphaeromonas communis (ORPIN, 1975 e 1977). N. frontalis foi integrado na Família Neocallimasticeae, na Ordem Spizellomycetales, Classe Chytridomycetes (HEATH et al., 1983 - cit. por LOWE et al., 1985).

2.2.3.2. Micoplasmas - HUNGATE (1966) descreveu um microorganismo de tipo respiratório estritamente anaeróbio, isolado a partir do conteúdo ruminal, com actividade citoclástica em relação às bactérias. Este organismo foi caracterizado posteriormente como Mycoplasma (ROBINSON e HUNGATE, 1973), tendo já sido descritas até hoje duas espécies: Aneroplasma blastoclasticum e Anaeroplasma ablastoclasticum (ROBINSON et al., 1975_a e 1975_b; ROBINSON, 1979). O seu número varia entre 10^5 - 10^7 unidades viáveis /grama de conteúdo ruminal (ROBINSON, 1979). O seu papel no retículo-rumen não é, no entanto, conhecido mas, apesar da sua pequena dimensão populacional relativamente à população bacteriana, os micoplasmas contribuem para o "pool" dos produtos da fermentação microbiana (ROBINSON, 1979).

2.2.3.3, Bacteriófagos - Estudos efectuados com o microscópio de transmissão (MET), revelaram a presença de bacteriófagos no retículo-rumen. Conhecem-se hoje 125 tipos morfológicamente distintos (RITCHIE et al., 1970), e mais de 65 espécies bacterianas ruminais foram observadas contendo fagos no interior do seu citoplasma (CHURCH, 1979). Estes bacteriófagos possuem capacidade lítica em relação a Streptococcus bovis (IVERSON e MILLIS, 1977), Bifidobacterium

thermophilum (MATTEUZI e SOZZI, 1971) e os Eadie's oval (ORPIN e MUNN, 1974). Os bacteriófagos temperados e virulentos, podem exercer um papel importante na ecologia do retículo-rumen (THIVEND et al., 1985). Após infecção por um fago virulento, uma espécie bacteriana pode tornar-se subdominante. A sua acção poderá, no entanto, ser compensada pela proliferação de uma outra espécie não susceptível, capaz de ocupar o mesmo nicho ecológico. Em contrapartida, a indução não específica de fagos temperados, por exemplo através de um factor presente na ração, pode trazer consigo o desaparecimento de várias espécies e ter assim, um efeito negativo no balanço das fermentações e sobre o animal.

2.3. LOCALIZAÇÃO DOS MICROORGANISMOS NO RETÍCULO-RUMEN

Experiências com o "Rusitec" (CZERKAWSKI, 1977; CZERKAWSKI e BRENKENRIDGE, 1979_a e 1979_b) evidenciaram a existência de uma verdadeira compartimentação no interior do retículo-rumen que, dirige a distribuição espacial da micropopulação no interior do retículo-rumen. CZERKAWSKI distribui os microorganismos por 4 compartimentos (Tabelas 2.1. e 2.2.) que se encontram perfeitamente interrelacionadas.

O fluxograma da Fig. 2.4., representa um modelo conceptual simplificado do retículo-rumen, com um sistema básico de 4 compartimentos e o seu interrelacionamento funcional.

O compartimento - 1 é definido pelo líquido retículo-ruminal; o compartimento-2, o líquido nas imediações das partículas alimentares; o compartimento-3, é definido pela

TABELA 2.1
Propriedades dos compartimentos no modelo de 4-compartimentos
do reticulo-rumen (CZERKAWSKI, 1979)

	Compartimento			
	4	1	2	3
Propósito geral	Controle dos "inputs" e "outputs" do sistema		Controle da sequestração dos componentes particulados	
Papel particular	Controle Estratégico	Meio Transporte	Serviço de Transporte	Degradação da fibra
Influência sobre o hospedeiro	Forte	Relativamente forte	Alguma influência	Muito pouca influência

superfície e interior do material particulado; e compartimento 4 definido pela mucosa do reticulo-rumen.

2.3.1. Bactérias - No reticulo-rumen as bactérias distribuem-se por três biótopos distintos (CHENG e COSTERTON, 1980). Podem encontrar-se livres no fluido reticulo ruminal (comp. 1 e 2) ou fixadas, quer sobre as partículas alimentares (comp. 3), quer sobre o epitélio da mucosa do reticulo-rumen (comp. 4). Algumas espécies bacterianas podem ainda colonizar a superfície exterior dos protozoários ciliados (IMAI e OGIMOTO, 1978; OGIMOTO e IMAI, 1981; IMAI e TSUNODA, 1972; KRUMHOLZ et al., 1983).

As bactérias livres no fluido reticulo-ruminal podem apresentar-se rodeadas por uma estrutura fibrosa de natureza poliholosídica, conhecida por glicocálix (CHENG e COSTERTON, 1980) de complexidade variável e extensível (Fig. 2.5.). No interior desta estrutura as bactérias vivem em microcolónias, onde as células são perfeitamente idênticas (CHENG e COSTERTON, 1980). É bem possível que o glicocálix funcione como uma barreira defensiva contra a acção dos bacteriófagos

TABELA 2.2.

Papel dos 4 compartimentos básicos no rumen. Sumário de alguns processos importantes que influenciam o metabolismo do N no rumen (CZERKAWSKI, 1979)

Compartimento	Processo	Efeito
4 (estratégico)	(a) Actividade ureásica poderosa	Controle da relação NH_4^+ /ureia
	(b) Decomposição dos tecidos danificados	Mais N-não proteico caso seja necessário
	(c) Utilização de O_2 pelas bactérias facultativas	Manutenção da anaerobiose e mais poder redutor para a biossíntese
1 (transporte)	(a) Indução da urease	Controle secundário da relação NH_4^+ /urease
	(b) Rápida produção de N solúvel	Fornecimento adicional de N aos compartimentos 2 e 3
	(c) Fluxo e diluição	Fornecimento equilibrado de proteína
2 (vaivém)	(a) Fluxo intercompartimental	Fornecimento de NNP e enzimas ao compartimento 3 e remoção de produtos do compartimento 3
	(b) Passagem da digesta sólida	Grande fornecimento de proteína, intermitentemente. Provável envolvimento na ruminação.
3 (degradação)	(a) Sequestro de matéria microbiana	Aprisionamento de proteína para a função digestiva
	(b) Ataque a partir do interior e lise	Manutenção da estrutura e fornecimento de enzimas hidrolíticos, degradação eficiente da fibra.

e outros agentes antibacterianos (OGIMOTO e IMAI, 1981).

2.3.1.1. Bactérias aderentes às partículas alimentares:

A utilização do microscópio electrónico de exploração (MEE) e do microscópio electrónico de transmissão (MET) na observação

das partículas alimentares do conteúdo retículo-ruminal, revelou a existência de um vasto consórcio bacteriano estreito-

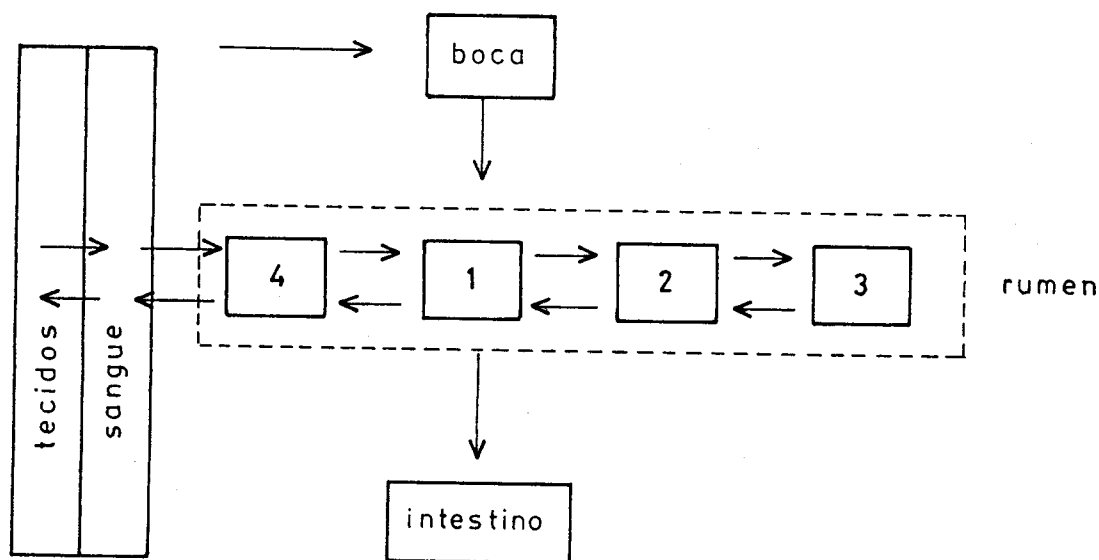


Fig. 2.4. Modelo conceitual do retículo-rúmen como um sistema básico de 4 compartimentos. Condições particulares não aplicáveis durante a ruminaco. Compartimentos 1, 2, 3 e 4 são definidos no texto. (CZERKANSKI, 1979).

tamente relacionado com a sua digestão (CHENG e COSTERTON, 1980; CRAIG et al., 1984 e 1987). HUNGATE (1966) destaca a importância da flora associada com as partículas alimentares, ao separar a actividade fermentativa da fracção fluida, da actividade fermentativa das partículas no mesmo contudo (Fig.2.6.).

FORSBERG e LAM (1977), evidenciaram que 75% do ATP microbiano detectado no contudo retículo-ruminal, estava associado com a fracção particulada. MINATO et al.(1966), ao estudarem estas bactérias removidas das partículas por lavagem com solução salina e Tween 80, mostraram que cerca de metade das bactérias estavam associadas com as

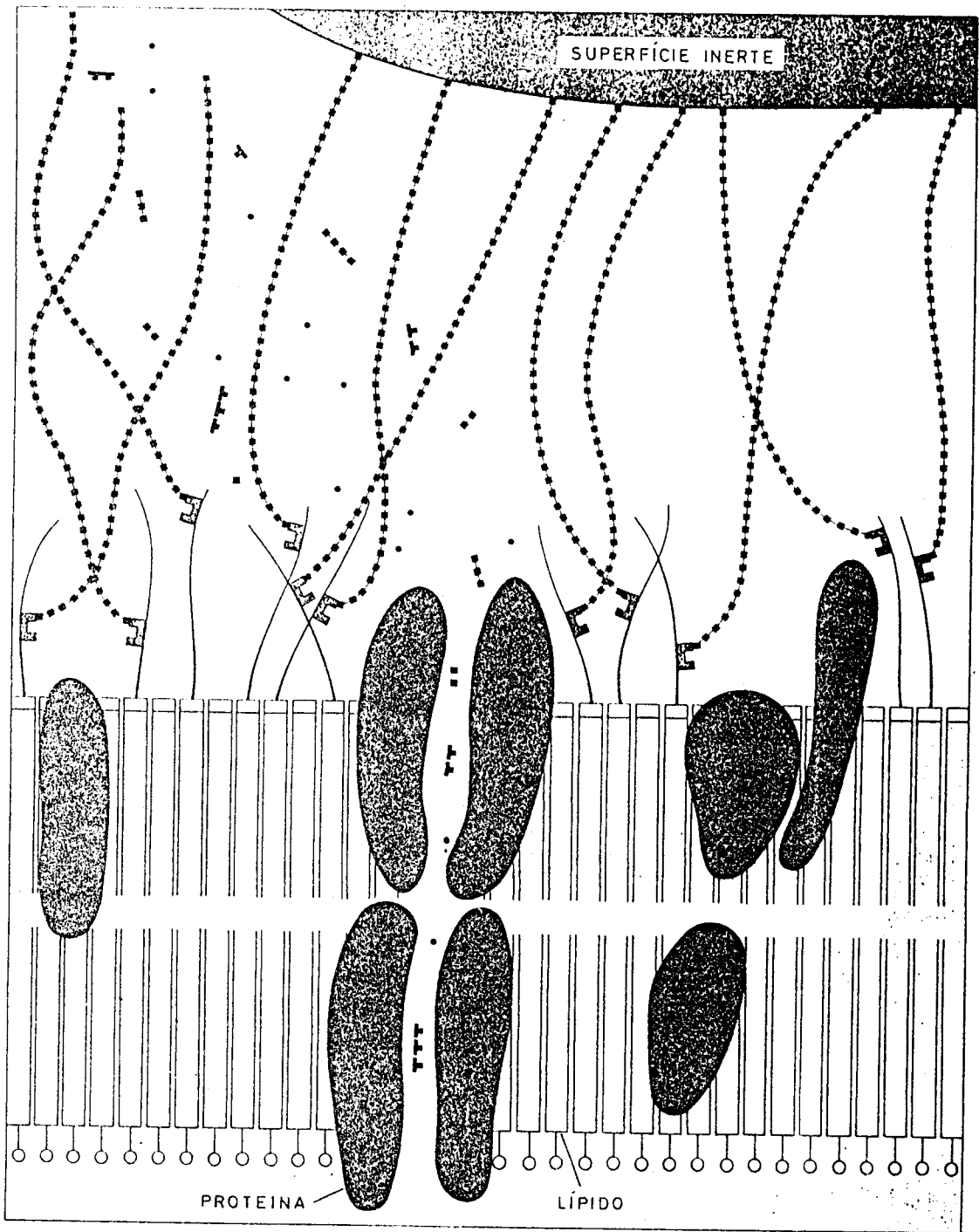


Fig. 2.5. Estrutura e organização do glicocálice, onde se pode ver a membrana lipopolissacarídica, na organização da parede celular bacteriana, em estrutura de mosaico fluido (LEHNIMBER, 1978) onde as proteínas estão incluídas. As moléculas lipopolissacarídicas (estruturas pilosas) estendem-se a partir da membrana. O glicocálice está representado por uma massa de longas cadeias de fibras polissacarídicas (cadeias de quadrados) (COSTERTON et al., 1978).

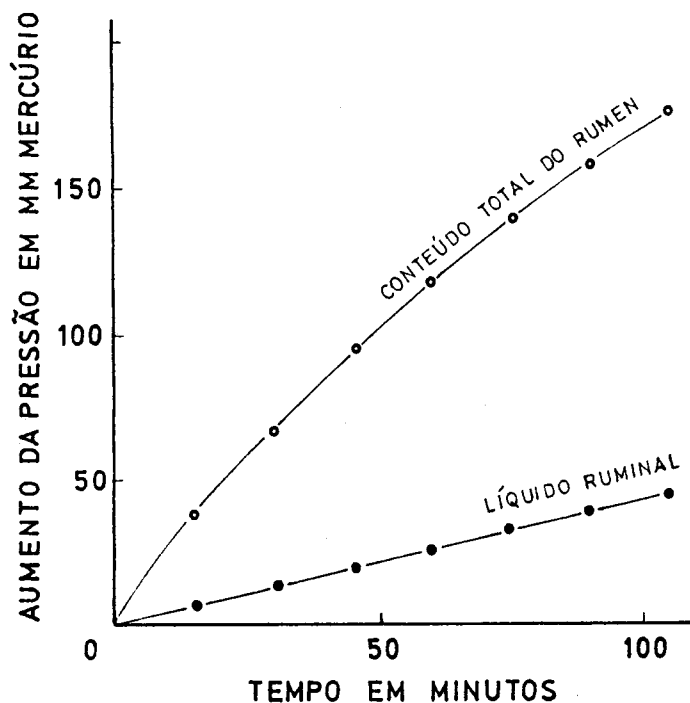


Fig. 2.6. Taxas de fermentação relativas pelo líquido ruminal e pelo conteúdo ruminal na presença de feno de luzerna. 10 g de material ruminal, 20 ml de solução mineral equilibrada, e 1 g de feno de luzerna moído em cada fermentador. Temperatura: 39°C. Volume do fermentador: 110 ml (HUNGATE, 1965).

partículas. Este facto, coloca à partida um grande criticismo relativamente aos métodos de amostragem do conteúdo retículo-ruminal, particularmente quando os animais se encontram munidos de cânulas com diâmetro inferior a 5 cm (TALJARD, 1972).

A introdução no retículo-rumen de um polímero como a celulose e o amido, é seguida da sua rápida colonização por um número limitado de bactérias substracto-específicas (BAKER, 1950; HAMLIN e HUNGATE, 1956; HUNGATE, 1966). Esta colonização foi possível demonstrar em culturas puras de Ruminococcus albus, Ruminococcus flavefaciens e Bacteroides

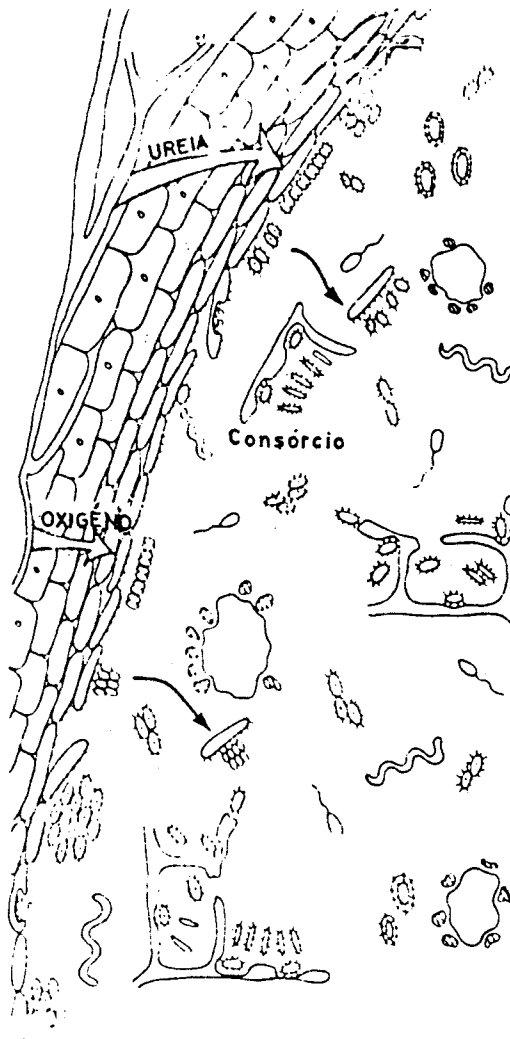


Fig. 2.7. Representação diagramática das três populações de bactérias ruminais, as espécies ureásicas facultativas que aderem à parede do rúmen e entram para o fluido rúmen com as células epiteliais danificadas, as espécies que aderem às partículas alimentares formando por vezes consórcios estruturais, e aquelas que proliferam no fluido rúmenal (CHENG e COSTERTON, 1980).

succinogenes, utilizando celulose e paredes celulares vegetais (LATHAM et al., 1978_a e 1978_b; LEATHERWOOD, 1973; MINATO e SUTO, 1978; PATTERSON et al., 1975; STEWART et al., 1979 - cit. por CHENG e COSTERTON, 1980) e de Bacteroides amylophilus sobre amido purificado (BAKER et al., 1950; HAMLIN e HUNGATE, 1966; HUNGATE, 1966). A ligação bactéria-

partícula é realizada pela estrutura do glicocálice (CHENG e COSTERTON, 1981). Com a utilização de "nylon-bags" colocados no interior do retículo-rumen, foi possível evidenciar não só taxas de fermentação diferentes, como também a intervenção de consórcios bacterianos diferentes, em diferentes tipos de paredes celulares vegetais, em folhas de Lolium perenne ou L. multiflorum (DINSDALE et al., 1978). A maior parte dos enzimas produzidos pelas bactérias ruminais, estão essencialmente localizados na estrutura fibrosa polissacarídica do glicocálice (CHENG e COSTERTON, 1981). Esta estreita associação das celulases e possivelmente amilases com a estrutura do glicocálice, impediria a perda destes enzimas por difusão num meio tão móvel como o conteúdo retículo-ruminal (COSTERTON et al., 1974).

2.3.1.2. Bactérias aderentes à mucosa do retículo-rumen: Esta população bacteriana, que se encontra aderente às paredes do retículo-rumen, fixa-se sobre o epitélio escamoso estratificado por intermédio do glicocálice poliholossídico, que se comporta como um polímero aniónico (LOFT, 1971 - cit. por THIVEND et al., 1985).

A sua evidenciação resultou de simples observações directas de fragmentos da parede ruminal de ovinos, utilizando o MEE e MET, estando limitadas a um número muito restrito de tipos morfológicos (BAUCHOP et al., 1975; McCOWAN et al., 1978 e 1980; CHENG et al., 1974 e 1980; DINSDALE et al., 1980). Constam essencialmente de diplococos, cocos e bacilos Gram +, de tipo respiratório anaeróbio facultativo (CHENG e COSTERTON, 1980), com forte acção

proteolítica (DINSDALE et al., 1980) e ureolítica (McCOWAN et al., 1980; DEHORITY e GRUBB, 1981). Se para alguns autores estas bactérias se diferenciam taxonomicamente daquelas no fluido ruminal (CHENG e COSTERTON, 1980) para outros, entretanto, esta população seria muito diversificada (BAUCHOP et al., 1975) e integrada em grande parte por espécies anaeróbias estrictas (DEHORITY e GRUBB, 1981; MEAD e JONES, 1981). Ao que parece, esta população manifesta-se menos sensível às modificações alimentares, ao contrário do que sucede com a população livre no fluido ruminal, uma vez que é possível fazer a sua manutenção em animais alimentados artificialmente com infusões líquidas de nutrientes directamente no retículo-rumen (DINSDALE et al., 1980).

Cabe a este consórcio bacteriano cinco funções importantes:

- hidrolisar a ureia que se difunde através das paredes do retículo-rumen, até amónia (CHENG e COSTERTON, 1980; WALLACE et al., 1979), facilitando e regulando o transporte de ureia;
- converter a proteína residual das células epiteliais mortas em biomassa bacteriana, e produzir amónia por desaminação da proteína digerida (CHENG e COSTERTON, 1980);
- contribuir com mais de 10% da actividade proteásica no fluido retículo-ruminal (DINSDALE et al., 1980);
- proteger a microflora anaeróbia, de crescimento

fastidioso, da parede e conteúdo ruminais, da acção do oxigénio (CHENG e COSTERTON, 1980);

- utilizar o oxigénio que se difunde através das paredes do retículo-rumen, na oxidação energeticamente favorável da capacidade redutora gerada anaerobicamente (CHENG e COSTERTON, 1980).

2.3.1.3. Bactérias aderentes aos ciliados - A superfície externa do córtex dos ciliados, constitui uma ampla área de colonização para algumas espécies bacterianas do rumen. Com efeito, foi possível evidenciar com o MEE uma população bacteriana relativamente abundante, vivendo implantada na superfície externa dos ciliados Eudiplodinium, Diplodinium, Entodinium e Epidinium (IMAI e OGIMOTO, 1978; VOGELS et al., 1980). Esta população pode representar de 1 a 10% da flora total do retículo-rumen. O número médio de bactérias fixadas sobre cada ciliado está naturalmente dependente do seu tamanho, tendo aquele sido estimado em cerca de 250 bactérias (THIVEND et al., 1985). A maior parte das bactérias aderentes foram identificadas como sendo Streptococcus bovis, Ruminococcus albus (IMAI e OGIMOTO, 1978) e bactérias metanogéneas (KRUMHOZZ et al., 1983; VOGELS et al., 1980).

2.3.2. Ciliados - Os protozoários ciliados distribuem-se fundamentalmente pelos compartimentos 1 e 2, alguns fixando-se também sobre as partículas vegetais, particularmente as espécies pertencentes aos géneros Epidinium (AMOS e AKIN, 1978; BAUCHOP e CLARKE, 1976; ORPIN e LETCHER, 1978; GRAIN e SENAUD, 1984), Isotricha e Dasytricha (ORPIN e HALL, 1977).

Isotricha prostoma e I. intestinallis manifestam um quimiotactismo bastante desenvolvido relativamente aos glúcidos solúveis libertados na degradação dos glúcidos parietais, aderindo às partículas alimentares por intermédio de um organito especializado (ORPIN e LETCHER, 1978). A resposta destes ciliados a estímulos químicos da ração, confere-lhes capacidade para migrarem para o rumen a partir do retículo, onde se podem encontrar fixados (ABE et al., 1981). A fixação dos ciliados sobre as partículas vegetais, parece poder explicar, pelo menos em parte, a sua sequestração e a sua retenção no retículo-rumen, bem como a sua sobrevivência neste órgão, apesar de possuírem de um tempo de geração mais longo que o tempo de renovação da fase líquida do retículo-rumen (BAUCHOP e CLARKE, 1976).

2.3.3. Fungos - Os fungos estão normalmente associados com as partículas vegetais alimentares (BAUCHOP, 1979_a, 1979_b, 1979_c, 1981 e 1985; ORPIN, 1984). Apenas os zoósporos se encontram temporariamente no fluido ruminal (Compt. 2). Fixam-se sobre os tecidos vegetais triturados pela mastigação, e também sobre os estomas, utilizando como meios de orientação um quimiotactismo fortemente activo em relação aos glúcidos parietais (ORPIN, 1981).

2.4. A DEGRADAÇÃO DOS GLÚCIDOS

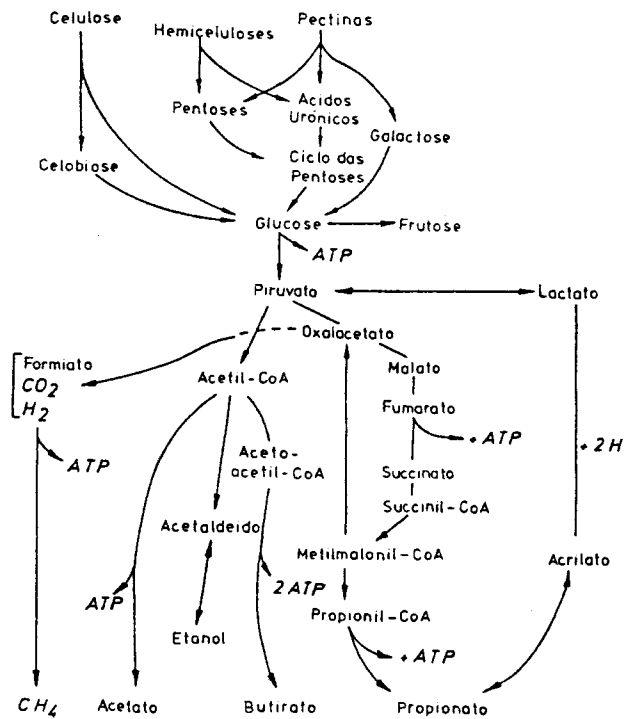
A poderosa fermentação dos carbohidratos constitui talvez, a característica mais marcante do processo digestivo global no retículo-rumen. Uma grande variedade de carbohidratos, desde os mais simples glúcidos solúveis

provenientes dos sucos vegetais, até à forte e quimicamente resistente fibra celulósica, são aqui transformados e reduzidos a metabólitos que constituem o grande suporte energético para o animal. Possuidora de um extraordinário e diversificado mosaico enzimático, a população microbiana do retículo-rumen degrada os componentes glucídicos das paredes celulares vegetais (celulose, hemicelulose e pectina), que são de imediato fermentadas de acordo com o esquema da Fig.2.8..

A extensão desta degradação é muito variável, 80 - 90% num alimento muito pouco lenhificado (erva jovem) e 40 - 50% para uma planta bastante lenhificada (palha). Tal variação está ligada à natureza dos glúcidos parietais (dependente da variedade da planta), ao órgão da planta (talo ou folha), ao tecido considerado (parênquima ou esclerênquima) e também ao seu estado vegetativo.

A degradabilidade dos componentes glucídicos parietais e a sua taxa de degradação depende de vários factores:

- percentagem de lenhina, e em menor grau outros constituintes, como a sílica e a cutina;
- factores que modificam o tempo de permanência das partículas alimentares no retículo-rumen, o tempo de contacto enzima-substrato, o estado físico do alimento e os tratamentos tecnológicos a que é sujeito, com o objectivo de amplificar a superfície parietal acessível aos enzimas e reduzir o número e a força das ligações celulose-lenhina.



Metabolismo dos glúcidos parietais no rumen

Fig. 2.8. Vias degradativas para os glúcidos parietais no retículo-rumen (THIVEND et al., 1985)

A disponibilidade no que refere a outros constituintes na ração, particularmente a natureza e quantidade de azoto e elementos minerais, os quais suportam a actividade e crescimento dos microorganismos.

Os microorganismos do rumen derivam as suas necessidades em carbono e energia (ATP) para a manutenção e crescimento, a partir da utilização fermentativa dos glúcidos parietais. Os metabólitos resultantes desta fermentação constituem, conforme anteriormente referido, uma mistura de ácidos orgânicos (C₂ a C₆) e gases (CO₂ e CH₄). No ruminante adulto, a maior parte das necessidades energéticas são garantidas pelos AGVs, contrariamente ao que sucede ao animal

nos primeiros tempos de vida (THIVEND et al., 1985). VERMOREL (1978 - cit. por THIVEND et al., 1985) refere que os AGVs podem colocar à disposição do animal 65 a 75% da energia assimilada, a restante sendo garantida pelos aminoácidos por via neoglucogénica, ácidos gordos de cadeia longa e, nalgumas situações, pela fracção glucose que escapa à degradação no reticulo-rumen, ou transita para o omaso no interior do compartimento celular dos ciliados (HUNGATE, 1969) (Tabela. 2.3.).

TABELA 2.3.
Origem e repartição (%) da energia absorvida no tubo
digestivo do ruminante (VERMOREL, 1978)

	AGVs	Glucose	Aminoácidos	Ácidos gordos longos
Feno de pradaria	78	0,2	16	5
Dieta mista (50 - 50)	65	3	23	9
Dieta rica em milho (70%)	50	16	24	10

2.5. DEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS DE AZOTO

2.1.1. Introdução - A capacidade para utilizar azoto não proteico (ANP) na edificação da proteína microbiana, destaca uma outra faceta do reticulo-rumen. O facto de a proteína microbiana constituir uma fonte importante de aminoácidos para o hospedeiro animal (STORM et al., 1983), permite a este tirar partido de fontes de azoto extremamente baratas (ureia e sais de amónio).

A proteína ingerida pelo ruminante é fortemente degradada pelos microorganismos do retículo-rumen (TAMMINGA, 1979). Esta degradação é processada em duas fases distintas. Primeiramente a cadeia proteica é inicialmente clivada por hidrólise das suas cadeias peptídicas (proteólise), com a libertação de péptidos e aminoácidos. Em segunda fase os aminoácidos ou são fermentados, ou então incorporados na proteína dos microorganismos (TAMMINGA, 1979).

A proteólise e a desaminação, estão ambas dependentes dos valores de pH, se bem que o resultado das experimentações realizadas até à data não permitam grande consenso por parte dos autores, relativamente a este facto. Para alguns autores, o pH óptimo para a proteólise e desaminação situa-se entre 6 - 7 (BLACKBURN e HOBSON, 1960; HENDERICKX, 1962; LEWIS e EMERY, 1962). "In vitro" a experimentação tem evidenciado que a amonificação é máxima a pH 4,5, 5,6, 6,7 e 7,7 (HENDERICKX e DEMEIJER, 1967). A pH superior a 7,2 a desaminação parece ser bloqueada (CHALMERS, 1969).

2.5.2. Mecanismo de degradação - Este difere consoante se trate de bactérias ou protozoários ciliados. As bactérias degradam a proteína em pequenas porções, processo que se realiza fora do compartimento celular, com a utilização de exoenzimas. Os peptídeos e aminoácidos resultantes, são transportados para o interior das células e os peptídeos hidrolisados a aminoácidos e os aminoácidos, por sua vez, ou são incorporados na estrutura das proteínas bacterianas, ou são fermentados a AGVs, NH_4^+ , CO_2 e CH_4 , que são excre-

tados para o exterior do compartimento celular (TAMMINGA, 1979; PORTUGAL, 1963).

Os ciliados estão mais vocacionados para a utilização da fracção proteica menos solúvel, que é ingerida na estrutura do material particulado alimentar e nas células bacterianas (COLEMAN, 1975; USHIDA e JOUANY; 1985).

O determinismo da degradação das proteínas e aminoácidos no reticulo-rumen, não está ainda perfeitamente elucidado (TAMMINGA, 1979). Para este autor, parece aceitável que a degradação proteica garanta aos microorganismos os precursores para a sua síntese proteica, sob a forma de amónia, α -cetoácidos, ou mesmo os aminoácidos. No entanto, as necessidades são fortemente ultrapassadas, talvez porque a degradação dos aminoácidos forneça energia (ATP) utilizável pelos microorganismos para os seus processos biossintéticos, uma vez que pelo menos uma estirpe bacteriana requiere a presença de aminoácidos como fonte de energia (PRINS, 1977). Do ponto de vista termodinâmico, a quantidade de energia passível de ser proporcionada pela degradação proteica, não favorece a produção de ATP. Com efeito, a hidrólise dos enlaces peptídicos apenas liberta 3 Kcal de energia livre/mole (BALDWIN, 1968), quando para a formação de 1 mole de ligações terminais pirofosfato no ATP são necessárias 12 Kcal (ARMSTRONG, 1968). Por conseguinte a proteólise não parece cumprir uma finalidade energética.

A fermentação dos resíduos aminoácidos, traduz-se em modificações na sua estrutura molecular por desaminação,

descarboxilação e transaminação (DEMEIJER, 1976; PRINS, 1977), a mais importante das quais é a desaminação seguida de descarboxilação do cetoácido resultante (DEMEIJER, 1976; PRINS, 1977). Esta última reacção já liberta energia suficiente para a formação de 1 ATP (TAMMINGA, 1979).

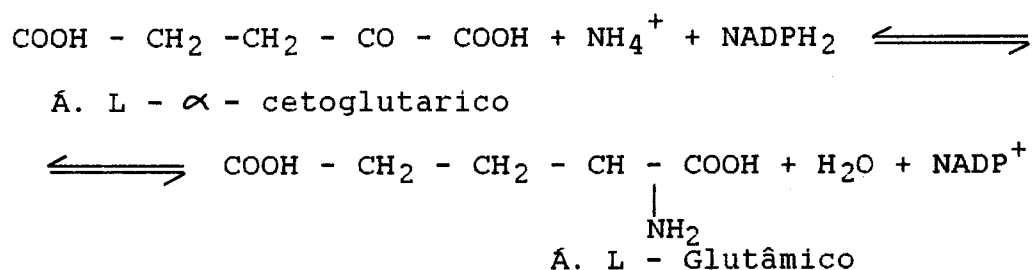
Outra razão apontada para a degradação excessiva de aminoácidos pelas bactérias do retículo-rumen, pode ser a falta de mecanismos de transporte para a excreção dos aminoácidos (TAMMINGA, 1979). Bacteroides succinogenes apenas assimila peptídeos (PITTMAN et al., 1967), denotando a falta de sistemas de transporte para os aminoácidos individualizados.

2.5.3. A amónia - O azoto amoniacal constitui o substrato preferencial para uma parte importante da população bacteriana, podendo constituir 50 a 80% do N imobilizado nas suas proteínas (THIVEND et al., 1985). Os mesmos autores referem que algumas espécies bacterianas (Ruminococcus, Bacteroides, Methanobrevibacter) não utilizam N dos péptidos ou dos aminoácidos. Duma maneira geral, os aminoácidos não são indispensáveis à proteossíntese bacteriana. No entanto, conforme já referido, esta é francamente estimulada quando se associam aminoácidos a uma fonte de azoto de natureza não proteica (MAENG e BALDWIN, 1976 cit. por ORSKOV, 1982).

O nível de amónia no retículo-rumen varia amplamente, estando fortemente relacionado com a dieta que os animais ingerem e com o facto de os mesmos se encontrarem ou não dotados com a sua população de ciliados (CHRISTIANSEN, et al., 1965). Os valores da concentração de amónia variam entre 0 e 130 mg/100 ml de fluido ruminal, manifestando os valores

mais elevados 2 h após a ingestão de alimentos. Segundo alguns autores, para que o crescimento microbiano se estabeleça nos seus valores máximos, é indispensável uma concentração de amônia de 5 mg/100 ml no fluido ruminal (SATTER e SLYTER, 1974 cit. por ORSKOV, 1982). Outros autores, referem no entanto valores mais baixos para a mesma eficiência no crescimento microbiano, que devem estar relacionados com o efeito de numerosos factores (composição da ração, natureza e importância da população bacteriana, etc.).

A utilização do azoto amoniacal na síntese de aminoácidos pelas bactérias do retículo-rumen, está perfeitamente elucidado. O mecanismo de assimilação, tal como sucede com bactérias em outros ecossistemas, é efectuado através da via glutâmico-desidrogenase ($K_m = 5 \times 10^{-4}$) (BHATIA et al., 1980), que em Streptococcus bovis opera com NAD^+ e em Megasphaera elsdenii opera com $NADP^+$ (THIVEND et al., 1985):



2.6. PROTEOSSÍNTESE MICROBIANA

2.6.1. Introdução - A síntese microbiana no retículo-rumen, é de capital importância para a economia proteica do ruminante, uma vez que 50% do azoto que chega ao duodeno

é de origem microbiana (Tabela 2.4.). Em alguns casos, aquela proporção pode ser muito mais importante, se a degradação das proteínas alimentares no retículo-rumen é elevada, ou se elas aparecem em baixos teores na ração (THIVEND et al., 1985).

2.6.2. Factores que influenciam a proteossíntese - Entre muitos factores de que depende a síntese proteica microbiana, a quantidade de energia disponível (ATP) é de extrema importância. Assim que as necessidades energéticas do ecossistema estejam garantidas, a quantidade de azoto

TABELA 2.4.

Digestão do azoto no ruminante (THIVEND et a., 1978)

Azoto ingerido (g/dia)	Azoto no duodeno			
	g/dia	% azoto ingerido	microbiano %	alimentar %
34,2	21,8	64	63	35
22,8	23,4	103	52	44
22,1	32,8	148	54	43
17,0	16,6	98	96	-

microbiano que que deixa o retículo-rumen pode ser superior à quantidade de azoto ingerida, uma vez que as bactérias podem utilizar a amónia proveniente da ureia reciclada no rumen através das paredes e da saliva.

A biomassa microbiana sintetizada no retículo-rumen transita para o intestino delgado juntamente com a fracção alimentar não digerida, onde sofrerá um processo de

hidrólise. O ruminante terá à sua disposição a maior parte dos aminoácidos de que necessita (STORM et al., 1983), mercê da boa digestibilidade da proteína microbiana (70% para as bactérias e 80% para os protozoários) e o seu valor biológico sendo apenas limitante no que respeita à metionina e histidina (THIVEND et al., 1985).

A síntese proteica microbiana no retículo-rumen constitui um mecanismo fundamental na nutrição azotada do ruminante, facto que justifica o interesse que tem merecido por parte dos nutricionistas de todo o mundo nos últimos dez anos. De facto, muitos têm sido os trabalhos publicados em torno deste assunto, com o objectivo de quantificar a síntese proteica microbiana e estudar os vários factores que fazem variar a sua eficiência: o papel dos protozoários, utilização de antibióticos ionóforos, tempo de retenção das partículas alimentares, aporte de energia e azoto (HARRISON e McALLAN, 1980; DEMEYER e VERVAEKE, 1984 cit. por THIVEND et al., 1985; SMITH, 1979; HESPELL e BRYANT, 1979).

2.6.2.1. A dieta - A eficiência máxima na proteossíntese microbiana é possível quando a concentração de N é adequada (STERN e HOOVER, 1979), caso contrário desenvolvem-se fermentações desacopladas (McMENIMAN et al., 1976; BUTTERY, 1977). O excesso em N também não é desejável, uma vez que a energia como factor limitante, torna a utilização do azoto ineficiente (STERN e HOOVER, 1979), pelo que para que a proteossíntese decorra nos seus valores máximos, as disponibilidades em energia e azoto no retículo-rumen devem

estar perfeitamente balanceadas.

O incremento na concentração de N de 0,95 para 1,82% em dietas semipurificadas e desproteinizadas, aumentou a proteossíntese no retículo-rumen de ovinos (HUME et al., 1970). Contudo, o aumento da concentração de N para valores de 3,29% não se traduziu em qualquer aumento na síntese proteica. Para os mesmos autores, a síntese proteica no rumen é severamente afectada, quando o nível de proteína bruta na dieta é inferior a 11%.

Os microorganismos do rumen utilizam na sua proteossíntese, utilizam como precursores $\text{NH}_4\text{-N}$ e/ou aminoácidos, estes necessariamente dependentes da proteína da dieta (STERN e HOOVER, 1979). O $\text{NH}_4\text{-N}$ pode concorrer em 40 - 100% para a proteossíntese bacteriana (PILGRIM et al., 1970; NOLAN et al., 1976; AL-RABBAT e HEANEY, 1978)(Fig. 2.9.)

Estudos vários "in vitro" encontraram valores máximos para a proteossíntese microbiana quando a concentração de amónia se situava entre 5 e 8 mg/100 ml (ALLISON, 1970; ANNISON, 1975; NIKOLIC et al., 1975; SATTER e SLYTER, 1974).

"In vivo" os autores não são tão unânimes referindo valores da ordem de 9 mg /100ml para a proteossíntese máxima (HUME et al., 1970), 29 mg /100 ml (MILLER, 1973) e 5mg/100 ml (OKORIE et al., 1977). Valores próximos àqueles apresentados por MILLER (1973) foram encontrados por MEHREZ et al. (1977), 23,5 mg/100ml.

Se a concentração de N é determinante para a eficiência da síntese microbiana, não menos importante é a resistência que a proteína oferece à degradação no retículo-rumen, uma

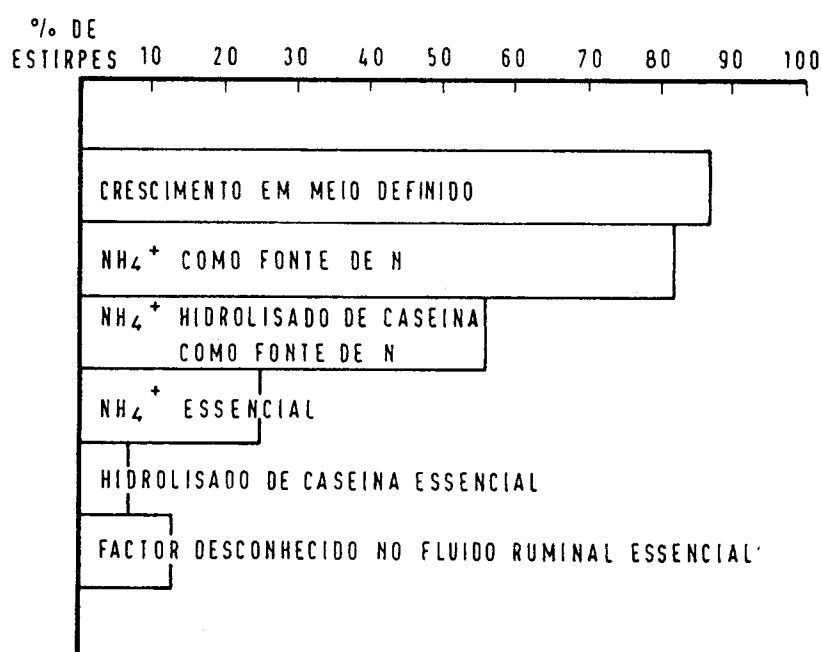


Fig. 2.9. Fontes de N para o crescimento de bactérias ruminais isoladas num bovino alimentado com feno + concentrado utilizando um meio de cultura relativamente não selectivo com fluido ruminal (ALLISON, 1969).

vez que a baixa degradabilidade se pode traduzir em deficiência azotada (STERN e HOOVER, 1979). 2,0 g de azoto disponível por 100 g de Matéria Orgânica Digestível (MOD) é a quantidade mínima de N requerida, em dietas com baixo teor em fibra, para uma síntese proteica eficiente (McMENIMAN e ARMSTRONG, 1977). Em dietas ricas em amido, particularmente milho em que a proteína é muito resistente à degradação, os valores serão necessariamente diferentes (THOMAS, 1977).

Se bem que as dietas com ureia como única fonte de azoto permitem a síntese proteica, a substituição de parte da ureia por 25% de proteína, incrementa a proteossíntese microbiana em 100%, reduzindo o tempo médio de geração

bacteriana de 6,7 para 3,4 h (MAENG e BALDWIN, 1976). A explicação reside no facto de que a fermentação de alguns aminoácidos (valina, leucina e isoleucina) produz AGVs de cadeia ramificada (ácidos isobutírico, isovalérico e 2-metilbutírico), indispensáveis ao crescimento de algumas bactérias celulolíticas (ALLISON e BRYANT, 1963; ALLISON et al., 1958, 1962; ALLISON, 1969). Assim HUME (1970) observou diferentes valores para a síntese proteica microbiana, 17,1, 19,8, 23,3 e 22,5 g de PB/100g MOD, consoante a fonte azotada era ureia, gelatina, caseína e zeína respectivamente.

Estas observações colocam alguns problemas em relação com a suplementação proteica dos animais. AMOS e EVANS (1976) constataram que a inclusão de bagaço de girassol como suplemento proteico numa dieta de baixa qualidade, aumentou a síntese proteica microbiana, em contraste com a adição de ureia à mesma dieta, em que não se verificou qualquer incremento na síntese proteica. No entanto, em novilhos alimentados com dietas de baixa qualidade, a substituição de bagaço de soja por ureia aumentou a síntese proteica microbiana (KROPP et al., 1977).

Para que a degradação do azoto alimentar se faça de uma forma eficiente, é necessário que a energia proporcionada pela fermentação da MO seja fornecida a uma taxa que se ajuste às capacidades biossintéticas dos microorganismos (OLDHAM et al., 1977). Os glúcidos facilmente fermentáveis são naturalmente mais eficientes que os glúcidos estruturais no aumento da utilização do azoto degradado da ração e no

aumento do crescimento microbiano, tanto "in vivo", como "in vitro" (McDONALD, 1952; CHALMERS e SYNGE, 1954; LEWIS e McDONALD, 1958; PHILLIPSON et al., 1962; ROBERTSON e HAWKE, 1965; OFFER et al., 1978; STERN et al., 1978).

A inclusão de amido em dietas muito celulósicas, aumenta a utilização do N e diminui a fibrólise (SLYTER et al., 1971; OFFER et al., 1978; STERN et al., 1978). A fermentação do amido, proporciona uma maior quantidade de energia às bactérias, quando comparado com outros glúcidos (McALLAN e SMITH, 1976). Contudo, existem diferenças na digestão atribuíveis aos diferentes tipos de amido, consoante se trate de milho ou cevada (ORSKOV et al., 1971; DURAND et al., 1975 e 1976).

Em conclusão, os factores mais determinantes na utilização do azoto degradado da dieta, são o tipo e a disponibilidade dos glúcidos, sendo aparente que a extensão e a taxa de degradação no retículo-rumen, tanto do N como dos carboidratos, são muito importantes na determinação da eficiência dos crescimento microbiano (STERN e HOOVER, 1979).

2.6.2.2. Taxa de diluição - HARRISON et al. (1975) definem a taxa de diluição do conteúdo retículo-ruminal como a proporção do seu volume total que abandona o retículo-rumen no espaço de tempo de 1 h. é influenciada por vários factores, designadamente a dieta, infusão de soluções tampão, nível de ingestão e temperatura ambiental (Quadro 2.7.) (SEQUEIRA, 1988).

O aumento da taxa de diluição do conteúdo retículo-ruminal incrementa o crescimento microbiano, em virtude de

diminuir as despesas energéticas com a manutenção celular (HOBSON, 1965; HOBSON e SUMMERS, 1967; STOUTHAMER e BETTENHAUSSEN, 1973; ISAACSON et al., 1975; HARRISON et al., 1976; KENNEDY et al., 1976).

A natureza da dieta ingerida pelos animais é um dos factores que influencia os valores da taxa de diluição do conteúdo reticulo-ruminal. A transferência de novilhos de uma dieta concentrada para outra contendo 14% de fibra, provocou um aumento na taxa de diluição (0,03 para 0,05/h) acompanhado de um aumento na síntese proteica microbiana (COLE et al., 1976). A infusão intrarruminal de saliva em ovinos, aumentou a taxa de diluição de 0,03 para 0,08/h, acompanhado de um aumento de 25,4 para 29,8 g de aminoácidos totais sintetizados por mole de hexose fermentada (HARRISON et al., 1976). Também a temperatura ambiental modifica os valores da taxa de diluição do conteúdo reticulo-ruminal. Com efeito, ovinos mantidos a temperaturas ambientais de 18 a 21°C foram menos eficientes na proteossíntese microbiana do que quando mantidos a temperaturas variando entre -1 e 1, fornecendo valores da ordem de 47,9 e 54,9 g N/Kg MOD respectivamente (KENNEDY et al., 1976). O aumento na eficiência da síntese proteica, correlaciona positivamente com a taxa de diluição, 0,1 vs. 0,14/h, respectivamente. Estes resultados acordam com os valores obtidos por KENNEDY e MILLIGAN (1978) que, trabalhando também com ovinos, verificaram que a transferência dos animais duma temperatura ambiental de 22 - 25°C para 2 - 5°C, determinava um aumento na taxa de diluição

de 0.07 para 0,12/h, e um aumento na síntese proteica microbiana de 35,9 para 50,9 g N/Kg MOD respectivamente.

2.6.2.3. Os ciliados - O desaparecimento dos protozoários ciliados por desfaunação do retículo-rumen não modifica a proteossíntese microbiana (JOUANY, 1978). Aqueles representam 46 a 87% da biomassa microbiana total do retículo-rumen, dependendo do regime alimentar. A sua contribuição para a biomassa microbiana total no duodeno é, no entanto, mais fraca, oscilando entre 6 e 55% (Quadro 2.5.).

É menos expressiva em dietas à base de forragens e após ingestão alimentar, pois os ciliados fixam-se preferencialmente às partículas alimentares que são retidas no retículo-rumen (JOUANY, 1978). Se a taxa de diluição for incrementada, a biomassa protozoária que chega ao duodeno aumenta, e a reciclagem das proteínas dos ciliados diminui no retículo-rumen. HARRISON (1975 - cit. por JOUANY, 1978) calculou que se a taxa de diluição fosse 0,078/h, a totalidade dos ciliados devia poder deixar o retículo-rumen, sem alteração na sua população.

Qualquer um, ou mais verosimilmente uma combinação dos seguintes factores pode estar envolvida no aumento da eficiência da proteossíntese microbiana, relacionada com a taxa de diluição (KENNEDY et al., 1976):

- autólise bacteriana reduzida;
- ingestão das bactérias pelos ciliados diminuída;
- modificações no tecido populacional microbiano, induzidas por trocas no substracto, ou possivelmente devido à remoção dos microorganismos com tempo de

geração mais longo.

2.6.2.4. Outros factores - Paralelamente aos factores anteriormente considerados, existem outros como a disponibilidade em enxofre (S) na dieta e a frequência na ingestão alimentar, que condicionam a síntese proteica microbiana (STERN e HOOVER, 1979). A metionina e cisteína na sua síntese pelos microorganismos, necessitam do aporte de S, e a proteossíntese pode ficar limitada na sua extensão, quando na dieta dos animais são utilizadas grandes quantidades de N não proteico (BUTTERY, 1977). A diminuição da razão N:S de 34,3 para 10,9 incrementou a proteína microbiana sintetizada de 82 g para 94 g /dia em ovinos, não se verificando mais qualquer aumento quando a razão N:S baixou para 6,4 (HUME e BIRD, 1970).

A alimentação de ovinos em intervalos de 2 horas, proporcionou mais proteína microbiana sintetizada, do que quando os animais foram alimentados apenas uma só vez ao dia (AL ATTAR et al., 1976). Por outro lado, a alimentação dos animais apenas 2 vezes ao dia, comparativamente a uma alimentação 12 vezes ao dia, resultou numa diminuição dos metabólitos microbianos no fluido retículo-ruminal e num aumento do "pool" ATP (JENSEN e WOLSTRUP, 1977).

2.7. METABOLISMO DOS LÍPIDOS

2.7.1. Introdução - As dietas dos ruminantes caracterizam-se por apresentarem na sua composição um teor lipídico de 1 - 4% (CHURCH, 1979). Tal facto terá dirigido todo o processo adaptativo do ruminante e da sua micropopulação de tal

Quadro 2.7. Modificações de alguns parâmetros no retículo-rúmen de ovinos em consequência da inclusão de PEG nas suas dietas (Adaptado de SEQUEIRA, 1988)

Infusão (4 l/dia)	Osmolalidade	pH	Taxa de diluição	A. acético	A. propiónico	A. butírico + A. isobutírico
Controle*	331	6,01	0,060	62,7	27,8	9,5
Água	312	5,94	0,056	65,2	28,0	6,8
NaHCO ₃ (2,5% p/v)	336	5,85	0,066	68,6	25,2	6,2
Saliva artificial	338	6,14	0,109	71,5	23,1	5,4
Saliva artificial + PEG (4% p/v)	347	6,10	0,117	66,2	22,4	9,4
Saliva artificial + PEG (8% p/v)	360	5,99	0,140	69,6	21,6	8,8

Infusão							
Animal 3	Controle*		5,84	0,038	62,0	29,6	6,6
	PEG (4% p/v)		5,99	0,105	66,9	19,7	11,4
Animal 4	Controle*		6,12	0,087	69,4	23,1	5,8
	PEG (4% p/v)		5,08	0,093	69,0	23,5	5,7
Animal 5	Controle*		6,13	0,039	63,1	29,3	5,8
	PEG (4% p/v)		6,04	0,091	66,0	21,6	10,4

	Ingestão	*Apport* ao duodeno proximal					
		Animal 3		Animal 4		Animal 5	
		Controle	PEG	Controle	PEG	Controle	PEG
Energia bruta (MJ/dia)	17,20	8,20	8,01	8,98	8,05	8,30	8,12
Matéria orgânica (g/dia)	889	357	412	403	418	365	432
-Poliglucoses (g/dia)	403	12	30	32	44	5	45
Hemicelulose (g/dia)	62	62	24	27	24	26	29
Celulose (g/dia)	161	41	27	35	32	37	29
N total (g/dia)	17,2	20,8	21,7	22,7	22,5	20,4	21,0
Ácidos aminados							
microbianos (g/dia)		69,4	84,3	85,4	86,6	64,7	80,8
Produção de AGVs (moles/dia)		6,17	6,00	6,08	6,11	6,25	5,90

* Sem infusão

forma que, a introdução de suplementos lipídicos normalmente provoca distúrbios no funcionamento do ecossistema retículo-ruminal (VAN SOEST, 1982; BROOKS et al., 1954; CZERKAWSKI, 1973; KOWALCZYK et al., 1977; DEVENDRA e LEWIS, 1974).

Os lípidos que integram a ingesta são digeridos no retículo-rúmen, e a maior parte dos ácidos gordos na digesta que deixa o retículo-rúmen, encontra-se sob a forma livre, conforme se pode verificar na Tabela 2.5.

TABELA 2.5.
 Ácidos gordos livres no tracto alimentar de dois
 carneiros sacrificados (GARTON et al., 1961)

Fonte da Digesta	A.G.L. como % dos A.G.T.
Carneiro 1	
Rumen.....	92
Abomaso.....	90
Intestino delgado (Superior).....	96
Intestino delgado (Inferior).....	94
Carneiro 2	
Rumen.....	78
Abomaso.....	94
Intestino delgado (Total).....	97

O metabolismo lipídico no reticulo-rumen apresenta duas facetas distintas (HOBSON e HOWARD, 1969). Por um lado existe a degradação lipídica, por outro a síntese de lípidos pelos microorganismos. As condições fortemente anaeróbias do sistema impoem fortes restrições à utilização dos lípidos da dieta, por parte dos microorganismos (HUNGATE, 1962). Os ácidos orgânicos libertados na degradação lipídica, apenas podem ser incorporados nas estruturas celulares dos microorganismos, ou são integradas nas vias biossintéticas dos mesmos (HOBSON e HOWARD, 1969). Apenas a estrutura mitocondrial dos organismos aeróbios, reúne condições para a realização da clivagem molecular da estrutura carbonada dos ácidos gordos por β - oxidação (LENNINGER, 1978.).

2.7.2. Digestão dos lípidos - O metabolismo microbiano dos galactolípidos e triacilglicéridos, começa com a hidrólise das ligações éster e éter e os resíduos de glicerol e galactose são imediatamente fermentados a AGVs (VAN SOEST,

1984). A hidrólise desenvolve-se rapidamente após a ingestão alimentar, conforme pode ser observado na Tabela 2.6. (BATH e HILL, 1969 - cit. por VAN SOEST, 1982).

TABELA 2.6.
Hidrólise de lípidos no retículo-rumen (BATH e HILL, 1969)

	Lípidos totais %	% dos lípidos totais				A. gordos livres
		Triglicéridos	diglicéridos	Monoglicéridos	Fosfolípidos	
Dieta	6,3	72,4	13,7	1,7	1,2	11
Digesta ruminal 0 h	5,1	0,1	0,0	0,1	15,2	85
Digesta ruminal 1h	6,2	30,4	1,7	0,0	7,1	61
Digesta ruminal 5h	6,4	11,1	0,0	0,0	12,4	76

Dieta: 1 Kg de feno traçado + 50 g óleo de palma.

Na hidrólise intervêm apenas bactérias lipolíticas (HAWKE e SILCOCK, 1978). A biohidrogenação dos ácidos gordos insaturados realiza-se apenas se o radical carboxílico estiver livre (HAWKE e SILCOCK, 1969). Entre as bactérias lipolíticas identificadas, Butyrivibrio fibrisolvens e Ruminococcus albus estão fortemente associadas com a biohidrogenação dos ácidos gordos (KEPLER et al., 1966; Kemp et al., 1975).

DAWSON e KEMP (1969) verificaram experimentalmente que a hidrogenação dos ácidos gordos de cadeia longa (AGCL) no retículo-rumen, era menos completa nos animais desfaunados. SKLAN et al. (1971) verificaram que as fracções de conteúdo

retículo-ruminal enriquecidas com ciliados, apresentavam uma hidrogenação mais intensa que as fracções desprovidas de ciliados.

O determinismo da hidrogenação dos AGCL insaturados tem vindo a ser questionado por vários cientistas. Uma das teorias parece fornecer uma explicação aparentemente racional, atribuindo à hidrogenação o papel de sistema de remoção para o H₂ gerado na fermentação anaeróbica (CHURCH, 1979). Com efeito, a metanogénese foi reduzida com a introdução no retículo-rumen de vários AGCL, redução mais manifesta com a introdução de AGCL com índice de saturação mais elevado (CZERKAWSKI et al., 1966; CZERKAWSKI, 1973).

As bactérias lipolíticas do retículo-rumen produzem uma lipase, que nunca foi possível isolá-la em estado livre, pelo que a lipólise será realizada no interior do compartimento celular bacteriano ou no ponto de contacto entre a bactéria e a estrutura lipídica (GARTON et al., 1961), um enzima eventualmente da mesma categoria dos "cell-bound-enzymes" celulolíticos (HUNGATE, 1966).

Tanto as bactérias como os ciliados, são capazes de sintetizar ácidos gordos de cadeia longa a partir de precursores com número ímpar de carbonos e de cadeia ramificada (PALMQUIST e JENKINS, 1980), constituindo uma importante fonte de lípidos para o animal (KEENEY et al., 1962).

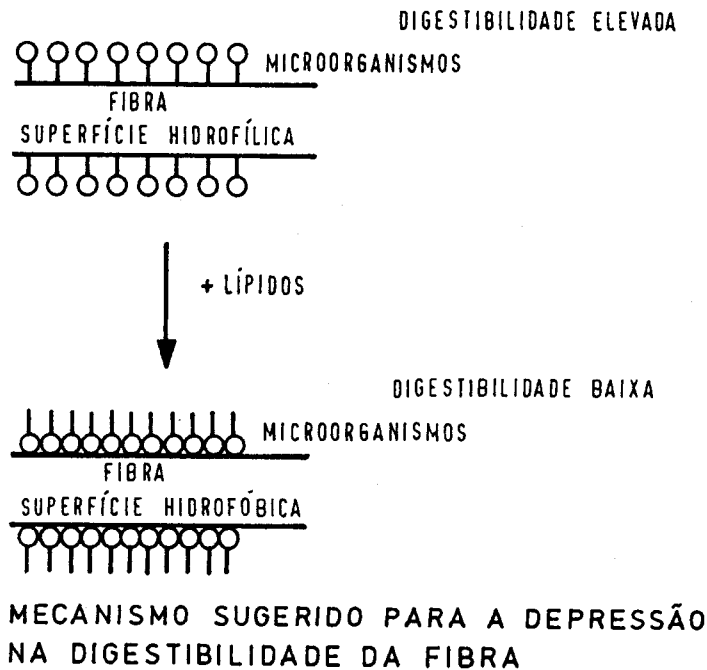
2.7.3. Efeito dos lípidos da dieta - A inclusão de gordura na dieta dos ruminantes, provoca uma diminuição na digestibilidade da fibra, tanto em bovinos como em ovinos

(BROOKS et al., 1954; DAVISON e WOODS, 1960; WARD et al., 1957). ROBERTSON e HAWKE (1964) verificaram que a introdução de gorduras líquidas nas fermentações "in vitro" e no retículo-rumen provocava uma depressão na digestibilidade da celulose, incrementava a NH_4^+ , reduzia a concentração molar de ácido acético e aumentava a concentração molar de ácido propiónico.

A susceptibilidade apresentada pelos organismos à acção dos AGCL, depende da espécie de organismo e do tipo de AGCL. Se por um lado a inclusão de ácido oleico não afectou o crescimento de Anaerovibrio lipolytica, Megasphaera elsdenii, Bacteroides ruminicola e Selenomonas ruminantium, já Methanobacterium ruminantium foi bastante afectada com a presença deste ácido (HENDERSON, 1973). Concentrações baixas de $\text{C}_{18}:\text{O}$, $\text{C}_{14}:\text{O}$ e $\text{C}_8:\text{O}$ nos meios de cultura estimularam o crescimento de Butyrivibrio fibrisolvens, mas em concentrações elevadas funcionaram como inibidores do crescimento.

Foram postuladas quatro teorias para explicar este efeito (DEVENDRA e LEWIS, 1974): 1) revestimento físico da fibra com a gordura bloqueando a acção microbiana; 2) modificação da população microbiana do retículo-rumen, por acção tóxica dos lipídios sobre alguns microorganismos; 3) inibição da actividade microbiana por acção detergente dos ácidos gordos sobre as membranas; 4) disponibilidade reduzida de catiões, pela formação de complexos insolúveis com ácidos gordos de cadeia longa. DEVENDRA e LEWIS (1974),

apresentaram um modelo explicativo para a 1ª teoria, da interferência física.



Os ácidos gordos, inibem a actividade das células bacterianas em cultura pura (HENDERSON, 1973). Complexam-se com as paredes celulares microbianas (MAXCY e DILL, 1967; HENDERSON, 1973; WIEMAN, 1954) e a adição de fibra reduz esta complexação (HARFOOT et al., 1974). Quando na dieta é incorporada gordura, a população bacteriana cresce, ao contrário do que sucede com a população de ciliados, que diminui (CZERKAWSKI, 1973; MACZULACK, 1979 - cit. por PALMQUIST, 1980), indicando talvez uma maior sensibilidade dos ciliados à acção dos ácidos gordos.

A depressão na digestibilidade da fibra por acção dos lípidos, pode ser revertida com a inclusão na dieta de

catiões metálicos. O cálcio em particular, constitui o melhor aditivo para impedir a fibrólise (WHITE et al., 1958; JHONSON e McCLURE, 1973). A digestibilidade da celulose e hemicelulose do malte destilado, aumentou com a incorporação de cloreto de cálcio (HAG e MILLER, 1972). PALMQUIST e JENKINS (1980) postulam que o cálcio melhora a digestibilidade da fibra nas rações com grande quantidade de gordura, pela formação de sabões insolúveis que removem os ácidos gordos da solução, não ficando assim disponível para se complexarem com as células microbianas.

2.7.4. Influência do tipo de gordura - Segundo PALMQUIST e JENKINS (1980), o efeito da gordura na digestão no retículo-rumen está directamente relacionado com duas propriedades: a insaturação e a esterificação. As gorduras insaturadas são mais tóxicas para os microorganismos que as saturadas (HENDERSON, 1973; GALBRAITH e MILLER, 1973). LUCAS e LOOSLI (1944) referem que a incorporação de 7% de ácidos gordos de óleo de soja, não inibiu a digestibilidade da fibra bruta, enquanto que igual quantidade de óleo de soja triturada, ou óleo + farinha de soja, foram mais inibitórios para a digestibilidade.

2.8. OS MINERAIS NA DIGESTÃO NO RETÍCULO-RUMEN

2.8.1. Macrominerais - Estes elementos concorrem fundamentalmente para a manutenção das condições físico-químicas no ecossistema retículo-ruminal (poder tampão, pressão osmótica e taxa de renovação da fase líquida), para que o metabolismo digestivo possa evoluir nos seus valores

máximos (DURAND e KAWASHIMA, 1980). O ruminante pode assim ingerir dietas ricas em amido, sem que os valores de pH desçam abaixo dos limites fisiológicos, desde que sejam administrados tampões minerais. A osmolalidade do retículo-rumen (250 - 350 mosmol/Kg) é mantida mercê da presença de vários iões minerais (Na^+ , K^+ , PO_4^{2-} , Cl^- , Mg^{2+}) (THIVEND et al., 1985). Conforme anteriormente referido, para que a proteossíntese microbiana decorra nos seus valores máximos, é necessário que a taxa de "turn-over" da fase líquida seja incrementada, com a incorporação de sais minerais na dieta (HARRISON et al., 1975; POTTER et al., 1972; THOMSON et al., 1978; SEQUEIRA, 1988).

A importância dos macrominerais no metabolismo microbiano também se deve ao facto de estes se associarem com determinadas estruturas celulares, conferindo-lhes funcionalidade, e interferirem na grande maioria dos processos enzimáticos (CHURCH, 1979; THIVEND et al., 1985).

2.8.2. Microminerais - Estes elementos (Fe, Mn, Zn, Co, Mo, Se, Ni e Cu), desempenham um papel fundamental em numerosas actividades enzimáticas microbianas, regulando a actividade de certos enzimas ou intervindo como elementos estruturais de enzimas e organitos celulares (CHURCH, 1979). A suplementação de dietas, com baixos ou elevados teores em fibra, com cobalto sob a forma de glucoheptonato de cobalto aumentou significativamente a síntese de vitamina B_{12} , a digestão do NDF e ADF (ALLEN e STERN, 1985). Os microorganismos do retículo-rumen apresentam teores em elementos micromi-

nerais geralmente muito superiores aos dos alimentos (THIVEND et al., 1985). Com efeito, as paredes celulares bacterianas são capazes de fixar elementos microminerais através de ligações que são mais ou menos reversíveis em meio ácido, facto que dificulta o cálculo das necessidades bacterianas relativamente a partir das suas concentrações na biomassa microbiana.

2.9. CONCLUSÕES

O retículo-rumen constitui um fermentador de características marcadamente anaeróbicas, capaz de utilizar, homo- e heteropolímeros de natureza glucídica que estruturam as paredes celulares vegetais, e azoto não proteico, para satisfação de todas ou pelo menos uma grande parte das necessidades do hospedeiro ruminante em energia e em aminoácidos. Este quadro confere aos ruminantes uma clara vantagem no que respeita à valorização de subprodutos pouco ou nada utilizáveis pelos outros mamíferos, inclusivamente não entrando em competição com o Homem relativamente a muitos alimentos.

Apesar destas vantagens, o fermentador retículo-rumen também tem as suas limitações de ordem termodinâmica que lhe são impostas pela anaerobiose. Por muito eficiente que o sistema seja, a anaerobiose limita a extensão em que os alimentos podem ser transformados em material celular. Em aerobiose, 60 - 70% do substrato glucídico pode ser transformado em biomassa microbiana, ao passo que em anaerobiose dificilmente se conseguem valores da ordem de 20%

(HUNGATE, 1966). Outra grande limitação imposta pelas condições anaeróbicas é a incapacidade do sistema para oxidar ácidos gordos de cadeia longa, produto da digestão microbiana dos lípidos, situação agravada pela interferência que estes compostos fazem na digestão de outros componentes da dieta, particularmente aqueles que conferem ao ruminante o estatuto de animais bem adaptados ao meio. Outras limitações prendem-se ainda, com o conhecimento ainda insuficiente dos mecanismos de degradação dos alimentos, particularmente celulólise e proteólise, e dos factores de variação da actividade microbiana.

Apesar de o retículo-rumen ser hoje o ecossistema melhor estudado, ainda não se conhecem, de facto, as suas reais potencialidades, que colocaram os ruminantes numa situação de melhor adaptação relativamente aos outros herbívoros.

PARTE II

ESTUDOS "IN VIVO"



CAPÍTULO 1

O MODELO EXPERIMENTAL "IN VIVO"

1.1. INTRODUÇÃO

Definiremos neste capítulo introdutório, a estrutura fundamental de suporte aos estudos por nós realizados "in vivo", com o objectivo de perspectivar a fenomenologia digestiva no retículo-rumen nas dietas contendo grandes quantidades de bolota.

1.2. OS ANIMAIS

Nos estudos "in vivo" foram utilizados três ovinos adultos da raça Merino Branco do Alentejo, com pesos variando entre 60 - 70 Kg, os quais foram munidos de cânulas ruminais.

1.3. ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais receberam a dieta repartida em duas refeições intervaladas oito horas: 1ª refeição às 9:00 h e 2ª refeição às 17:00 h. Esta opção foi tomada com base em estudos efectuados por JOUANY (1978), sobre a evolução do comportamento alimentar, ao longo das 24 h, em função do modo de alimentação (Figs. 1.2 e 1.3). Com efeito, a repartição da dieta por duas refeições diárias, determina uma maior uniformidade no tempo que o animal dedica à ingestão, mastigação e

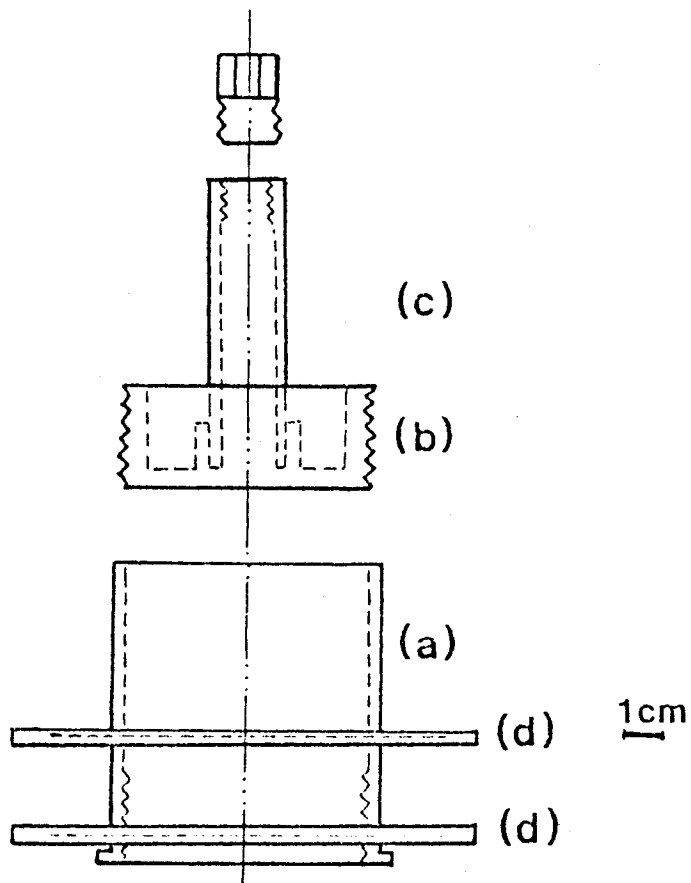


Fig.1.1_a . CANULA DO RUMEN

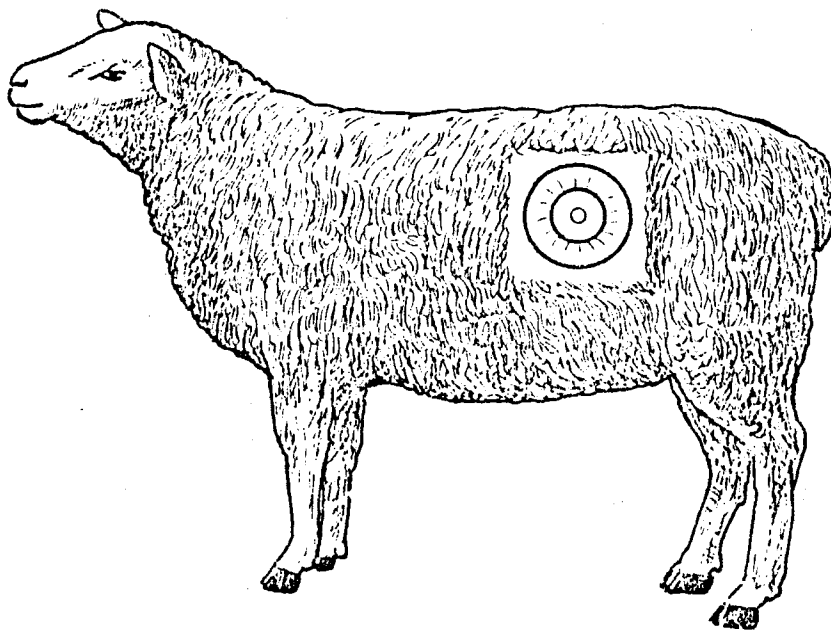


Figura1.1_b. Ovino portador de uma fistula permanente no rumen

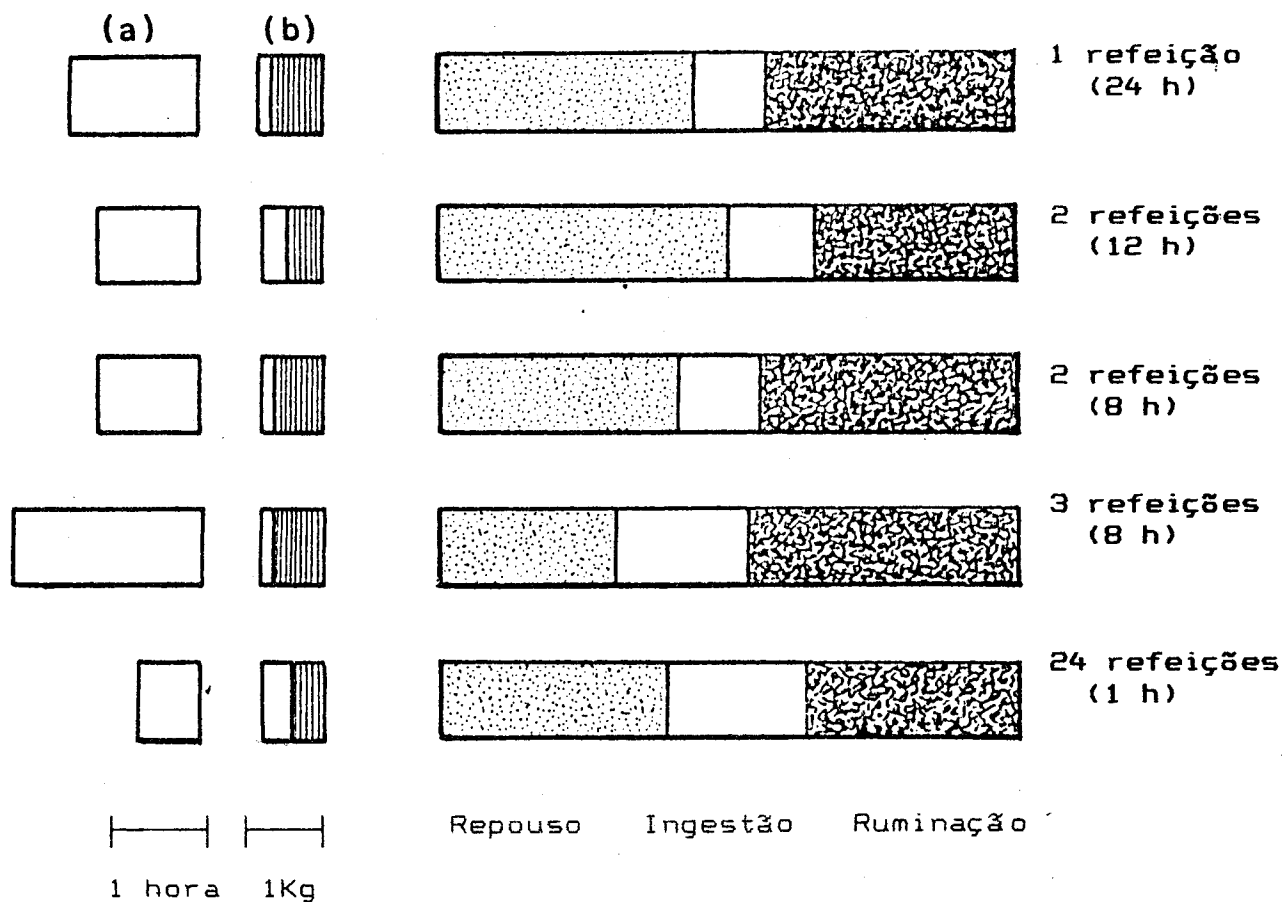


Fig. 1.2. Comportamento alimentar e mericico dos animais.

() - Tempo separando 2 refeições.

a - Duração de período de ruminação.

b - Quantidade de matéria seca ingerida.

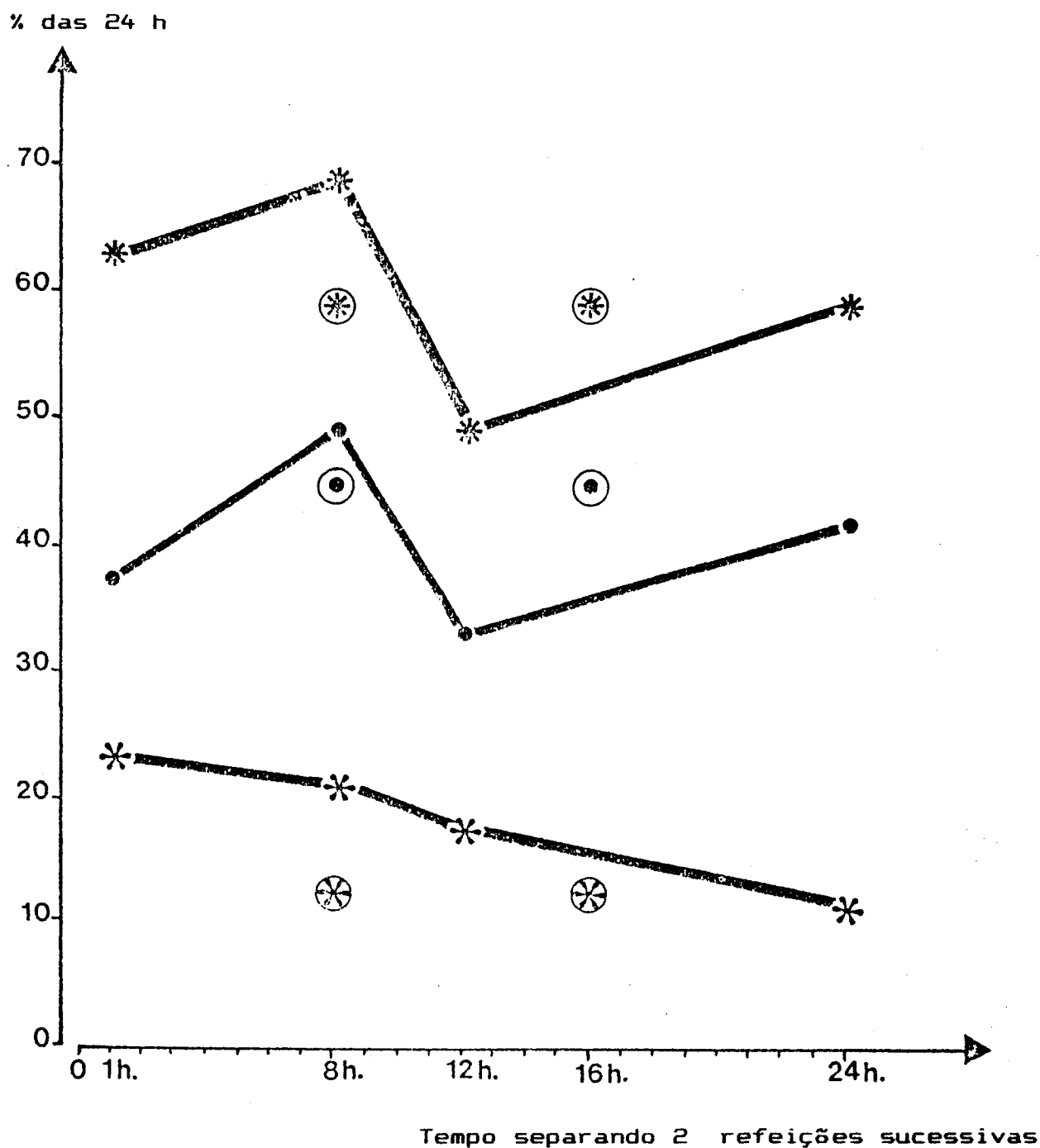


Fig. 1.3. Evolução do comportamento alimentar em função do modo de alimentação.

* - Duração da mastigação.

● - Duração da ruminação.

* - Duração da ingestão.

○ - Animais com 2 dietas espaçadas 8 h.

ruminação.

1.4. CIRURGIA - Fistulação dos animais

1.4.1. Material: A cânula do rumen (Fig.1.1), para permitir o acesso ao interior do compartimento retículo-ruminal, foi construído de acordo com o material descrito por JOUANY (1978). De fácil implantação, é uma cânula de grande secção (6 cm \varnothing), permitindo uma mais fácil amostragem do conteúdo total do retículo-rumen (TALJAARD, 1972). Este modelo de cânula pela sua versatilidade, permite adaptar ainda um dispositivo para amostragem directa de gases no interior do compartimento retículo-ruminal (JOUANY e SENAUD, 1979; MARINHO, 1983).

1.4.2. Técnica cirúrgica: A implantação da cânula no rumen foi feita de acordo com a técnica desenvolvida por JOUANY e LEFAIVRE (1978), descrita por MARINHO (1983), é feita com uma só intervenção cirúrgica, com anestesia local e tranquilizante.

1.5. AS EXPERIÊNCIAS

1ª Experiência: Estudo da adaptação dos animais à incorporação gradualmente crescente de bolota (15, 35, 60 e 70% MS), em dietas isoproteicas a 8,5% PB.

2ª Experiência Estudo da influência de vários níveis de suplementação proteica com bagaço de soja (8,5, 11 e 14% PB), em dietas com incorporação de 70% de bolota.

3ª Experiência: Reimplantação no retículo-rumen dos animais de Polyplastron, Diploplastron, Ophryoscolex, Isotricha e Dasytricha, ciliados que os animais perderam durante o período de adaptação à ingestão de bolota a que foram sujeitos.

4ª Experiência: Estudo da resistência dos microorganismos do retículo-rumen à presença de taninos.

1.6. DESCRIÇÃO DE ALGUMAS TÉCNICAS UTILIZADAS NAS EXPERIMENTAÇÕES "IN VIVO"

1.6.1. Determinação da Osmolalidade - A estimativa da osmolalidade do conteúdo retículo-ruminal dos animais foi feita no sobrenadante de amostras de conteúdo filtrado e centrifugado a alta velocidade a 40 000 g. A determinação é feita por diminuição do ponto crioscópico, utilizando um semimicroosmómetro KNAUER tipo M, após calibração do aparelho utilizando como referências água destilada (0 miliosmoles/Kg) e uma solução de NaCl (12,687g/L - 400 miliosmoles).

1.6.2. Separação das fracções microbianas no fluido retículo-ruminal (JOUANY, 1978) - Após a amostragem, o conteúdo retículo-ruminal é filtrado através de 3 camadas de um tecido de malha muito apertada ("cheese-cloth" ou etamine) para a separação da fracção particulada da fracção fluida. O resíduo sobre a malha é lavada 3 vezes com uma solução de NaCl 0,5%, para libertar o máximo de microorganismos possível das partículas vegetais.

Seguidamente procede-se à separação dos protozoários das bactérias no filtrado. Com este método está-se longe de poder contar com uma parte importante da população na estimativa real da população bacteriana, pois uma parte bastante importante dessa população permanece ligada com as partículas alimentares (CRAIG et al., 1984; CHENG e COSTERTON, 1980; FORSBERG e LAM, 1977). O método proposto baseia-se num método de centrifugação fraccionado, tirando partido não só da grande diferença dimensional das células de ciliados e bactérias, como também dos diferentes coeficientes de sedimentação, de acordo com a lei de Stokes. O esquema metodológico desenvolve-se de acordo com o esquema da Fig.1.4.

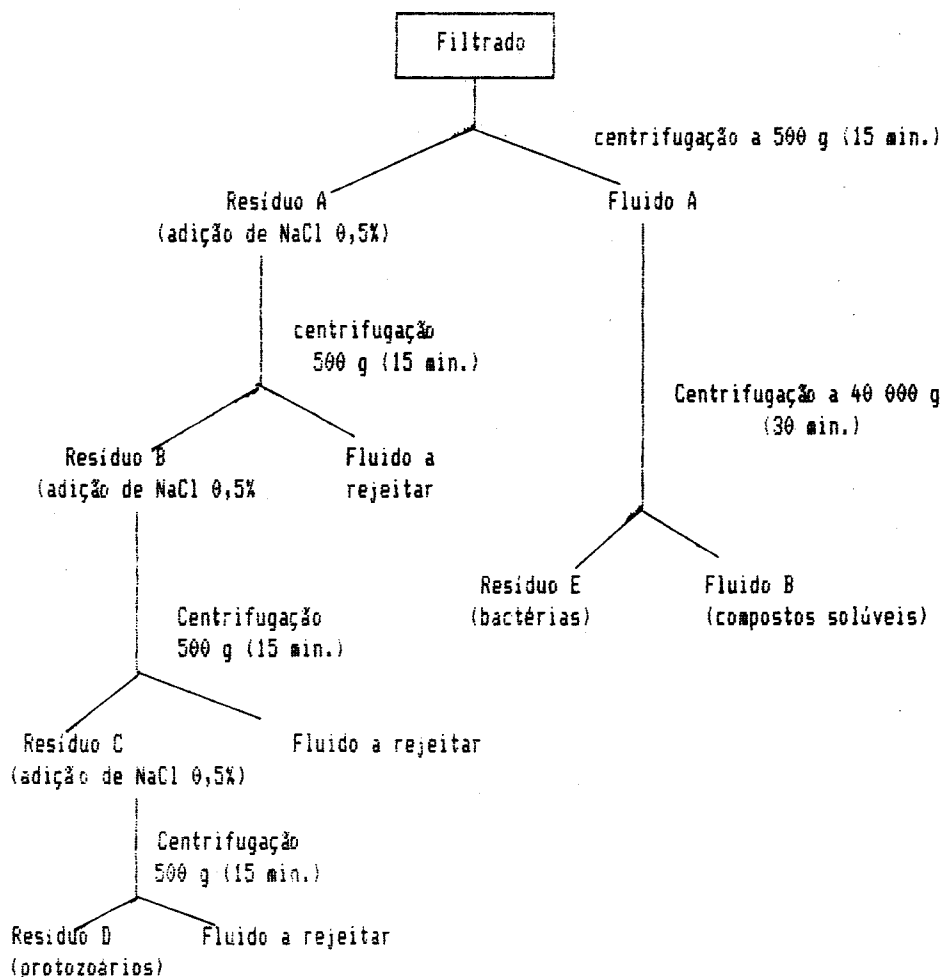
Com esta técnica é possível obter uma fracção de ciliados pouco contaminada com partículas alimentares, e uma fracção bacteriana apropriada. Os resíduos são então liofilizados, armazenados e processados na altura mais apropriada.

Sobre estes liofilizados é feita determinação do peso seco das fracções e do respectivo azoto.

1.6.3. Análise qualitativa e quantitativa dos AGVs - O método por nós utilizado (Lab. Nutrição da Estação Zootécnica Nacional) permite separar os ácidos acético, propiónico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico, em uma única análise. Trata-se de uma cromatografia de adsorção, do tipo gás-líquido em isoterminia, com detecção por ionização de chama. O modelo de cromatógrafo utilizado foi Hewlett-Packard, modelo A 5890.

1.6.3.1. As colunas - As colunas em ácido inoxidável

Fig.1.4 Separação de bactérias e ciliados no fluido retículo-ruminal.



tinham um comprimento de 2 m e uma secção interior de 1/8" , cheias com FFAP 5% + 0,5% H_3PO_4 em Chromosorb WAW, granulometria 80 - 100 mesh.

1.6.3.2. Temperatura e fluxo de gases - O gas de arrasto foi o azoto, com um fluxo de 24 ml/min.. O detector de ionização de chama foi alimentado com hidrogénio e ar, respectivamente com os fluxos, 40 ml/min. e 450 ml/min..

A temperatura do forno foi de 130°C, a do injector 200°C e a do detector 250°C.

1.6.3.2. Modo operativo - O método utilizado foi o método do "padrão interno", para a quantificação de cada ácido nas amostras. Como padrão interno foi utilizado o ácido isocapróico. A 3 ml da solução a analisar acidificada com ácido metafosfórico a 7%, foram adicionados 2,21 mg de ácido isocapróico. A quantidade amostra assim tratada, injectada no cromatógrafo foi 0,4 µl depois de previamente agitada. Cada ácido na mistura foi calculado com base na determinação da área dos picos, com um auxílio de um integrador da mesma marca que o cromatógrafo, sendo os resultados expressos em concentrações molares ou em percentagens molares de cada um dos AGVs.

1.6.4. Bacteriologia - Na quantificação das bactérias viáveis no conteúdo retículo-ruminal dos animais em experimentação, utilizámos o método do "roll-tube" desenvolvido por HUNGATE (1969), para a cultura de anaeróbios estrictos não esporuláveis. Este método tem vindo a ser modificado no sentido duma maior simplicidade na sua utilização. O método de Hungate, que tivémos a oportunidade de contactar no National Animal Disease Center, Ames-IOWA, modificado por BRYANT (1972), HOLDEMAN et al. (1977) e LATHAM e SHARPE (1971), apresenta já uma grande simplicidade na sua execução (MARINHO, 1983).

Os meios de cultura utilizados na quantificação dos anaeróbios totais e substracto-especificos são os sugeridos por BRYANT e ROBINSON (1961) e HOBSON (1969), alguns com algumas modificações sugeridas por outros autores (vidé

Anexo).

1.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com a excepção das observações apresentadas no Capítulo 2, os resultados dos ensaios foram tratados estatisticamente por análise de variância "one-way" (SNEDECOR e CHOCRAN, 1967), para testar o nível de significância das diferenças devidas a um factor, utilizando o "multirange-test" de DUNCAN para comparação de médias. Para testar a significância das diferenças devidas a dois factores e a sua interacção, foi utilizada a análise de variância multifactorial (STEELE e TORRIE, 1982) e a comparação de médias feita com o "multirange-test" de DUNCAN. A análise de regressão linear (STEELE e TORRIE, 1982) foi também utilizada para testar o nível de correlação entre algumas variáveis .

São considerados valores significativos, aqueles que satisfaçam o nível de probabilidade de $P < 0,05$, isto é, concedendo-se 5 % de probabilidades de que qualquer diferença entre tratamentos seja devida ao acaso. Em algumas observações utilizaram-se para os vários níveis de probabilidade as notações: * para $P < 0,05$; ** para $P < 0,01$; e *** para $P < 0,001$.

Na apresentação dos quadros todos os parâmetros observados são apresentados como médias das observações com os respectivos desvios ($\bar{X} \pm EPM$).

CAPf TULO 1

ANEXOS

1.1. Composição da solução diluente anaeróbia (BRYANT e BURKEY, 1953).

	<u>400</u>	<u>ml</u>
Solução Mineral 1.....	15	ml
Solução Mineral 2.....	15	ml
Resazurina (0,1%).....	0,4	ml
H ₂ O desionizada.....	350	ml
Na ₂ CO ₃ (8%).....	15	ml
Cloreto de cisteína (2,5%).....	8	ml

1.1.1. Solução Mineral 1

K ₂ HPO ₄	3,0	g
H ₂ O desionizada.....	500	ml

1.1.2. Solução Mineral 2

KH ₂ PO ₄	3,0	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0	g
NaCl.....	6,0	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O.....	0,6	g
CaCl ₂ ·6H ₂ O.....	0,6	g
H ₂ O desionizada.....	500	ml

1.2. Composição do meio geral (BRYANT e ROBINSON, 1961 -
 modificado por HENNING e VAN DER WALT, 1978).

	<u>100</u>	<u>ml</u>
Glucose.....	0,25	g
Celobiose.....	0,25	g
Xilano.....	1,20	g
Amido solúvel.....	0,50	g
Solução Mineral 1.....	3,75	ml
Solução Mineral 2.....	3,75	ml
Fluido ruminal clarificado.....	40,00	ml
Resazurina (0,1%).....	0,10	ml
Cloreto de cisteína (2,5%).....	2,00	ml
Agar-agar.....	2,00	g
H ₂ O desionizada.....	46,00	ml
Na ₂ CO ₃ (8%).....	5,00	ml

pH 7,00

1.3. Composição do meio de amido (KURIHARA, 1967 -
modificado)

	<u>100</u> <u>ml</u>
Bacto-casitona.....	1,00 g
Extracto de levedura.....	0,25 g
Amido.....	0,50 g
Fluido ruminal clarificado*.....	20,00 ml
Solução Mineral 1.....	15,00 ml
Solução Mineral 2.....	15,00 ml
Resazurina (0,1%).....	0,10 ml
NaHCO ₃	0,40 g
Cloreto de cisteína.....	0,05 g
Agar-agar.....	2,00 g
H ₂ O desionizada.....q.s.p.	100,00 ml

pH 7,00

* Fluido ruminal fermentado durante 7 dias (DEHORITY e GRUBB, 1976).

1.4. Composição do meio de caseína (APPLEBY, 1955 -
modificado por BELLET, 1984)

	<u>100</u>	<u>ml</u>
K ₂ HPO ₄	0,05	g
KH ₂ PO ₄	0,05	g
NaCl.....	0,10	g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01	g
CaCl ₂	0,01	g
Na ₂ CO ₃	0,40	g
Caseína.....	1,00	g
Cloreto de cisteína*.....	0,03	g
Resazurina (0,1%).....	0,10	ml
Fluido ruminal clarificado.....	10,00	ml
Agar-agar.....	2,00	g
H ₂ O desionizada.....q.s.p.	100,00	ml

pH 7,00

* Como redutor e associado ao cloreto de cisteína, foi incluído também 0,1 ml de citrato de titânio (ZEHNDER e WUHRMANN, 1976).

1.5. Composição do Meio de celulose (MANN, 1968).

	<u>100</u>	<u>ml</u>
Celobiose.....	0,025	g
Bacto-casitona.....	0,250	g
Extracto de levedura.....	0,060	g
Solução Mineral 1.....	15,000	ml
Solução Mineral 2.....	15,000	ml
Fluido ruminal clarificado.....	10,000	ml
Resazurina (0,1%).....	0,100	ml
Cloreto de cisteína (2,5%)	2,000	ml
NaHCO ₃	0,400	g
H ₂ O desionizada.....	60,000	ml

pH 7,00

A tira de papel de celulose Whatman nº 1, é incluída no meio após inoculação.

1.6. Meio selectivo para bactérias utilizadoras de ácido láctico (MACKIE e HEATH, 1979.)

	<u>100</u> <u>ml</u>
DL-Lactato de sódio (10%).....	20,00 ml
Bacto-casitona.....	2,00 g
Extracto de levedura.....	0,20 g
Solução Mineral 1.....	7,50 ml
Solução Mineral 2.....	7,50 ml
Resazurina (0,1%).....	0,10 ml
Fluido ruminal clarificado.....	40,00 ml
Na ₂ CO ₃ (8%).....	5,00 ml
Cloreto de cisteína (2,5%).....	2,00 ml
Agar-agar.....	2,00 g
H ₂ O desionizada.....q.s.p.	100,00 ml

pH 7,00

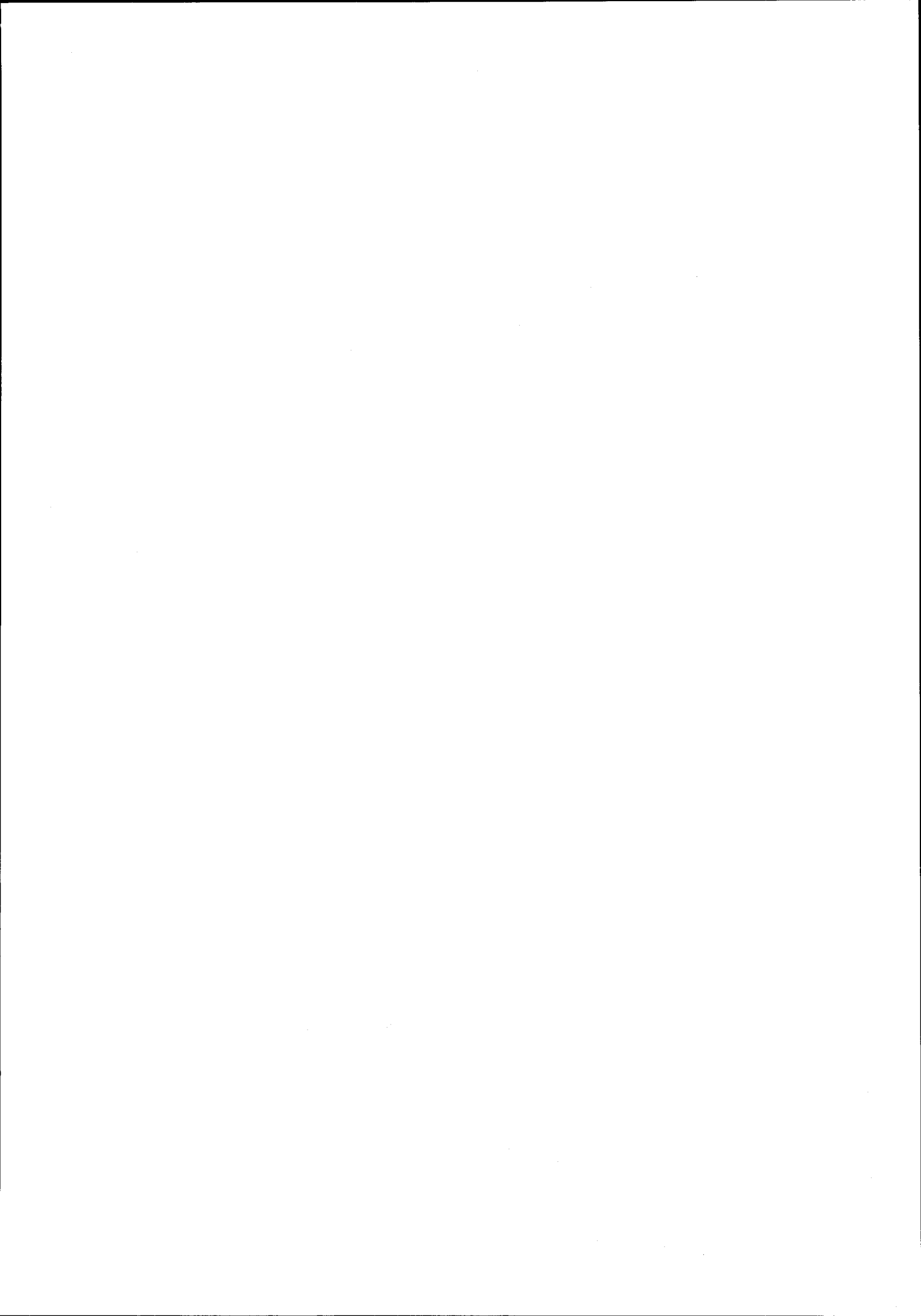
1.7. Composição química dos alimentos que integraram as várias dietas (% MS)

Constituintes	Bolota	Bagaço de soja	Palha
Matéria seca total	65,51 ± 0,14	84,15 ± 0,35	82,66 ± 2,07
Matéria orgânica	97,70 ± 0,50	93,15 ± 0,19	91,24 ± 0,01
Azoto (x 6,25)	5,28 ± 0,31	46,80 ± 0,17	2,78 ± 0,05
NDF*	28,49 ± 0,02	13,53 ± 0,45	76,80 ± 0,92
ADF**	21,22 ± 0,95	8,21 ± 0,52	56,11 ± 1,35
ADL***	8,31 ± 0,09	-	5,30 ± 0,13
Cinzas totais	2,30 ± 0,02	6,85 ± 0,19	8,76 ± 0,01

* Fibra insolúvel em detergente neutro.

** Fibra insolúvel em detergente ácido.

*** Lenhina.



CAPÍTULO 2

ALTERAÇÕES NO RETÍCULO-RUMEN DE OVINOS NO DECURSO DA ADAPTAÇÃO PROGRESSIVA DE INGESTÃO DE NÍVEIS ELEVADOS DE BOLOTA

2.1. INTRODUÇÃO

O conhecimento actual da microbiologia do rumen, particularmente no que respeita à bioquímica e fisiologia de ruminantes alimentados com dietas muito concentradas é bastante vasto. As modificações que se operam no retículo-rumen com a ingestão de grandes quantidades de amido ou açúcares, são largamente testemunhadas por vários autores (KROGH, 1961; ALLISON et al., 1964; DUNLOP e HAMMOND, 1965; MANN, 1970; ALLISON et al., 1975). O número e tipo de organismos, bem como o perfil dos metabólitos da sua fermentação no retículo-rumen de ovinos e bovinos completamente adaptados a dietas moderadamente ou muito ricas em amido, também têm sido objecto de especial atenção (GIESECKE et al., 1966; SLYTER et al., 1968; EADIE et al., 1970; LATHAM et al., 1971; LATHAM et al., 1972; LATHAM et al., 1974; OGIMOTO e GIESECKE, 1974). No que respeita às modificações que ocorrem durante a adaptação, merecem especial relevância os trabalhos de GRUBB e DEHORITY (1975); de HUBER et al. (1976) e o mais exaustivo realizado por MACKIE et al. (1978), que retratam com bastante profundidade a fenomenologia que dirige todo o processo de adaptação no

retículo-rumen. Na transferência dos animais de uma dieta para outra com características diferentes, é imprescindível um período de adaptação mais ou menos longo, que pode ser definido como o lapso de tempo necessário para que a população microbiana estabilize (GRUBB e DEHORITY, 1975). A duração desse período de adaptação depende de quão radical é essa transferência (HALL e WOOLFOLK, 1952; LLOYD et al., 1956; NICHOLSON et al., 1956).

Em regra, as transferências bruscas dos animais de uma dieta muito celulósica para outra com uma composição elevada em amido e açúcares, desencadeia no retículo-rumen modificações muito rápidas na composição da microfauna e microflora, acompanhadas de alterações importantes no epitélio da mucosa, que nos casos mais extremos pode terminar com o desenvolvimento de uma indigestão ácida aguda. A evolução desta troca varia de alguma forma de umas situações para outras. Usualmente, a flora bacteriana normal, os protozoários ciliados e a produção de AGVs, são severamente reprimidos e aumenta simultaneamente a população de Streptococcus bovis e Clostridium butyricum, bactérias amilolíticas acidotolerantes, em detrimento das bactérias celulolíticas (STEWART, 1977). Este quadro é acompanhado de uma grande produção de ácido láctico, etanol e uma descida nos valores de pH (Fig.2.1.). O ácido láctico, com um pK mais baixo que os AGVs, tende a baixar ainda mais os valores de pH, se a intervenção das espécies bacterianas utilizadoras do ácido láctico (Selenomonas ruminantium e Megasphaera elsdenii) não se fizer sentir, mobilizando o ácido láctico e

transformando-o em ácido propiônico. Com efeito, o ácido láctico, particularmente o isômero D, é metabolizado a uma

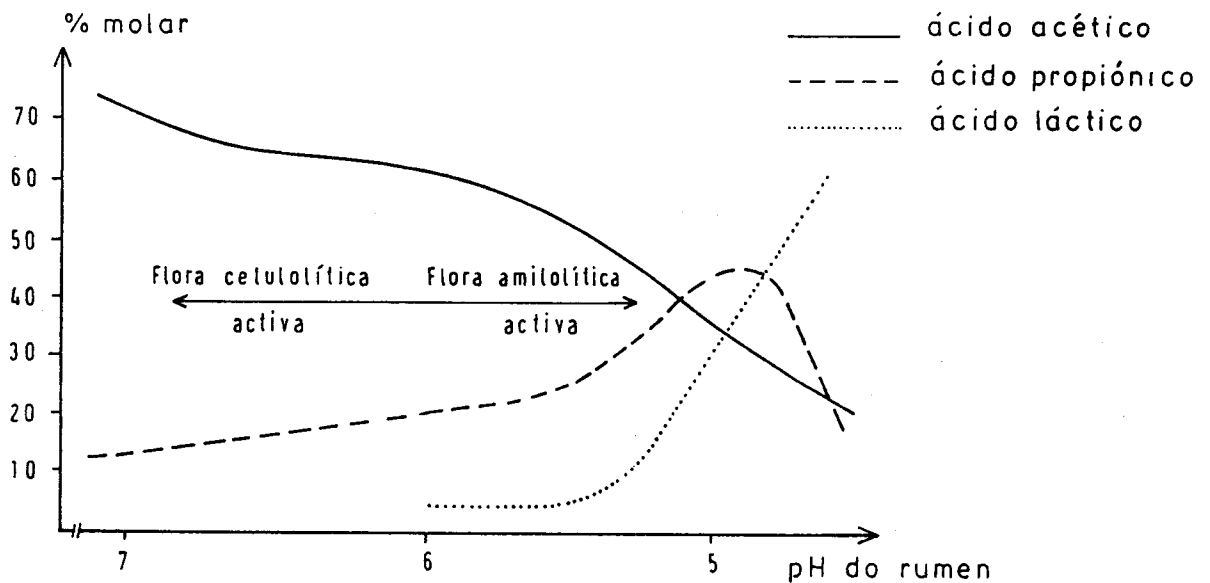


Fig.2.1 - Adaptação das fermentações do retículo-rumen em resposta às variações de pH (KAUFMANN et al., 1981).

taxa muito baixa pelos tecidos do animal (ALLISON et al., 1964).

EADIE e MANN (1970) sugerem que a incorporação de materiais fibrosos nas dietas ricas em granulados, podem contribuir para a estabilização da micropopulação retículo-ruminal, particularmente a população de protozoários ciliados. A inclusão de feno em dietas de produção tem

mostrado aumentar as "performances" quer de ovinos (ORSKOV et al., 1971; BIGHAM e McMANUS, 1975; DAVIS, 1977), quer de bovinos (NICHOLSON e CUNNINGHAM, 1961).

McMANNUS et al.(1977) faz referência ao aparecimento de microlesões em papilas aparentemente sãs em carneiros ingerindo 100% de trigo. LEE et al.(1982) não observaram qualquer evidência de lesões macroscópicas. No entanto, conseguiram observar microlesões na mucosa em 10 de 24 animais.

A degradação do amido no reticulo-rumen é da responsabilidade não só das bactérias específicas

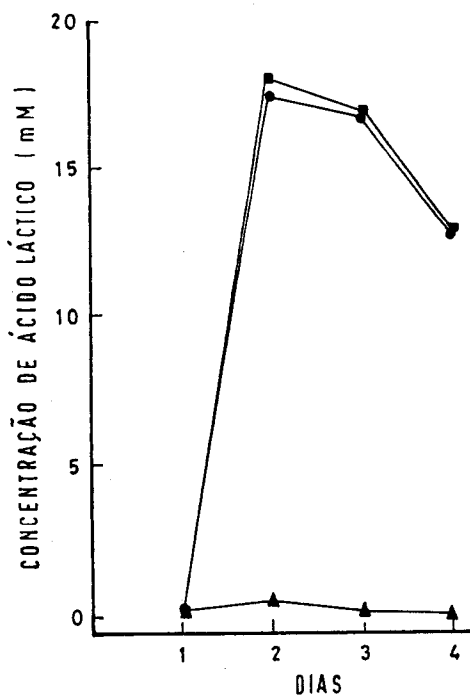


Fig. 2.2 - Concentrações de ácido láctico total e isômeros D- e L- no conteúdo retículo-ruminal de ovinos 8 h após a ingestão de trigo nos primeiros 4 dias. ■ ácido láctico total, ● ácido D-láctico e ▲ ácido L-láctico (LEE et al., 1982).

anteriormente referidas, mas também da responsabilidade de algumas bactérias fibrolíticas. Estas bactérias produzem α -

β - e γ -amilases, que decompõem completamente a estrutura molecular do amido.

O amido não apresenta sempre a mesma degradabilidade no retículo-rumen, facto que tem a ver com as características da planta de onde provém. O amido existe no interior do endosperma dos cereais emaranhado numa matriz proteica, que é particularmente resistente no sorgo e no milho (ROONEY e PFLUGFELDER, 1986). A degradabilidade do amido é afectada pelas espécies de plantas, o grau de interacção amido-proteína, a forma física do grânulo de amido, a presença de inibidores químicos como os taninos, e o tipo de amido (ROONEY e PFLUGFELDER, 1986). Entre os cereais, o sorgo geralmente é o que apresenta a mais baixa taxa de degradação, a camada periférica resistente do endosperma sendo a responsável por tal efeito. Com o milho, 30% ou mais de amido escapa à fermentação no retículo-rumen, a maior parte do qual será digerido no intestino delgado ou fermentado no intestino grosso (ORSKOV, 1986). O amido fermentado no cego provoca um aumento nas perdas de azoto nas fezes. A digestão do amido no cego conduz à síntese de proteína microbiana a partir do azoto residual na digesta e da ureia que penetra no intestino grosso. O N microbiano é então excretado nas fezes, com a correspondente diminuição da excreção do N urinário, baixando a digestibilidade aparente do azoto da dieta de 70 para 50% (ORSKOV, 1986).

A bolota de azinho (Quercus ilex) e sobro (Q. suber), pela sua composição química, satisfaz cabalmente todas as condições para ser encarada como um concentrado energético de

acordo com o TABELA 2.1.. que se apresenta (CARVALHO, 1979).

Tabela 2.1. Composição química de duas variedades de bolota (% MS)

	Azinho	Sobro
Açúcares.....	16,4	19,7
Amido.....	65,9	58,6
Proteína.....	6,1	6,4
Pentosanas.....	1,9	2,0
Resíduo celulósico...	8,7	13,3
Cinzas.....	2,3	1,0

Este facto e as modificações por nós observadas em estudos anteriores (MARINHO, 1983; MARINHO, 1984 - não publicado) na composição da microfauna do retículo-rumen, colocou-nos o imperativo de estudar as alterações qualitativas e quantitativas da micropopulação retículo-ruminal, bem como outros parâmetros físico-químicos, quando os animais transitam de uma dieta fibrosa convencional para dietas incorporando níveis crescentes de bolota como fonte de energia.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Animais e dietas - Foram utilizados 3 ovinos Me-

rino Branco adultos, munidos de cânulas ruminais, alimentados ao nível de manutenção com dietas isoproteicas a 8,5% PB. O carneiro # 3, foi omitido em alguns estudos, devido ao facto de durante algum tempo na fase de adaptação, ter tido problemas com a cânula ruminal.

A transição gradual da dieta convencional grosseira (80% de palha + 20% de concentrado comercial, 13% PB), oferecida "ad libitum", para a dieta contendo 70% MS de bolota (D₄) foi realizada com três níveis de incorporação intermédia de bolota, 15%, 35%, respectivamente D₁, D₂ e D₃, 7 - 10 dias para cada nível de incorporação. A composição das dietas vem expressa na Tabela 2.2..

Tabela.2.2. - Níveis de incorporação (% MS) de palha, bolota e bagaço de soja.

Componentes da mistura	Dietas			
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
Palha	72,5	53,5	29,17	20,43
Bolota	15	35	60	70
soja	12,5	11,5	10,23	9,5

2.2.2. Amostragem do conteúdo retículo-ruminal: As recolhas de amostras de conteúdo retículo-ruminal foram feitas às 0h (em jejum), 2h, 4h e 6h após a primeira ingestão alimentar.

2.2.3. Microbiologia - Todas as manipulações anaeróbicas foram realizadas de acordo com as técnicas desenvolvidas por HUNGATE (1969). Foram utilizados os meios 98 - 5 + xilano (HENNING e VAN DER WALT, 1978), de amido (KURIHARA, 1967) e de ácido láctico (MACKIE e HEATH, 1979), respectivamente na quantificação das bactérias viáveis, anaeróbias totais, utilizadoras de amido e utilizadoras de ácido láctico. A amostra utilizada na inoculação dos meios era constituída pela mistura das várias amostras colhidas no período de 6h. Todas as diluições foram processadas de acordo com BRYANT e BURKEY (1959).

O número de protozoários ciliados foi feita de acordo com WARNER (1962_a), PURSER e MOIR (1958 - modificado por MARINHO, 1983) e a distribuição genérica foi feita de acordo com a nomenclatura de OGIMOTO e IMAI (1981).

2.2.4. Análises químicas: O pH das amostras foi rapidamente determinado após a sua recolha, antes de se proceder à sua filtração através de "itamine", para a remoção do material particulado. As amostras destinadas à determinação do N - NH_4^+ , AGVS e ácido láctico, foram imediatamente congeladas a -25°C , após a adição de 0,2 ml de H_2SO_4 .

O N - NH_4^+ foi determinado titrimetricamente (AOAC, 1972). O ácido láctico foi determinado de acordo com HARPER e RANDOLPH (1964). Os AGVs foram determinados por cromatografia gás-líquido.

2.2.5. Osmolalidade: A osmolalidade do conteúdo retículo-ruminal foi determinada em amostras centrifugadas a 40 000 g, pelo abaixamento do ponto crioscópico, utilizando um semi-

microosmómetro KNAUER.

2.2.6. Biomassa microbiana: o resíduo seco microbiano foi determinado sobre os "pellets" liofilizados, provenientes da centrifugação anterior, e após 3 lavagens sucessivas com NaCl 0,5%. O N total microbiano foi determinado por Kjeldhal, em duplicados de 250 mg de resíduo seco microbiano.

2.2.7. Fenóis totais e taninos: Os fenóis totais foram determinados no sobrenadante das amostras centrifugadas a 40 000 g, pelo método do Azul da Prússia de acordo com ALMEIDA (1986).

Os taninos no alimento e no fluido retículo-ruminal foram determinados por turbidimetria de acordo com o método desenvolvido por ALMEIDA (1986).

2.3. RESULTADOS

Em todas as situações os animais ingeriram integralmente a bolota e a soja no espaço de tempo de 1/2 - 1 hora. A ingestão da palha foi mais arrastada.

Tanto as bactérias anaeróbias totais como as utilizadoras de amido aumentaram a sua população com a incorporação de bolota (Figs.2.3. e 2.4.) até ao nível de 60%, se bem que em D1 tenha sido um pouco devido à diminuição da população de ciliados. As bactérias utilizadoras de ácido láctico, aparentemente, manifestam um crescimento evidente da sua população em D2 e D3 (Fig.2.5.).

A composição inicial (D_0) da população de protozoários ciliados nos três carneiros, vem expressa no Quadro 2.1..

A diminuição da população ciliada Entodiniinae em D1, deve-se não só à grande modificação ambiental introduzida com a incorporação de bolota, particularmente diminuição acentuada nos valores de pH em 0,8 unidades, como também, muito provavelmente, à diminuição dos teores em energia e proteína. No entanto o seu crescimento é manifestamente exuberante quando os animais são transferidos para a D2, voltando novamente a diminuir quando são transferidos para D3, vindo a aumentar ligeiramente a sua população na transição para D4, para novamente voltar a diminuir. Facto bastante marcante é o

Quadro 2.1. Composição da microfauna dos três carneiros no início da sua fase de adaptação

Espécies de Ciliados	Carneiro # 1		Carneiro # 2		Carneiro # 3	
	D ₀	D ₄	D ₀	D ₄	D ₀	D ₄
<u>Isotrichidae</u>						
<u>Isotricha prostoma</u>	+	-	+	-	+	-
<u>Dasytricha ruminantium</u>	+	-	+	-	+	-
<u>Entodiniinae</u>						
<u>Entodinium nanellum</u>	++	+	++	-	++	-
<u>Entodinium simplex</u>	+	-	+	-	+	-
<u>Entodinium exiquum</u>	+++	-	+++	-	+++	-
<u>Entodinium brevispinum</u>	-	-	+	-	+	+
<u>Entodinium caudatum</u>	-	+	+	-	+	+
<u>Entodinium longinucleatum</u>	-	+	+	+	+	+
<u>Entodinium bursa</u>	-	-	-	-	+	-
<u>Entodinium dilobum</u>	-	++	-	+++	-	+++
<u>Diplodiniinae</u>						
<u>Diplodinium sp.</u>	+	-	-	-	-	-
<u>Diploplastron affine</u>	+	-	+	-	+	-
<u>Polyplastron multivesiculatum</u>	+	-	+	-	+	-
<u>Ophryoscolecinae</u>						
<u>Ophryoscolex sp.</u>	-	-	+	-	+	-

+++ Formas predominantes
 ++ Numerosas
 + Raros
 - Ausentes

desaparecimento gradual dos Entodinium de pequena dimensão, sendo substituídos por Entodinium longinucleatum, formas de grande dimensão (Fig.2.9.), que apresentaram a sua máxima expressão em D3.

Os outros grupos de ciliados apresentam padrões de comportamento bastante diferenciados, conforme pode ser observado nas Figs. 2.6, 2.7., 2.8. e 2.10.. Assim, os Isotricha e Dasytricha, apresentaram um comportamento semelhante entre si, não mostrando fortes respostas populacionais ao incremento dos vários níveis de bolota, acabando gradualmente por desaparecer do retículo-rumen em D4, situação mais dramática para Dasytricha, que no carneiro # 2 deixa de ter expressão populacional já em D3. Os Diplodiniinae, embora com trajecto semelhante, tiveram um comportamento mais irregular entre os animais (Fig.2.10.). Tal como os holótricos, acabaram gradualmente por desaparecer do retículo-rumen.

O pH baixou imediatamente, conforme referido, 0,8 unidades com a introdução do primeiro nível de bolota, mas foi em D2 que foi registado o valor mais baixo para o pH, 5,8.

O perfil apresentado pelos animais para o $N - NH_4^+$ (Fig. 2.13.) foi manifestamente irregular, seguindo de perto a curva de desenvolvimento da população de ciliados, atingindo os seus valores mais baixos em D3 e D4, respectivamente 10,6 e 10.4 mg $N - NH_4^+$ /100 ml de fluido retículo-ruminal.

A biomassa microbiana total (Fig. 2.15.), cresce progressivamente atingindo o máximo de crescimento em D3. Excepção para o carneiro # 1, que o valor mais baixo para a biomassa microbiana total em D2. O azoto total microbiano,

conforme pode ser observado na mesma figura, acompanha de perto a evolução da biomassa, atingindo também o seu valor mais elevado em D3 e em D2 para o carneiro # 1.

A concentração de ácido láctico (Fig. 2.12.), aumenta progressivamente com a incorporação de bolota, apresentando dois picos bastante bem marcados em D2 e D3, no carneiro # 2 e no carneiro # 3. No carneiro # 1 o primeiro pico desenvolve-se já no fim de D1.

A osmolalidade (Fig. 2.14.), embora situando-se sempre no limiar dos valores mínimos apresentados como fisiológicos (250 mOsmoles), vai aumentando gradualmente com a incorporação gradual da bolota, facto que estará relacionado

Quadro 2.2. Evolução do volume retículo-ruminal e da taxa de "outflow" do Cr.EDTA em função dos incrementos de bolota ($\bar{X} \pm \text{e.p.m.}$)

Dietas e % bolota	Carneiro # 1		Carneiro # 2	
	Volume (L) Reticulo-ruminal	Taxa de "outflow" (%/H)	Volume (L) Reticulo-ruminal	Taxa de "outflow" (%/H)
D ₁ (15% Bolota)	14,77 \pm 1,42	5,18 \pm 0,45	9,65 \pm 0,35	5,96 \pm 0,46
D ₂ (35% Bolota)	14,85 \pm 1,47	5,05 \pm 0,41	9,73 \pm 0,37	5,48 \pm 0,38
D ₃ (60% Bolota)	16,81 \pm 1,35	5,56 \pm 0,45	7,73 \pm 0,29	9,13 \pm 0,28
D ₄ (70% Bolota)	15,99 \pm 1,29	6,63 \pm 1,36	10,18 \pm 0,33	5,17 \pm 0,15

Marcador introduzido no retículo-rumen 1 h após a ingestão alimentar da manhã.

com a subida nos valores da concentração dos ácidos gordos voláteis totais (AGVTs).

A taxa de diluição da fase líquida do retículo-rumen medida apenas em 2 animais, baixou de D₁ para D₂, aumentou em

Quadro 2.5.. Evolução da concentração de fenóis totais (mg/100 ml) no fluido reticulo-ruminal dos ovinos durante a fase de adaptação à bolota ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Carneiro Nº	Diets			
	D1	D2	D3	D4
1	5,2 ± 0,6	10,7 ± 0,9	6,5 ± 0,5	4,9 ± 0,6
2	8,5 ± 0,8	6,2 ± 0,7	4,9 ± 0,4	5,2 ± 0,4
3	11,0 ± 0,9	8,5 ± 0,9	6,2 ± 0,7	8,8 ± 0,9

em D₃, e em D₄ aumentou no carneiro # 1 e baixou no carneiro # 2 (Quadro 2.4.).

A concentração de fenóis no fluido reticulo-ruminal, não apresenta grandes modificações com a incorporação de bolota, se bem que a concentração de taninos vá aumentando com a incorporação gradual da bolota (de 0,67 a 3,15%). O carneiro #1 apresenta em D₂ o valor mais elevado para a concentração de fenóis (Quadro 2.5.).

A evolução das concentrações dos AGVs ao longo do período de adaptação vem expresso no Quadro 1.6, onde é possível verificar que a concentração dos AGVT aumenta de uma forma expressiva na transição de D1 para D2, onde os valores atingem em média 8,2 mmoles/100ml. Nesta transição a população de ciliados aumenta exuberantemente a sua população. Em D3 a concentração dos AGVT diminui ligeiramente, para novamente subir em D4, mas sem atingir a expressão de D2. A percentagem relativa de ácido acético sobe gradualmente até D3, baixando os seus valores em D4. Esta subida é acompanhada pela descida da percentagem relativa do ácido butírico. O ácido propiónico atinge o seu valor mais baixo em D2 e sobe

gradualmente em D3 e D4.

2.4. DISCUSSÃO

A diminuição da população de ciliados em D1 fica, provavelmente, a dever-se não só à diminuição do nível alimentar (POTTER e DEHORITY, 1973; WARNER, 1962) mas também à alteração da relação azoto/energia. Com efeito, os animais transitaram de uma dieta "ad libitum" (D₀), em que tiveram à disposição feno de baixa qualidade suplementado com um concentrado comercial (70 : 30 - 9% PB), para uma dieta ao nível de manutenção. O facto de as bactérias terem manifestado um pico populacional em D1, ficou a dever-se fundamentalmente à diminuição da população de ciliados (TEATHER et al., 1984).

A substituição dos Entodiniinae de pequena dimensão por Entodinium longinucleatum, de muito maior dimensão, estará provavelmente relacionado com a eliminação gradual dos Diplodiniinae, que provavelmente controlam aquela subpopulação. Estudos "in vitro" por nós realizados evidenciaram que quando Diploplastron affine desaparecia da combinação populacional, os Entodiniinae de maior dimensão (E. bursa e E. longinucleatum), libertando-se da pressão de predação exercida por Polyplastron multivesiculatum e Diploplastron affine, ganhavam sistematicamente grande expressão populacional, eliminando quase completamente a presença dos pequenos Entodiniinae, metabolicamente mais importantes no reticulo-rumen.

A eliminação gradual dos Isotrichidae, particularmente Dasytricha ruminantium, não seria talvez de esperar, uma vez que a concentração de glúcidos colocada à disposição pela bolota é bastante aceitável (CARVALHO, 1979). Outros factores não facilmente evidenciáveis terão contribuído para o seu desaparecimento, nomeadamente a tipo de glúcidos solúveis na composição da bolota. Com efeito, estes ciliados ocupam um nicho ecológico onde não cabe a utilização do amido e apenas preferencialmente glucose, frutose, celobiose, sacarose e rafinose (HOWARD, 1959 - cit. por HUNGATE, 1966; HEAD e OXFORD, 1953 - cit. por HUNGATE, 1966). Contrariamente, Isotricha para além de utilizar os mesmos glúcidos solúveis, possui adicionalmente a capacidade de utilizar o amido (HUNGATE, 1966), conferindo-lhe maior capacidades para competir no ecossistema.

O desaparecimento dos Diplodiniinae a que se assistiu no final do período de adaptação poderá ter sido em parte devido à diminuição gradual da palha nas dietas, complicada talvez com a eventual intensa lipólise, limitação da utilização da fibra da palha e adicionalmente o baixo pH que se registou em D₂, pois que a diminuição gradual começou a tomar desenvolvimento nesta fase. A limitação na disponibilidade em fibra pode, com efeito, criar dificuldades na manutenção deste grupo de ciliados, uma vez que constituem os grandes utilizadoras deste tipo de material (HUNGATE, 1942 e 1943; ABOU AKKADA et al., 1963; DEHORITY, 1981 -inf. pessoal).

As bactérias anaeróbias totais viáveis manifestam cres-

cimento populacional em D₂ e mais intensamente em D₃ onde desenvolvem a sua máxima expressão populacional. Contudo os seus picos populacionais acontecem quando a população de ciliados diminui (WARNER, 1962; HUMGATE, 1966; COLEMAN, 1975). As bactérias utilizadoras de amido embora acompanhando a curva de crescimento dos anaeróbios totais, apresentam o seu pico máximo populacional em D₂. Seria de esperar uma população mais elevada em D₃, com o "apport" de energia bastante mais elevado, mas tal não se manifestou por qualquer fenómeno de interferência. As concentrações de ácido láctico nunca superiores a 25 mg/L, muito aquém dos valores referidos na literatura em animais ingerindo grandes quantidades de concentrados energéticos (EADIE et al., 1970; NEWBOLD et al., 1986) não parecem justificar uma inibição desta envergadura. Sem dúvida nenhuma que em D₃ o espaço populacional abandonado pela população amilolítica, foi ocupado pela microflora utilizadora de ácido láctico, que apresenta aqui a sua expressão máxima de crescimento. Com efeito, apesar de neste nível de incorporação de bolota as concentrações de ácido láctico terem atingido o seu valor máximo, o efeito sobre os valores de pH não se fez sentir devido à intervenção sinérgica da flora utilizadora de ácido láctico e dos ciliados que aqui apresentam um pico populacional. NEWBOLD et al. (1986) referem que nos animais faunados a taxa de remoção de ácido láctico é bastante mais elevada que aquela apresentada pelos animais desfaunados. WILLIAMS (1983) trabalhando "in vitro", verificou que os ciliados provenientes de animais alimentados com silagem

utilizavam o ácido láctico 10 a 20 vezes mais rapidamente que a fracção bacteriana. O facto de a flora bacteriana utilizadora de ácido láctico e a população de ciliados não apresentarem grande expressão populacional em D₂ justifica os baixos valores de pH registados nesta dieta. A modificação na microflora ao longo da fase de adaptação está perfeitamente patente na sequência fotográfica feita sobre os esfregaços efectuados ao longo deste período no carneiro # 2. Assim para além da densidade populacional bacteriana ser manifestamente superior com a ingestão de bolota, é possível constatar um aumento do número de selenomonas (MOIR e MASSON, 1952), lactobacilos e bifidobactérias, de acordo com as observações feitas por LATHAM et al. (1971).

A evolução dos AGVs ao longo do período de adaptação expressa no Quadro 2.6., permite verificar que a concentração dos AGVTs aumenta de uma forma bastante expressiva na transição de D₁ para D₂, onde os animais apresentam uma concentração média de 8,2 mMoles/100ml. A sua concentração diminui ligeiramente em D₃, para novamente subir em D₄ mas sem atingir valores tão elevados como em D₂. A evolução da percentagem molar relativa para os ácidos acético, propiónico e butírico apresentam um perfil bastante característico. A percentagem relativa de ácido acético sobe gradualmente até D₃, diminuindo em D₄. Esta subida é acompanhada pela descida nos valores do ácido butírico. O ácido propiónico atinge o seu valor mais baixo em D₂, subindo gradualmente até D₄.

Quadro 2.6. Evolução dos AGVs ao longo do período de adaptação à bolota (m.moles/100 ml)($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Ovino Nº	D ₁ - 15% Bolota			D ₂ - 35% Bolota			D ₃ - 60% Bolota			D ₄ - 70% Bolota		
	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico
1	2,87±0,25	0,63±0,08	0,50±0,07	7,73±0,08	1,10±0,12	0,91±0,10	2,67±0,29	0,37±0,05	0,23±0,07	6,76±0,01	0,94±0,09	0,88±0,11
2	1,53±0,18	0,41±0,06	0,27±0,09	4,85±0,57	0,70±0,09	0,63±0,05	5,69±0,88	1,07±0,08	0,48±0,08	3,30±0,38	1,16±0,08	0,64±0,09
3	-	-	-	-	-	-	4,36±0,57	0,48±0,09	0,58±0,12	3,77±0,38	0,72±0,09	0,73±0,07

(-) Não foi possível amostrar devido a problemas com a cânula do animal.

Apesar da influência dos ciliados na produção de AGVs referida na literatura ser bastante controversa, alguns estudos referem, no entanto, níveis de AGVs mais elevados quando os ciliados estão presentes (CHRISTIANSEN et al., 1965); JOUANY, 1979), uma subida nos valores para o ácido propiónico (ABOU-AKKADA e EL-SHAZLY, 1964) ou ácido butírico (KLOPFENSTEIN et al., 1966), neste estudo apenas o incremento nos valores dos AGVTs acompanham o crescimento da população de ciliados, talvez devido à instabilidade apresentada pelo retículo-rumen nesta fase. A produção de ácido propiónico no retículo-rumen é implementada com a presença de ácido láctico no retículo-rumen (KAUFMANN et al. 1981). Neste estudo, não foi possível verificar essa tendência, talvez pelo facto de as concentrações de ácido láctico não terem sido muito elevadas.

O perfil do $N-NH_4^+$ muito diferente nos três animais, acompanha, no entanto, a curva de crescimento dos ciliados em conformidade com as observações efectuadas por outros autores (KLOPFENSTEIN et al., 1966; JOUANY, 1979).

As taxas de diluição da fase líquida do conteúdo retículo-ruminal mostraram um certo grau de flutuação acompanhando a curva de crescimento populacional dos ciliados. ORPIN e LETCHER (1983) referem que a taxa de diluição do retículo-rumen dos animais faunados é superior àquela apresentada pelos animais desfaunados. Não foi possível observar neste estudo uma tendência para a diminuição das taxas de diluição da fase líquida, tal como os autores referem quando se aumenta o nível de concentrado nas

dietas (EADIE et al., 1970).

CAPITULO 2

ANEXOS

Fig. 2.3. Variação dos anaeróbios viáveis totais no período de adaptação à ingestão de bolota.

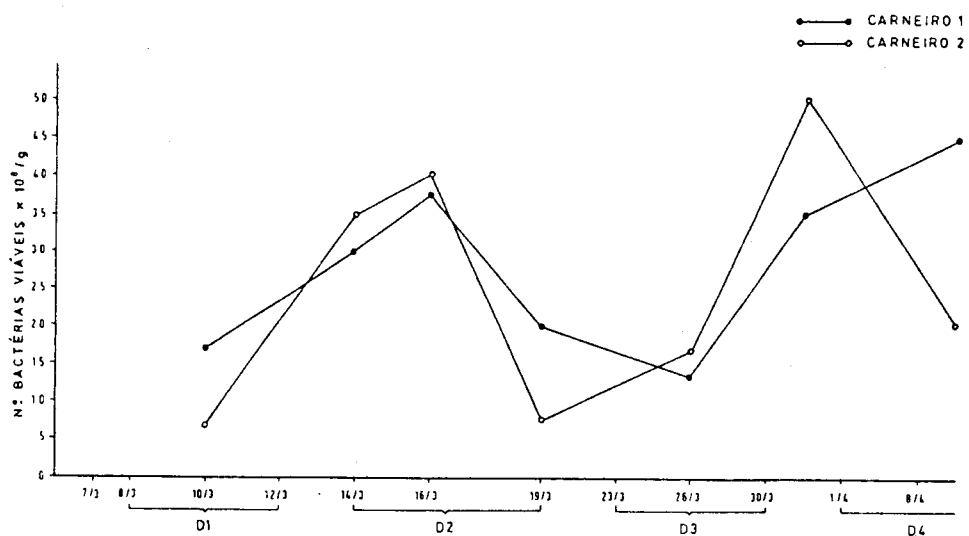


Fig. 2.4. Variação da flora amilolítica no período de adaptação à ingestão de bolota

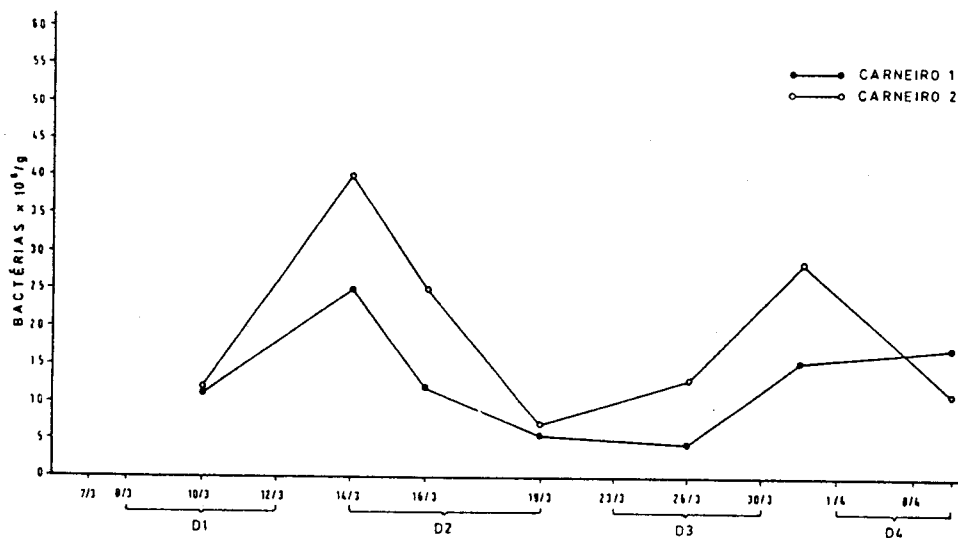


Fig. 2.5. Variação da flora láctica no período de adaptação à ingestão de bolota.

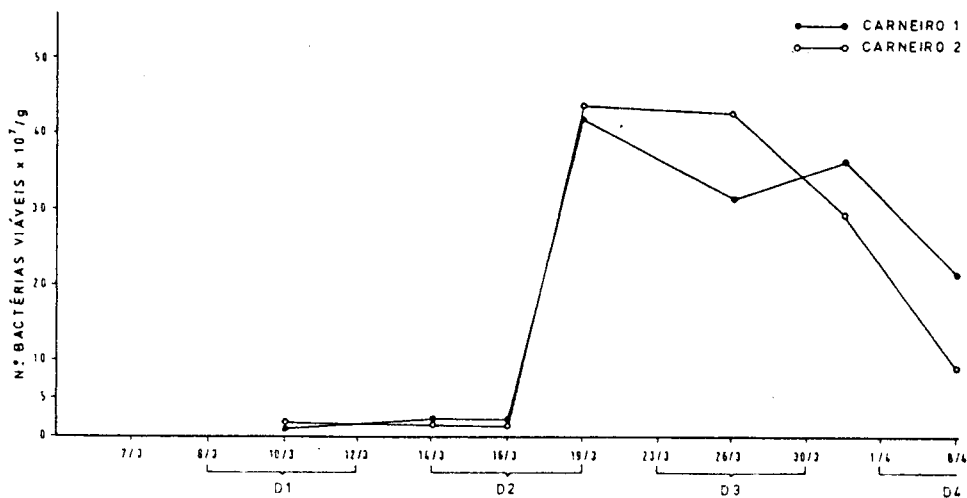


Fig. 2.6. Variação na microfauna Entodini-
inae no período de adaptação à ingestão de bolota

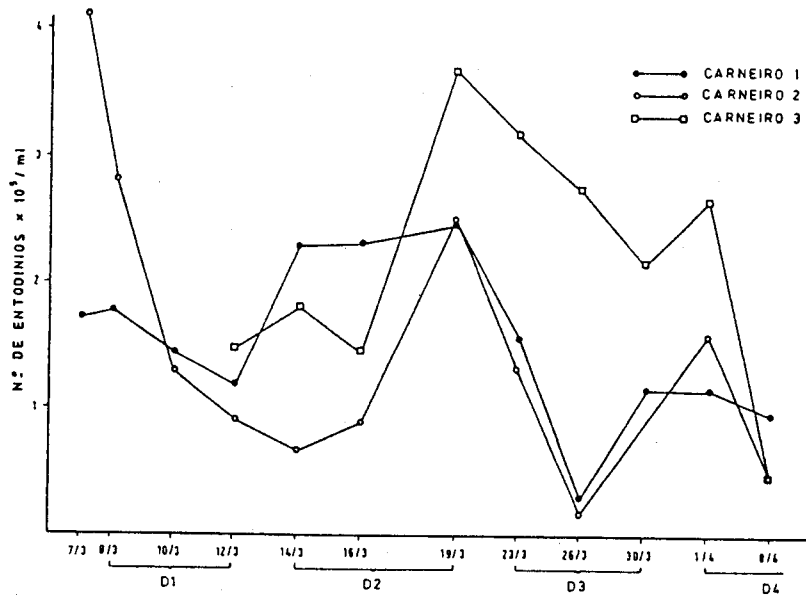


Fig. 2.7. Variação da microfauna Isotricha no período de adaptação à ingestão de bolota.

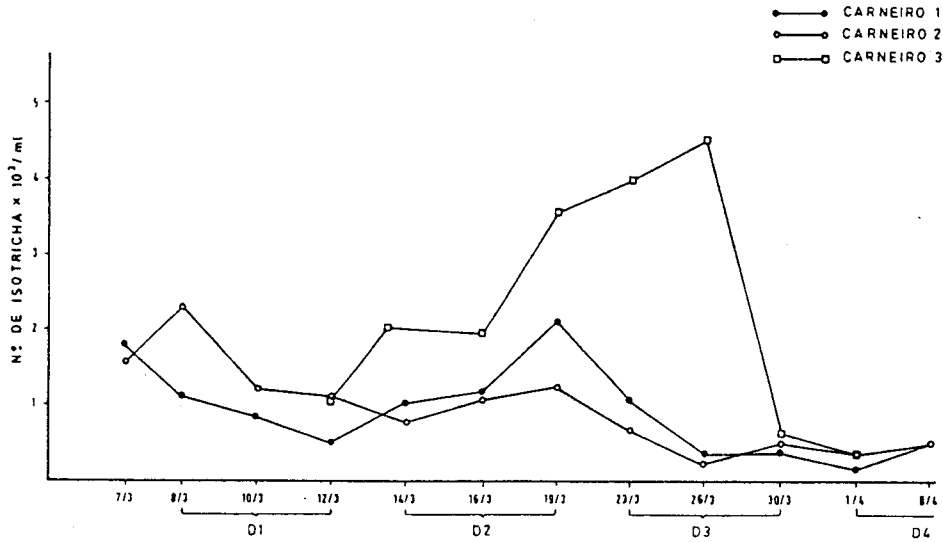


Fig. 2.8. Variação na microfauna Dasytricha no período de adaptação à ingestão de bolota.

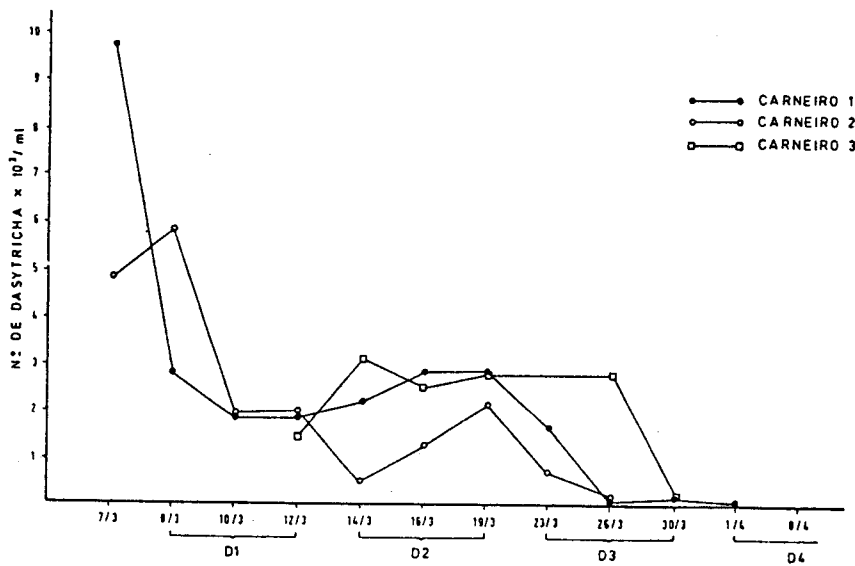


Fig. 2.9. Evolução de Entodinium longinucleatum no período de adaptação à ingestão de bolota.

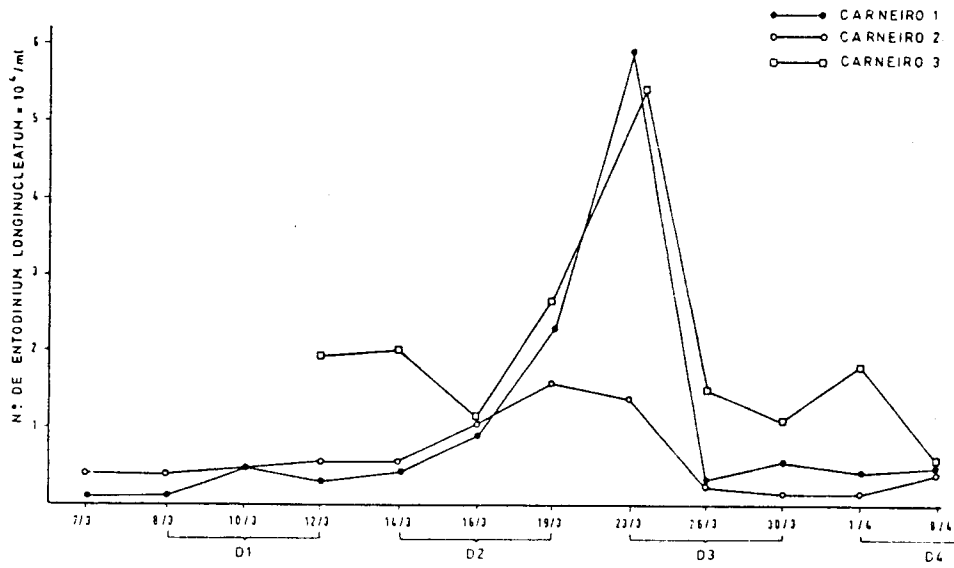


Fig. 2.10. Variação da microfauna Diplodiniinae no período de adaptação à ingestão de bolota.

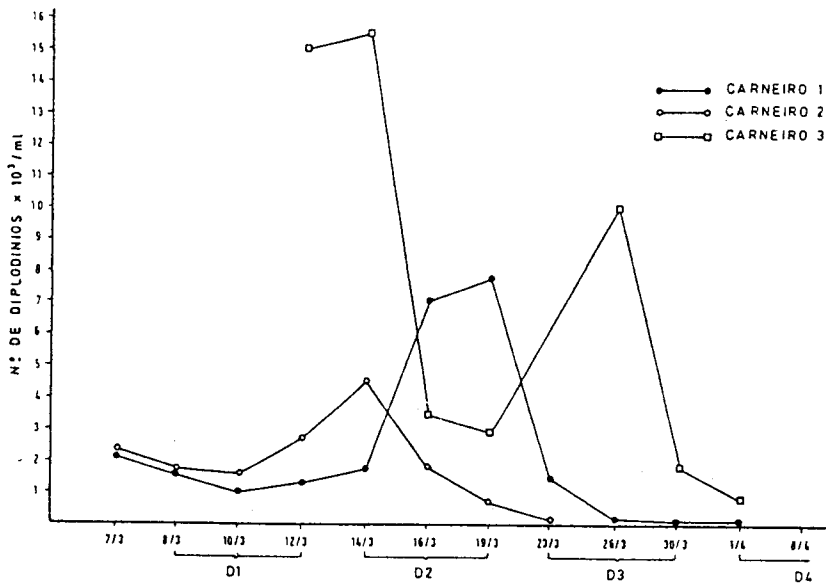


Fig. 2.11. Evolução nos valores do pH no período de adaptação à ingestão de bolota.

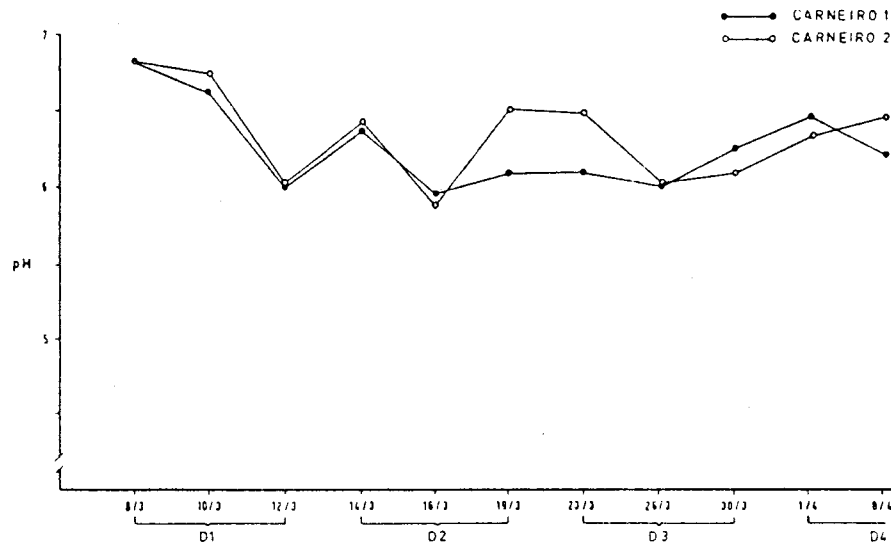


Fig. 2.12. Variação nas concentrações de ácido láctico no conteúdo retículo-ruminal no período de adaptação à ingestão de bolota.

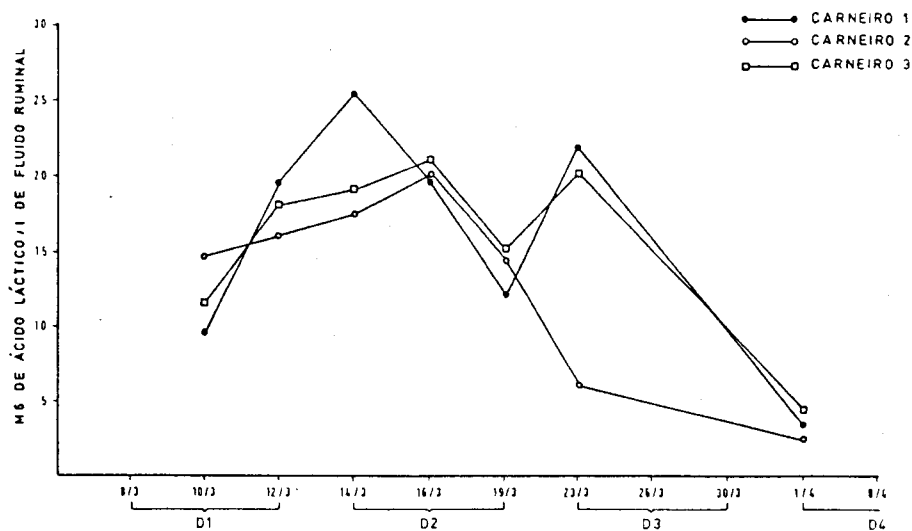


Fig. 2.13. Variação nos valores do $N-NH_4^+$ no conteúdo retículo-ruminal no período de adaptação à ingestão de bolota.

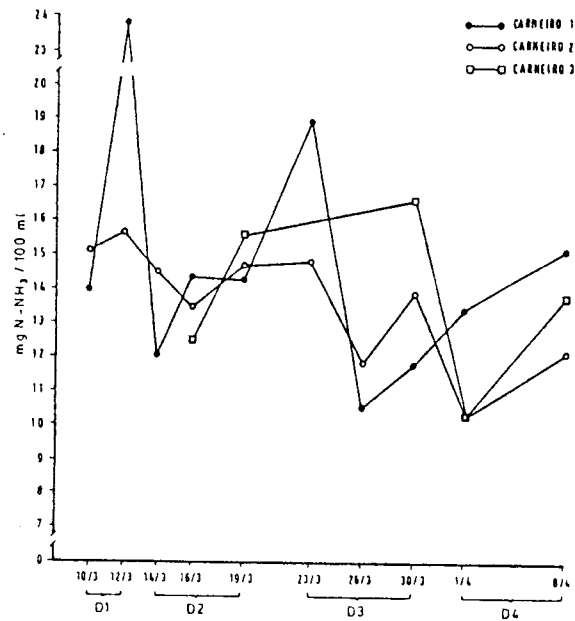


Fig. 2.14. Variação da osmolalidade do conteúdo retículo-ruminal no período de adaptação à ingestão de bolota.

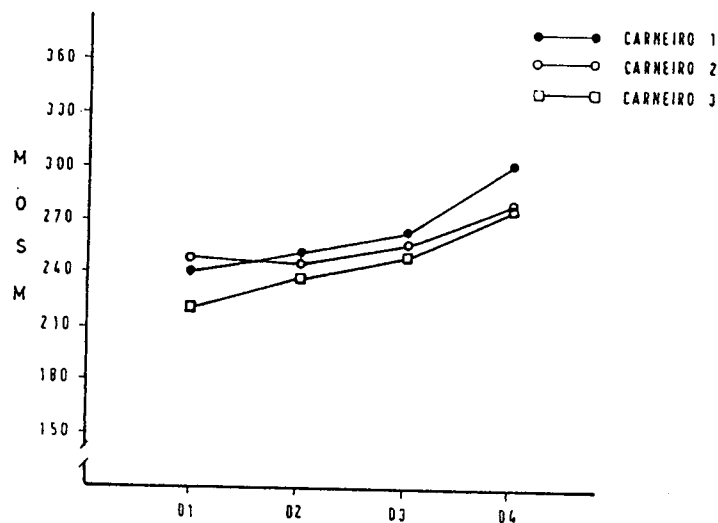
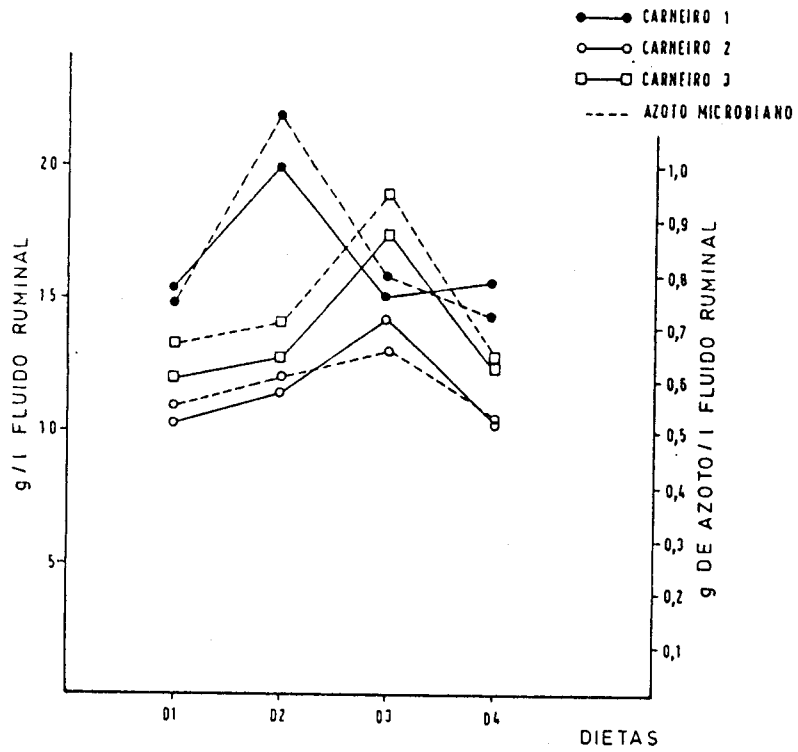
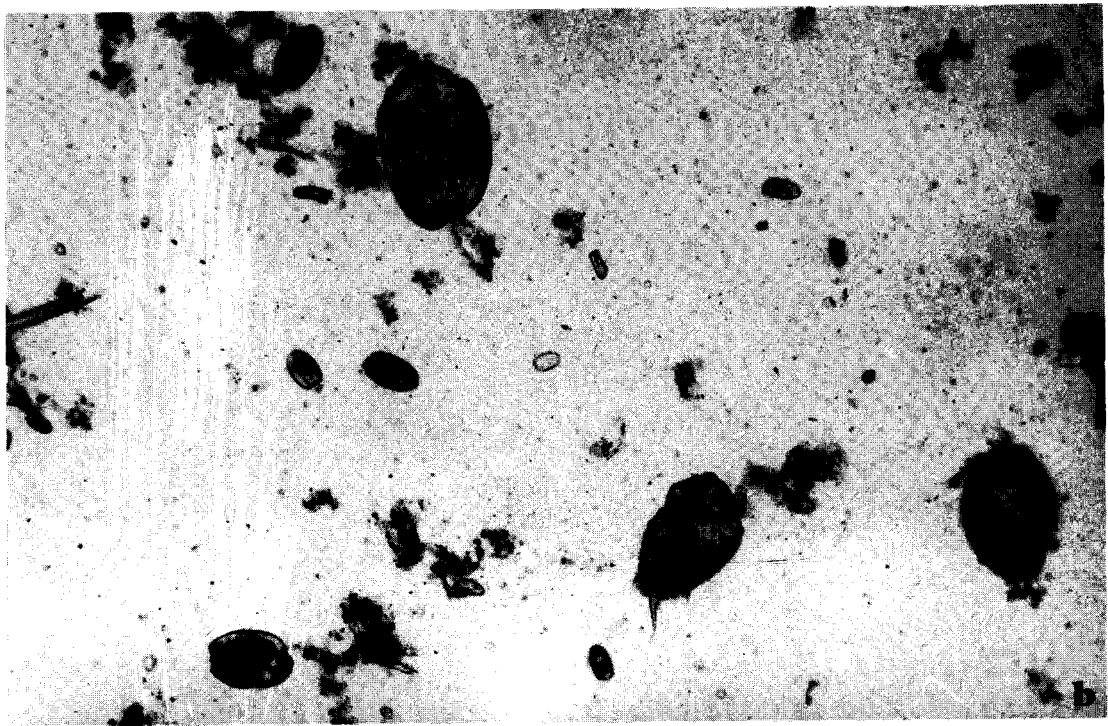
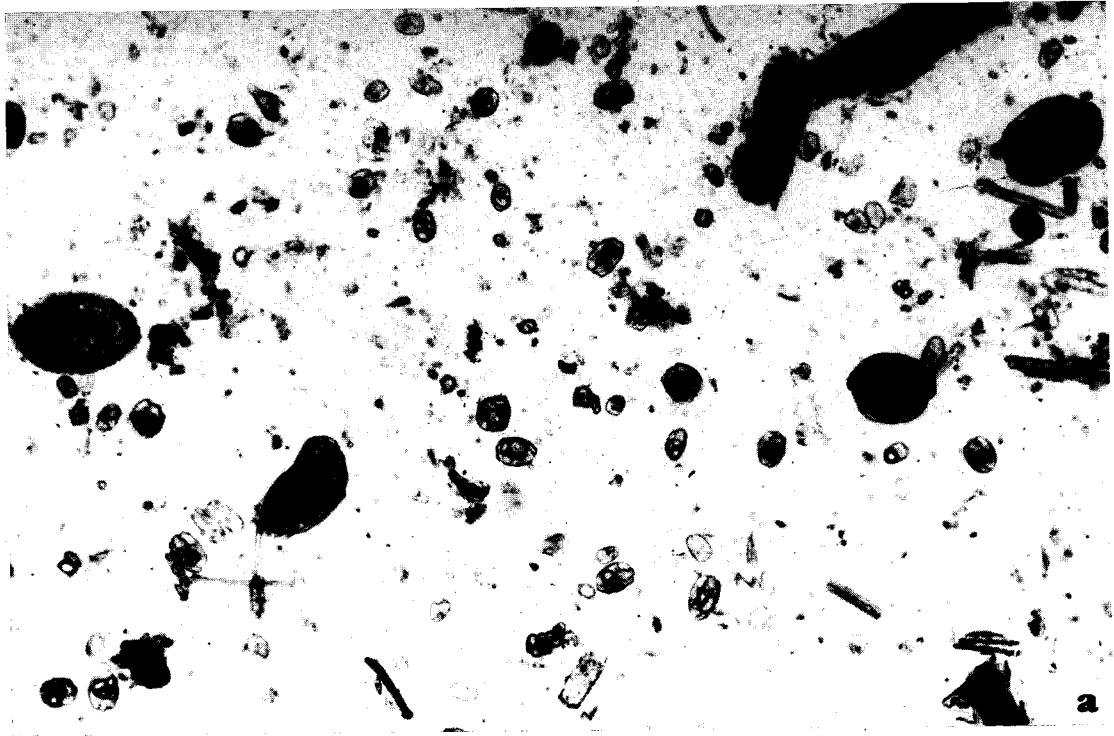
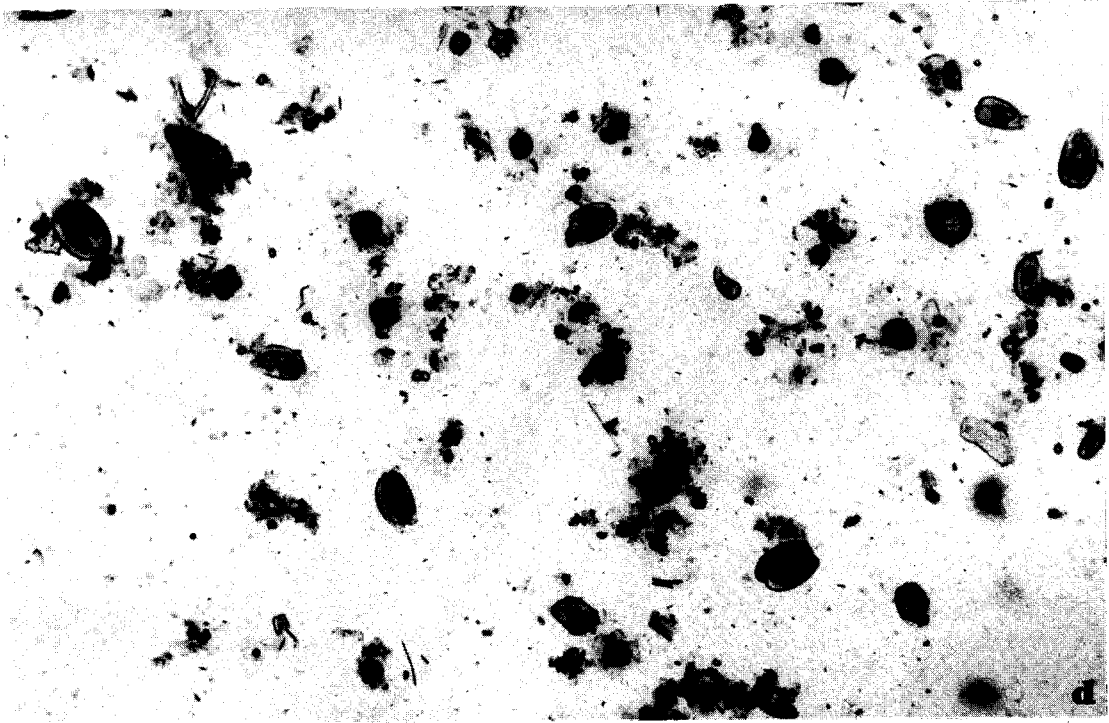
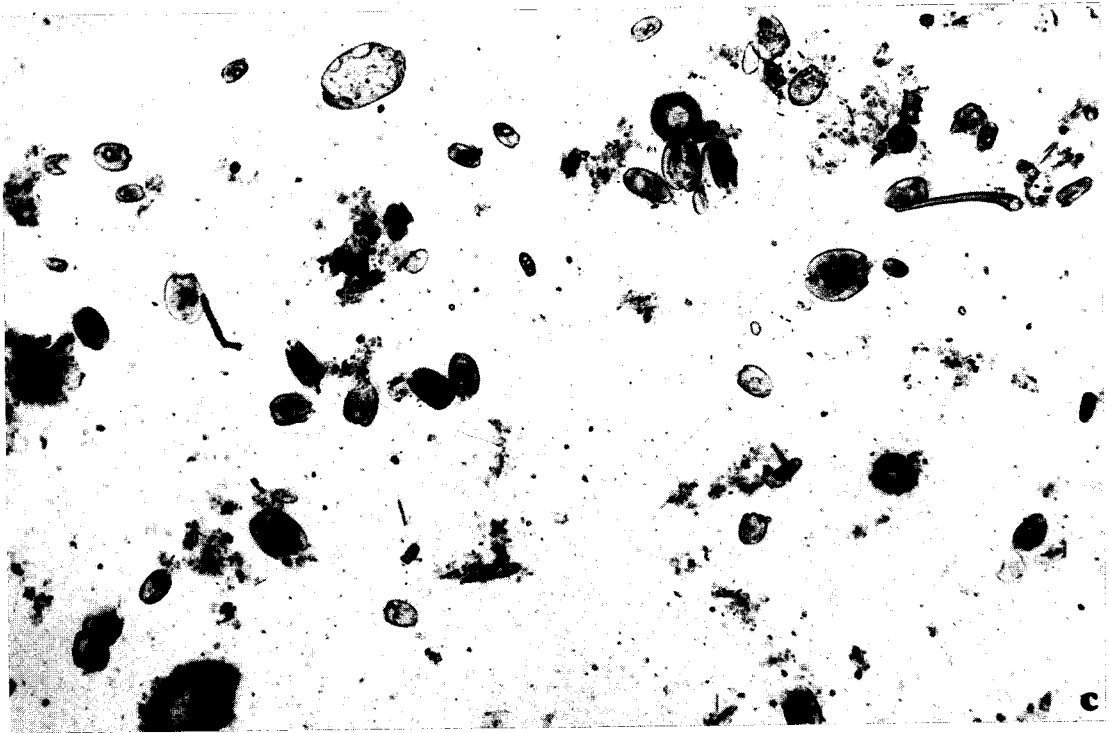


Fig. 2.15. Variação da biomassa e azoto microbianos no período de adaptação à ingestão de bolota.







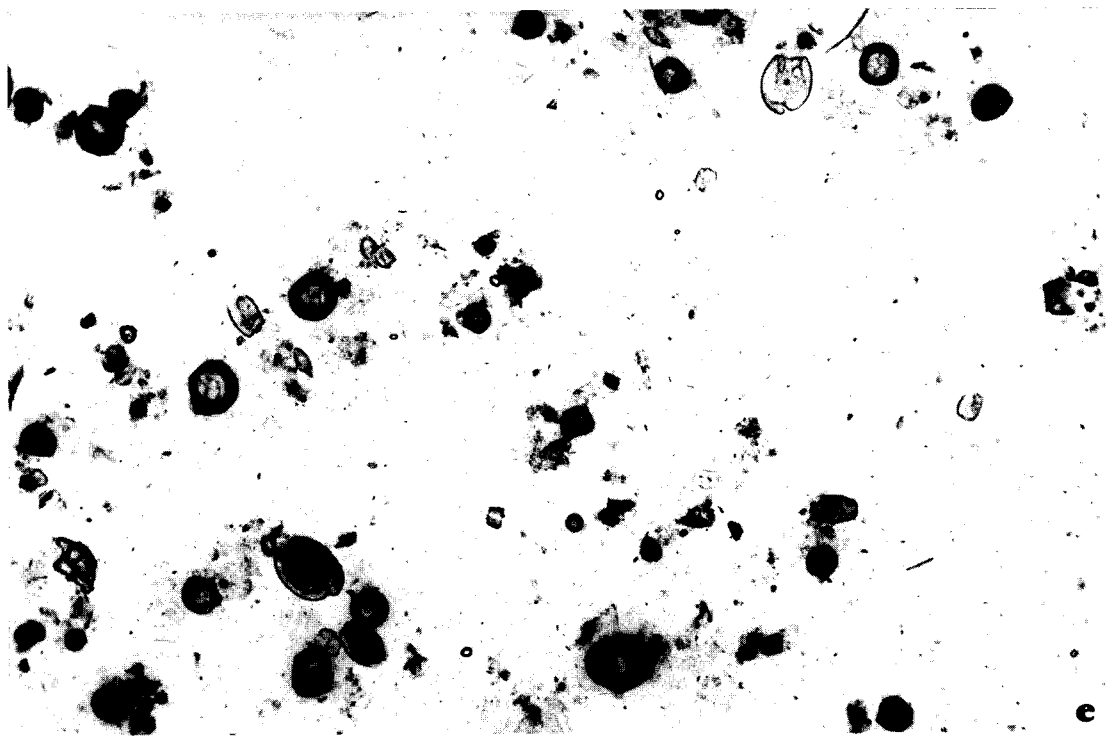


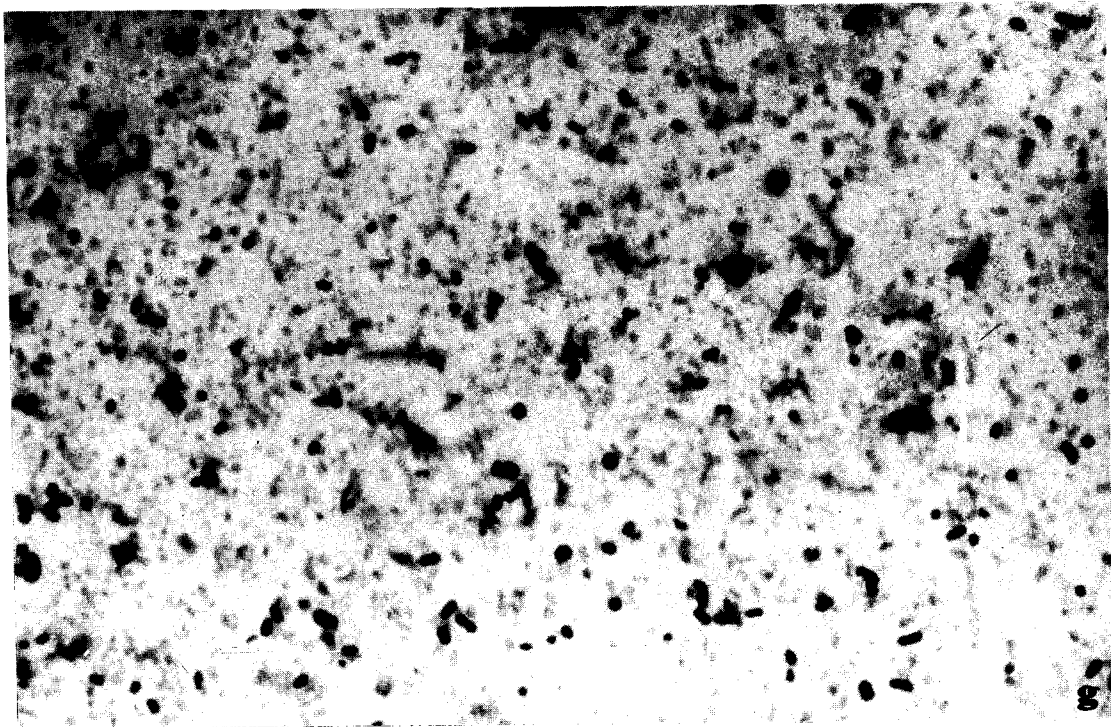
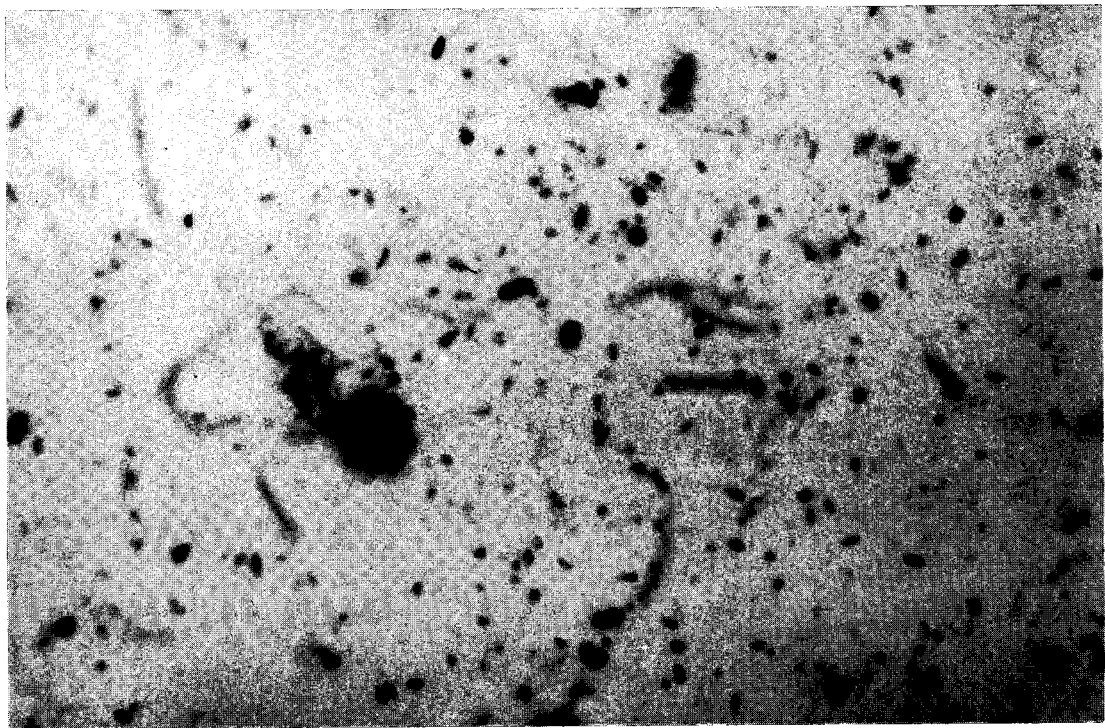
Foto (a) . Ciliados no retículo-rumen dos ovinos antes de iniciarem a fase de adaptação

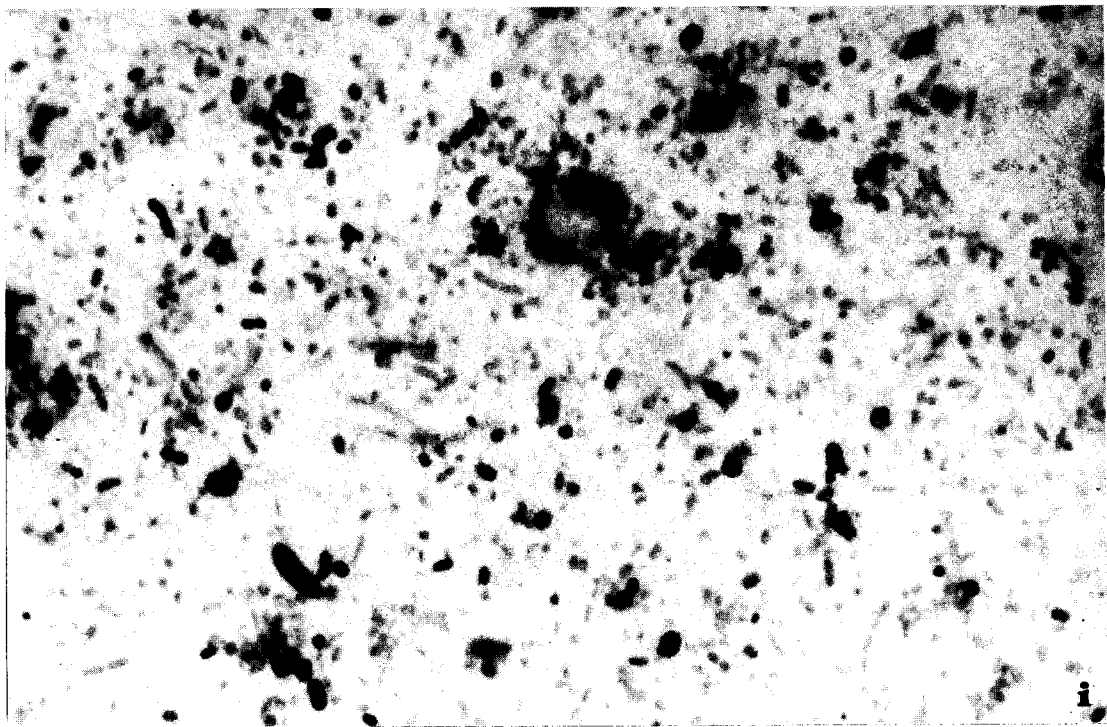
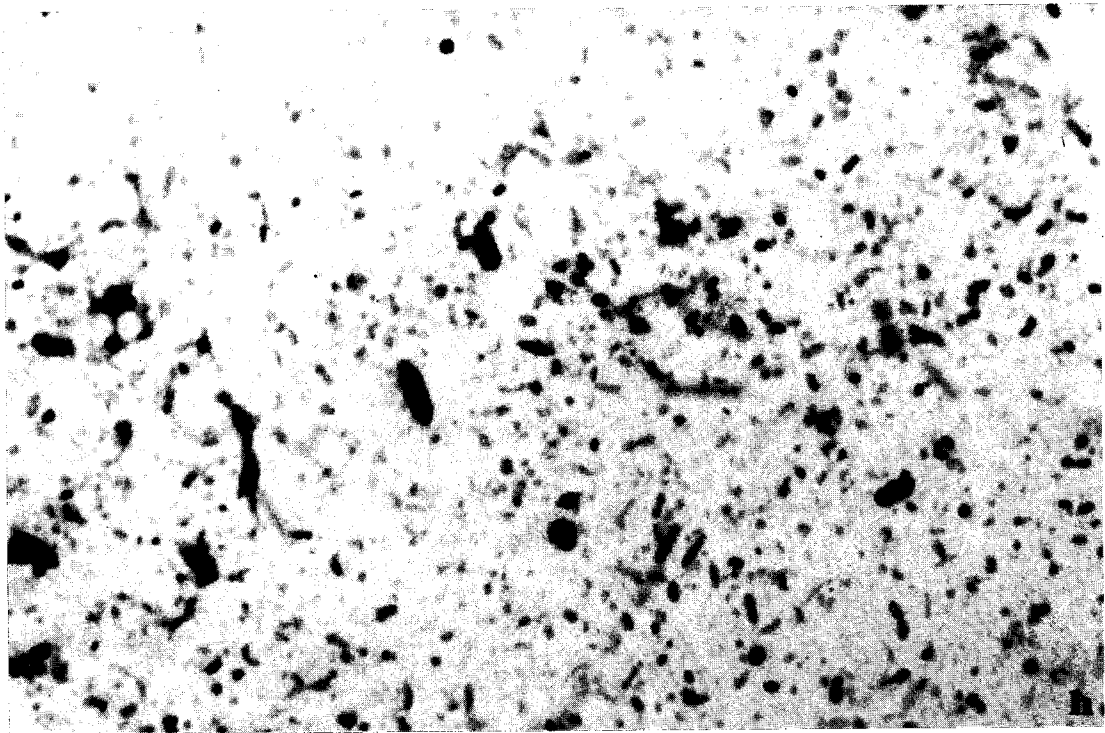
Foto (b) . Ciliados no retículo-rumen dos ovinos ingerindo 15% MS de bolota.

Foto (c) . Ciliados no retículo-rumen dos ovinos ingerindo 35% MS de bolota.

Foto (d) . Ciliados no retículo-rumen dos ovinos ingerindo 60% de bolota.

Foto (e) . Ciliados no retículo-rumen dos ovinos ingerindo 70% MS de bolota.





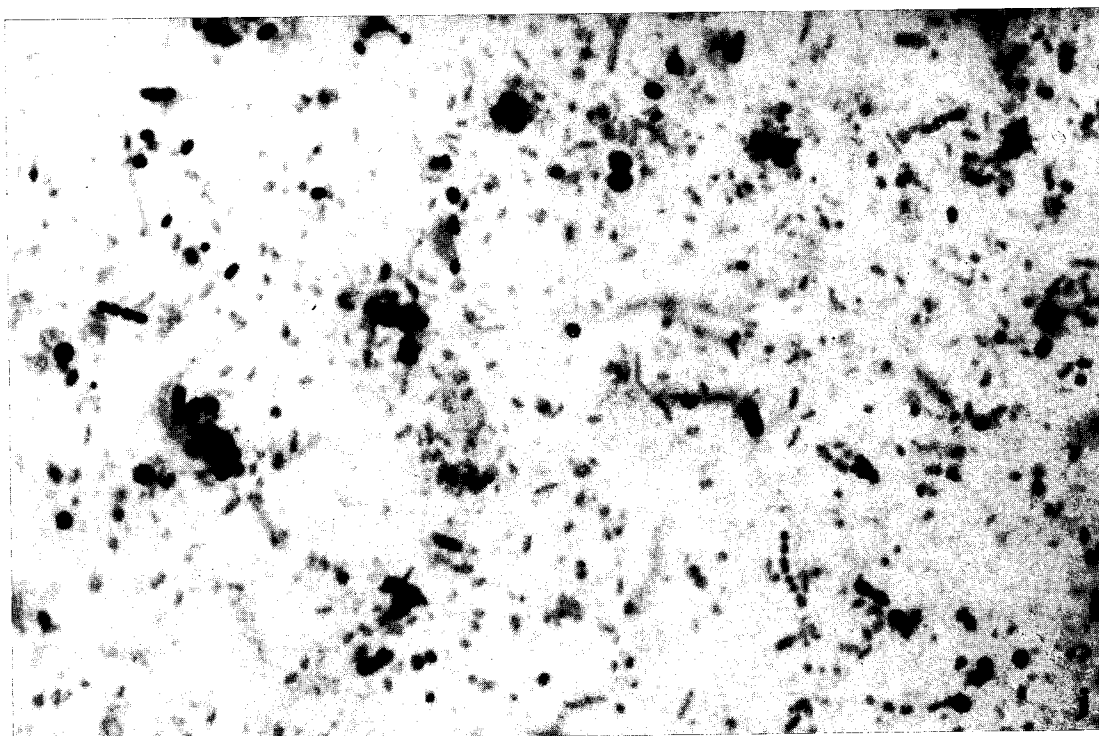


Foto (f) . Espectro bacteriano no conteúdo retículo-
-ruminal dos ovinos antes de iniciarem a
fase de adaptação

Foto (g) . Espectro bacteriano no conteúdo retículo-
ruminal dos ovinos ingerindo 15% de bolota

Foto (h) . Espectro bacteriano no conteúdo retículo-
ruminal dos ovinos ingerindo 35% de bolota

Foto (i) . Espectro bacteriano no conteúdo retículo-
ruminal dos ovinos ingerindo 60% de bolota

Foto (j) . Espectro bacteriano no conteúdo retículo-
ruminal dos ovinos ingerindo 70% de bolota



CAPÍTULO 3

INFLUENCIA DA SUPLEMENTAÇÃO PROTEICA E DA INCORPORAÇÃO DE PEG NA FERMENTAÇÃO NO RETÍCULO-RUMEN DE OVINOS ALIMENTADOS COM BOLOTA.

3.1. INTRODUÇÃO

A expressão deletérea dos taninos é afectada pelo nível proteico das dietas (SCHAFFERT et al., 1974; FORD e HEWITT, 1979). Com efeito, não se casos de intoxicação de animais quando estes acesso a grandes quantidades de bolota numa pastagem luxuriante de Outono-Inverno. Este facto estará provavelmente relacionado com a remoção mais completa dos taninos solúveis ao nível do tubo digestivo, permitindo que parte da proteína não complexada seja digerida e dessa forma absorvida, impedindo, por outro lado, qualquer efeito tóxico devido à hidrólise e absorção dos taninos (ALMEIDA, 1986).

A associação de bolota com erva de Outono (50:50) baixou a digestibilidade aparente da MO no reticulo-rumen (ALMEIDA, 1986), considerando o autor como sendo consequência da actividade dos taninos da bolota. A digestibilidade aparente do azoto também foi diminuída com a incorporação de bolota na erva (ALMEIDA, 1986). FERREIRA (1984), observou em ovinos alimentados com feno e bolota que a digestibilidade aparente do N do feno (0,69) foi diminuída com a incorporação de 30% de bolota (0,63), desconhecendo-se, no entanto, se as diferenças foram ou não significativas.

A incorporação de bolota parece afectar a digestão

intestinal do NNA e a quantidade de N microbiano que chega ao duodeno. ALMEIDA (1986) constatou uma ligeira diminuição da digestão do NNA (como proporção do NNA que fluiu diariamente para o duodeno) devido à incorporação de bolota em associação com erva. Se bem que a quantidade de N bacteriano no retículo-rumen tenha sido superior nos animais ingerindo bolota, a quantidade de N bacteriano que atingiu o duodeno diminuiu com a inclusão de bolota.

3.1.1. Influência da suplementação proteica: Se a interação da proteína da ração com os taninos, conduzindo à formação de complexos indigestíveis tanino-proteína for o efeito imediato dos taninos na dieta, então a suplementação da dieta com proteína excedentária deveria eliminar o seu efeito. (HAGERMAN e BUTLER, 1978) referem ser necessário uma grande quantidade de proteína para anular o efeito dos taninos, uma vez que para a complexação total dos taninos seria necessário uma quantidade de proteína duas vezes superior. ALMEIDA (1986) refere que uma relação tanino-proteína de 0,5 provoca uma precipitação quase completa dos taninos.

A utilização da ureia como suplemento azotado de rações contendo taninos tem sido sugerida, mas os resultados têm sido bastante controversos. RAI e SHUKLA (1977) refere que a digestibilidade da PB do concentrado contendo 20% de farinha de "sal-seed" desengordurada, não foi modificada na presença de 10% de ureia. SINHA e NATH (1982) verificaram que a suplementação com ureia tornou a farinha de "sal-seed" desengordurada mais palatável, tendo aumentado a

digestibilidade da PB e da fibra. No entanto, BUCKLEY et al. (1983) não encontrou diferenças nas digestibilidades "in vitro" de fava rica em taninos e fava sem taninos na sua constituição, em presença de ureia.

A suplementação de dietas com 70% de bolota com ureia, aumentou a digestibilidade da PB em ovinos, mas diminuiu as digestibilidades da MS e da MO (LUCAS, 1986). Contudo, a suplementação das mesmas dietas com bagaço de girassol descorticado aumentou as digestibilidades da MS e da MO (LUCAS, 1986)

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Animais e dietas - Foram utilizados 3 ovinos Merino Branco do Alentejo do sexo masculino, munidos de cânulas ruminais, alimentados ao nível de manutenção, duas vezes ao dia com dietas incorporando 70% de bolota. Como tratamentos foram utilizados três níveis diferentes de suplementação azotada com bagaço de soja: 8,5% PB (D₄), 11% PB (D₅) e 14% PB (D₆). Em cada um destes tratamentos foi incorporado 5% de PEG₄₀₀₀ como adsorvente dos taninos (D₅, D₆ e D₇, respectivamente).

3.2.2. Amostragem do conteúdo reticulo-ruminal - As recolhas de amostras foram feitas às 0 (antes da 1ª refeição do dia), 2, 4, 6, 10, 14 h após a primeira refeição do dia, com o auxílio de uma colher de sopa para permitir um acesso mais profundo no interior do compartimento reticulo-ruminal e repetidas ao fim de 7 dias.

3.2.3. Microbiologia - Todas as manipulações anaeróbicas foram de acordo com as técnicas desenvolvidas por HUNGATE (1969), com as modificações introduzidas por BRYANT (1972). A diluição das amostras foi processada de acordo com BRYANT e BURKEY (1959). A quantificação das bactérias anaeróbias viáveis totais foi feita em meio 98-5 + xilano (HENNING e VAN DER WALT, 1978). Na quantificação das bactérias substractoespecíficas foram utilizados meios contendo substractos purificados, meio de amido (KURIHARA, 1967), meio de celulose (HOBSON e MANN, 1969) e meio de caseína (APPLEBY, 1955 - modificado por BELLET, 1984) respectivamente para a quantificação de bactérias utilizadoras de amido, celulose (estatisticamente pelo método do NMP) e caseína.

A fim de minimizar o efeito das diferentes ingestibilidades dos animais, as amostras para inoculação dos meios eram provenientes da mistura dos conteúdos retículo-ruminais recolhidos às 0, 2, 4 e 6 h, conservadas no refrigerador a 4°C (DEHORITY e GRUBB, 1980) dentro de copos de vidro selados anaerobicamente.

As contagens de ciliados e a sua caracterização foram feitas de acordo com WARNER (1962_a) PURSER e MOIR (1958 - modificada por MARINHO, 1983) e OGIMOTO e IMAI (1981) respectivamente, em amostras compostas provenientes de todas as recolhas efectuadas no período de 24 h, contando todas as células em alicotas de 10 µl.

3.2.4. Análises químicas - O pH das amostras foi imediatamente determinado potenciometricamente no conteúdo inteiro, antes da sua filtração por "itamine", para remoção

do material particulado. As amostras filtradas eram imediatamente acidificadas com H_2SO_4 a 50% e rapidamente armazenadas em congelador, para análise dos AGVs, ácido láctico e amónia.

A amónia foi determinada por titrimetria dos destilados recebidos em ácido bórico. O ácido láctico foi determinado de acordo com a técnica desenvolvida por HARPER e RANDOLPH, após desproteïnização das amostras com ácido tricloroacético a 5% (JOUANY, 1979). Os AGVs foram determinados por cromatografia gás-líquido em aparelho Hewlett Packard, munido de um detector de ionização de chama, utilizando com gás de arrasto azoto (24 ml/min.). A separação dos ácidos foi feita em colunas inox, 2 m comp x 1/8" cheias com FFAP 0,5% + H_3PO_4 0,5% em Chromosorb WAW.

Os fenóis totais foram determinados no sobrenadante de amostras centrifugadas a 40 000 g, pelo método de oxidorredução do Azul da Prússia, utilizando ácido tânico como padrão, de acordo com ALMEIDA (1986). Os taninos no alimento foram determinados por turbidimetria, utilizando gelatina como agente complexante, de acordo com o método desenvolvido por ALMEIDA (1986).

3.2.5. Osmolalidade - A osmolalidade do conteúdo retículo-ruminal foi determinada em amostras centrifugadas a 40 000 g, pelo abaixamento do ponto crioscópico, utilizando um semimicrosmómetro Knauer.

3.2.6. Biomassa e azoto microbiano - O resíduo seco microbiano foi determinado nos "pellets" liofilizados, de amostras centrifugadas fraccionadamente de acordo com o

método desenvolvido por JOUANY (1979). O N das fracções microbianas foi determinado por Kjeldhal, em duplicados de 250 mg para a fracção bacteriana e duplicados de 500 mg para a fracção ciliados.

3.2.7. Volume do conteúdo retículo-ruminal e taxa de "out-flow" - O volume do conteúdo retículo-ruminal e a taxa de "out-flow" foram determinados espectrofotometricamente de acordo com a técnica desenvolvida por EL-SHAZLY et al. (1976). A introdução do marcador no retículo-rumen foi feita 1 h após a ingestão alimentar da manhã e as amostras foram recolhidas em intervalos de 2h, da 1ª à 7ª horas. Até processamento posterior, as amostras eram imediatamente congeladas. O volume do conteúdo retículo-ruminal na altura da infusão do Cr.EDTA foi obtido matematicamente por extrapolação a partir da reta de regressão da concentração do marcador "versus" tempo. O coeficiente de regressão foi usado para o cálculo da taxa de "out-flow" (% do marcador/h).

3.2.8. Testes de fermentação "in vitro" - A fim de testar a capacidade fermentativa do inóculo dos ovinos ao longo dos tratamentos, foi utilizado o sistema "gas-test" (MENKE et al, 1979) para fermentar substractos purificados e a capacidade fermentativa em relação ao alimento que os animais estavam a ingerir. A actividade sacaroclástica foi testada utilizando celulose pura (papel de filtro Whatman nº1), amido solúvel (BDH), xilano (SIGMA) e pectina (SIGMA). A actividade lipolítica foi testada utilizando glicerol e óleo de linhaça. A actividade proteolítica foi testada utilizando caseína (DIFCO). O tempo de fermentação para efeitos da leitura de

gás variou com o tipo de substracto. Para os substractos glucídicos rapidamente fermentáveis, para o alimento e glicerol estabelecemos utilizámos o valor da produção de gás às 6 h de fermentação. Para a caracterização da actividade celulolítica foi utilizada a leitura feita às 48 h de incubação e para a caracterização da actividade lipolítica utilizámos a leitura da produção de gás às 24 h de incubação. Estes critérios foram estabelecidos em estudos prévios, verificando as cinéticas de produção de gás nos vários substractos. Todas as fermentações foram sujeitas a uma repetição com intervalo de 7 dias. Os conteúdos reticulo-ruminais para as fermentações no sistema do "gas-test", foram misturas dos conteúdos dos três carneiros da experiência.

3.2.9. Taxas de produção de gás pelo conteúdo reticulo-ruminal "in vivo" - Para a avaliação das produções de gás pelo conteúdo reticulo-ruminal "in vivo", utilizámos a técnica desenvolvida por EL-SHAZLY e HUNGATE (1965), sendo os resultados expressos em $\mu\text{l/g/min}$.

3.2.10. Análise estatística - Os resultados foram tratados estatisticamente por análise de variância "one way" e multifactorial e a comparação de médias foi feita utilizando o "multirange-test de Duncan. O tratamento por regressão linear simples foi também utilizado para testar o nível de correlação entre algumas variáveis.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Os protozoários ciliados - A população de ciliados foi significativamente ($P < 0,001$) influenciada pelas

suplementações proteicas e pela incorporação de PEG, tendo aumentado com a incrementação da PB das dietas e diminuído com a incorporação de PEG nas dietas com 11 e 14% PB (Quadro 3.1.) (Fig. 3.1).

Quadro 3.1. Efeitos da suplementação proteica e da incorporação de PEG no nº de ciliados ($\times 10^7/\text{ml}$) do retículo-rúmen de ovinos ingerindo 70% de bolota nas suas dietas ($\bar{X} \pm \text{e.p.m.}$).

Ovino Nº	PEG %	Dietas % PB		
		D ₄ - 8,5	D ₈ - 11	D ₁₄ - 14
1	0	0,60 ^a _c ± 0,04	- -	9,10 ^a _d ± 1,20 *
	5	0,80 ± 0,25	- -	4,05 ± 0,68
2	0	0,75 ^a _c ± 0,10	1,55 ^a _d ± 0,16	8,75 ^a _e ± 0,99 *
	5	0,74 ± 0,37	1,27 ± 0,64	4,09 ± 0,99
3	0	0,56 ^a _c ± 0,08	1,41 ^a _d ± 0,20	10,90 ^a _e ± 2,12 *
	5	0,55 ± 0,17	1,37 ± 0,55	4,49 ± 0,92
4	0	- -	1,22 ^a ± 0,21	- -
	5	- -	0,98 ± 0,55	- -
\bar{X}	0	0,64 ^a _c ± 0,10	1,39 ^a _d ± 0,17	9,58 ^a _e ± 1,15 *
	5	0,69 ± 0,13	1,21 ± 0,26	4,21 ± 0,24

Os asterísticos referem-se a diferenças significativas na mesma coluna, devidas ao PEG; Na mesma coluna, diferenças significativas entre animais, letras diferentes em índice superior; Na mesma linha, diferenças significativas por efeito do nível de suplementação proteica, letras diferentes em índice inferior.

Paralelamente a acompanhar as modificações quantitativas operadas ao longo dos tratamentos, as modificações qualitativas foram também importantes, particularmente com a inclusão de PEG no nível de suplementação proteica mais baixo (8,5% PB). Com efeito, com a incorporação de PEG nesta dieta, os Entodiniinae de maiores dimensões

(Entodinium dilobum e E. longinucleatum) foram gradualmente substituídos por formas de pequena dimensão (Entodinium brevispinum).

3.3.2. As bactérias - As bactérias viáveis anaeróbias totais foram influenciadas significativamente pela suplementação proteica ($P < 0,001$), mas a influência do PEG não foi significativa ($P = 0,06$) (Quadro e Fig. 3.2.). As bactérias utilizadoras de amido (Fig. 3.3.) foram também influenciadas significativamente pela suplementação proteica ($P < 0,001$) e pelo PEG ($P < 0,05$) (Quadro 3.3.). As bactérias proteolíticas

Quadro 3.2. Efeitos da suplementação proteica e da incorporação de PEG no nº de bactérias anaeróbias totais ($\times 10^7/\text{ml}$) ($\bar{X} \pm \text{e.p.m.}$).

Ovino Nº	PEG %	Dieta - % PB		
		D ₄ - 8,5	D ₈ - 11	D ₆ - 14
1	0	3,07 ^a _c ± 0,47 *	- -	48,60 ^a _d ± 9,74
	5	6,06 ± 0,33	- -	45,25 ± 12,19
2	0	2,77 ^a _c ± 0,85 *	5,74 ^a _d ± 0,45 *	11,17 ^a _e ± 1,78 *
	5	6,58 ± 1,30	20,00 ± 0,76	52,30 ± 16,12
3	0	2,74 ^a _c ± 1,26 *	5,82 ^a _d ± 0,66 *	43,75 ^a _e ± 16,96
	5	5,73 ± 0,96	34,50 ± 4,24	41,50 ± 3,37
4	0	- -	5,33 ^a ± 1,63	- -
	5	- -	7,13 ± 2,33	- -
\bar{X}	0	2,86 ^a _c ± 0,18	5,63 ^a _d ± 0,26 *	34,51 ^a _e ± 4,37
	5	6,12 ± 0,43	20,54 ± 13,69	46,35 ± 5,48

Os asteriscos referem-se a diferenças significativas na mesma coluna devidas ao PEG; Na mesma coluna, diferenças significativas entre animais, letras diferentes em índice superior; na mesma linha, diferenças significativas por efeito do nível de suplementação proteica, letras diferentes em índice inferior.

(Fig. 3.4.) foram influenciadas significativamente ($P < 0,01$) pela suplementação proteica e pela incorporação de PEG nas dietas (Quadro 3.4.). As bactérias celulolíticas foram influenciadas significativamente pela suplementação proteica ($P < 0,001$) e pela incorporação de PEG ($P < 0,05$) (Quadro e Fig. 3.5.). Os

Quadro 3.3. Efeitos da suplementação proteica e da incorporação de PEG no nº de bactérias utilizadoras de amido ($\times 10^8$ /g) ($\bar{X} \pm$ e.p.m.)

Ovino Nº	PEG %	Dietas - % PB		
		D ₄ - 8,5	D ₈ - 11	D ₆ - 14
1	0	8,94 ^a _c ± 4,37 *	- -	72,70 ^a _d ± 5,00 *
	5	20,70 ± 3,10	- -	89,40 ± 7,10
2	0	12,18 ^a _c ± 1,80 *	11,35 ^a _c ± 1,56 *	86,30 ^a _d ± 5,10 *
	5	30,30 ± 5,40	18,30 ± 0,40	62,50 ± 17,00
3	0	9,38 ^a _c ± 2,12 *	12,38 ^a _c ± 1,56 *	77,30 ^a _d ± 4,20
	5	29,60 ± 6,10	93,70 ± 17,70	79,40 ± 11,90
4	0	- -	12,51 ^a ± 2,04 *	- -
	5	- -	84,70 ± 16,00	- -
- X	0	10,17 _c ± 1,76 *	12,08 _c ± 0,64 *	79,90 _d ± 5,50
	5	27,60 ± 4,10	65,60 ± 41,20	77,10 ± 13,60

Os asteriscos referem-se a diferenças significativas, na mesma coluna, devidas ao PEG; na mesma coluna, diferenças significativas entre animais, letras diferentes em índice superior; na mesma linha, diferenças significativas por efeito do nível de suplementação proteica, letras diferentes em índice inferior.

animais apresentaram em D₈, diferenças significativas entre si ($P < 0,01$) na contagem de bactérias celulolíticas. Os anaeró-

bios totais, as bactérias utilizadoras de amido e as bactérias proteolíticas, não foram influenciadas pelos animais de forma significativa.

Quadro 3.4. Efeito da suplementação proteica e da incorporação de PEG no nº de bactérias proteolíticas ($\times 10^7/ml$) ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Ovino Nº	PEG %	Diets - % PB		
		D ₄ - 8,5	D ₉ - 11	D ₆ - 14
1	0	4,00 ^a _c ± 0,30	- -	8,83 ^a _d ± 0,89
	5	5,20 ± 0,17	- -	9,36 ± 0,72
2	0	3,46 ^a _c ± 0,62	4,95 ^a _c ± 0,54	9,10 ^a _d ± 1,54
	5	3,82 ± 0,17	* 13,80 ^b ± 5,70	* 5,75 ± 3,25
3	0	3,78 ^a _c ± 0,37	4,43 ^a _c ± 0,59	8,23 ^a _d ± 1,13
	5	5,49 ± 1,36	* 34,00 ^c ± 8,80	8,66 ± 1,58
4	0	- -	4,39 ^a ± 0,41	- -
	5	- -	* 33,90 ^c ± 5,3	- -
\bar{X}	0	3,75 _c ± 0,27	4,59 _c ± 0,31	8,72 _d ± 0,45
	5	4,84 ± 0,89	* 27,20 ± 11,60	7,92 ± 1,91

Os asterísticos referem-se a diferenças significativas na mesma coluna, devidas ao PEG; Na mesma coluna, diferenças significativas entre animais, letras diferentes em índice superior; na mesma linha, diferenças significativas por efeito do nível de suplementação, letras diferentes em índice inferior.

3.3.3. Análises químicas - Os valores de pH não foram influenciados significativamente, nem pelo nível de suplementação, nem pela inclusão de PEG. Contudo, nas dietas contendo 11 e 14 % PB, os valores foram ligeiramente mais baixos (Gráficos 3.6., 3.7., 3.8., 3.9., 3.10. e 3.11.). Os valores de $N-NH_4^+$ foram significativamente influenciados pelo nível de suplementação ($P < 0,001$). No entanto, nas dietas

contendo 8,5 e 14 % PB, o PEG incrementou ligeiramente os valores do $N-NH_4^+$, baixando ligeiramente na dieta contendo 11 % PB (Fig. 3.12.). Os valores da amônia variaram com a hora de amostragem tendo as tendências das curvas sido influenciadas pelos tratamentos. Os valores vêm expressos no gráfico da Fig 3.14.. Valores médios diurnos no Quadro 3.6..

Os valores do ácido láctico foram influenciados significativamente pelo nível de suplementação ($P < 0,001$),

Quadro 3.5. Efeito da suplementação proteica e da incorporação de PEG no número de bactérias celulolíticas ($\times 10^7$) ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Ovino Nº	PEG %	Diets - % PB		
		D ₄ - 8,5	D ₈ - 11	D ₆ - 14
1	0	2,60 ^a _c ± 0,40	- -	17,00 ^a ± 0,20
	5	17,00 ± 0,20	- -	18,00 ± 0,20
2	0	4,45 ^a _c ± 1,90	9,70 ^a _d ± 0,10	12,60 ^a _e ± 6,80
	5	12,60 ± 6,80	3,00 ± 1,10	15,30 ± 4,80
3	0	4,78 ^a _c ± 2,37	5,80 ^a _c ± 0,10	17,00 ^a _d ± 2,00
	5	17,00 ± 2,00	4,50 ± 0,10	19,80 ± 1,00
4	0	- -	7,90 ^a ± 0,70	- -
	5	- -	5,00 ± 0,70	- -
\bar{X}	0	4,78 _c ± 2,37	7,80 _c ± 1,00	15,50 _d ± 2,50
	5	15,50 ± 2,50	4,20 ± 1,00	15,55 ± 2,60

Os asteriscos refere-se a diferenças significativas, na mesma coluna, devidas ao PEG; na mesma coluna, diferenças significativas entre animais, letras diferentes em índice superior; na mesma linha, diferenças significativas por efeito do nível de suplementação proteica, letras diferentes em índice inferior.

Quadro 3.6. Efeito da suplementação proteica e da incorporação de PEG nos valores médios diurnos da concentração de N-NH₄ (mg/100ml) (X ± e.p.m.)

Ovino	PEG	Dieta - % PB		
		D ₄ - 8,5	D ₈ - 11	D ₆ - 14
1	0	15,07 _c ± 2,85	- -	45,02 _d ± 1,02
	5	12,99 ± 1,02	- -	35,04 ± 2,61
2	0	8,13 _c ± 0,91 *	27,68 _d ± 3,30	25,39 _d ± 4,45 *
	5	12,41 ± 1,41	28,56 ± 5,78	32,32 ± 3,76
3	0	8,77 _c ± 1,35 *	29,80 _d ± 3,71 *	28,74 _d ± 3,21 *
	5	12,09 ± 1,83	21,72 ± 3,91	35,45 ± 4,02
4	0	- -	23,12 ± 2,32	- -
	5	- -	21,91 ± 2,67	- -
X	0	8,45 ± 0,45 *	26,87 ± 3,41	33,05 ± 10,50
	5	12,50 ± 0,46	24,06 ± 3,90	35,23 ± 0,27

Os asteriscos referem-se a diferenças significativas na mesma coluna, devidas ao PEG; na mesma coluna, diferenças significativas entre animais, letras diferentes em índice superior; na mesma linha, diferenças significativas por efeito do nível de suplementação proteica, letras diferentes em índice inferior.

tendo a dieta com 11% PB (D₈) apresentado os valores mais elevados, embora não significativamente relativamente à dieta contendo 14 % PB (D₆) (Quadro 3.7.) (Fig. 3.16). A inclusão de PEG influenciou significativamente (P<0,05) as concentrações de ácido láctico apenas na dieta com 8,5% PB.

Os ácidos gordos voláteis não foram influenciados significativamente pelos tratamentos (Quadro 3.9.), se bem que tenham aumentado ligeiramente com o nível de suplementação proteica. O ácido butírico foi o que apresentou uma tendência mais definida para aumentar com a suplementação

priteica.

Os fenóis totais doseados no fluido retículo-ruminal (Quadro 3.8.) foram influenciados significativamente ($P < 0,001$) pela suplementação proteica das dietas, não tendo sido influenciado significativamente (Fig. 3.19.) pela incorporação de PEG. Os valores mais elevados foram registados quando os animais ingeriam a dieta contendo 11 % PB.

Quadro 3.7. Efeito da suplementação proteica e da incorporação de PEG nos valores médios diurnos para o ácido láctico (mg/L) ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Ovino	PEG	Dietas - % PB		
		D ₄ - 8,5	D ₉ - 11	D ₆ - 14
1	0	2,78 _c ± 1,40 *	- -	55,70 _d ± 10,20
	5	8,50 ± 4,14	- -	31,67 ± 1,53
2	0	2,97 _c ± 2,23 *	69,30 _d ± 25,10	73,60 _e ± 14,01
	5	14,60 ± 4,55	59,70 ± 28,10	35,60 ± 5,85
3	0	3,80 _c ± 2,67 *	87,50 _d ± 13,20	53,50 _e ± 11,20
	5	16,00 ± 4,53	62,90 ± 11,50	43,30 ± 8,57
4	0	- -	70,10 ± 21,80	- -
	5	- -	63,60 ± 12,90	- -
— X	0	3,18 _c ± 0,54 *	75,60 _d ± 10,30	60,93 _d ± 11,00
	5	13,00 ± 3,99	62,10 ± 2,10	36,86 ± 5,92

Os asterísticos referem-se a diferenças significativas na mesma coluna, devidas ao PEG; na mesma coluna, diferenças significativas entre animais, letras diferentes em índice superior; na mesma linha, diferenças significativas por efeito do nível de suplementação proteica, letras diferentes em índice inferior.

3.3.4. Osmolalidade - A osmolalidade não foi influenciada significativamente quer pelo nível de suplementação, quer pela incorporação de PEG. Porém, os seus valores baixaram sempre com a incorporação de PEG em função da hora após a in-

Quadro 3.8. Efeito da suplementação proteica e da incorporação de PEG na concentração de fenóis (mg/100 ml) ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Ovino	PEG	Dieta - % PE		
		D ₄ - 8,5	D ₈ - 11	D ₆ - 14
1	0	4,90 _c ± 0,25	- -	7,50 _d ± 0,18
	5	6,20 ± 0,29	- -	7,80 ± 0,25
2	0	4,90 _c ± 0,76	12,70 _d ± 0,38	6,20 _c ± 0,13
	5	5,20 ± 0,24	11,70 ± 0,33	6,90 ± 0,11
3	0	4,30 _c ± 0,17 *	10,70 _d ± 0,27	8,80 _d ± 0,14 *
	5	8,50 ± 0,35	11,70 ± 0,31	5,90 ± 0,11
4	0	- -	10,30 ± 0,25	- -
	5	- -	12,00 ± 0,30	- -
\bar{X}	0	4,70 _c ± 0,35	11,23 _d ± 1,29	7,50 _{cd} ± 1,30
	5	6,63 ± 1,69	11,80 ± 0,17	6,87 ± 0,95

Os asterísticos referem-se a diferenças significativas na mesma coluna, devidas ao PEG; na mesma coluna, diferenças significativas entre animais, letras diferentes em índice superior; na mesma linha, diferenças significativas por efeito do nível de suplementação proteica, letras diferentes em índice inferior.

gestão alimentar, de forma significativa (Fig. 3.13. e 3.15).

3.3.5. Biomassa e azoto microbiano - O peso seco dos ciliados foi influenciado significativamente ($P < 0,001$) pela suplementação proteica e pela incorporação de PEG. A interação suplementação proteica/PEG foi significativa para $P < 0,01$. Se bem que os valores para o peso seco dos ciliados tenha aumentado sempre com a incorporação de proteína, os seus valores baixaram sempre com a incorporação de PEG, de uma forma bastante manifesta na dieta contendo 14% PB (Fig.3.20). O N acompanhou esta tendência (Fig.3.21.), mostrando uma certa variação de acordo com o tempo decorrido após a primeira

Quadro 3.9. Efeito da suplementação proteica e da incorporação de PEG na concentração de AGVs (mmoles/100 ml)($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Ovino	PEG	Dieta - % PB											
		D ₄ - 8,5				D ₈ - 11				D ₆ - 14			
		Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico
1	0	6,42 ± 0,98	0,93 ± 0,10	0,63 ± 0,08	-	-	-	5,94 ± 0,85	0,84 ± 0,09	0,94 ± 0,11	5,94 ± 0,85	0,84 ± 0,09	0,94 ± 0,11
	5	4,43 ± 0,58	0,64 ± 0,57	0,57 ± 0,07	-	-	-	5,04 ± 0,09	1,03 ± 0,12	0,94 ± 0,13	5,04 ± 0,09	1,03 ± 0,12	0,94 ± 0,13
2	0	3,85 ± 0,43	0,84 ± 0,07	0,46 ± 0,05	5,55 ± 0,76	0,65 ± 0,07	0,83 ± 0,10	4,74 ± 0,53	0,54 ± 0,07	0,60 ± 0,07	4,74 ± 0,53	0,54 ± 0,07	0,60 ± 0,07
	5	5,86 ± 0,55	0,94 ± 0,06	0,53 ± 0,07	4,43 ± 0,65	0,51 ± 0,08	0,43 ± 0,07	4,93 ± 0,47	0,87 ± 0,09	0,93 ± 0,09	4,93 ± 0,47	0,87 ± 0,09	0,93 ± 0,09
3	0	4,61 ± 0,87	0,54 ± 0,03	0,46 ± 0,03	4,23 ± 0,55	0,47 ± 0,06	0,53 ± 0,05	5,60 ± 0,64	0,92 ± 0,09	1,24 ± 0,08	5,60 ± 0,64	0,92 ± 0,09	1,24 ± 0,08
	5	7,15 ± 0,89	0,81 ± 0,07	0,67 ± 0,07	6,07 ± 0,69	0,72 ± 0,09	0,68 ± 0,08	4,73 ± 0,50	0,84 ± 0,07	0,83 ± 0,09	4,73 ± 0,50	0,84 ± 0,07	0,83 ± 0,09
4	0	-	-	-	3,74 ± 0,46	0,51 ± 0,07	0,39 ± 0,06	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	5,25 ± 0,78	0,77 ± 0,09	0,68 ± 0,05	-	-	-	-	-	-
\bar{X}	0	4,96 ± 1,32	0,77 ± 0,20	0,52 ± 0,20	4,51 ± 0,94	0,54 ± 0,09	0,58 ± 0,22	5,42 ± 0,62	0,77 ± 0,20	0,93 ± 0,32	5,42 ± 0,62	0,77 ± 0,20	0,93 ± 0,32
	5	5,81 ± 1,36	0,80 ± 0,15	0,59 ± 0,07	5,25 ± 0,82	0,67 ± 0,14	0,60 ± 0,14	4,90 ± 0,16	0,91 ± 0,10	0,91 ± 0,07	4,90 ± 0,16	0,91 ± 0,10	0,91 ± 0,07

refeição do dia embora não de uma forma clara (Fig. 3.22., 3.24. e 3.26.).

Os valores para o peso seco bacteriano foram influenciados significativamente ($P < 0,001$) pela suplementação proteica e pela incorporação de PEG. A interação suplementação proteica/PEG também apresentaram o mesmo nível de significância. A biomassa bacteriana aumentou com o nível de PB nas dietas e aumentou ainda mais com a incorporação de PEG (Fig. 3.23. e 3.28.). Os valores do N acompanharam esta tendência (Fig. 3.29.), apresentando alguma variação com o tempo decorrido após a ingestão alimentar (Figs. 3.25. e 2.27.).

3.3.6. Volume do conteúdo retículo-ruminal e taxa de "out-flow" - O volume do conteúdo-ruminal e as taxas de "outflow" não foram influenciadas significativamente pelo nível de suplementação proteica e pela incorporação de PEG nas dietas (Quadro 3.10.) (Fig. 3.30.). O volume do conteúdo retículo-ruminal manifestou tendências para diminuir com a inclusão PEG, que baixou ligeiramente as taxas de "outflow" em D_4 e g , e incrementou em D_6 (Gráfico 3.31.).

3.3.7. Taxas de produção de gás pelo conteúdo retículo-ruminal - As taxas de produção de gás pelo conteúdo retículo-ruminal "in vivo" apenas foi influenciada significativamente pela suplementação proteica ($P < 0,001$), subindo com os incrementos de proteína, não tendo, no entanto, sido significativamente alterada pela inclusão de PEG nas dietas (Fig. 3.32.). As taxas variaram com o tempo decorrido após a ingestão alimentar, apresentando os valores mais elevados às 2 e 10 h (Fig. 3.17.).

Quadro 3.10. Efeito da suplementação proteica e da incorporação de PEG no volume e no conteúdo retículo-ruminal (L) e na taxa de "outflow" do Cr.EDTA (%/h)($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Ovino Nº	PEG X	Dieta - X PB									
		D ₄ - 8,5		D ₈ - 11		D ₆ - 14					
		Volume	Outflow"	Volume	"Outflow"	Volume	"Outflow"				
1	0	15,99 ± 1,29	6,63 ± 1,36	-	-	14,22 ± 0,49	4,14 ± 0,52				
	5	7,89 ± 2,28	4,16 ± 1,00	-	-	10,23 ± 0,50	6,80 ± 0,91				
2	0	10,18 ± 0,33	5,17 ± 0,15	11,05 ± 0,54	3,42 ± 0,72	9,40 ± 0,47	4,21 ± 1,20				
	5	9,97 ± 0,02	5,52 ± 0,06	9,75 ± 0,04	2,91 ± 0,41	8,98 ± 0,44	5,64 ± 0,89				
3	0	14,93 ± 0,68	4,85 ± 0,30	12,26 ± 0,79	5,32 ± 0,17	10,04 ± 0,12	5,87 ± 0,56				
	5	10,58 ± 1,20	5,87 ± 0,56	10,43 ± 0,32	5,47 ± 0,14	8,68 ± 0,01	7,95 ± 0,93				
4	0	-	-	10,20 ± 0,67	6,22 ± 0,81	-	-				
	5	-	-	8,10 ± 0,52	4,17 ± 0,33	-	-				
X	0	13,70 ± 3,09	5,55 ± 0,95	11,17 ± 1,04	4,99 ± 1,43	11,22 ± 2,62	4,14 ± 0,88				
	5	9,48 ± 1,41	5,18 ± 0,90	9,43 ± 1,20	4,18 ± 1,28	9,30 ± 0,82	6,80 ± 1,16				

3.3.8. Testes de fermentação de substractos purificados "in vitro" - A fermentação do alimento foi influenciada significativamente pela qualidade do inóculo, isto é, foi influenciada significativamente ($P < 0,001$) pela suplementação proteica pelo PEG, tendo a interacção PB/PEG apresentado também o mesmo nível de significância (Fig. 3.33.).

A fermentação do amido foi influenciada significativamente pela suplementação proteica ($P < 0,001$), pela incorporação de PEG ($P < 0,05$) e pela interacção PB/PEG ($P < 0,001$). O PEG fez baixar a produção de gás em D_7 e D_9 , tendo aumentado as produções em D_5 (Fig. 3.34.).

A produção de gás a partir da fermentação da pectina foi influenciada significativamente ($P < 0,001$) pela suplementação proteica, pela incorporação de PEG e pela interacção PB/PEG. A incorporação de PEG fez baixar as produções em D_7 e D_9 (Fig. 3.35.).

As produções de gás na fermentação do xilano, celulose e glicerol também foram significativamente influenciadas ($P < 0,001$) pela suplementação proteica, pela incorporação de PEG e pela interacção PB/PEG, tendo o PEG baixado a produção de gás em D_9 (Fig. 3.36. , 3.37. e 3.38.).

A produção de gás na fermentação do óleo de linhaça, foi influenciada pela suplementação proteica, mas não de uma forma significativa ($P = 0,09$), tendo a incorporação de PEG e a interacção PB/PEG influenciado significativamente ($P < 0,05$) as produções de gás (Fig. 3.39.).

As taxas de degradação da caseína foram influenciadas de uma forma bastante mais significativa pela incorporação de PEG nas dietas ($P < 0,001$), do que pela suplementação proteica ($P < 0,05$) (Fig. 3.18.) A interação foi significativa para $P < 0,05$.

2.4. DISCUSSÃO

A suplementação proteica das dietas foi determinante na modificação de todos os parâmetros fermentativos do retículo-rumen. As modificações qualitativas e quantitativas operadas no seio da população de ciliados, confirmam a importância que deve ser dada à suplementação azotada de dietas com elevado teor em energia. O aumento do nível de proteína nas dietas aumentaram a população de ciliados e de bactérias expressa nas suas densidades populacionais e na sua biomassa. Se a disponibilidade em energia sob a forma de glúcidos facilmente fermentáveis é decisiva para o desenvolvimento de grandes populações de ciliados (NAKAMURA e KANEGASAKI, 1969; ABE et al., 1973), não menos importante é a disponibilidade em proteína (HUNGATE, 1966; MOWRY e BECKER, 1930). Uma concentração adequada de azoto é fundamental para a maximização da proteossíntese microbiana no retículo-rumen (STERN e HOOVER, 1979), para o não desenvolvimento de fermentações desacopladas (McMENIMAN et al., 1976; BUTTERY, 1977).

O peso seco dos protozoários ciliados nas nossas amostras situaram-se a um nível bastante superior (15 - 30

g/L) aos valores citados por outros autores com outro tipo de dietas concentradas. Assim, JOUANY (1978) refere nos seus ensaios com substractos energéticos purificados, valores para o peso seco dos ciliados não superiores a 14 g/L e ARAMBEL et al. (1982) reporta nos seus estudos valores não superiores a 18 g/L. Esta diferença poderá ser atribuída a um certo grau de superestimação motivada pelas características específicas das dietas que os nossos animais ingeriram. Com a efeito a técnica foi por nós testada com os animais numa dieta convencional (70% feno + 30 % concentrado comercial), tendo sido obtido resultados muito próximos daqueles apresentados na literatura. O peso seco bacteriano também foi bastante superior (4 - 17 g/L). Os teores em N da fracção ciliados (5 - 6%) situaram-se abaixo dos valores apresentados por ARAMBEL et al. (1982), que referem valores para o N dos protozoários ciliados de 8,4% em bovinos alimentados com dietas de baixo teor concentrado, e 7,9% em bovinos alimentados com dietas de elevado teor concentrado. No entanto os nossos resultados foram muito semelhantes áqueles apresentados por JOUANY (1978).

O N da fracção bacteriana nas nossas (5 - 6,5%) amostras foram inferiores aos registados por ARAMBEL et al. (1982), que referem valores de 10,8 e 9,9%, consoante se trate de bactérias Gram (-) e Gram (+) respectivamente. Os valores referidos por JOUANY (1978) nos seus ensaios variam entre 5,6 e 9,6%). ARAMBEL et al. (1982), no cálculo do N das bactérias do retículo-rumen utilizou estirpes bacterianas puras cultivadas "in vitro". McALLAN e SMITH (1977) referem que o

conteúdo em azoto das bactérias baixa com o aumento no seu teorem carboidratos de reserva, que por sua vez está estreitamente relacionado com o nível de glúcidos ingeridos com a dieta. A variação na percentagem de azoto dos ciliados é claramente observável à 4 e 10 h de colheita, nas dietas contendo 8,5 e 11% PB.

Os valores apresentados para o $N-NH_4^+$ acordam com alguns valores citados na literatura, com animais suplementados com soja (DAVIS e STALLCUP, 1967 - cit. por CHURCH, 1979). As variações das concentrações em função da hora de colheita, mostraram diferentes tendências consoante o nível de suplementação proteica. No nível mais baixo de suplementação a tendência para um aumento dos viores da amónia após a ingestão alimentar. Situação semelhante foi possível observar em ovinos ingerindo 30% de bolota (MARINHO, 1983). Contudo, nos níveis mais elevados de suplementação proteica a tendência foi contrária, diminuindo após a ingestão alimentar. A incorporação de PEG nas dietas alteroude certa maneira os perfis do $N-NH_4^+$, aumentando consideravelmente os seus valores particularmente nas dietas contendo o nível mais elevado de proteína. CHRISTIANSEN et al. (1965) referem que a presença de ciliados está normalmente associada com valores elevados nos teores em $N-NH_4^+$, quando comparados com os valores fornecidos por animais desfaunados. Nos nossos animais a eliminação de uma parte da população de ciliados com a inclusão de PEG na dieta, determinou valores mais elevados para as concentrações de $N-NH_4^+$.

A suplementação proteica das dietas aumentou consideravelmente a concentração de ácido láctico no conteúdo retículo-ruminal dos animais, sem no entanto nunca atingir valores equiparáveis aos citados na literatura (CHAMBERLEIN et al., 1983; NEWBOLD et al., 1982). As concentrações de ácido láctico no retículo-rumen variaram com a hora de amostragem, atingindo os valores mais elevados 2 - 4 h após a ingestão alimentar. É possível observar no gráfico da Fig.3.16., que as taxas de remoção do ácido láctico são mais elevadas nas dietas que proporcionaram números populacionais mais elevados para os ciliados do retículo-rumen (CHAMBERLEIN et al., 1983; NEWBOLD et al., 1982; WILLIAMS, 1982), fenómeno estreitamente associado com a incorporação de PEG nas dietas dos animais.

As taxas de produção de gás pelo conteúdo retículo-ruminal foram manifestamente aumentadas com a suplementação proteica e com a incorporação de PEG nas dietas. As taxas máximas de produção são atingidas 2 h após a ingestão alimentar, quando são atingidas as concentrações de ácido láctico mais elevadas.

Não foi possível observar qualquer efeito pronunciado da suplementação proteica na produção de AGVs. Por limitação da quantidade de amostras, a leitura teve que ser feita na mistura das amostras pertencentes às várias horas de colheita. Talvez este tratamento tenha mascarado qualquer efeito mais pronunciado por parte da suplementação. A suplementação, no entanto, aumentou as concentrações dos AGVs vestigiais, se bem que de uma forma não significativa. Este

facto tem necessariamente a ver com a fermentação dos aminoácidos de cadeia ramificada (SHAZLY, 1952).

A actividade fermentativa "in vitro" quer o substracto ingerido pelos animais, quer os substractos purificados de natureza glucídica, aumentou com a incorporação de proteína na dieta. De destacar na fermentação da celulose a diminuição do tempo de latência na sua degradação, que baixou de 24 h na dieta com 8,5% PB, para 8 e 6 h, respectivamente 11 e 14 % PB. A degradação proteica no reticulo-rumen coloca à disposição das bactérias celulolíticas AGVs de cadeia ramificada que constituem factores de crescimento para estas bactérias (BRYANT et DOETSCH, 1955; ALLISON et al., 1962; BRYANT et ROBINSON, 1962; SALSBURY et al., 1960). Com efeito estes ácidos de cadeia ramificada, ácido isobutírico, ácido isovalérico e ácido 2-metil-isovalérico são utilizados pelas bactérias celulolíticas para sintetizar respectivamente os aminoácidos valina, leucina e isoleucina (ALLISON et al., 1962; ALLISON et BRYANT, 1963; BRYANT, 1973.).

As taxas de degradação da caseína mostraram uma ligeira tendencia para aumentarem com a elevação de nível de proteína nas dietas dos animais. O aumento significativo nas taxas de degradação que foi possível observar com a inclusão de PEG em Dg, associa-se perfeitamente com o crescimento da microflora proteolítica (Fig. 3.4.).

Parece existir, de facto, uma relação muito estreita entre a actividade glicerolítica e lipolítica (HOBSON e MANN, 1961). Nas Figs. 3.38. e 3.39., as tendências das curvas de produção de gás são bastante semelhantes.

A concentração de fenóis totais aumentou consideravelmente com a suplementação proteica. Os valores mais elevados registados no conteúdo retículo-ruminal dos animais na dieta contendo 11% PB encontram-se já nas margens de interferência que os fenóis são capazes de provocar nas bactérias do retículo-rumen (BORNEMAN et AKIN, 1985).

Não foi possível nas nossas condições experimentais despistar o efeito dos taninos com a utilização do PEG₄₀₀₀. A incorporação deste polímero nas dietas, produziu modificações importantes nos parâmetros fermentativos. As taxas de produção de gás pelo conteúdo retículo-ruminal "in vivo" aumentaram consideravelmente com a sua incorporação, como também aumentaram as populações bacterianas. Todavia não é possível atribuir apenas ao bloqueamento dos taninos da dieta pelo PEG, o aumento das actividades fermentativas do conteúdo retículo-ruminal. Com efeito, a incorporação de PEG alterou consideravelmente a relação bactérias/ciliados. A população de ciliados diminuiu sempre com a inclusão de PEG. Os resultados sugerem-nos que o aumento das actividades fermentativas no retículo-rumen ficou a dever-se, fundamentalmente ao aumento da população bacteriana, que possuem taxas metabólicas superiores aos ciliados (CLARKE, 1964). Se bem que os nossos resultados não deixem transparecer de uma forma clara, o PEG alterou as taxas de diluição do conteúdo retículo-ruminal, particularmente quando os animais ingeriram 14% PB nas suas dietas. SEQUEIRA (1988) refere modificações importantes na taxa de diluição do conteúdo retículo-ruminal dos animais tratados com 4% de PEG.

O aumento da proteossíntese microbiana que o mesmo autor refere, é provável que possa ser devida à diminuição da população de ciliados beneficiando o crescimento da população bacteriana. A confirmar-se esta situação, o aumento das "performances" dos animais com a inclusão de PEG nas suas dietas, fica a dever-se mais à modificação da taxa de diluição do fluido retículo-ruminal, do que à inactivação dos taninos nas dietas dos animais.

CAPÍTULO 3

ANEXOS

Fig-3-1-

Efeito da suplementação proteica e do PEG no nº de ciliados.

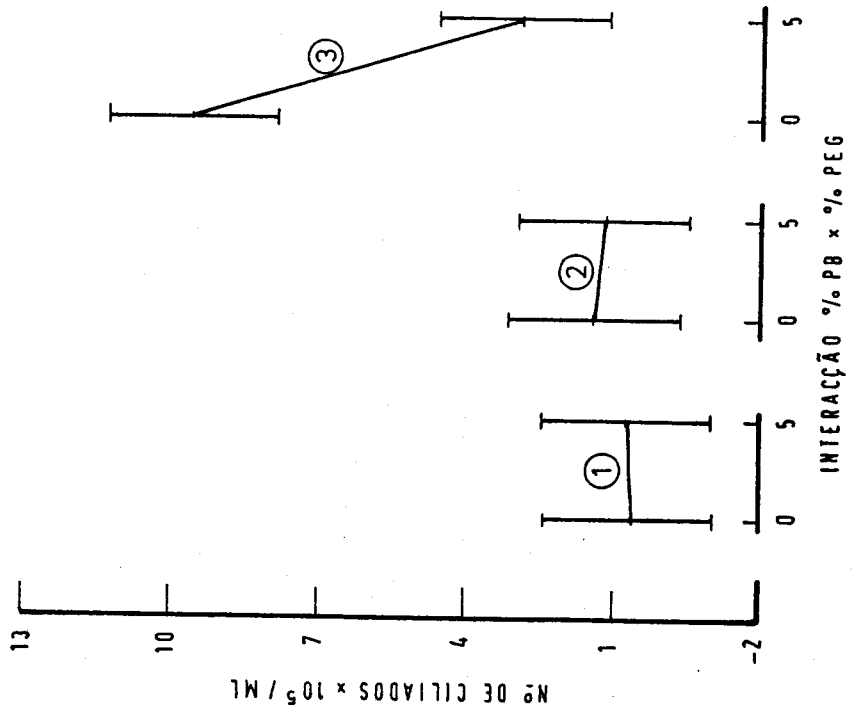


Fig-3-2-

Efeito da suplementação proteica e do PEG na microflora viável total.

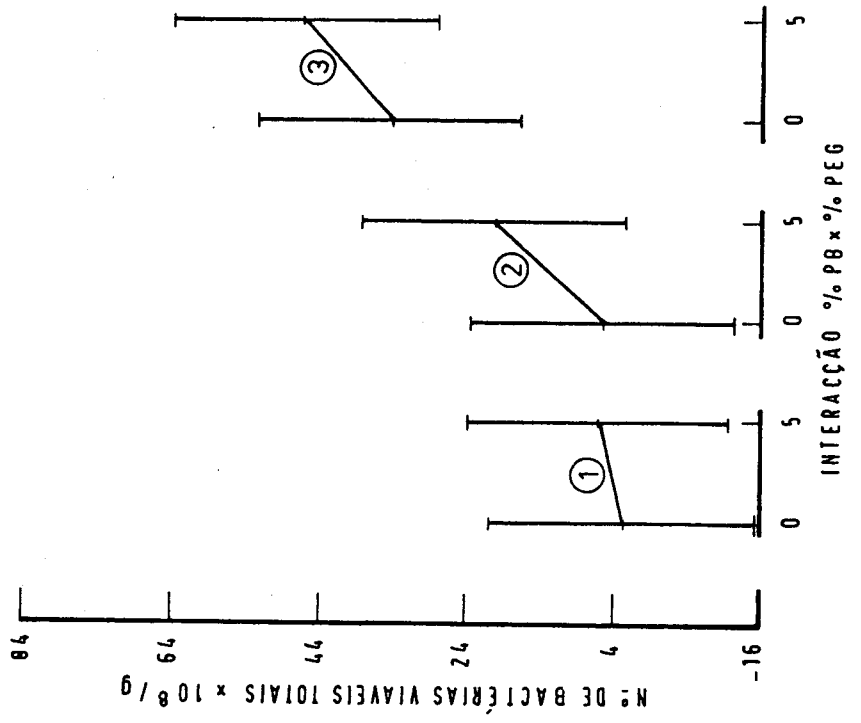


Fig-3-3-

Efeito da suplementação proteica e do PEG na microflora amilolítica

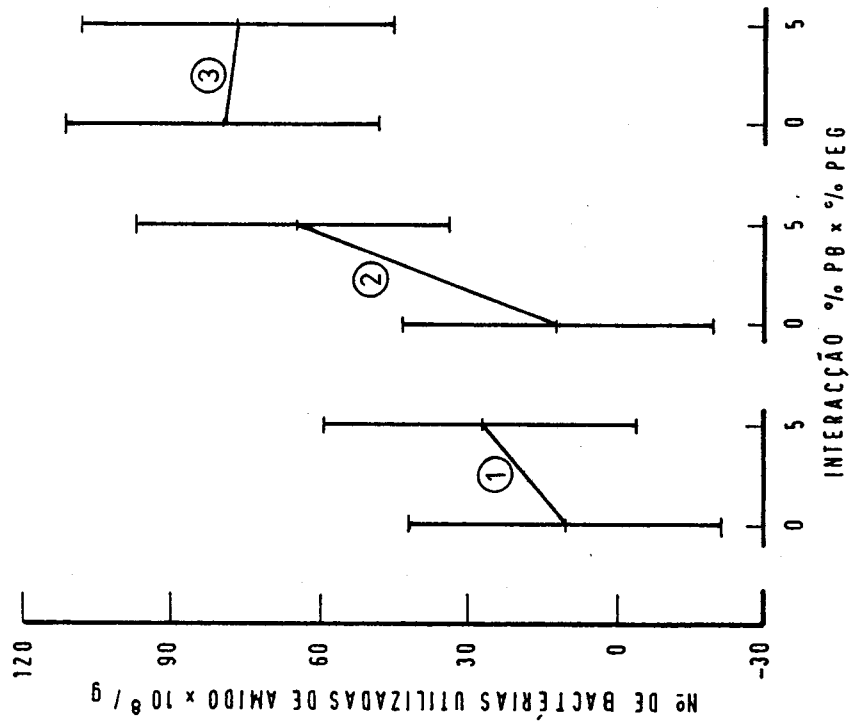


Fig-3-4-

Efeito da suplementação proteica e do PEG na microflora proteolítica

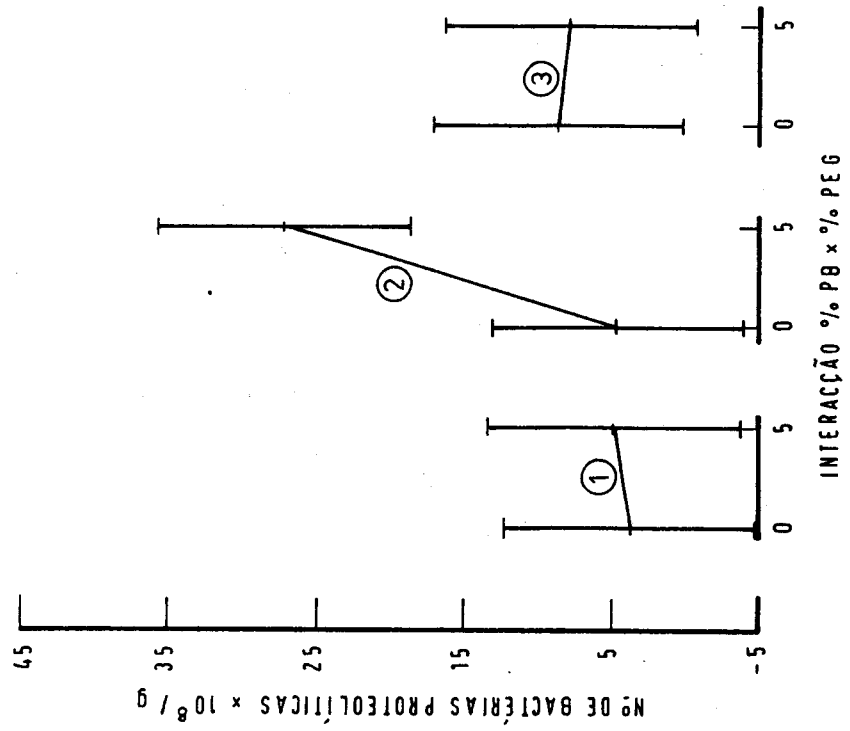
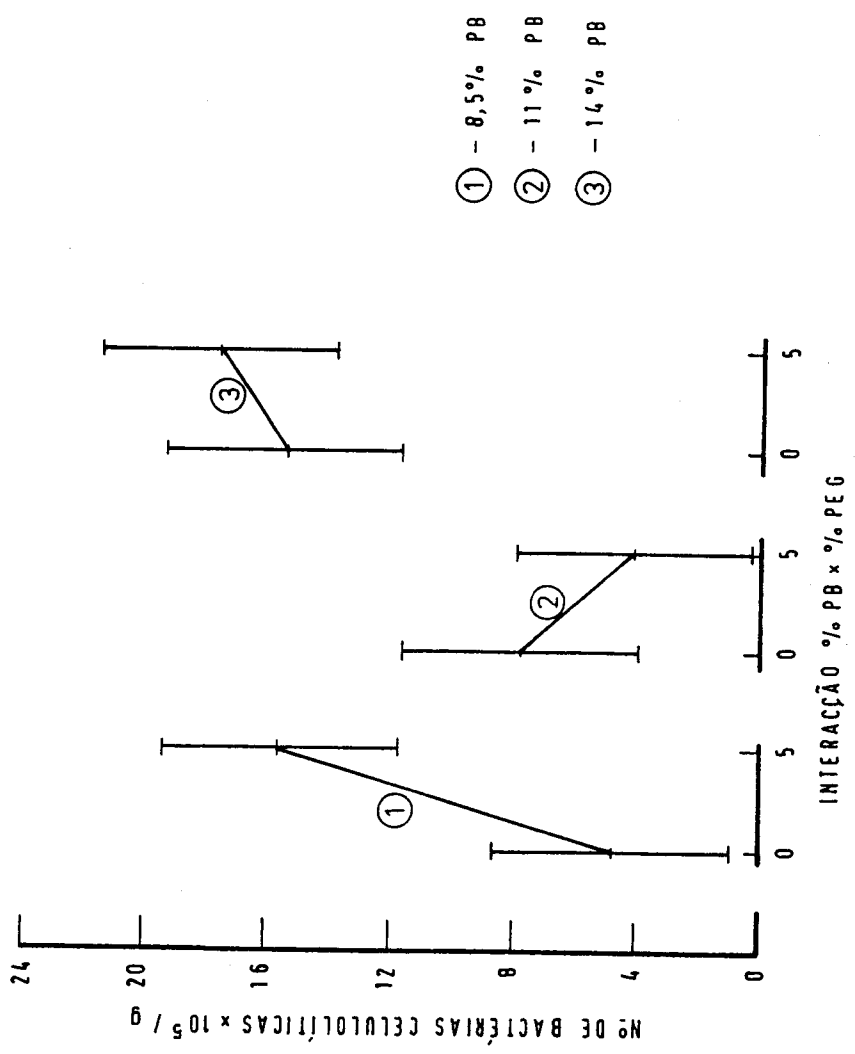


Fig-3-5.

Efeito da suplementação proteica e do PEG na microflora celulolítica



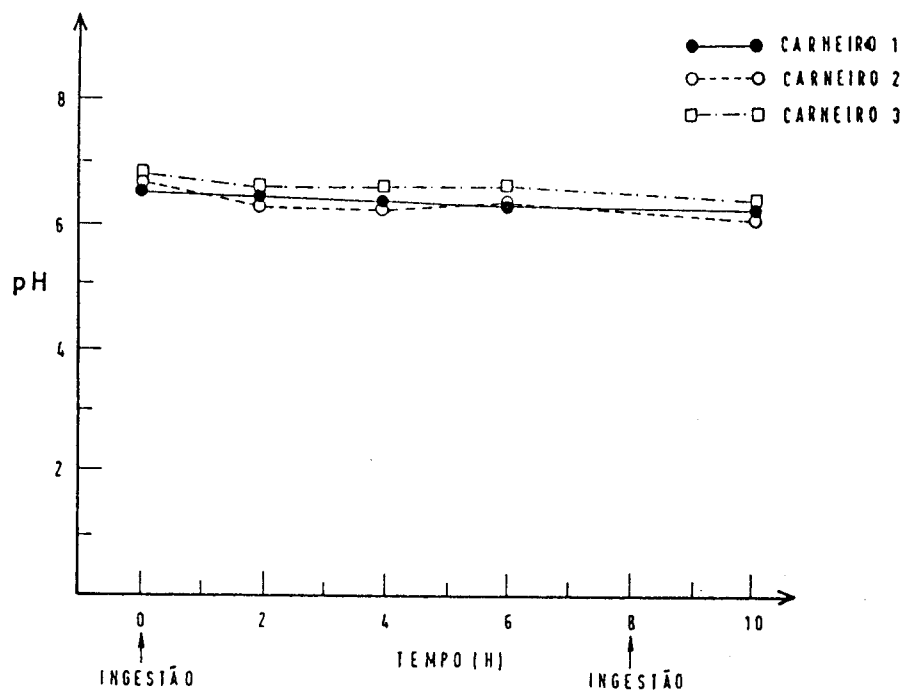


Fig. 3.6. Variação do pH no retículo-rumen dos ovinos na dieta suplementada com 8,5% PB

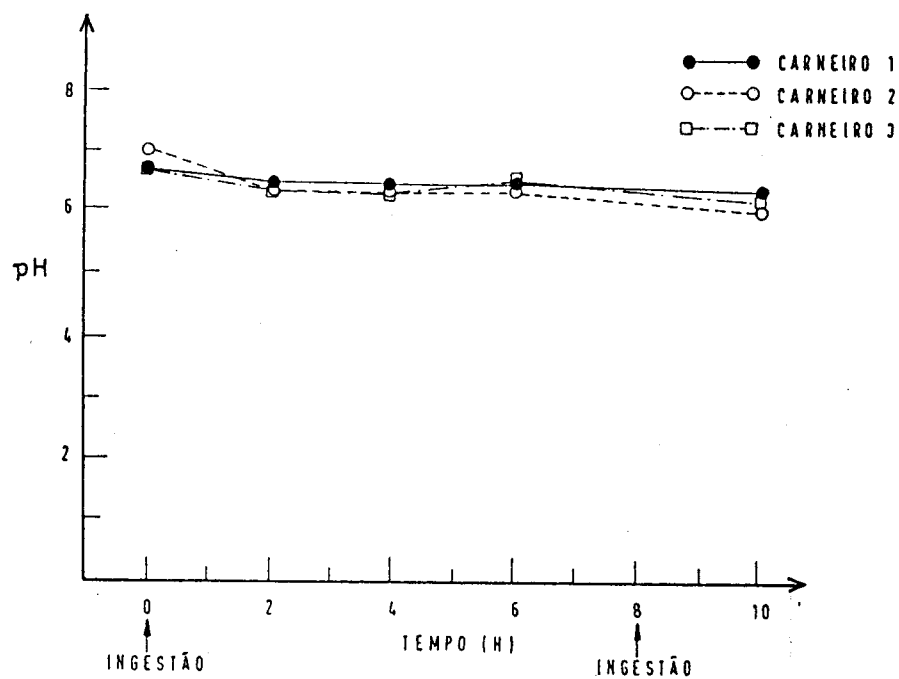


Fig. 3.7. Variação do pH no retículo-rumen dos ovinos na dieta suplementada com 8,5% PB + PEG

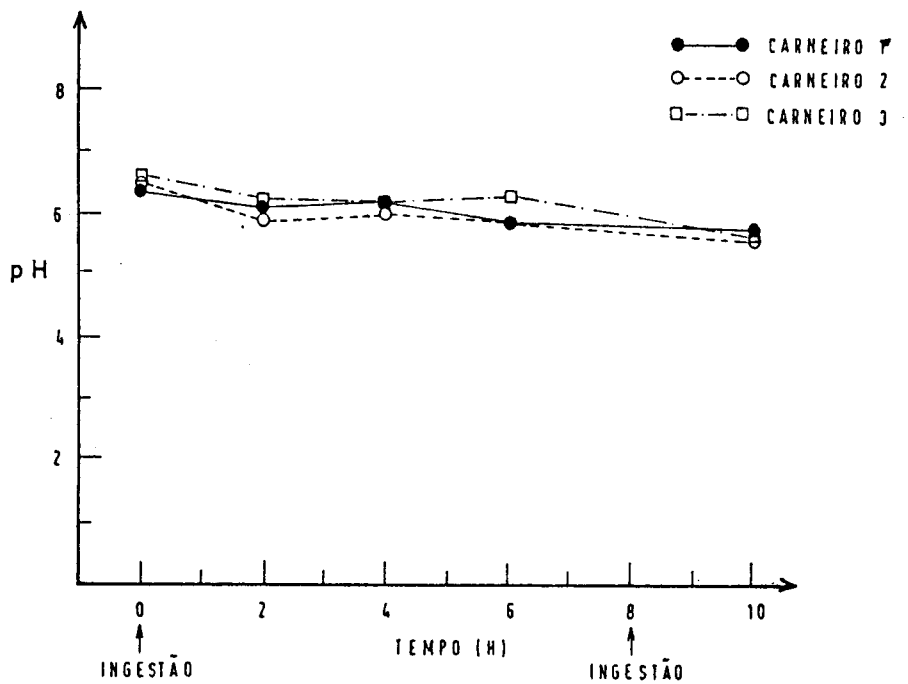


Fig. 3.8. Variação do pH no retículo-rumen dos ovinos na dieta suplementada com 14% PB

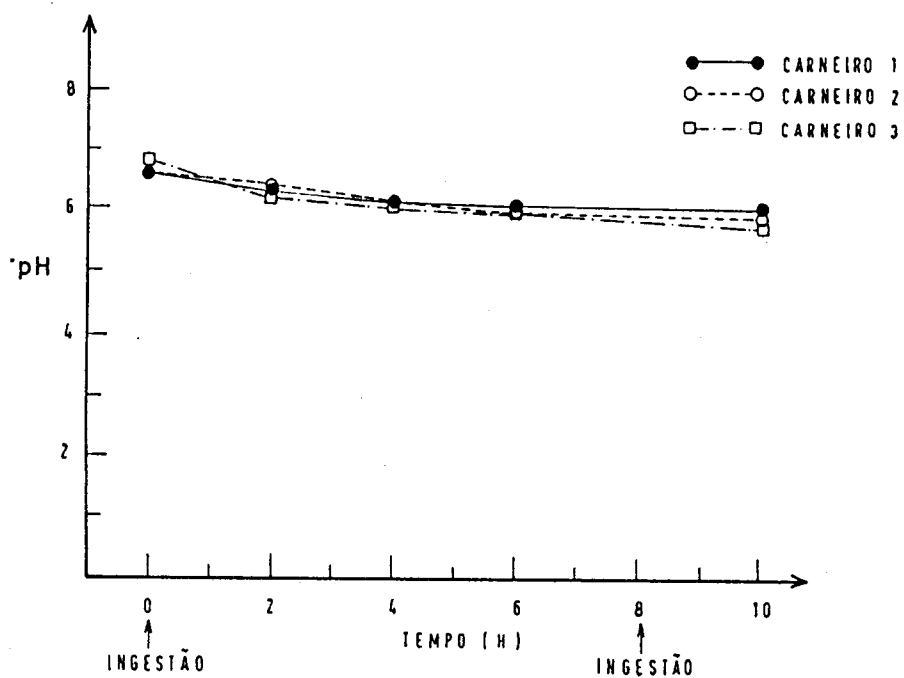


Fig. 3.9. Variação do pH no retículo-rumen dos ovinos na dieta suplementada com 14% PB + PEG

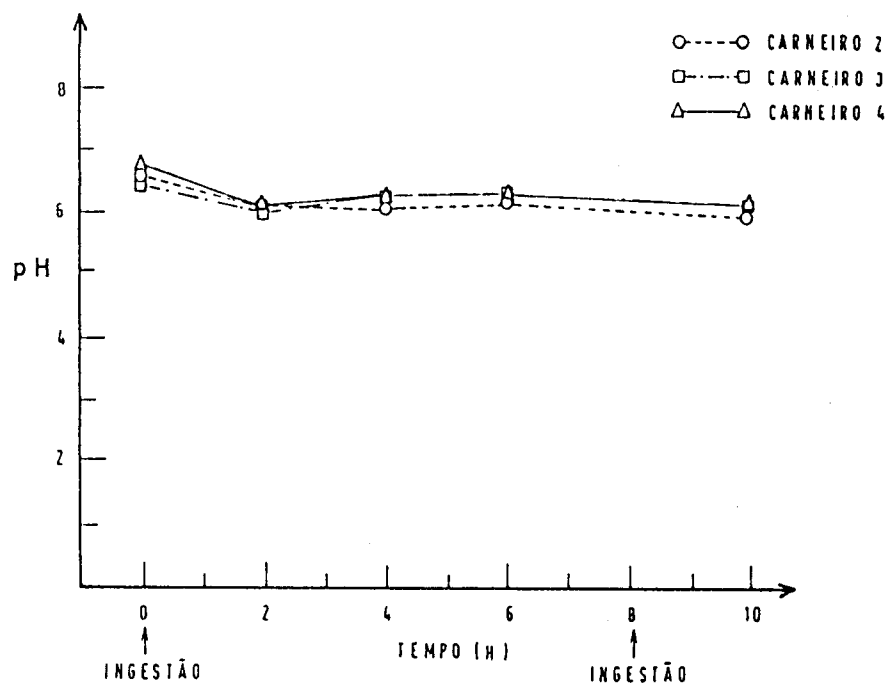


Fig. 3.10. Variação do pH no retículo-rumen dos ovinos na dieta suplementada com 11% PB

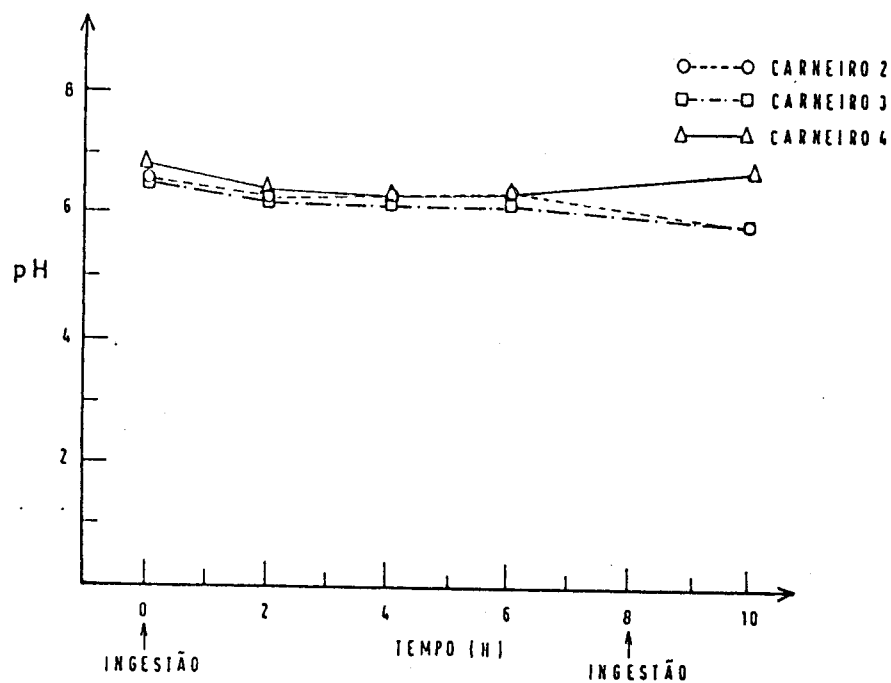


Fig. 3.11. Variação do pH no retículo-rumen dos ovinos na dieta suplementada com 11% PB + PEG

Fig-3-12.

Efeito da suplementação proteica e do PEG na concentração de $N-NH_4$

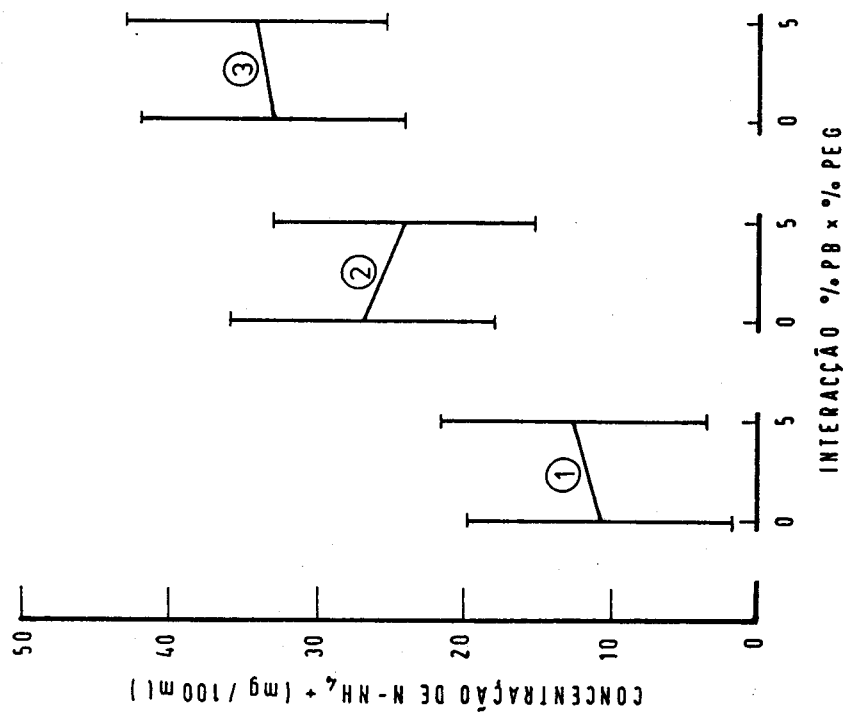
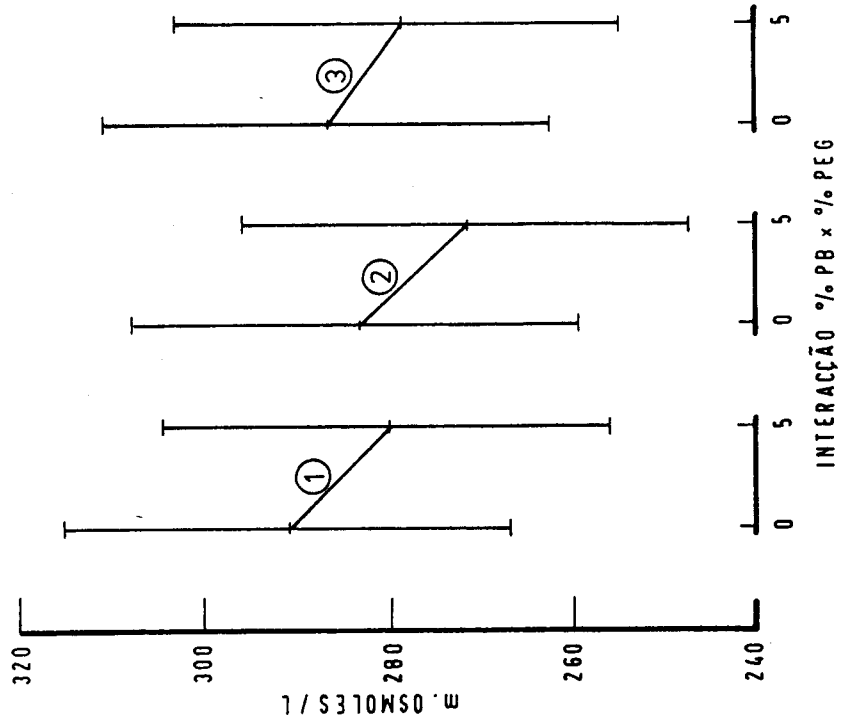


Fig-3-13.

Efeito da suplementação proteica e do PEG nos valores da osmolalidade



- ① - 8,5% PB
- ② - 11% PB
- ③ - 14% PB

Fig-3-14-

Efeito da suplementação proteica, do PEG e da hora de colheita da amostra na concentração de $N-NH_4$.

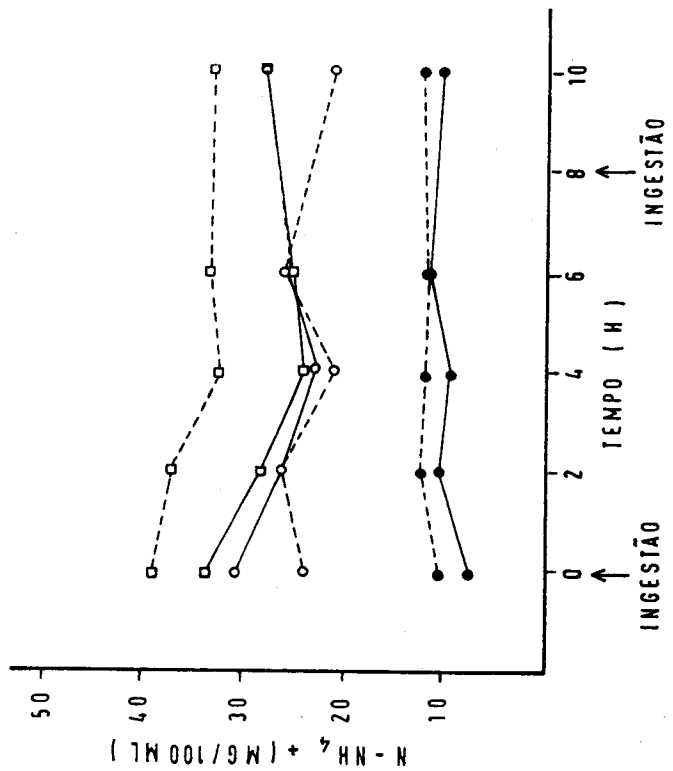


Fig-3-15-

Efeito da suplementação proteica, do PEG e da hora de colheita da amostra nos valores da osmolalidade.

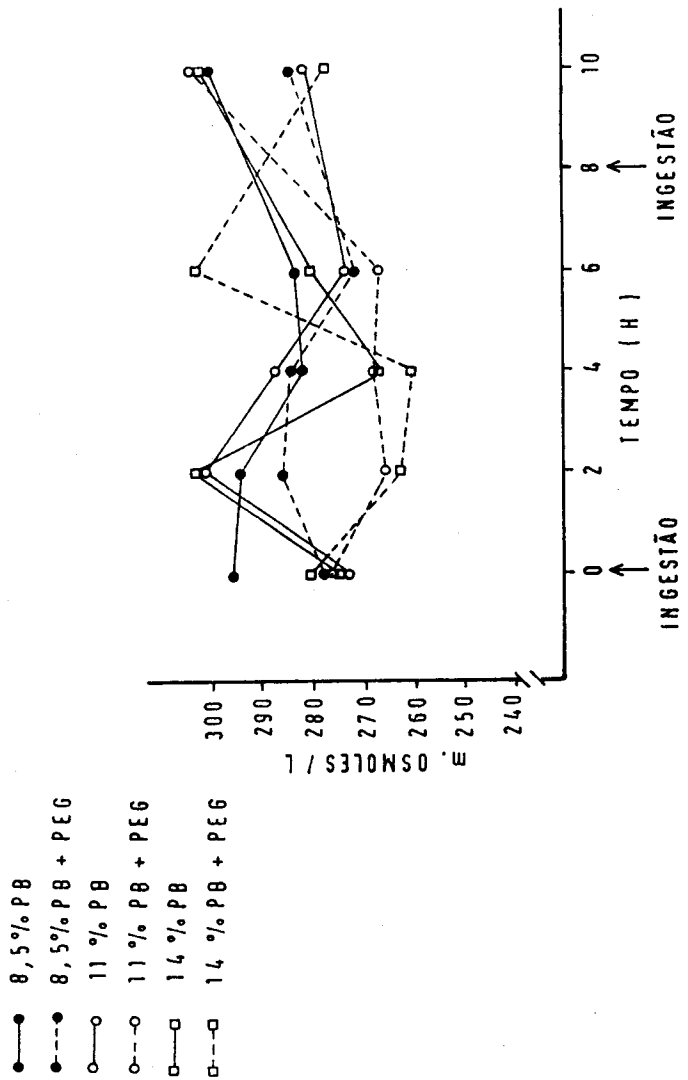


Fig-3-16-

Efeito da suplementação proteica, do PEG e da hora de colheita da amostra nas concentrações de ácido láctico.

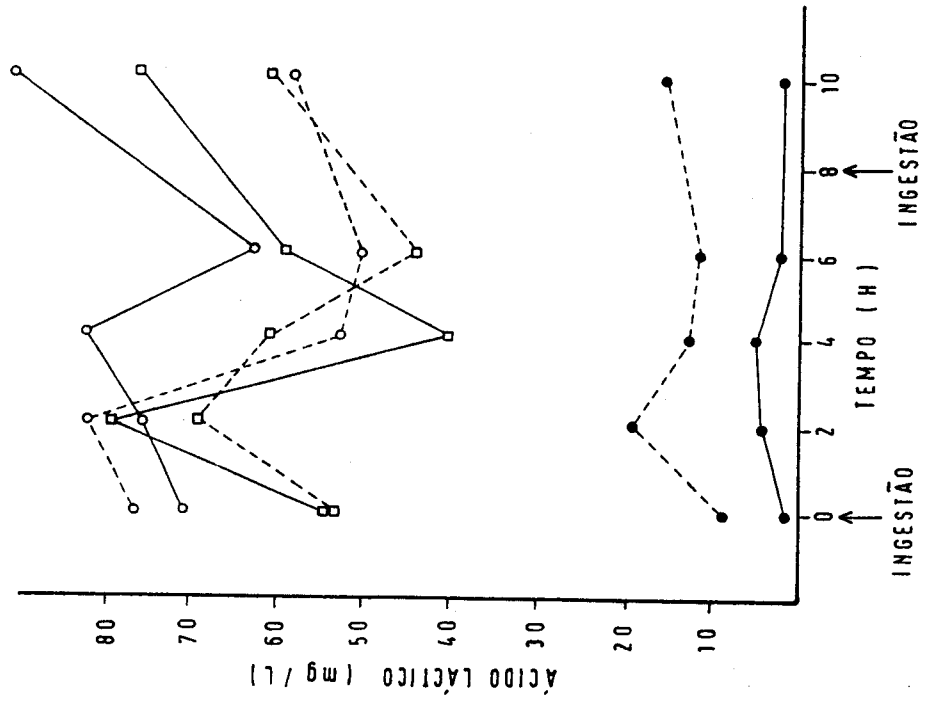


Fig-3-17-

Efeito da suplementação proteica, do PEG e da hora de colheita da amostra nas taxas de produção de gás pelo conteúdo retículo-ruminal "in vivo".

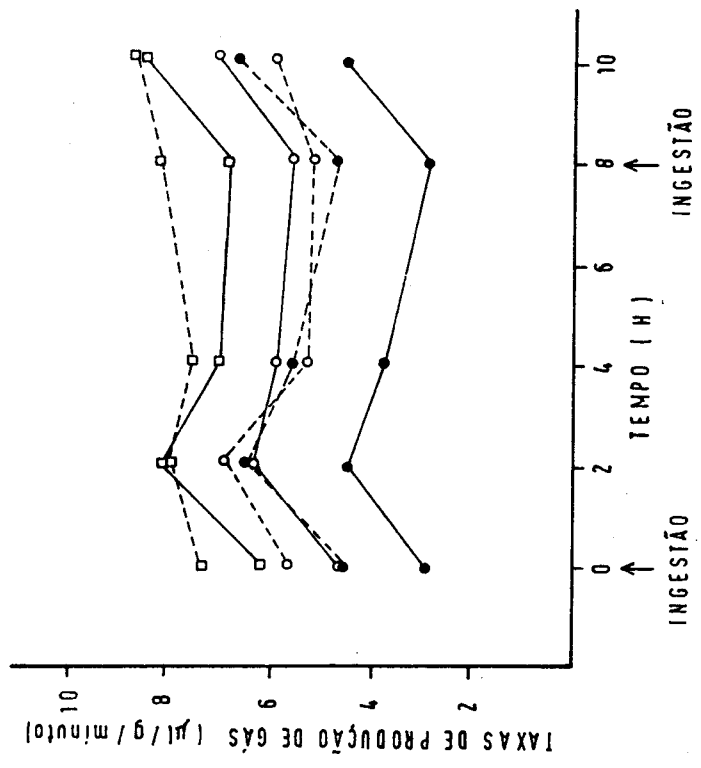


Fig-3-18.

Efeito da suplementação proteica e do PEG nas taxas de degradação da caseína "in vitro".

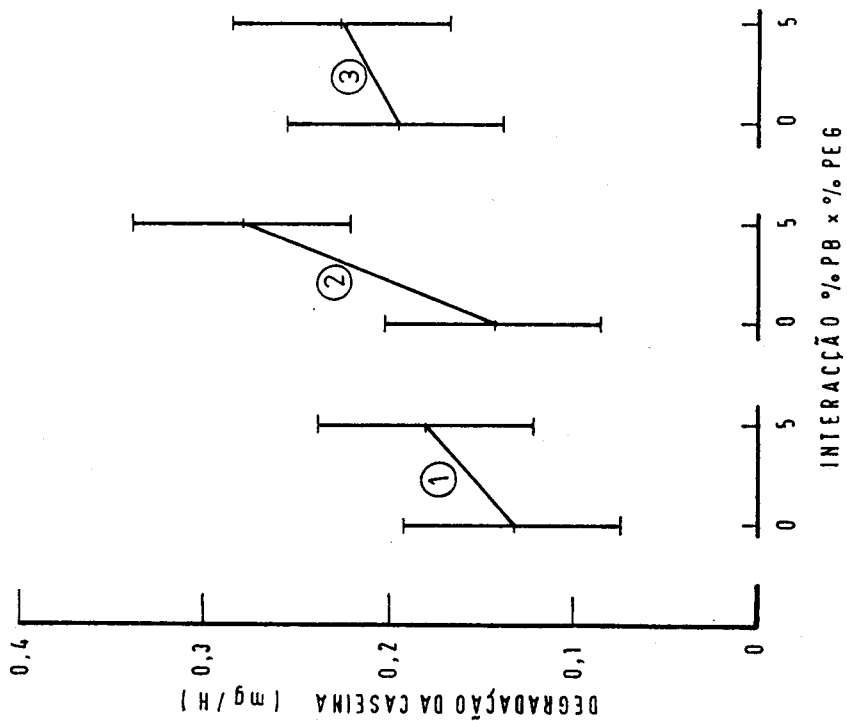


Fig-3-19.

Efeito da suplementação proteica e do PEG na concentração de fenóis totais.

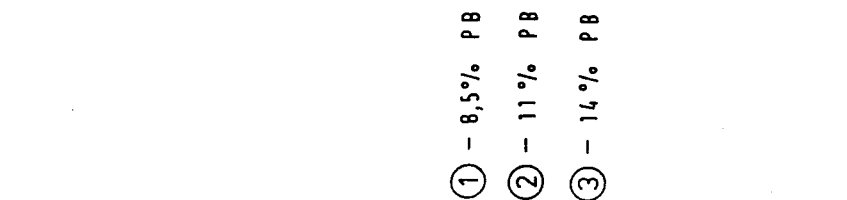


Fig-3-20-

Efeito da suplementação proteica e do PEG no peso seco dos ciliados.

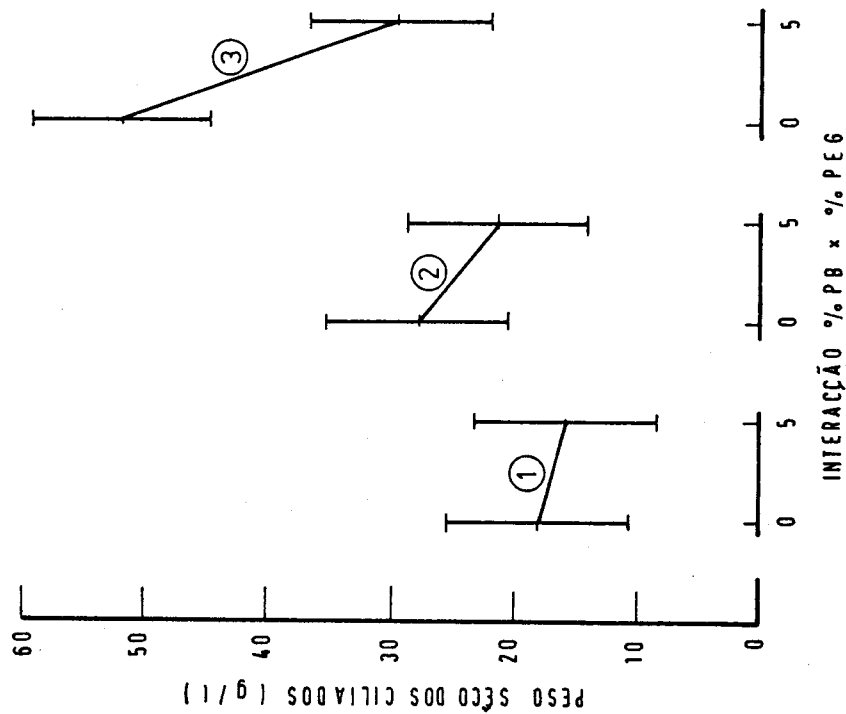


Fig-21-

Efeito da suplementação proteica e do PEG na fracção azoto dos ciliados.

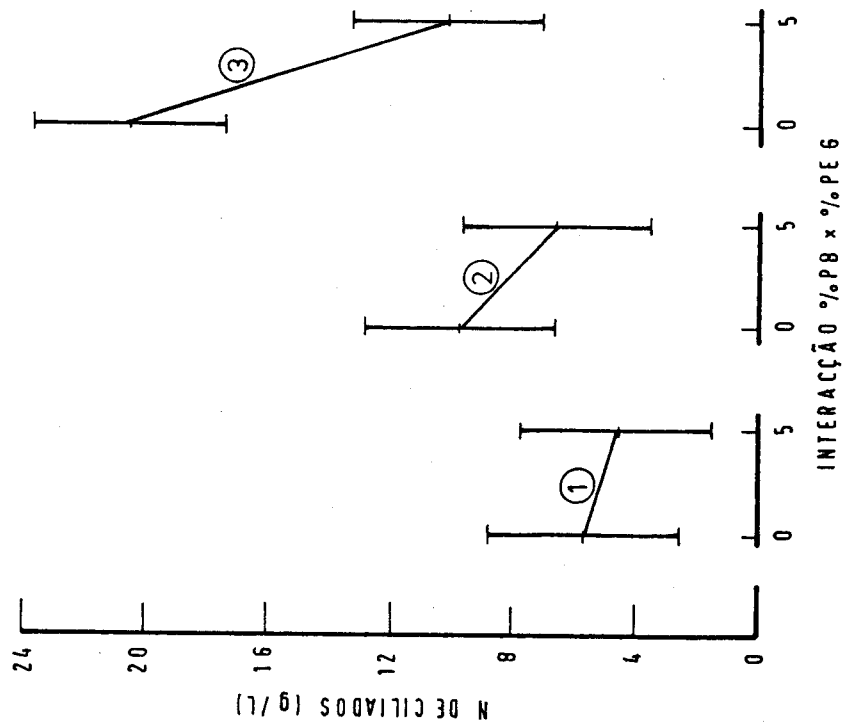


Fig-3-22.

Efeito da suplementação proteica, do PEG e da hora de colheita da amostra no peso seco dos ciliados.

- 8,5% PB
- 8,5% PB + PEG
- 11% PB
- 11% PB + PEG
- 14% PB
- 14% PB + PEG

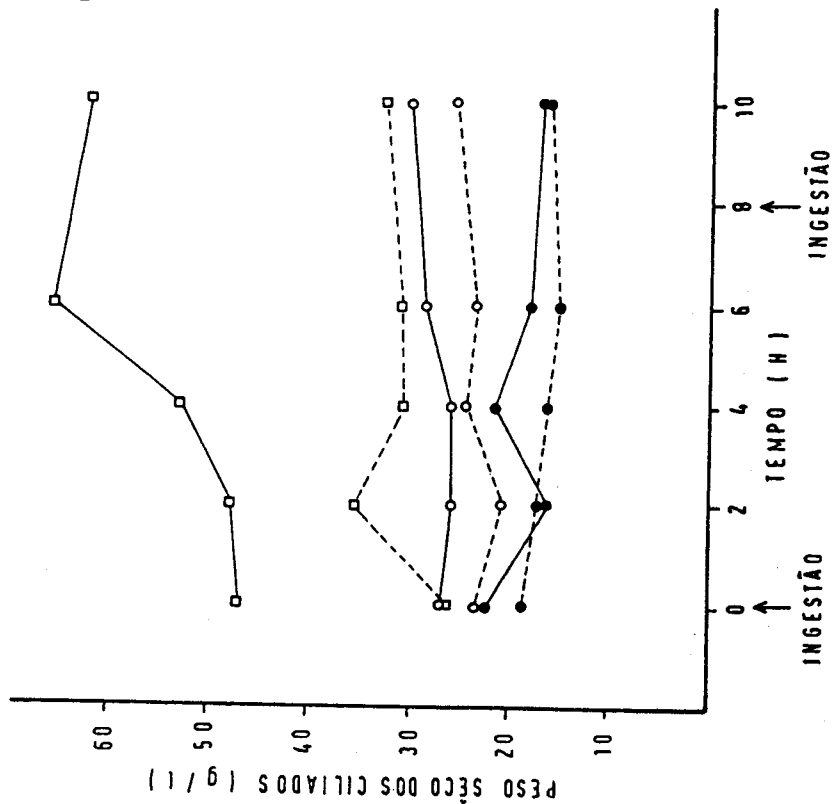


Fig-3-23.

Efeito da suplementação proteica, do PEG e da hora de colheita da amostra no peso seco das bactérias.

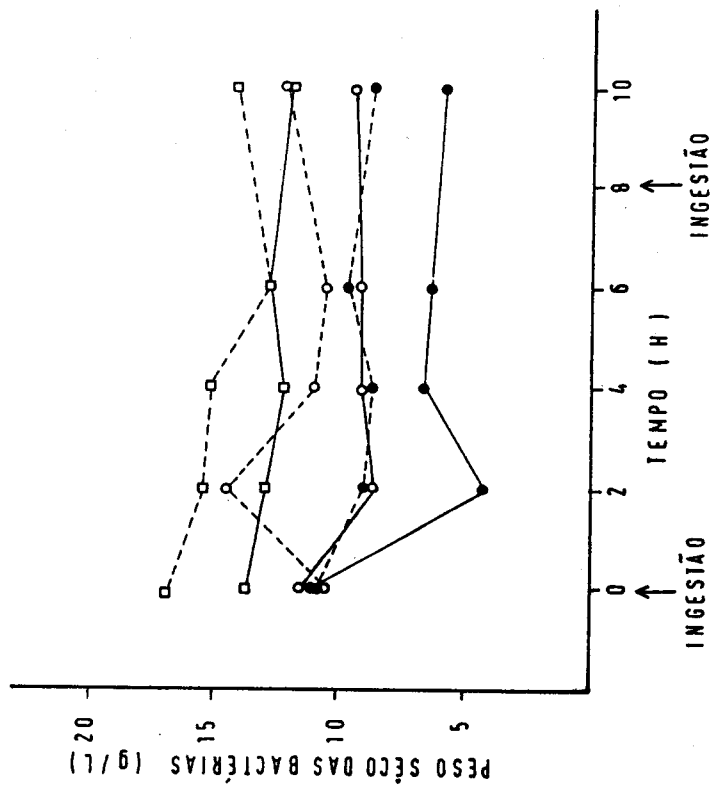


Fig. 3-24.

Varição da concentração de azoto nos ciliados com a hora de colheita das amostras.

● 8,5%PB
○ 11%PB
□ 14%PB
--- N

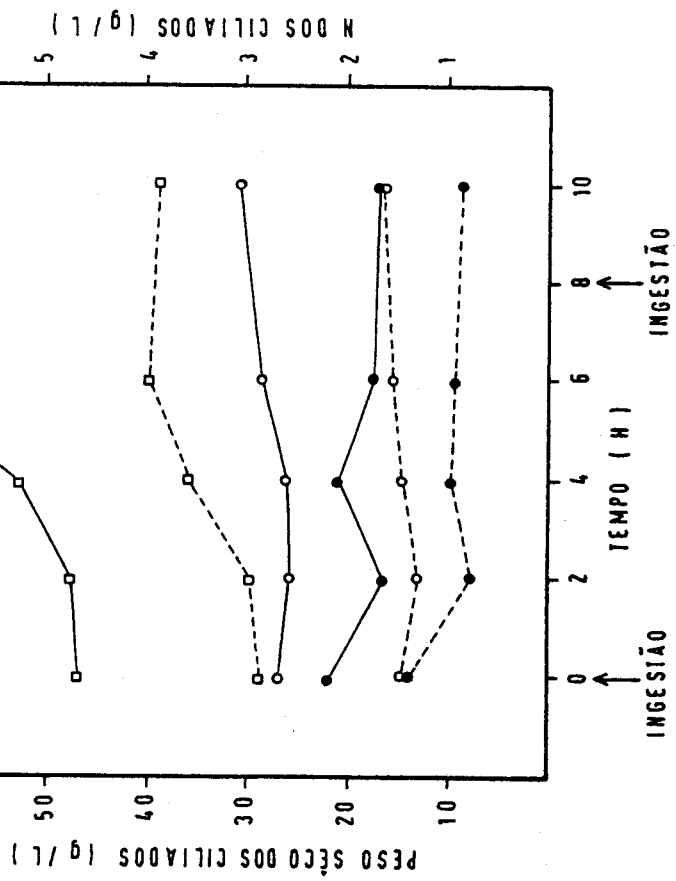


Fig. 3-25.

Varição da concentração de azoto nas bactérias com a hora de colheita das amostras.

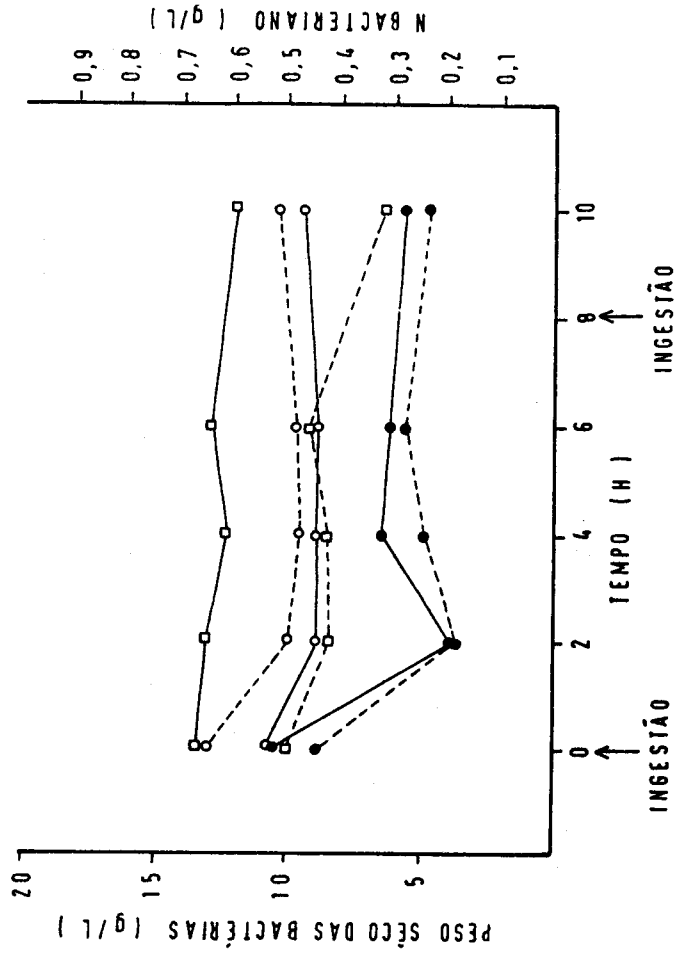


Fig:3-26-

Varição da concentração de azoto dos ciliados com a hora de colheita das amostras.

- 8,5%PB + PEG
- 11%PB + PEG
- 14%PB + PEG
- N

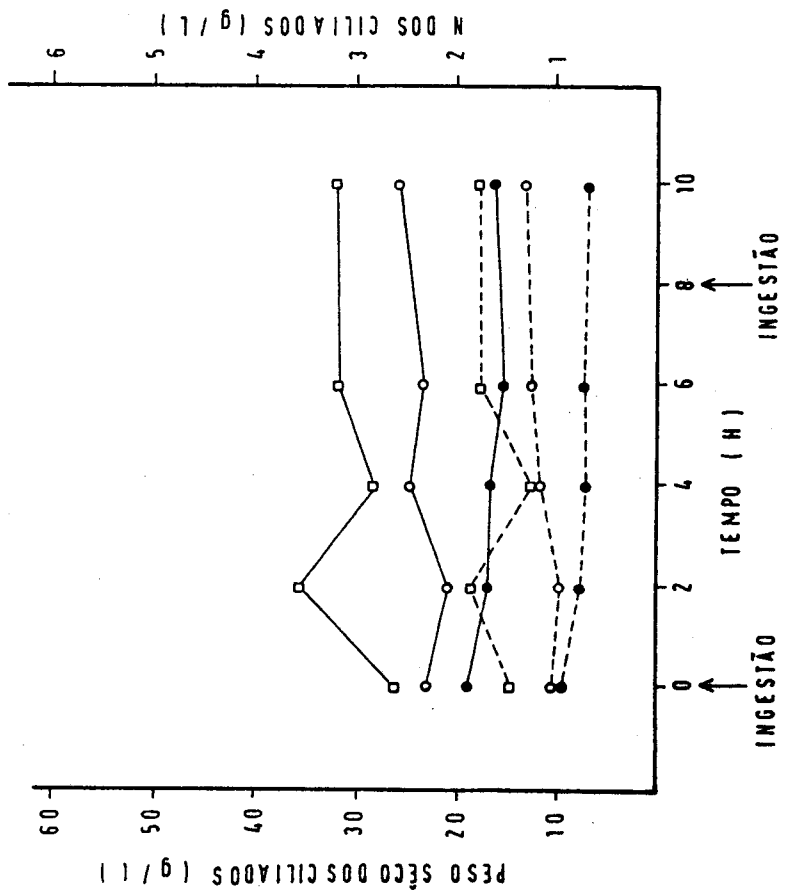


Fig-3-27-

Varição da concentração de azoto das bactérias com a hora de colheita das amostras.

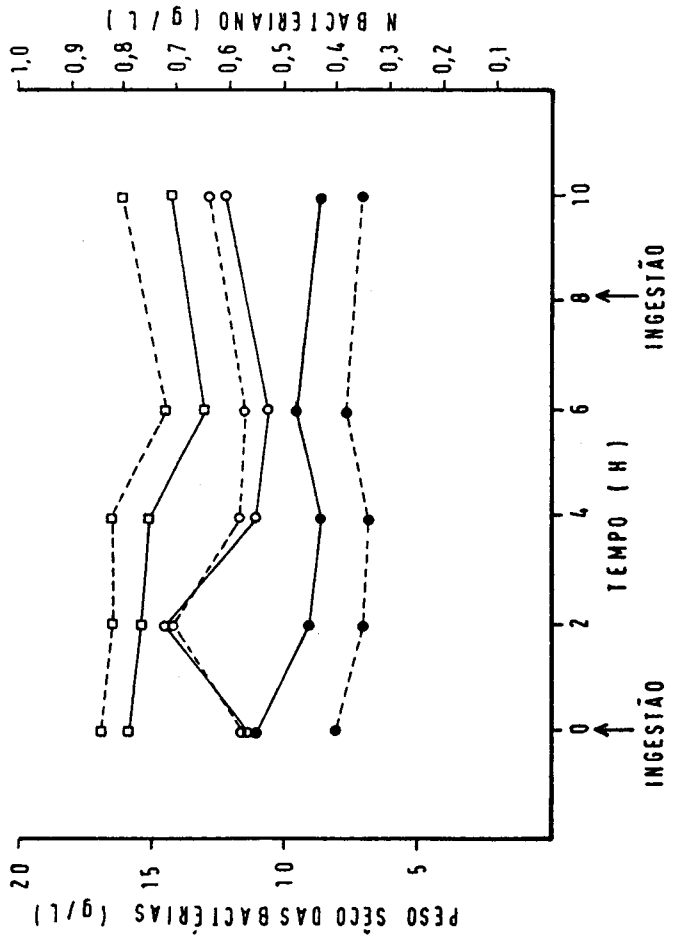


Fig. 3-28.

Efeito da suplementação proteica e do PEG no peso seco bacteriano.

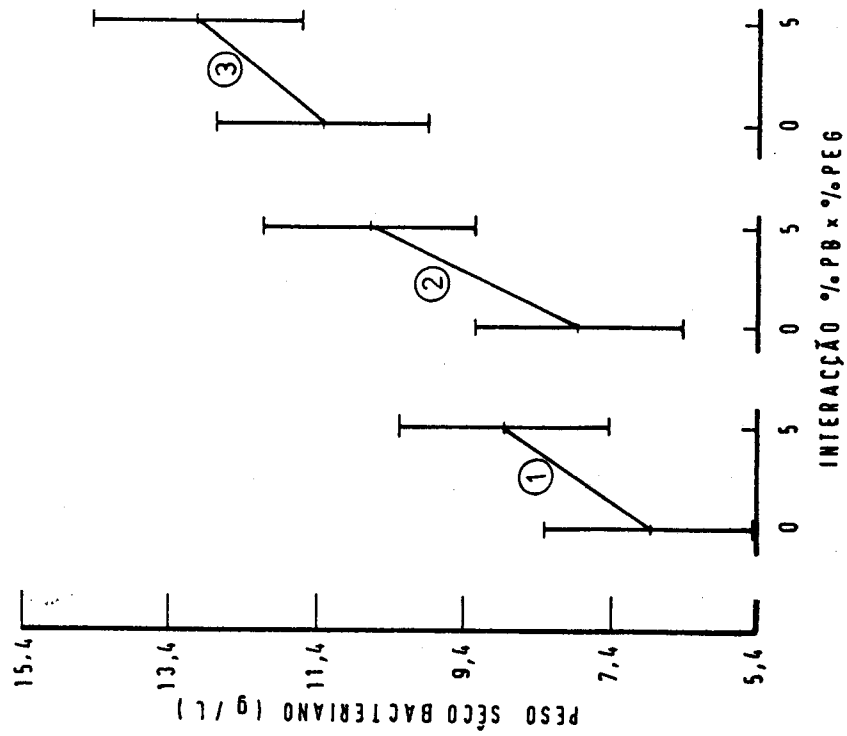


Fig. 3-29.

Efeito da suplementação proteica e do PEG no azoto bacteriano.

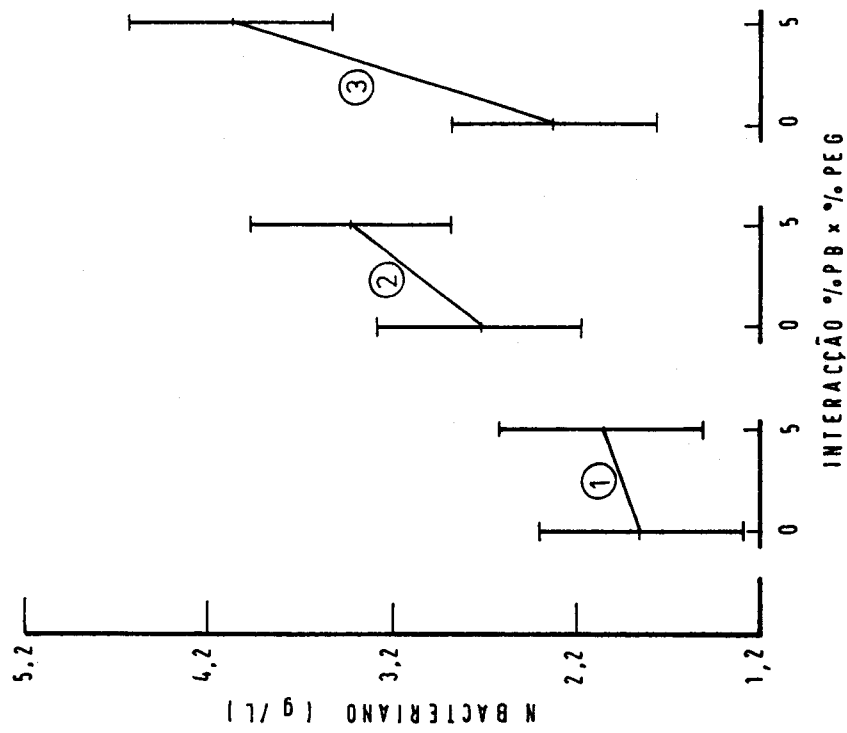


Fig. 3-30.

Efeito da suplementação proteica e do PEG nas taxas de "out-flow" do Cr.EDTA.

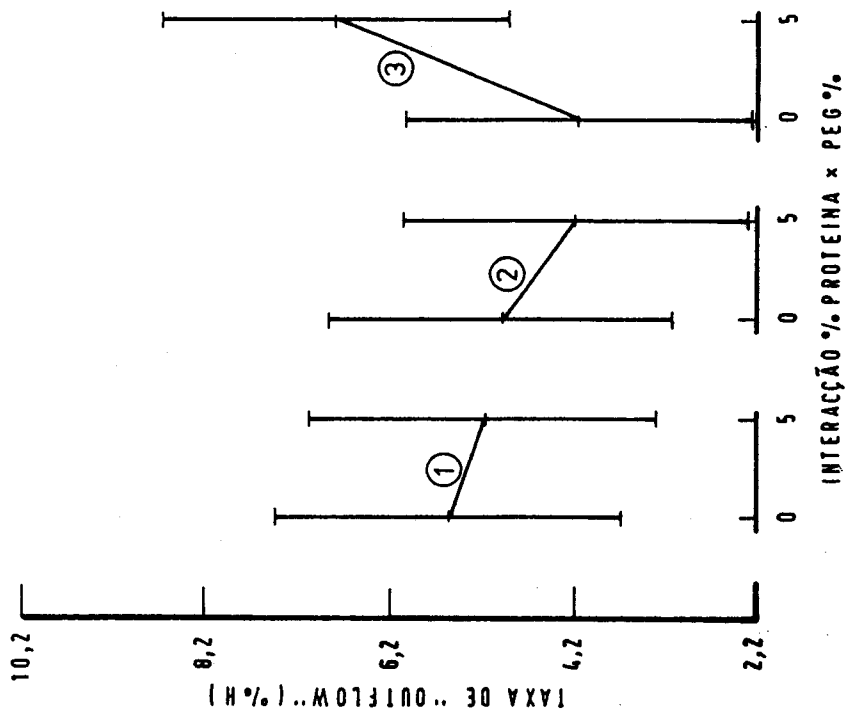


Fig. 3-31.

Efeito da suplementação proteica e PEG no volume do conteúdo retículo-ruminal.

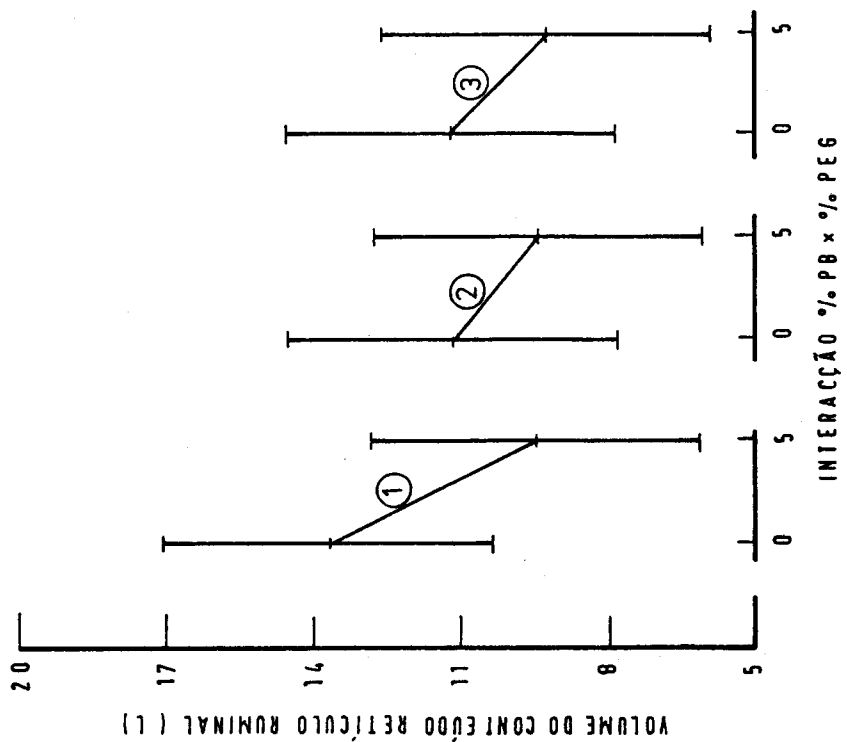


Fig-3-32.

Efeito da suplementação proteica e do PEG nas taxas de produção de gás pelo conteúdo reicculo-ruminal "in vivo".

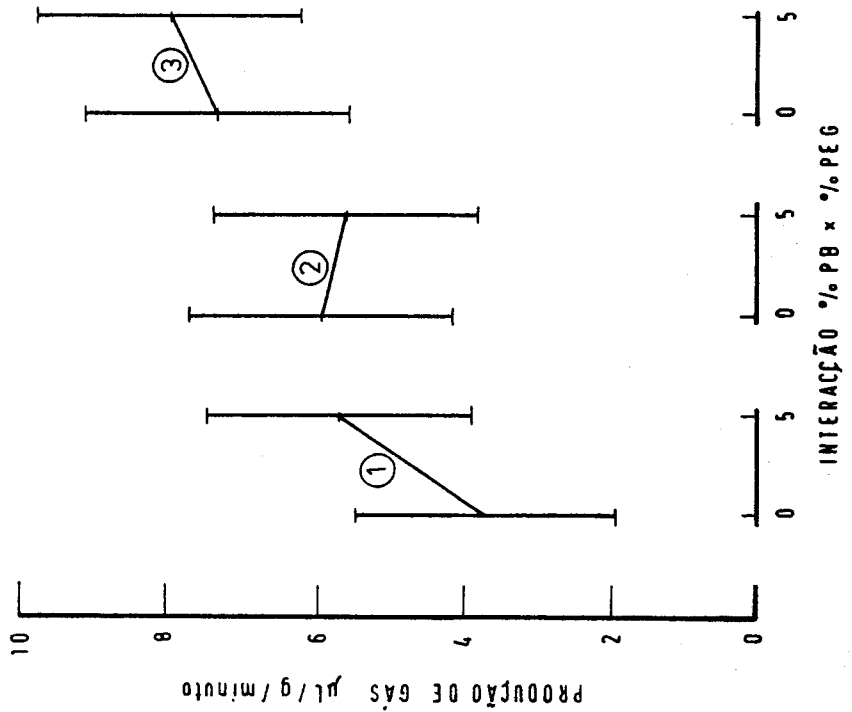


Fig-3-33.

Efeito da suplementação proteica e do PEG nas produções de gás na fermentação do substracto ingerido pelos animais.

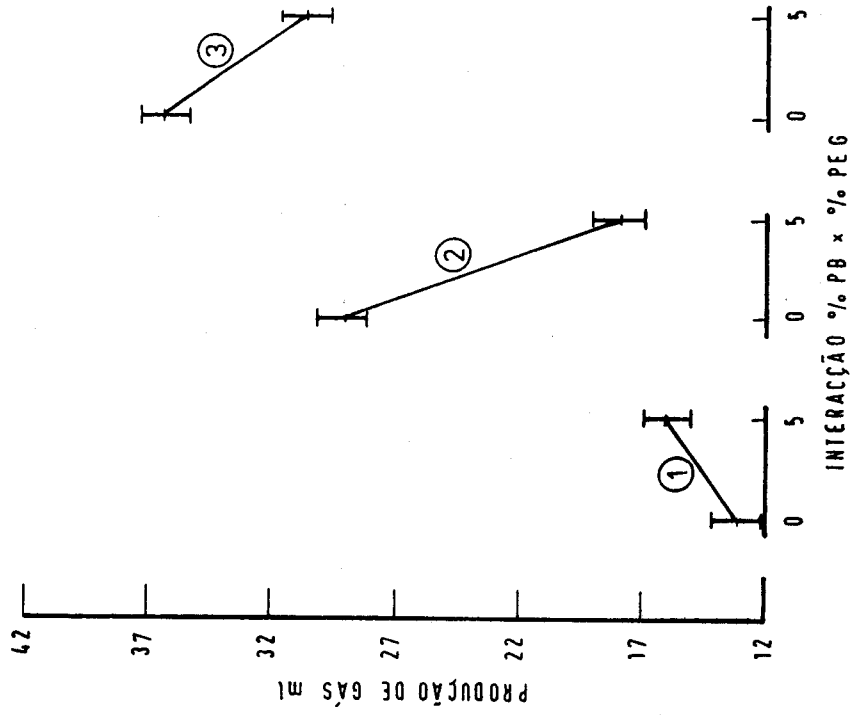


Fig - 3 - 34 -

Efeito da suplementação proteica e do PEG nas produções de gás na fermentação do amido "in vitro".

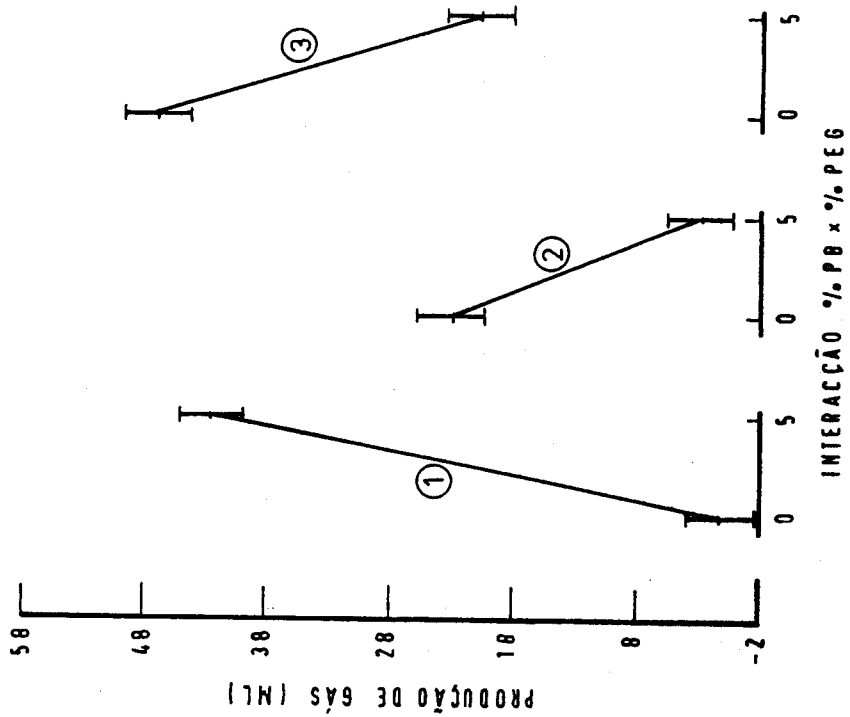


Fig - 3 - 35 -

Efeito da suplementação proteica e do PEG nas produções de gás na fermentação da pectina "in vitro".

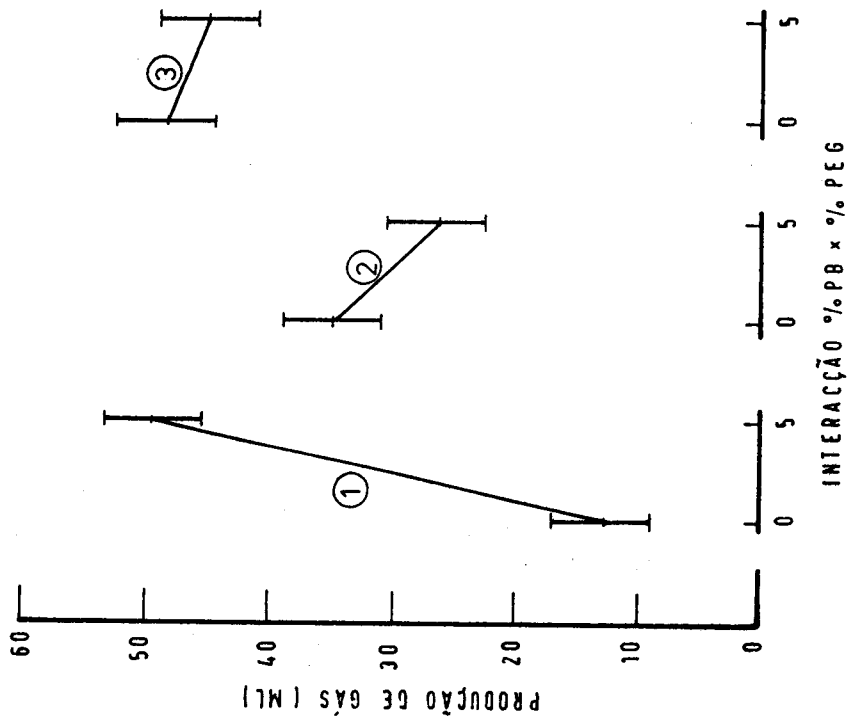


Fig-3-36-

Efeito da suplementação proteica e do PEG nas produções de gás na fermentação de xilano "in vitro".

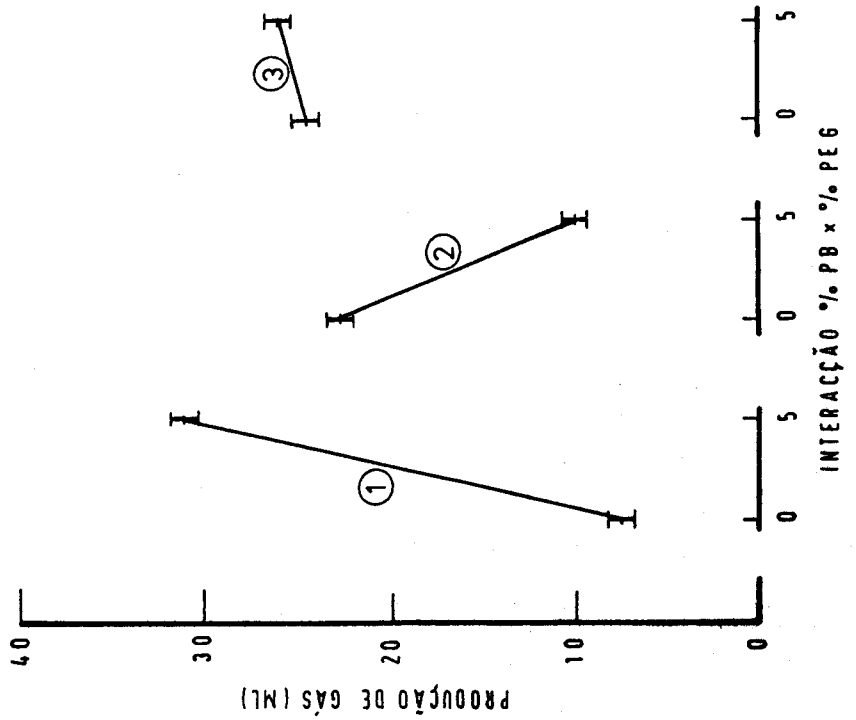


Fig-3-37-

Efeito da suplementação proteica e do PEG nas produções de gás na fermentação da celulose "in vitro".

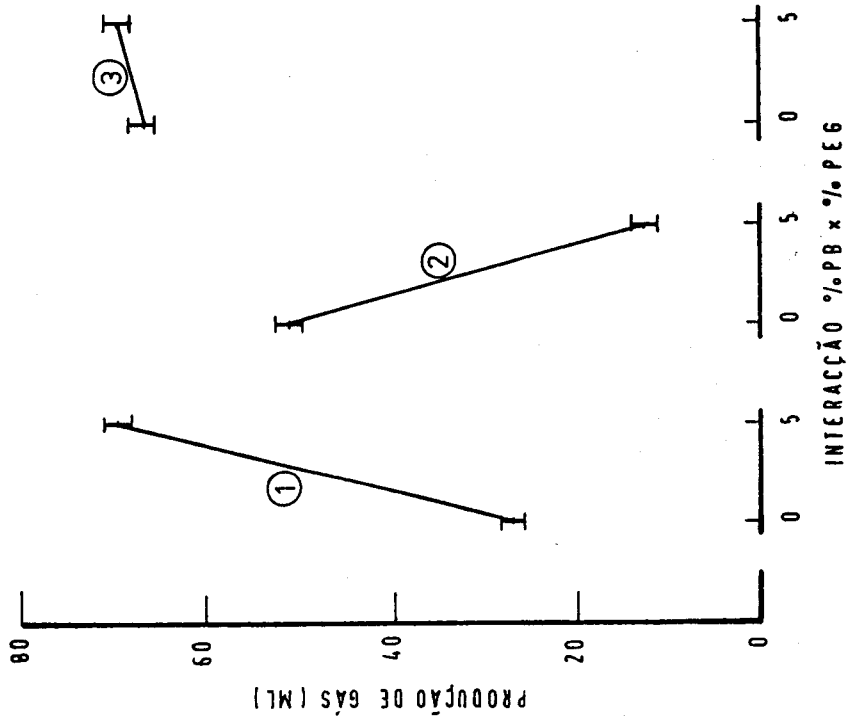


Fig. 3-38.

Efeito da suplementação proteica e do PEG nas produções de gás na fermentação de glicerol "in vitro".

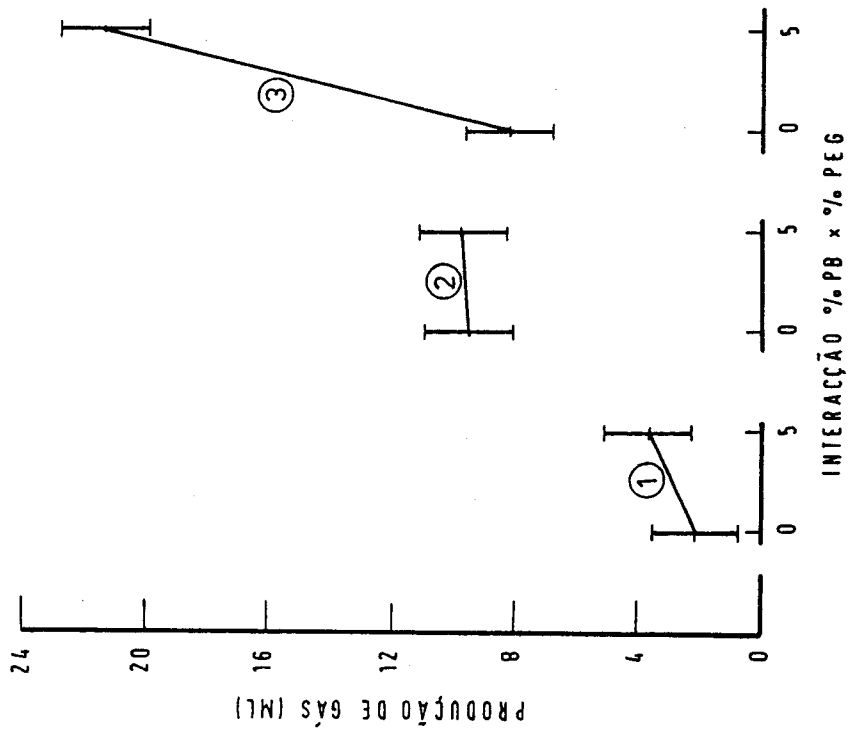
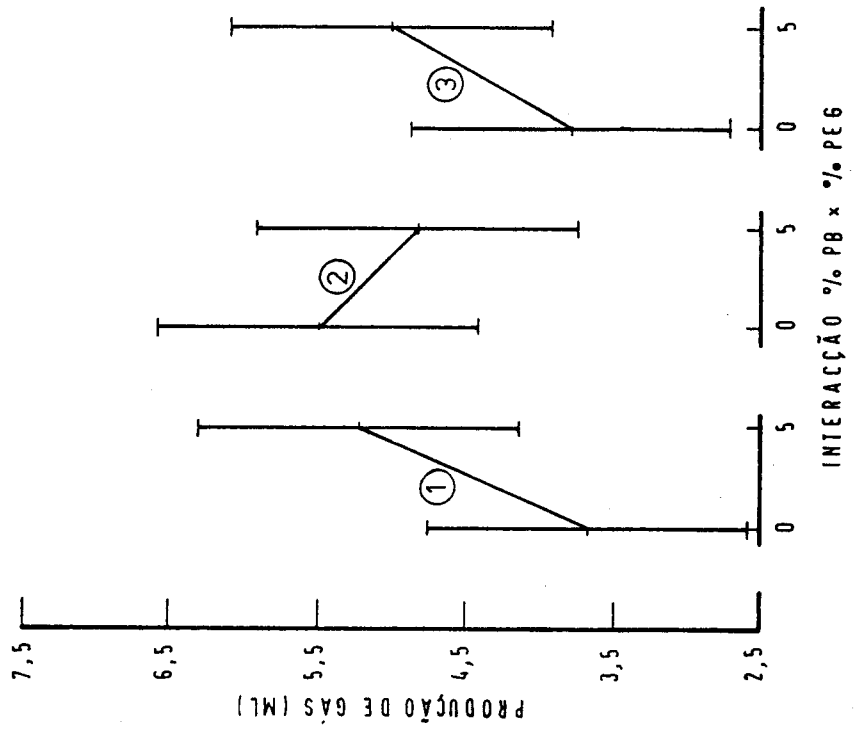
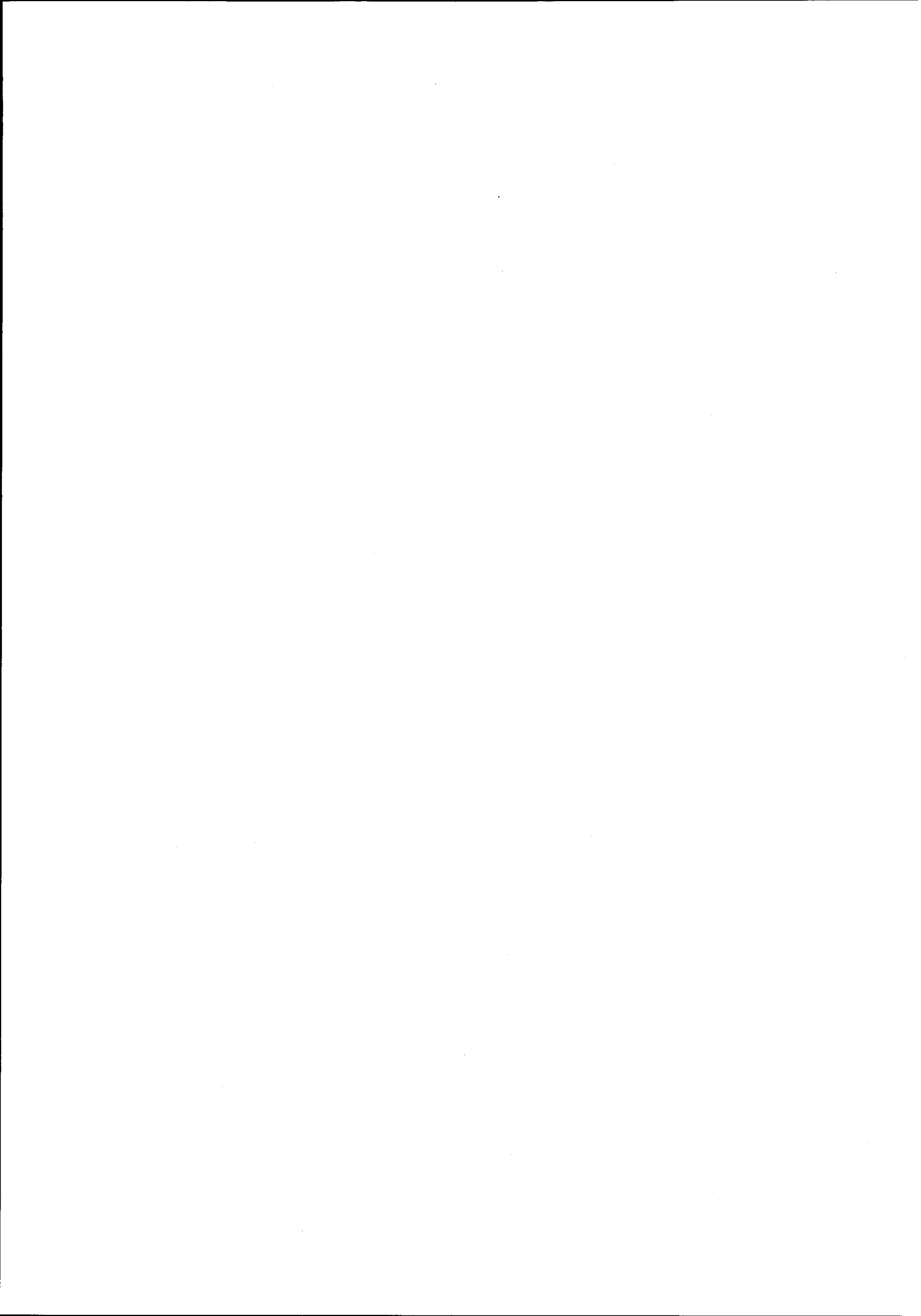


Fig. 3-39.

Efeito da suplementação proteica e do PEG nas produções de gás na fermentação de óleo de linhaça "in vitro".





CAPÍTULO 4

ESTUDOS RELATIVOS A REIMPLANTAÇÃO DE POLYPLASTRON, DI- PLOPLASTRON, OPHRYOSCOLEX, ISOTRICHA e DASYTRICHA.

4.1. INTRODUÇÃO

A implantação dos protozoários ciliados no retículo-rumen só é possível com a presença de uma flora bacteriana abundante e bastante diversificada (FONTY et al., 1982 - submetido a publicação; FONTY et al., 1981). Trabalhos efectuados "in vivo" por JOUANY (1978) e GRAIN et al. (1978), evidenciaram a existência de um conjunto de factores que dirigem a implantação dos ciliados Polyplastron, Entodinium e Isotricha no retículo-rumen. De uma forma geral, a implantação destes três géneros segue um padrão muito semelhante (Fig. 4.1.), isto é, os números populacionais no fim da fase de crescimento, são superiores em 50 - 80% à fase de estabilização (GRAIN et al., 1979).

Na mesma dieta praticamente não existem diferenças no tempo necessário para a implantação dos três géneros (Fig. 4.2.).

O tipo de dieta afectou, no entanto, o "plateau" populacional, sem no entanto afectar o tempo de implantação. A incorporação de amido na dieta fibrosa aumenta consideravelmente a população final de ciliados (Figs. 4.3. e 4.4.), que foi de apenas 2×10^4 , 1×10^3 e 5×10^3 respecti-

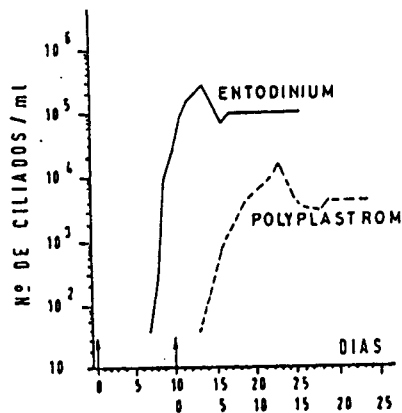


Fig. 4.1. Implantação de Polyplastron ou Entodinium no rumen de um ovino alimentado com feno de gramínea (GRAIN et al., 1979)

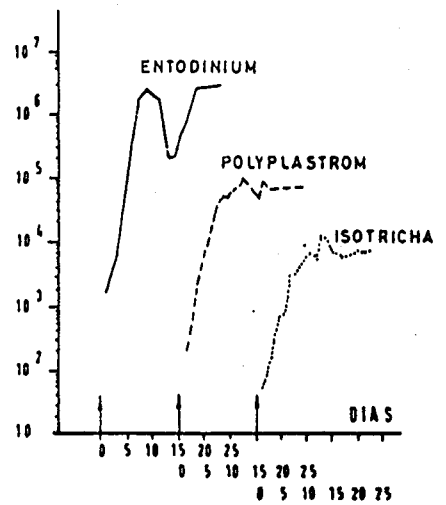


Fig. 4.2. Implantação de Entodinium, Polyplastron ou Isotricha no rumen de um ovino alimentado com luzerna e cevada (40:50) (GRAIN et al., 1979)

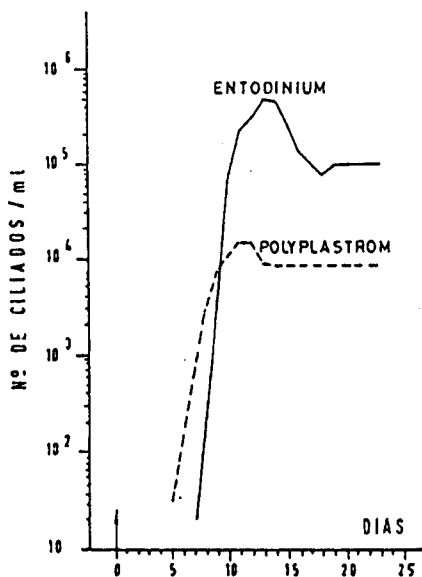


Fig. 4.3. Implantação simultânea de Polyplastron e Entodinium no rumen de um ovino alimentado com um feno (GRAIN et al., 1979).

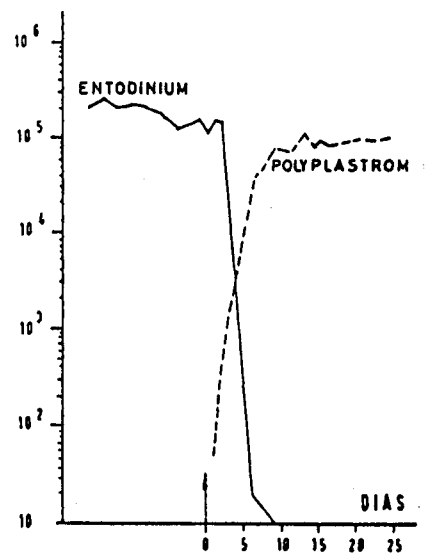


Fig. 4.4. Implantação de Polyplastron numa população de Entodinium já estabelecida no rumen de um ovino ingerindo luzerna e cevada (40:50) (GRAIN et al., 1979).

vamente para Entodinium, Polyplastron e Isotricha numa dieta à base de feno, e 2×10^6 , 6×10^4 e 7×10^3 respectivamente quando foi adicionado amido à mesma dieta.

A implantação é também condicionada pelas interrelações que se podem estabelecer entre os géneros reimplantar (GRAIN et al., 1981). Nunca foi possível implantar Entodinium na presença de Polyplastron, em animais alimentados com feno + + cevada (40 : 50) (Fig.4.4.). No entanto foi possível implantar quando o género Dasytricha também fazia parte do inóculo, não apresentando os autores qualquer explicação para tal facto. No que refere a Entodinium e Isotricha, a presença simultânea destes dois géneros no inóculo teve pouco ou nenhum efeito nas suas respectivas velocidades de implantação. Relativamente à interrelação Polyplastron e Isotricha, a taxa de implantação destas populações não foi afectada pelo facto de ambos estarem presentes no inóculo. Nos animais bicontaminados com Polyplastron e Isotricha, acontece uma ligeira descida nos números finais de Polyplastron, o que não sucede nos animais monocontaminados, descida que os autores explicam pela utilização competitiva do amido por estes dois géneros, com base nas observações efectuadas por ABOU AKKADA (1965).

Em conclusão, a tendência nestes interrelacionamentos é em parte devida ao tipo de dieta e em parte, também, à composição da restante microfauna.

O período de adaptação de aproximadamente 1 mês a que os ovinos foram sujeitos (Capítulo 2), teve como

consequência o desaparecimento de todos os Isotrichidae, Diplodiniinae e Ophryoscolecinae. O carneiro # 4, incorporado tardiamente no estudo de suplementação com bagaço de soja, embora recebendo conteúdo retículo-ruminal dos carneiros # 2 e # 3 adaptados à ingestão de bolota, não conseguiu manter a sua dotação original, acabando por perder exatamente os mesmos grupos. evolução dos valores de pH ao longo do período de adaptação a que os animais foram sujeitos, não parecem justificar a modificação tão profunda operada no seio da microfauna. Talvez o desajustamento azoto/energia, associado ao relativamente elevado teor lipídico das dietas ingeridas (5-6%), possam ter contribuído para o desenvolvimento de tal modificação. O desaparecimento dos Isotrichidae talvez fosse o menos esperado, uma vez que o teor em glúcidos solúveis da dieta ingerida pelos animais (10%), não deveria constituir factor limitante para o seu desenvolvimento.

A diminuição do teor em fibra do alimento pode condicionar o desenvolvimento populacional de Diploplastron e Polyplastron, pois estes dois grupos de ciliados estão normalmente associados com a sua degradação. A substituição gradual da palha por bolota, poderia limitar a disponibilidade nos componentes de natureza celulósica e condicionar o desenvolvimentos destes dois grupos de ciliados.

Partindo da hipótese de que a relação azoto/energia constituia factor limitante na manutenção dos grupos de ciliados desaparecidos, procedemos à reimplantação desses mesmos grupos quando os animais estavam a ingerir

bolota (70%) com o nível mais elevado de suplementação proteica (14%).

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta experiência foram utilizados os carneiros # 2 e # 3, do ensaio com as suplementações azotadas. Os animais estavam a ingerir bolota (70,8%) + palha (6,8%) + bagaço de SOJA (22,4%) a 14% PB.

Como animal dador de inóculo foi utilizado um carneiro adulto da mesma raça, dotado com os grupos de ciliados que pretendíamos implantar. Com o inóculo foram introduzidas 10^6 células de Polyplastron, Diploplastron e Ophryoscolex e 5×10^5 células de Isotricha e Dasytricha.

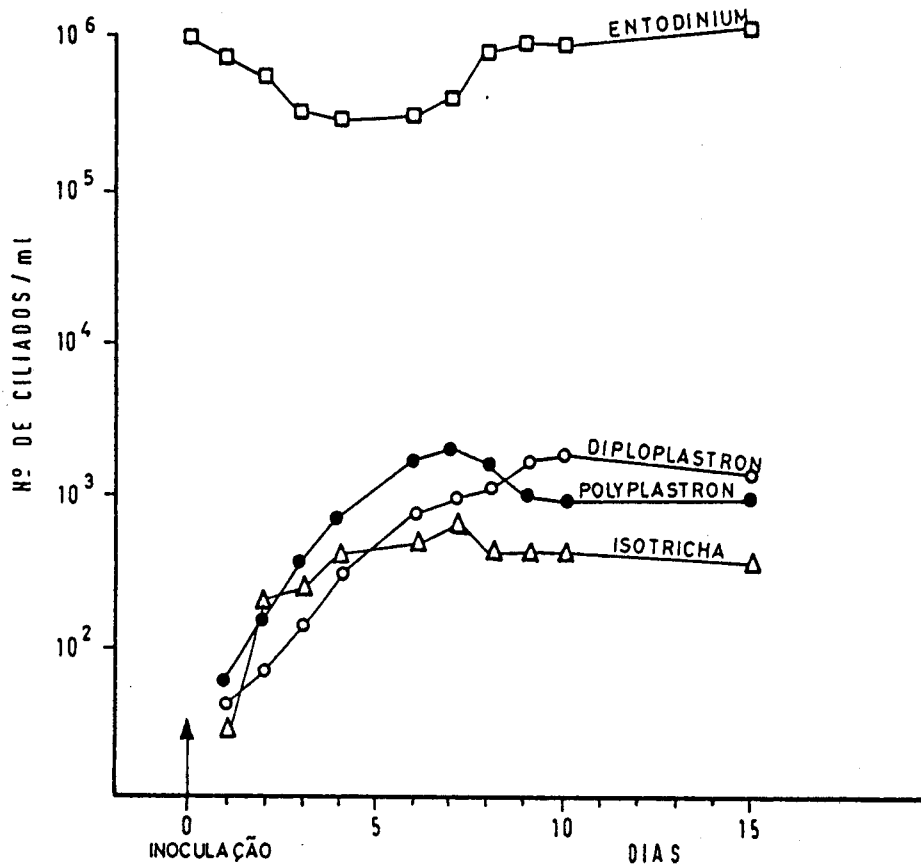
Foram feitas contagens de ciliados diariamente, no dia da inoculação e nos 10 dias posteriores, adicionalmente, também, no 15º dia após inoculação. As contagens de ciliados bem como a sua caracterização genérica foram feitas como anteriormente, em amostras recolhidas antes da primeira refeição diária.

A actividade celulolítica do conteúdo retículo-ruminal dos animais recolonizados foi testada "in vitro", com o método do gás-teste (MENKE et al., 1979), utilizando celulose pura (papel de filtro whatman nº 1) como substracto.

3.3. RESULTADOS

Conforme se pode verificar no gráfico da Fig. 4.5.,

apenas foi possível reimplantar Isotricha, Polyplastron, e



Fi4. 3.5. Implantação de «Polyplastron» e «Isotricha» numa população já estabelecida de «Entodinium» (média de 2 animais).

Dieta: D₆ - 14%PB

Quadro 4.1. Influência da qualidade do inóculo e do PEG na produção de gás (ml) a vários tempos de incubação com substracto D6 ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Tipo de Inóculo	PEG (%)	Tempo de incubação (horas)			
		2	4	6	24
Inóculo 1	0	18,67 _c ± 0,87	23,83 _c ^a ± 0,76	36,33 _c ± 1,04	42,83 ^a ± 0,58
	5	20,00 ± 0,58	32,50 ^b ± 0,50	38,17 ± 0,58	44,50 ^b ± 0,87
Inóculo 2	0	15,50 _d ± 0,50	23,00 _d ± 0,50	29,17 _d ± 0,50	44,17 ± 1,00
	5	15,83 ± 0,76	23,33 ± 0,29	29,17 ± 0,50	44,17 ± 0,50

Inóculo 1 - conteúdo ruminal antes da implantação de «Diploplastron» e «Polyplastron».

Inóculo 2 - conteúdo ruminal após implantação de «Diploplastron» e «Polyplastron».

Diferenças significativas (P<0,01) atribuídas ao PEG, em índice superior.

Diferenças significativas (P<0,01) atribuídas ao inóculo, em índice inferior.0

Quadro 4.2. Efeito do inóculo na produção de gás (ml) a diferentes tempos de incubação de celulose pura ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Tipo de Inóculo	Tempo de incubação (horas)				
	4	8	12	24	48
Inóculo 1	0,34 ± 0,29	1,10 ± 0,35	8,37 ^a ± 1,26	45,47 ^a ± 1,04	66,83 ± 0,87
Inóculo 2	0,57 ± 0,32	1,33 ± 0,50	13,83 ^b ± 1,26	48,67 ^b ± 0,50	66,50 ± 0,29

Inóculo 1 - Conteúdo ruminal antes da implantação de «Diploplastron» e «Polyplastron».

Inóculo 2 - Conteúdo ruminal após implantação de «Diploplastron» e «Polyplastron».

Diferenças significativas (P<0,01) atribuídas ao inóculo, em índice superior.

Diploplastron. Não foi possível, por conseguinte, recolonizar os animais com Dasytricha e Ophryoscolex, que também faziam parte da sua dotação original, e faziam parte da constituição do inóculo utilizado.

A actividade celulolítica dos inóculos provenientes dos animais recolonizados, foi manifestamente superior à actividade celulolítica dos inóculos dos animais antes da recolonização (Quadro 4.2.), particularmente às 8, 12 e 24 h, não havendo diferenças nas produções de gás às 48h. A produção de gás na fermentação da celulose foi significativamente influenciada pela qualidade do inóculo ($P < 0,001$), tendo a interacção inóculoXhora de fermentação sido também altamente significativa ($P < 0,001$).

O substracto ingerido pelo animal também foi fermentado a taxas diferentes, consoante o inóculo, e o efeito da inclusão de PEG também diferiu em consonância com o inóculo (Quadro 4.1.). As produções de gás diferiram significativamente com a qualidade do inóculo, com a incorporação de PEG₄₀₀₀ e com a hora de incubação ($P < 0,001$). Também foram significativas as diferenças na produção de gás nas interacções InóculoXPEG ($P < 0,001$), InóculoXhora de Incubação ($P < 0,005$) e PEGXhora de Incubação ($P < 0,005$).

4.4. DISCUSSÃO

A recolonização dos animais com Diploplastron, Polyplastron e Isotricha, alterou as características

fermentativas do conteúdo retículo-ruminal, não só relativamente à fermentação do substracto ingerido pelos animais, como também influenciou a fermentação da celulose. Com efeito, a reinoculação dos animais com Diploplastron affine e Polyplastron multivesiculatum aumentou a taxa de digestão da celulose às 24 h, tal como verificado por outros autores (JOUANY e SENAUD, 1979), que verificaram aumentos na taxa de digestão da celulose de 0,03 para 0,10, com a reinoculação de animais desfaunados com estas mesmas espécies, o equivalente a um aumento na degradação da celulose de 30 g/dia.

A taxa de fermentação da mistura alimentar inferior apresentada pelo inóculo retículo-ruminal depois da reinoculação (Inoc. 1), deve-se muito provavelmente à maior capacidade para a ingestão do amido apresentada por Polyplastron, Diploplastron e Isotricha, limitando a sua disponibilidade para as bactérias, retardando a sua degradação e nivelando o processo fermentativo (WILLIAMS, 1983). Através da redução da taxa de fermentação do amido, os ciliados contribuem para a manutenção de uma fermentação estável no retículo-rumen, prevenindo a acumulação excessiva de ácido láctico e permitindo a expressão populacional e metabólica das bactérias utilizadoras do ácido láctico (MACKIE et al., 1978).

Não foi possível Dasytricha ruminantium. Estes ciliados, tal como Isotricha, utilizam os monossacarídeos glucose, frutose, galactose e oligómeros solúveis de um ou mais destes açúcares (WILLIAMS, 1983). Contudo, a gama de

carbohidratos utilizável por estes dois géneros difere (HEALD e OXFORD, 1953; GUTIERREZ, 1955; HOWARD, 1959; WILLIAMS e HARFOOT, 1976). É possível que o espectro de glúcidos nos açúcares da bolota não faça parte daqueles para os quais Dasytricha esteja habilitada a utilizar, explicando a sua segregação no retículo-rumen dos animais.

A segregação de Ophryoscolex no conteúdo retículo-ruminal destes animais, talvez esteja relacionada com a indisponibilidade em determinadas estruturas das folhas das plantas, os cloroplastos, que fazem parte das suas preferências nutricionais (MAH, 1964). A sua expressão populacional nos animais em D_0 era já muito baixa.

Uma outra particularidade manifestada neste estudo foi a resposta à inclusão de PEG mais elevada com o inóculo-1. A taxa mais elevada a que o substracto foi fermentado por este inóculo permitiu a resolução do efeito PEG. ALMEIDA (1986) refere que o efeito PEG é mais evidente quando se incorpora energia no substracto a fermentar.

CAPÍTULO 4

ANEXOS

FIG - 4 - 6 -

Fermentação do substrato D₆ com e sem Peg pelo conteúdo retículo-ruminal antes da re-colonização (Inóc. 1)

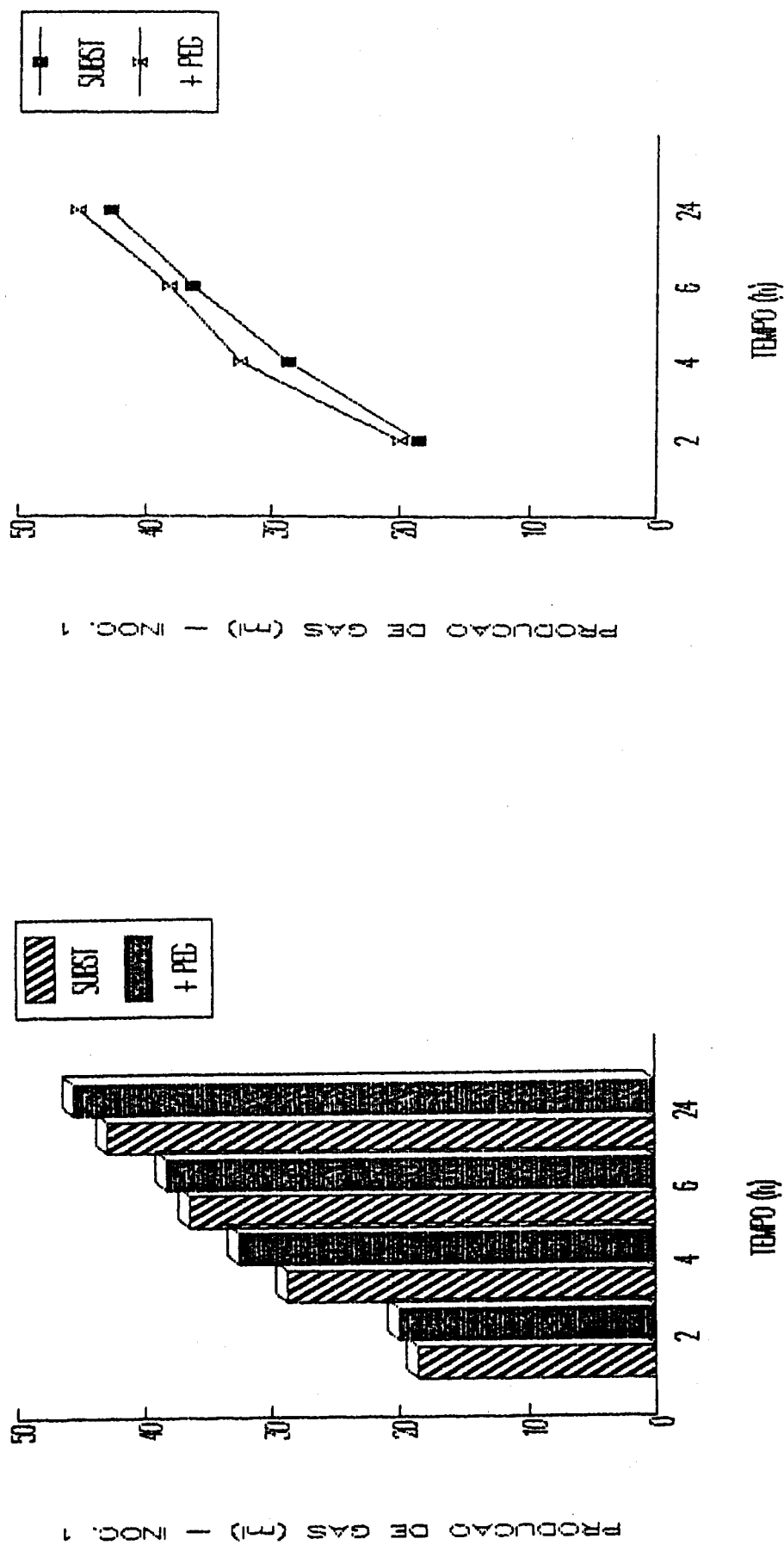


Fig - 4 - 7 -

Fermentação do substrato D₆ com e sem Peg pelo conteúdo retículo-ruminal após a re-colonização (Inóc. 2)

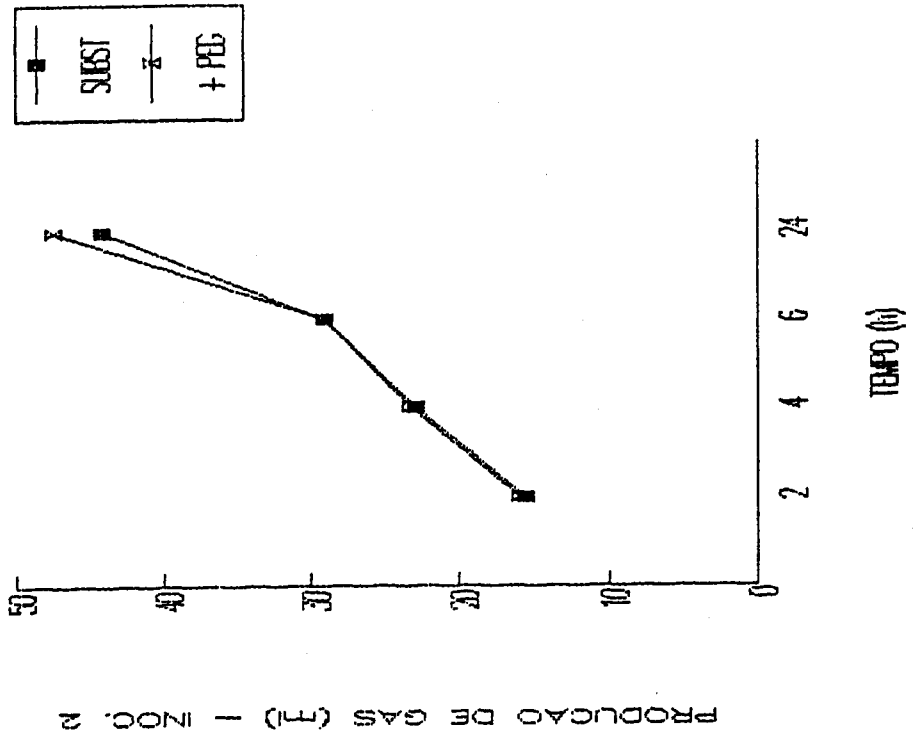
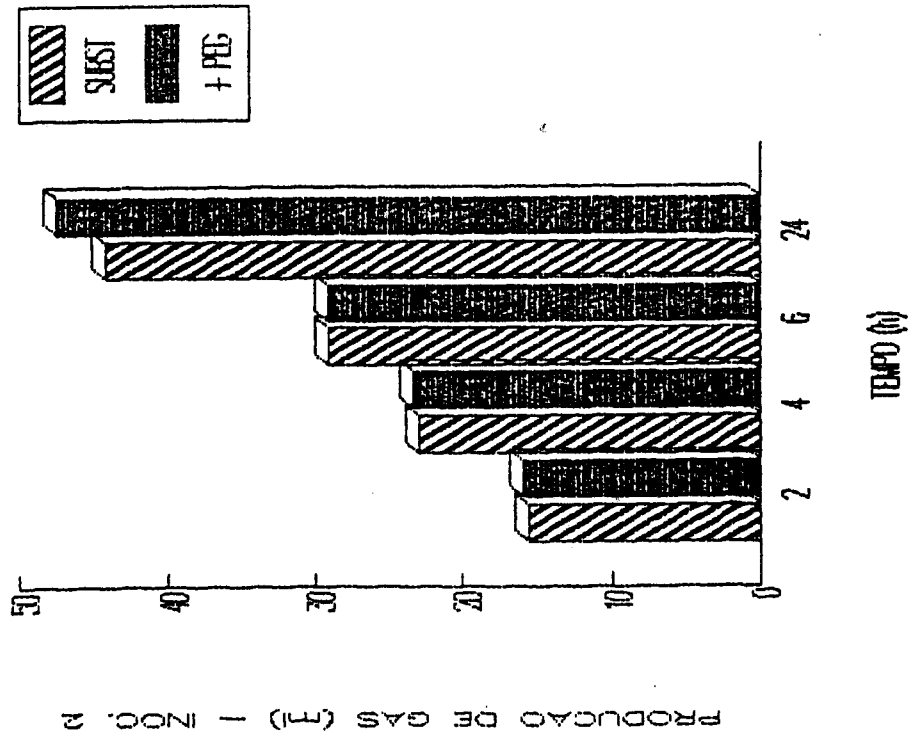


Fig - 4 - 8 -

Fermentação do substrato D₆ com e sem Peg pelo conteúdo retículo-ruminal antes (Inóc.1) e depois (Inóc.2) da recolonização

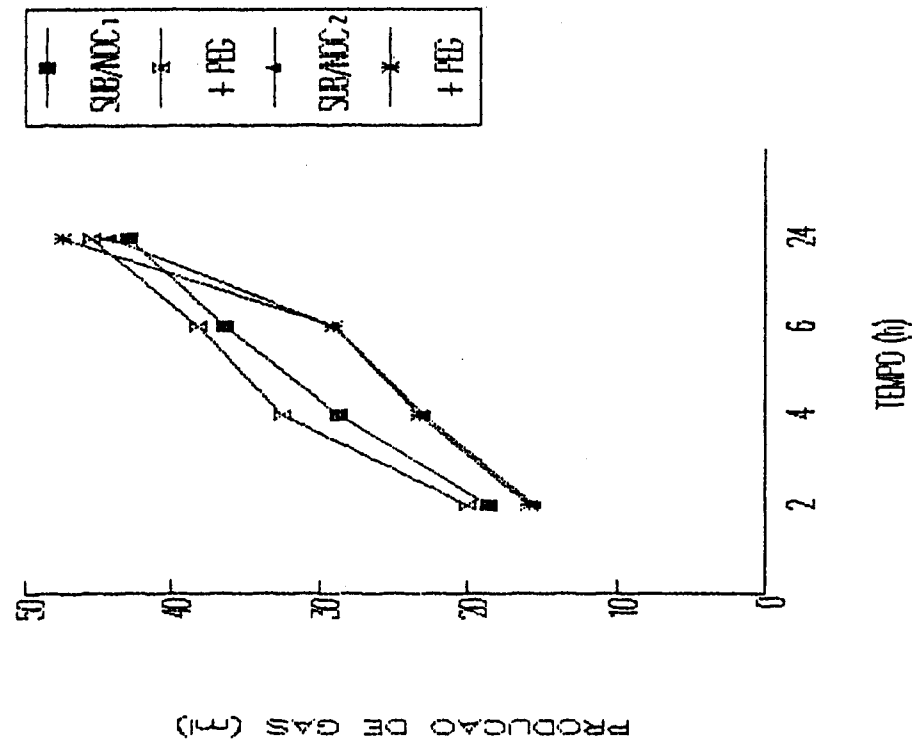
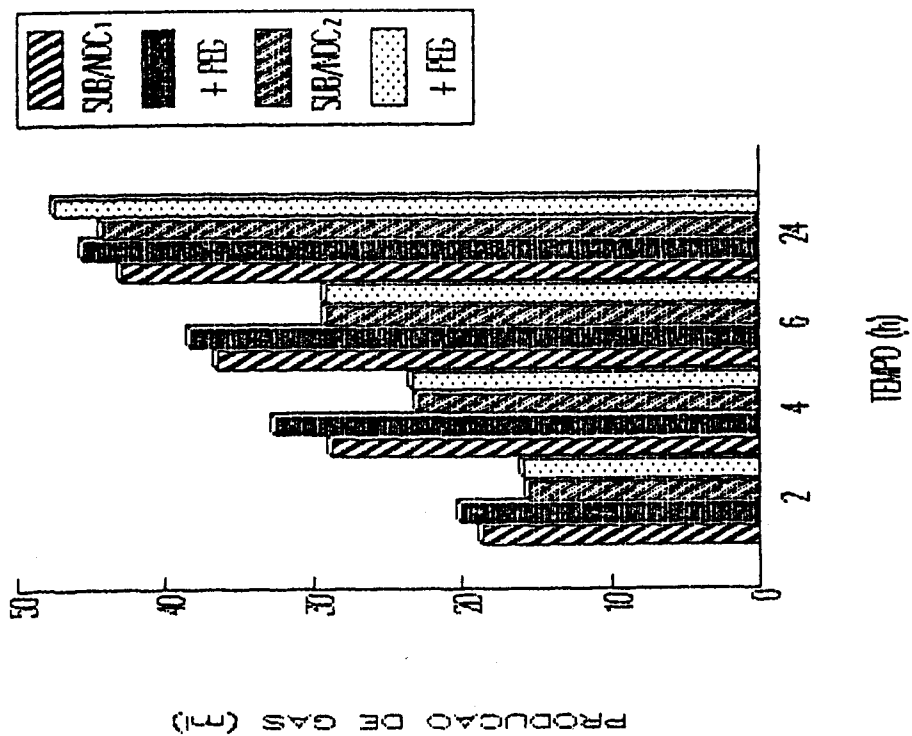
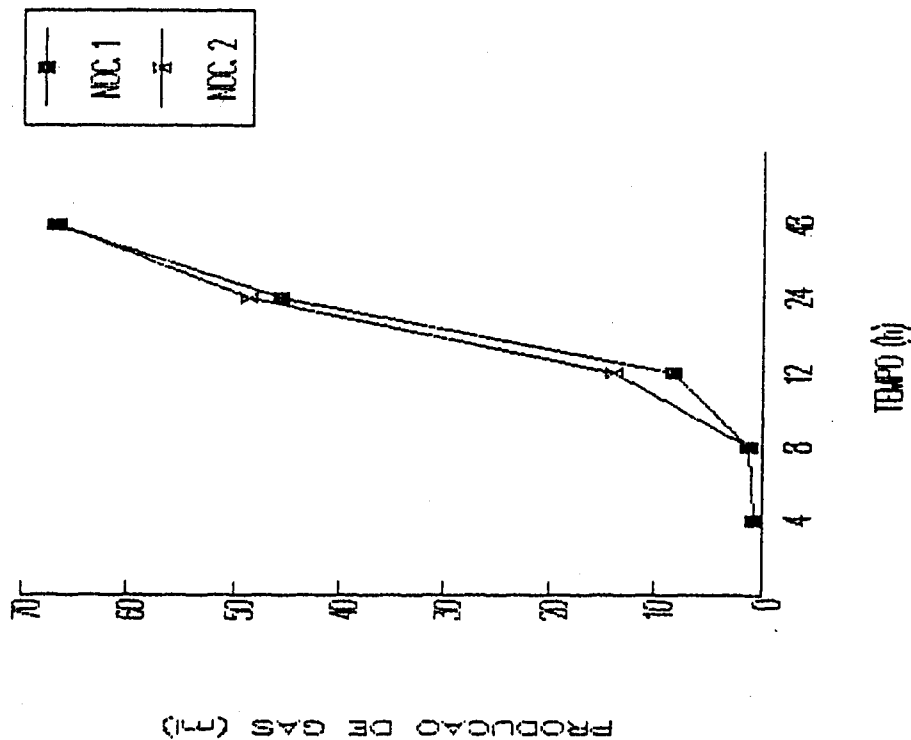
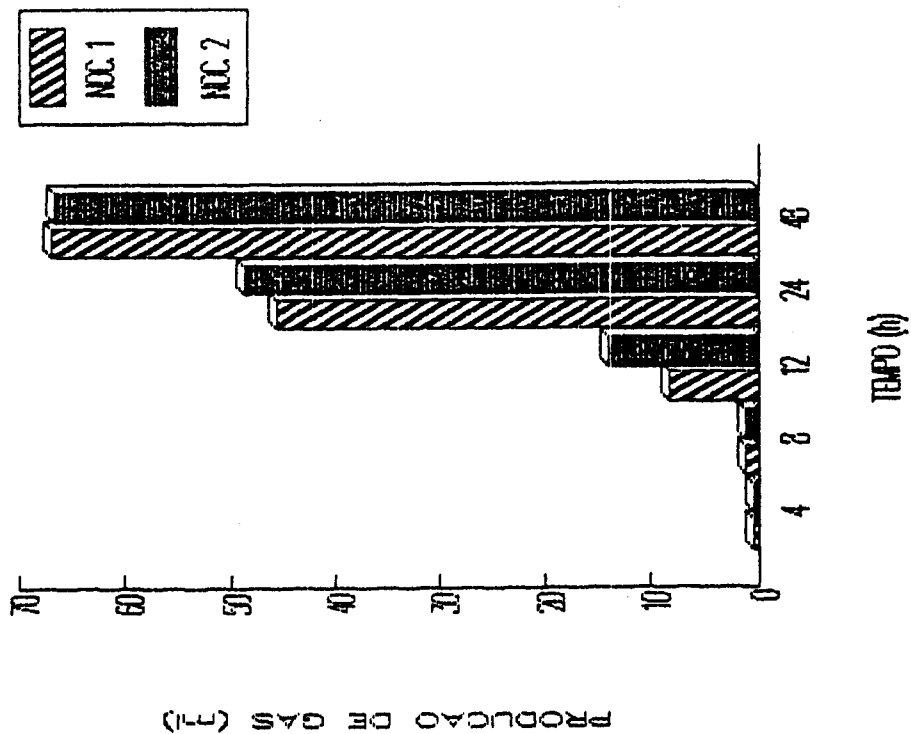
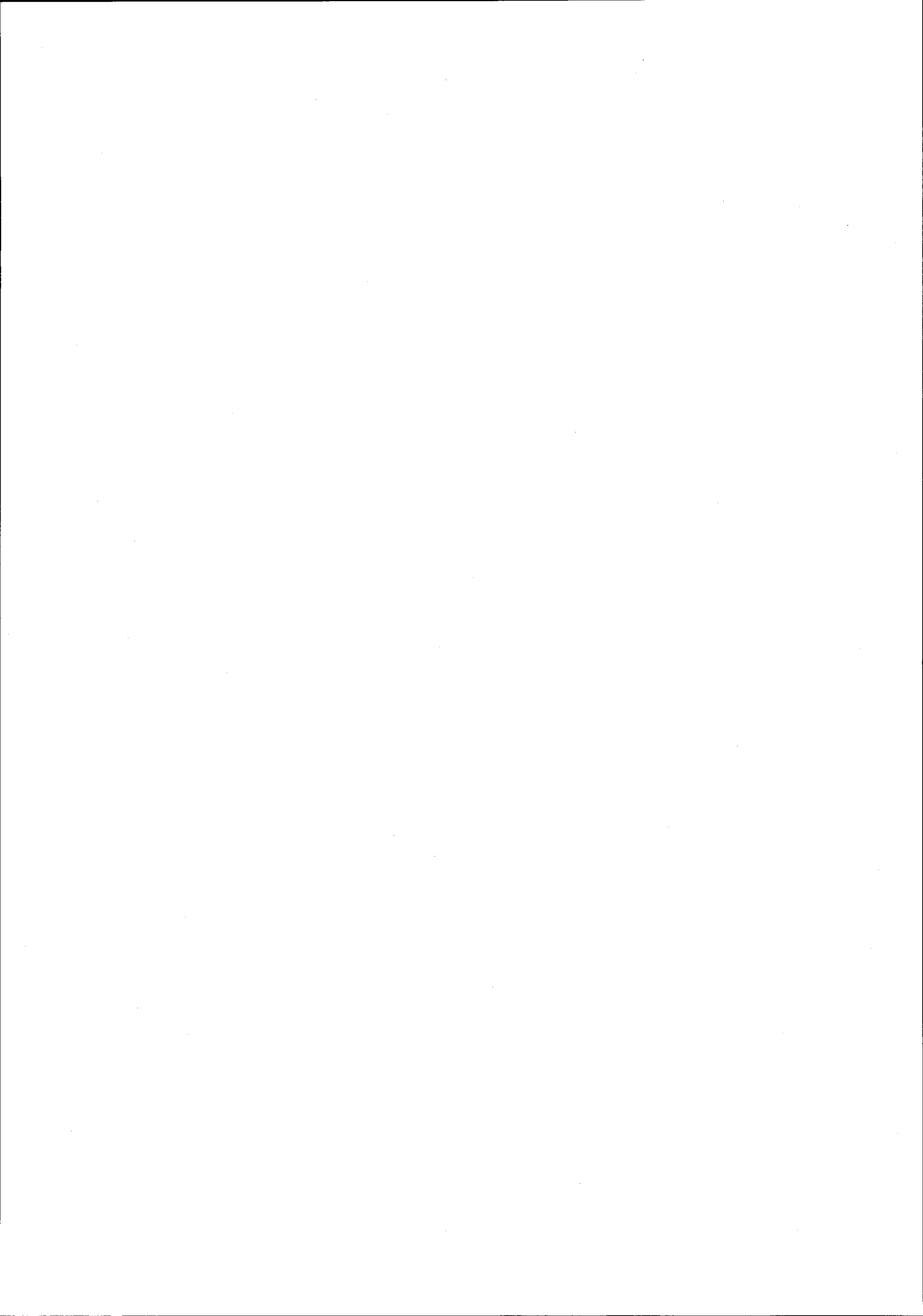


Fig - 4 - 9 -

Fermentação da celulose pelo conteúdo reticulo-ruminal antes (Inóc.1) e depois (Inóc.2) da recolonização





CAPÍTULO 5

COMPORTAMENTO DOS MICROORGANISMOS DO RETÍCULO-RUMEN DE OVINOS ALIMENTADOS COM BOLOTA, NA PRESENÇA DE TANINOS

5.1. INTRODUÇÃO

Os taninos, e os fenóis em geral, são responsáveis por alterações importantes na fermentação retículo-ruminal (DONNELLY et al., 1969; BURNS et al., 1974; SADANANDAN et al., 1979).

BÉGOVIC et al. (1978), refere a existência de capacidades tanásicas na mucosa do retículo-rumen de caprinos ingerindo folhas de Quercus sp.. Contudo ainda não foi possível relacionar essa actividade com a micropopulação do retículo-rumen, e dessa forma definir as reais possibilidades do ecossistema relativamente à degradação dos taninos.

SETTINERI et al. (1987) trabalhando com bovinos alimentados com alfarroba, um produto bastante rico em taninos (ALMEIDA, 1986), verificaram que a capacidade digestiva do conteúdo retículo-ruminal destes animais em relação a substratos convencionais, não era alterada. Se bem que os autores não façam referência, é curioso notar que a inclusão de 2,5% de ácido tânico no conteúdo retículo-ruminal dos animais ingerindo 50% de alfarroba nas suas dietas, aumentou a capacidade digestiva do inóculo sobre os substratos utilizados, palha e soja (Quadro 5.1.).

Têm sido isolados a partir de ecossistemas aquáticos

Quadro 5.1. Digestibilidade "in vitro" de alimentos sem taninos (palha e bagaço de soja) pelo fluido ruminal de novilhos alimentados com níveis diferentes de farinha de alfarroba (0, 25, 50%) antes e após a adição de ácido tânico (SETTINERI et al., 1987).

Alimentos	Fluido ruminal					
	0% alfarroba		25% alfarroba		50% alfarroba	
	Ácido tânico		Ácido tânico		Ácido tânico	
	0%	2,5	0%	2,5%	0%	2,5%
Palha	47,4	39,4	47,1	43,1	46,8	46,1
Bagaço de soja	93,0	78,6	91,8	92,7	90,8	92,6
X	70,2 ^a	59,0 ^b	69,4 ^a	67,9 ^a	68,8 ^a	69,3 ^a

Valores referenciados em índice superior com letras diferentes, diferem significativamente.

microorganismos com capacidade para degradarem os taninos. Bastantes espécies de leveduras possuem essa capacidade, com destaque para Pichia pseudopolymer, P. adeyehi, P. monospora, Debaromyces hansenii e andida spp. (JACOB e MARIE, 1975 - cit. por MARINHO, 1984).

A capacidade desmolítica sobre fenóis simples manifestada pelo microbiota do retículo-rumen, tem vindo a ser evidenciada, particularmente sobre os flavonóis (SIMPSON et al., 1969; CHENG et al., 1969 e 1970; SHARMA et al., 1981).

KRUMHOLZ e BRYANT (1985) isolaram a partir do retículo-rumen bactérias capazes de modificar o ácido gálgico

(componente da estrutura dos galhotaninos), descarboxilando-o a pirogalhol, em números populacionais da ordem de $9,3 \times 10^6$ células/ml. Bactérias capazes de processar a descarboxilação redutora, convertendo pirogalhol em resorcinol, estavam presentes em números populacionais da ordem de $9,3 \times 10^5$ células/ml, e aquelas com capacidade para converter o ácido gálgico em produtos não aromáticos, estavam presentes em populações da ordem de $4,3 \times 10^3$ / ml. Os mesmos autores, isolaram um vibrião Gram (+) que foi designada como Eubacterium oxidoreductans, capaz de crescer em cultura utilizando como substratos pirogalhol, ácido gálgico e floroglucinol ou quercitina, requerendo também nos meios de cultura, quantidades equimoleculares de ácido fórmico ou H_2 em associação com os fenóis. Os produtos foram ácidos acético e butírico.

KRUMHOLZ e BRYANT (1985) isolaram também um coco Gram (-) designado Syntrophoccus sucromutans a partir do conteúdo retículo-ruminal, em populações relativamente elevadas, $10^6 - 10^7$ /ml, com capacidade para crescer em meio de ácido síringico.

Parece-nos pois, que o retículo-rumen reúne condições para seleccionar populações microbianas com capacidade para destoxificar as moléculas tanínicas.

Para testar a capacidade de resistência dos microorganismos presentes no conteúdo retículo-ruminal dos animais ingerindo 70% de bolota nas suas dietas, utilizámos ácido tânico purificado e extractos tanínicos de bolota.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados os carneiros # 2, # 3 e # 4, nas dietas com 8,5% e 11% PB. As amostras para inoculação dos meios de cultura, foram amostras recolhidas de acordo com o protocolo anterior (Caps. 2 e 3). As amostras dos três animais foram então misturadas e diluídas com solução diluente anaeróbica e tratadas com as quantidades convenientes de ácido tânico. A quantificação das bactérias totais viáveis foi feita como anteriormente (Caps. 2 e 3) em meio 98-5 + xilano.

O ácido tânico purificado a 2,5% foi preparado a partir de ácido tânico Carlo Erba dissolvido em solução diluente anaeróbica e submetido a esterilização.

As soluções de ácido tânico foram adicionadas às soluções aos tubos de ensaio com solução diluente anaeróbica para a diluição 10^{-7} nas quantidades suficientes para estabelecerem concentrações finais de 1,39 mg/ml, 2,77 mg/ml e 4,16 mg/ml de solução. Para os inóculos provenientes de D₄, utilizaram-se adicionalmente dois níveis superiores de ácido tânico, 6 mg/ml e 8 mg/ml.

A partir dos meios contendo bactérias tratadas com o nível mais elevado de taninos, foram repicadas colônias para posterior caracterização microbiológica. Os isolados foram cultivados em tubos de agar inclinado, com a mesma composição do meio utilizado no seu isolamento. Posteriormente os isolados foram caracterizados morfológicamente e tratados com o corante de Gram (MOIR e MASSON, 1952), sendo os

tubos imediatamente armazenados em ultracongeladora para posterior caracterização cultural e bioquímica. Infelizmente esta última fase não foi possível realizar, devido a problemas com as temperaturas da ultracongeladora.

Foram utilizadas também provas de fermentação "in vitro" com substratos purificados, designadamente amido, pectina, xilano e celulose, aos quais foram adicionadas quantidades crescentes de ácido tânico que estabeleceram níveis na solução dos fermentadores da ordem de 1,17 mg/ml, 1,83 mg/ml e 2,49 mg/ml. A produção de gás foi o único parâmetro estimado directamente nos fermentadores. Para a leitura das produções de gás foram utilizadas a 6ª hora de incubação para as fermentações do amido, pectina e xilano e a 24ª e 48ª h de incubação para a fermentação do substrato celulose.

Os resultados foram tratados por análise de variância "one way" (SNEDECOR e COCHRAN, 1967) e por análises de variância multifactorial e regressão (STEEL e TORRIE, 1982).

5.3. RESULTADOS

A produção de gás às 6 h de incubação, na fermentação do amido, pectina e xilano, aumentaram com a incorporação de de ácido tânico nos fermentadores, se bem que não de uma forma significativa (Quadro 5.2.). A produção de gás às 24 e 48 h na fermentação da celulose aumentou de uma forma não significativa com a incorporação de ácido tânico (Quadro 5.3.).

Quadro 5.2. Influência da incorporação de ácido tânico nas produções de gás (ml) às 6 h de incubação de substratos purificados com inóculo D₄ ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

A. tânico mg/ml	Substratos		
	Amido	Pectina	xilano
0	6,25 \pm 1,06	31,00 \pm 0,50	12,75 \pm 0,35
1,17	6,75 \pm 0,35	29,75 \pm 1,06	13,25 \pm 0,35
1,83	6,75 \pm 1,06	30,50 \pm 0,47	14,50 \pm 0,63
2,49	8,75 \pm 0,35	30,75 \pm 0,35	15,00 \pm 0,37

Quadro 5.3. Influência da incorporação de ácido tânico nas produções de gás (ml) na incubação de celulose pura com inóculo D₄ ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

A. tânico mg/ml	Tempo de incubação (H)	
	24 h	48 h
0	4,25 \pm 0,35	31,25 \pm 1,77
1,17	5,25 \pm 0,35	33,00 \pm 2,12
1,83	5,75 \pm 0,37	33,25 \pm 0,37
2,49	6,25 \pm 0,43	33,25 \pm 0,30

O tratamento dos inóculos bacterianos com ácido tânico baixou significativamente ($P < 0,001$) o número de bactérias viáveis em todos os inóculos utilizados. Contudo, a diminuição foi bastante menos expressiva no inóculo dos animais em D₄ (8,5 % PB). Em D₈ (11 % PB), a diminuição do número de bactérias com o primeiro nível de incorporação de ácido tânico foi

Quadro 5.4. Influência da incorporação de ácido tânico na microflora viável ($\times 10^6$ /ml) dos inóculos D₄, D₈ e de referência (D₀)

A. tânico mg/ml	Inóculos		
	D ₄	D ₈	D ₀
0	2,88 ^a _c ± 0,55	5,82 ^b _c ± 0,61	6,23 ^b ± 0,53
1,39	2,65 ^a _c ± 0,44	2,86 ^a _d ± 0,29	1,97 ^b _d ± 0,55
2,77	2,65 ^a _c ± 0,62	2,07 ^a _d ± 0,17	1,19 ^b _e ± 0,12
4,16	1,38 ^a _d ± 0,41	1,29 ^a _e ± 0,46	0,43 ^b _f ± 0,09
6,00	0,20 _e ± 0,05	-	-
8,00	0,17 _e ± 0,03	-	-

Valores afectados por letras em índice superior, diferenças significativas por efeito do inóculo; em índice inferior letras diferentes, diferenças significativas devidas ao ácido tânico.

bastante significativa ($P < 0,001$), tendo a diferença para o inóculo D₄ sido muito significativa ($P < 0,001$). No inóculo de referência (animais não ingerindo bolota) o ácido tânico diminuiu significativamente o número de bactérias viáveis nos meios de cultura ($P < 0,001$).

A regressão múltipla do número de bactérias para o ácido tânico e inóculo foi apenas influenciada significativamente pelo ácido tânico ($P < 0,001$). No tratamento por regressão simples, foram as equações esponenciais que melhor explicaram o efeito do tratamento dos inóculos com ácido tânico (Quadro 5.4.).

Interessante observar que o ácido tânico nas concentrações de 6 e 8 mg/ml, não manifestou diferenças no número de bactérias viáveis recuperadas nos meios de cultura.

Quadro 5.5. Nº de bactérias viáveis nos inóculos D_0 , D_4 e D_8 (Y) em função da concentração de ácido tânico (X)

Inóculo	Equações de regressão	n	r	$S_{y,x}$	F
D_0	$Y = 7,02 - 1,82X^{***}$	12	-0,888	1,15672	37,2981
	$Y = e^{(2,58 - 0,85X)^{***}}$	12	-0,975	0,237967	192,9136
D_4	$Y = 3,52 - 0,45X^*$	12	-0,695	0,569728	9,3580
	$Y = e^{(1,38 - 0,23X)^{**}}$	12	-0,708	0,277434	10,0582
D_8	$Y = 6,61 - 1,44X^{***}$	12	-0,920	0,752166	54,8253
	$Y = e^{(2,18 - 0,50X)^{***}}$	12	-0,948	0,294170	88,7761

A caracterização morfológica dos isolados obtidos a partir dos inóculos tratados com 6 e 8 mg/ml (Fotografias 5.1, 5.2., 5.3., 5.4. e 5.5.), mostrou o carácter Gram (-) dos isolados e morfológicamente caracterizados como cocos, bacilos e vibriões, estes últimos todos móveis. Os vibriões identificam-se muito no seu tamanho com Selenomonas sp.

5.4. DISCUSSÃO

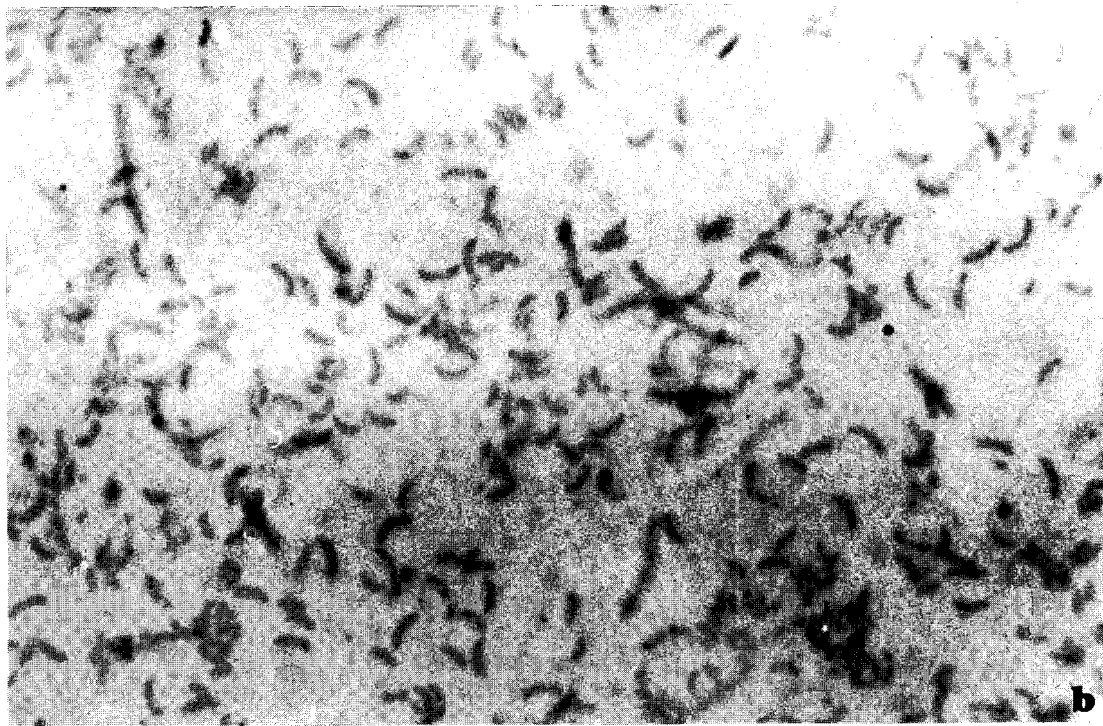
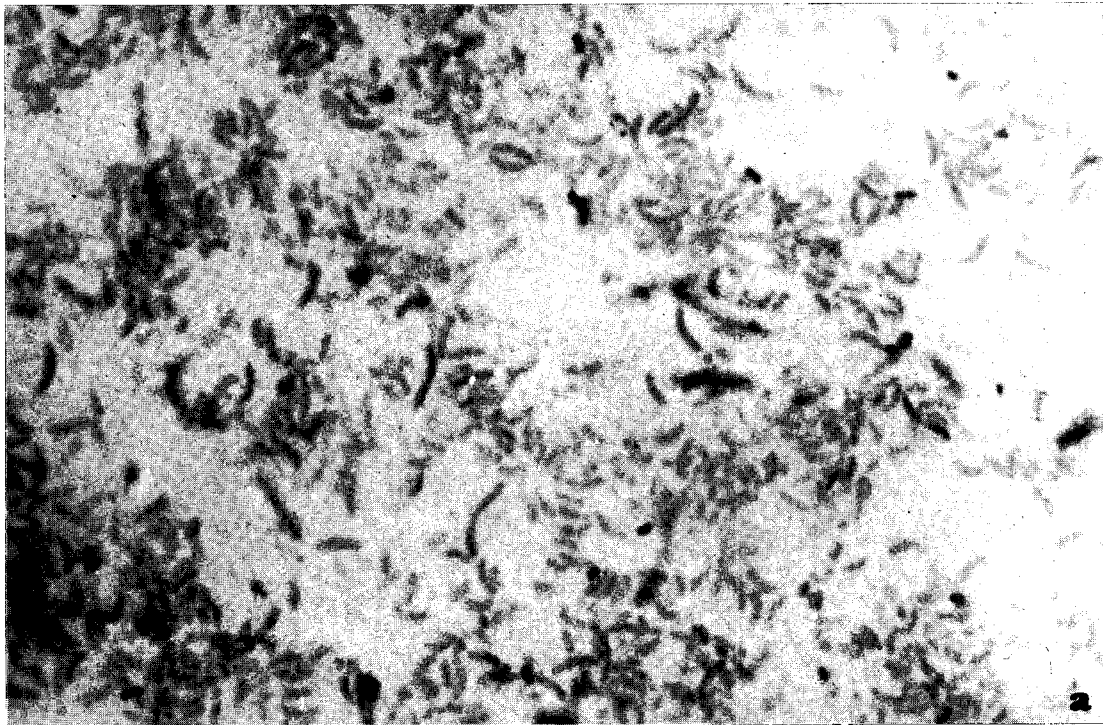
Os resultados parecem confirmar as observações feitas por BÉCOVIC et al.(1982). A ingestão de taninos com a dieta parece ter potenciado a actividade tanásica do conteúdo retículo-ruminal. Os microorganismos intestinais têm capacidade para se adaptarem à presença de elevadas concentrações de fenóis, como inclusivamente desenvolvem capacidades enzimáticas para processarem a sua degradação, se forem cultivados durante 1 - 2 meses na sua presença (MARTIN

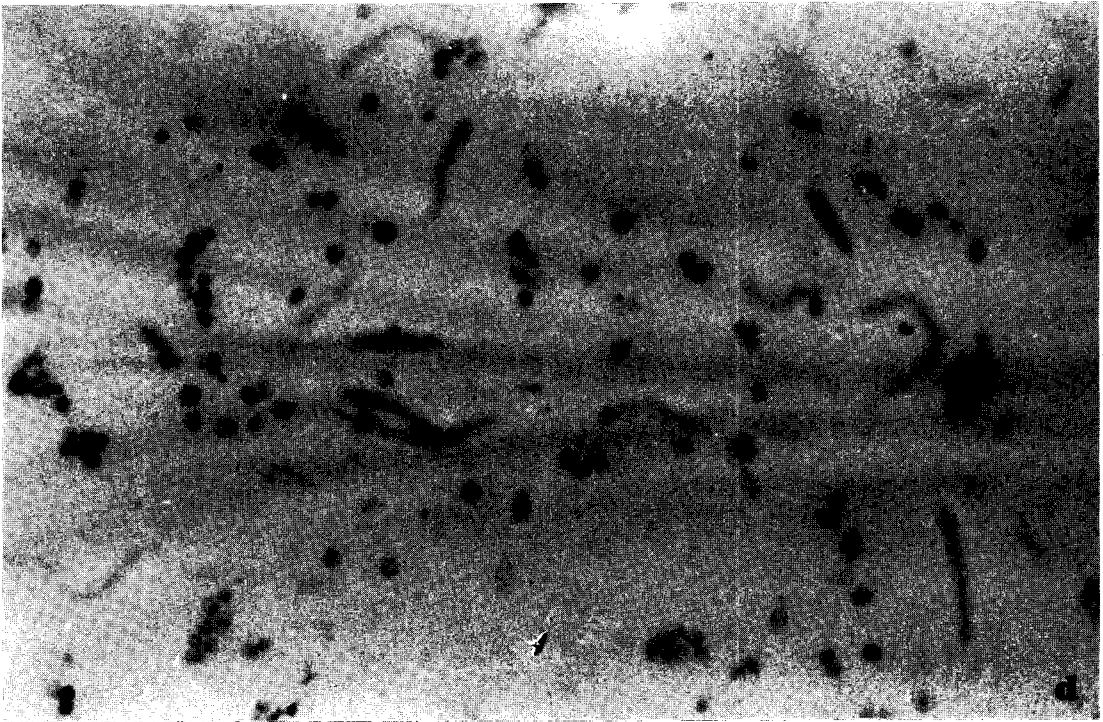
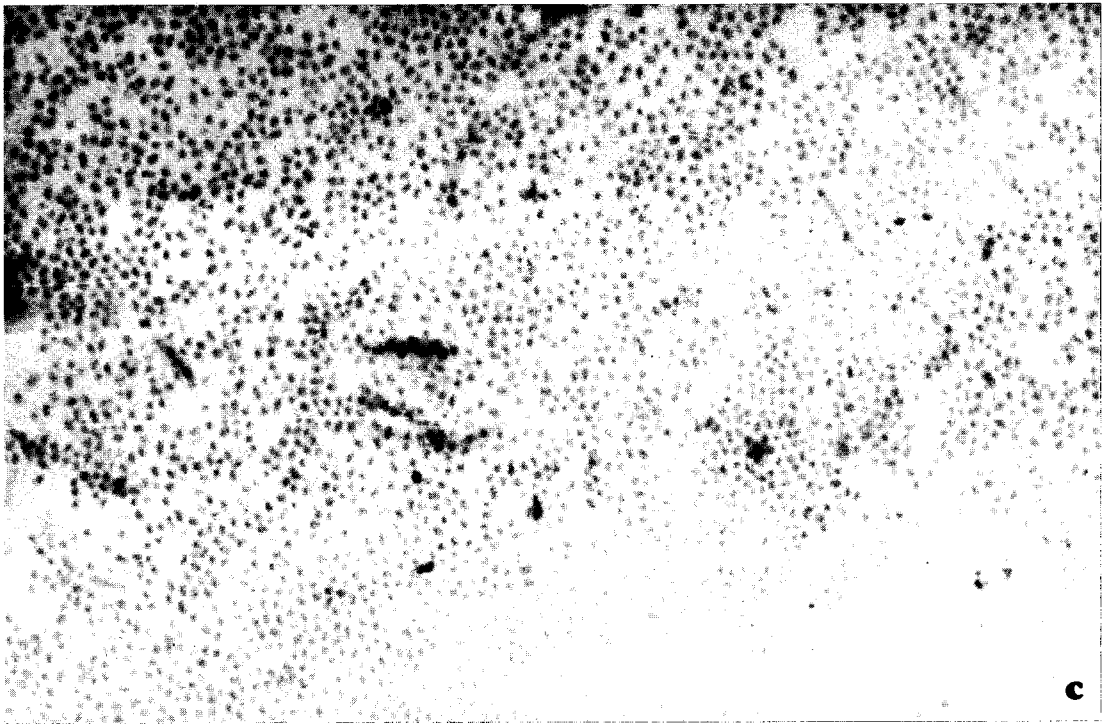
parecem, de facto, apontar nessa direcção.

Os resultados parecem mostrar uma certa sobriedade nutricional por parte da microflora resistente aos taninos, expresso na comparação feita entre o inóculo proveniente de D₄ e o inóculo D_g. Assim, a incorporação do primeiro nível de ácido tânico faz desaparecer no inóculo D_g quase 50% da população viável, enquanto a microflora em D₄ sofre uma redução de apenas 10% na sua população viável. Os resultados parecem sugerir que a população mais resistente à presença de taninos, não é muito sensível à elevação nos níveis de PB na dieta dos animais, talvez por apresentarem taxas de crescimento mais baixas, não exigindo um "apport" de proteína elevado para a satisfação das suas necessidades de crescimento.

CAPÍTULO 5

ANEXOS





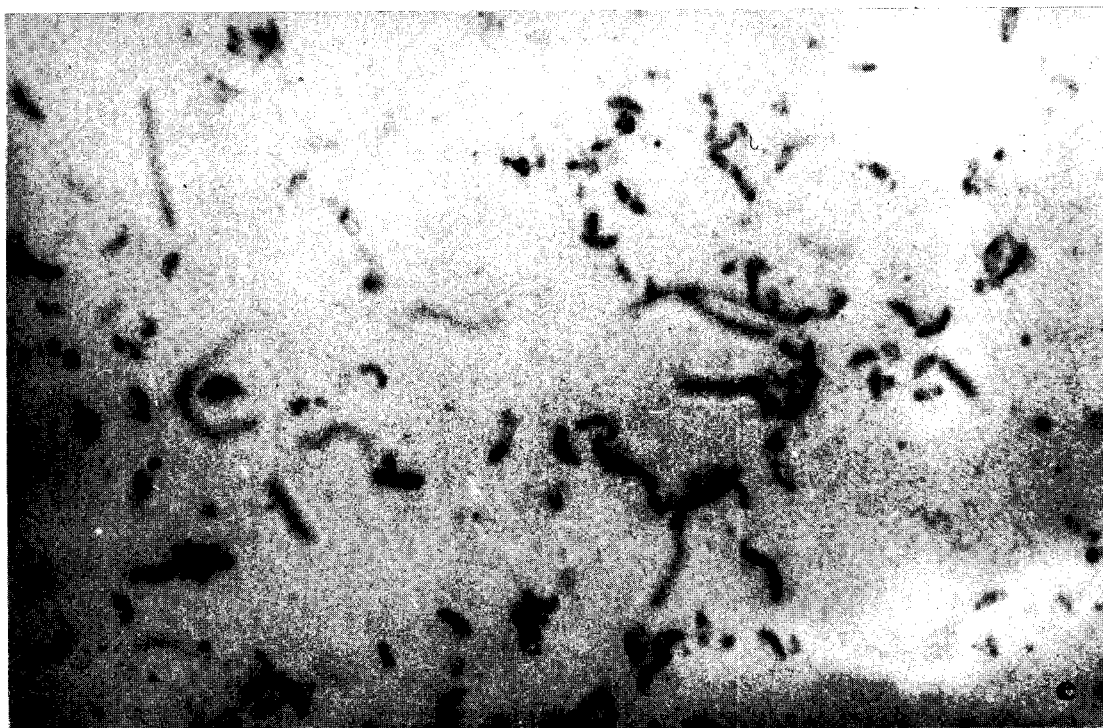


Foto (a) . Esfregaço corado pelo Gram de vibriões
Gram (-) resistentes ao ácido tânico

Foto (b) . Esfregaço corado pelo Gram de vibriões
Gram (-) resistentes ao ácido tânico

Foto (c) . Esfregaço corado pelo Gram de cocos
Gram (-) resistentes ao ácido tânico

Foto (d) . Esfregaço corado pelo Gram de cocos
Gram (-) resistentes ao ácido tânico

Foto (e) . Esfregaço corado pelo Gram de vibriões
Gram (-) resistentes ao ácido tânico

PARTE III

ESTUDOS "IN VITRO"

CAPÍTULO 1

A ADAPTAÇÃO DO MODELO "IN VITRO"

1.1. TÉCNICA DE CULTURA "IN VITRO"

O objectivo fundamental das culturas "in vitro" é a manutenção, o mais continuamente possível, de uma população microbiana que se afaste o mínimo possível daquela típica no retículo-rumen. A designação "rumen artificial" também tem sido utilizada para a caracterização destes modelos, se bem que este adjectivo seja mais aplicável às culturas "in vitro" bem sucedidas, para microorganismos individualizados desenvolvidos em cultura pura (HUNGATE, 1966). De qualquer forma, o termo "rumen artificial" tem sido utilizado para as culturas "in vitro" inoculadas com conteúdo retículo-ruminal e incubadas por períodos de 1 a vários dias (HUNGATE, 1966).

A manipulação das fermentações do conteúdo retículo-ruminal "in vitro", permitem a diminuição da variabilidade dentro dos tratamentos a que os inóculos e/ou substratos são sujeitos, permitindo desta forma uma experimentação mais precisa (HUNGATE, 1978).

A grande dificuldade no tratamento das fermentações retículo-ruminais "in vitro", deve-se à dificuldade na manutenção da diversidade na população de ciliados, por períodos de tempo mais ou menos longos. Esta falência reside em parte, na dificuldade em substituir artificialmente o ruminante nas operações de fornecimento de

nutrientes e remoção de metabólitos (HUNGATE, 1978). Isto é particularmente verdade quando "in vitro", são usadas as concentrações de substrato normalmente transformadas no retículo-rumen (HUNGATE, 1978). Segundo o mesmo autor, a quantidade de substrato que desaparece no retículo-rumen durante a fermentação de pelo menos 10% (P/V)/dia numa cultura normal. é muito difícil a manutenção de um pH favorável e difícil também se torna a remoção dos produtos tóxicos quando são utilizados grandes concentrações de substrato.

A utilização de concentrações baixas de substrato, facilita enormemente as culturas de ciliados "in vitro". Segundo HUNGATE (1978) é preferível cultivar ciliados a partir de um ruminante, que esteja a ingerir como alimento o substrato que alimentará as culturas "in vitro". Enquanto a concentração de substrato no retículo-rumen pode ser de 10% (P/V), "in vitro" esta pode ser tão baixa como 0,04%.

Um outro aspecto crítico a ter em consideração nas culturas "in vitro", é a manutenção da anaerobiose. Isotricha possui uma capacidade bastante limitada para usar oxigénio na formação de peróxido de hidrogénio (PRINS e PRAST, 1973). A injeção de 1 a 20 μ l de O_2 numa cultura destes ciliados não provoca grandes alterações no seu comportamento, porém a injeção de 30 a 40 μ l de O_2 já é letal (HUNGATE, 1978).

A produção de gás constitui um bom indicador para caracterizar a actividade do conteúdo retículo-ruminal (MARKOFF, 1913; STONE, 1949 - cit. por HUNGATE, 1966). A manometria a pressão constante, ajusta-se perfeitamente às

medições da taxa de fermentação desenvolvida pelos microorganismos no conteúdo retículo-ruminal, desde que o sistema garanta um meio de incubação a temperatura constante, o digestor possua uma boca de entrada suficientemente larga para permitir a transferência fácil da amostra de conteúdo retículo-ruminal, seja adicionado bicarbonato, e possua um mecanismo que permita a leitura dos incrementos na produção de gás (HUNGATE, 1966). SHIBATA et al. (1961) e OGIMOTO et al. (1962), utilizaram como fermentador o corpo de uma seringa, dentro da qual o conteúdo retículo-ruminal era colocado e a produção de gás desenvolvida era medida com a deslocação do êmbolo. Se bem que vários tipos de aparelhos tenham sido utilizados em estudos manométricos do conteúdo retículo-ruminal (HUNGATE, 1966; O'HARA e SUGIHASHI, 1972; FORSBERG, 1978; MENKE et al., 1979; GENEST, 1982), a utilização de seringas de grande capacidade adaptada por MENKE et al. (1979), assume de facto todas características de um método bastante prático e de uma elegância dificilmente igualável, que facilmente nos sugeriu a sua utilização em grande parte dos nossos estudos "in vitro".

1.2. O MÉTODO DO "GAS-TESTE"

A nossa opção relativamente ao método do "gás-teste", apoiou-se não só nas particularidades referidas anteriormente, mas também em algumas modificações a que sujeitámos este modelo, no sentido de o ajustarmos melhor às condições do retículo-rumen "in vivo". A relação inóculo/mistura mineral que originalmente é de 1:3 (vidé Anexos), foi alterado para

1:4, para um melhor ajustamento do tamanho da micropopulação reticulo-ruminal, particularmente os ciliadaos, à quantidade de substracto, a fim de os fenómenos de reciclagem serem minimizados. Para um melhor e mais rápido ajustamento do potencial redox ($Eh' < -350$ mVolts), utilizámos como redutor citrato de titânio (ZEHNDER e WUHRMANN, 1976) em associação com o sulfureto de sódio, para a imediata redução da mistura mineral, permitindo à micropopulação a imediata ignição dos seus sistemas enzimáticos (CAPELA-e-SILVA e MARINHO, 1989 - em preparação) e limitar a intervenção dos "coliformes", que competem eficientemente com as bactérias autóctones do reticulo-rumen em potenciais de óxidorredução compreendidos entre -100 e -50 mVolts (MARINHO, 1987 - em preparação).

Quadro 1.1. Produção de gás (ml) às 12 e 24 h relativamente às 48 h de incubação (ALMEIDA, 1986).

Substracto	PG_12 h/PG 48 h		PG_24 h/PG 48 h	
	\bar{X}	\pm e.p.m.	\bar{X}	\pm e.p.m.
Amido	0,61	0,06	0,87	0,06
Celulose	0,14	0,02	0,67	0,08
Milho grão	0,54	0,04	0,89	0,06
Feno aveia x vicia	0,47	0,03	0,79	0,03
Bolota	0,62	0,05	0,77	0,02
Erva de Outono	0,63	0,06	0,88	0,02

1.2.1. - A fixação do tempo de incubação: Existe uma relação entre a produção de gás e a utilização fermentativa do substracto (CZERKAWSKI e BRECKENRIDGE, 1969, 1969; MEN-

KE et al., 1979; CAFANTARIS, 1981; STEINGAß, 1983), traduzindo os valores da produção de gás, a digestão da MO pelos microorganismos do retículo-rumen. Uma vez que entre as 24 e 48 h de incubação os incrementos na produção de gás são pequenos (salvo para a fermentação da celulose)(Quadro 1.1.), e para limitar o crescimento críptico (ALMEIDA, 1986), utilizámos o tempo de 24 h como período de incubação, ao fim do qual a grande maioria dos ciliados do retículo-rumen completa o tempo de geração (COLEMAN, 1980). Esta opção é também fundamentada pelo tempo de permanência da maior parte dos alimentos (JILG, 1982 - cit. por ALMEIDA, 1986) e pelos resultados obtidos por STEINGAß (1983) utilizando a mesma técnica, o qual observou uma correlação muito elevada entre as produções de gás "in vitro" às 24 h e o valor energético de 262 alimentos determinados "in vivo".

1.2.2. - A fixação do tempo de amostragem: A escolha do tempo de amostragem no período de 24 h de incubação, para a leitura dos vários parâmetros fermentativos, apoia-se num conjunto de estudos efectuados em torno da utilização deste sistema "in vitro".

A evolução cinética dos vários parâmetros microbiológicos e fisico-químicos no modelo "in vitro" por nós preconizado para a realização dos vários testes fermentativos, respeita integralmente o princípio de funcionamento de qualquer sistema de cultura em meio não renovado (STANIER et al., 1977); SENEZ, 1968).

A curva de crescimento bacteriano em meio não renovado vem representada na Fig.1.1., apresentando, para

efeitos descritivos, 6 fases distintas:

- 1 - Fase de latência, em que a taxa de crescimento é nula ($\mu = 0$);
- 2 - Fase de crescimento acelerado, em que a taxa de crescimento aumenta ($\mu \uparrow$);
- 3 - Fase exponencial, em que a taxa de crescimento é máxima e constante ($\mu = \text{cte}$);
- 4 - Fase de crescimento retardado, em que a taxa de crescimento diminui ($\mu \downarrow$);

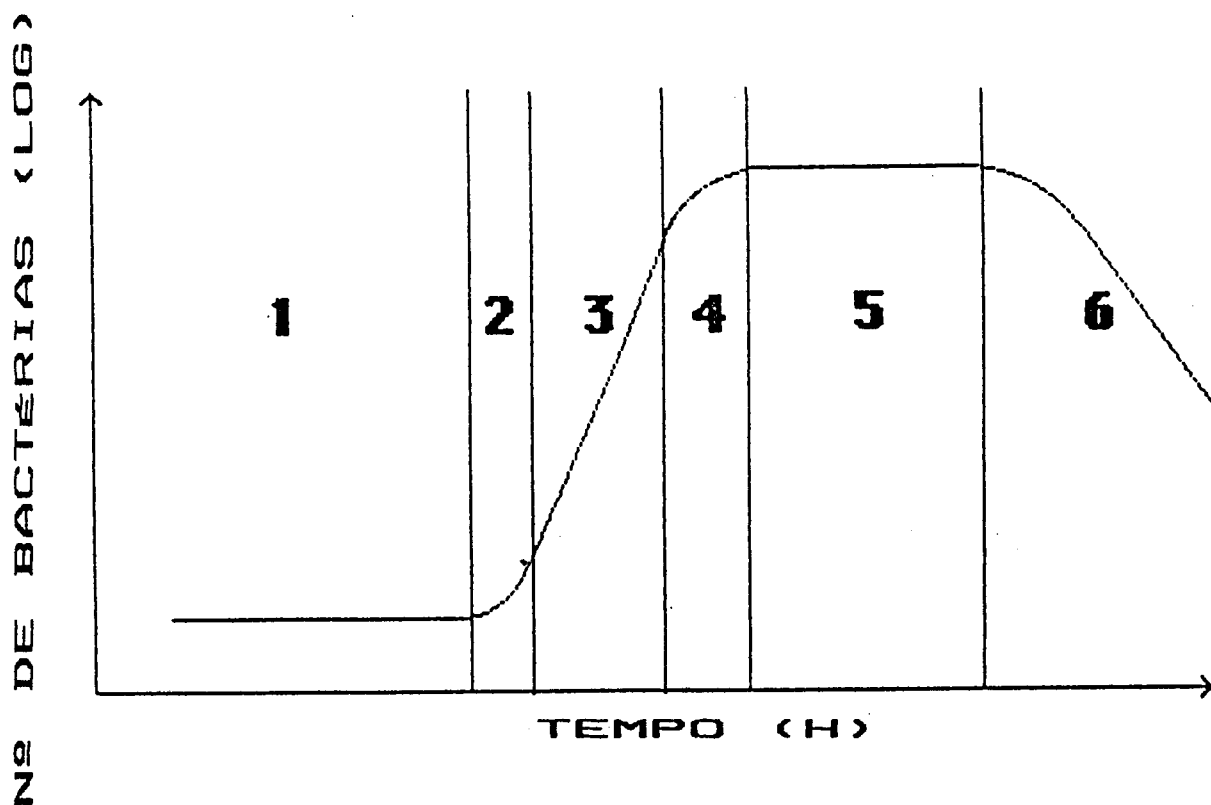


Fig 1.1. Curva de crescimento bacteriano em meio não renovado e as suas fases em coordenadas semilogarítmicas (SENEZ, 1968).

5 - Fase estacionária, em que a taxa de crescimento é nula ($\mu = 0$);

6 - Fase de declive, em que a taxa de crescimento é negativa ($\mu < 0$).

Os dados experimentais indicam que "in vitro", as fases 4 e 5 são atingidas entre as 8 e 12h de incubação, de acordo com a natureza do substrato (RAAB, 1980). Aquelas mesmas fases podem ser antecipadas em 3 horas se o substrato sujeito a fermentação for idêntico ao que o animal dador de inóculo utiliza na sua dieta. Os protozoários ciliados com um tempo de geração mais longo, projectam a sua curva de crescimento de uma forma diferente, de acordo com a espécie e respectivo tamanho (COLEMAN, 1980). A expressão do seu crescimento em termos populacionais, apenas se manifesta para além das 12 h até às 24 h, de acordo com os dados de que dispomos, apesar de as células mais pequenas mostrarem já às 6 h de fermentação indícios de divisão celular.

Perante este quadro, propusemos a amostragem às 6 h de incubação, para a quantificação das bactérias viáveis. Para a estimativa do número de ciliados, propusemos as 24 h de incubação e procedemos de igual forma para a quantificação do $N-NH_4^+$.

1.2.3. - Alimentação dos animais dadores de inóculo:
O inóculo utilizado nos testes "in vitro" foi fornecido por dois ovinos da raça Merino Branco do Alentejo, munidos de cânulas ruminais permanentes, os quais foram alimentados ao nível de manutenção com 70% de feno (aveia x vicia) e 30% de

concentrado comercial (13% PB).

1.3. AS EXPERIÊNCIAS

Os estudos "in vitro" foram fundamentalmente dirigidos para a caracterização da fermentação, pelo conteúdo retículo-ruminal, de substractos contendo bolota em diferentes percentagens de incorporação. Adicionalmente, faz-se a inclusão de um capítulo dedicado à utilização de folhas de Quercus ilex, Q. suber e Olea europea, fazendo uma abordagem ao seu potencial nutritivo como pastagem arbustiva integrada na estrutura do montado.

1ª Experiência: No primeiro estudo é feita uma abordagem à influência da percentagem de incorporação de bolota e à influência do estado de maturação em que se encontra, à influência da suplementação azotada e interacção com o estado de maturação para um nível de incorporação bastante elevado.

2ª Experiência: Dedicamos aqui um estudo com o objectivo de verificar o grau de interferência que a fracção lipídica da bolota exerce na fermentação retículo-ruminal dos componentes da fibra vegetal e na população de ciliados.

3ª Experiência: As estruturas foliares das árvores que povoam o montado, são aqui caracterizadas em alguns parâmetros fermentativos.

1.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tratados por análise de variância multifactorial (STEEL e TORRIE, 1982) e análise de variância "one way" (SNEDECOR e COCHRAN, 1967). Para testar o nível de correlação entre algumas variáveis e a significância das regressões, foram utilizadas a análise de regressão linear e a análise de regressão múltipla (STEEL e TORRIE, 1982).

CAPÍTULO 1

ANEXOS

1.1. - Composição química da Solução Micromineral (MENKE et al., 1979)

	<u>100 ml</u>
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	13,2 g
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	10,0 g
CoCl ₂ .6H ₂ O.....	1,0 g
FeCl ₃ .6H ₂ O.....	8,0 g
H ₂ O destilada.....q.s.p.	100,0 ml

1.2. - Composição da Solução Macromineral (MENKE et al., 1979)

	<u>100 ml</u>
Na ₂ HPO ₄	5,7 g
KH ₂ PO ₄	6,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,6 g
H ₂ O destilada.....q.s.p.	100,0 ml

1.3. - Composição química da solução tampão (MENKE et al., 1979)

	<u>100</u>	<u>ml</u>
NH ₄ HCO ₃	4,0	g
NaHCO ₃	35,0	g
H ₂ O destilada.....q.s.p.	100,0	ml

1.4. - Composição química da Solução Redutora (MENKE et al., 1979)

	<u>100</u>	<u>ml</u>
NaOH 1 N.....	4,0	ml
Na ₂ S.9H ₂ O.....	0,625	g
H ₂ O destilada.....q.s.p.	100,0	ml

1.5. - Composição química da solução de resazurina (MENKE et al., 1979)

	<u>100</u>	<u>ml</u>
Resazurina.....	1,0	g
H ₂ O destilada.....	q.s.p.	100,0 ml

1.6. - Composição do meio para introdução nas seringas (MENKE et al., 1979 - modificado)

H ₂ O destilada.....	400	ml
Solução Micromineral.....	0,1	ml
Solução tampão.....	200	ml
Solução macromineral.....	200	ml
Solução de resazurina.....	1,0	ml
Solução redutora*.....	40,0	ml
Fluido retículo-ruminal.....	280,0	ml

* Antes de adicionar a solução redutora, a mistura mineral foi reduzida com citrato de titânio (0,1 ml/100 ml)(CAPELA e SILVA e MARINHO - em preparação).

CAPÍTULO 2

ESTUDOS RELATIVOS AO EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE BOLOTA NA FERMENTAÇÃO DO CONTEÚDO RETÍCULO-RUMINAL "IN VITRO"

2.1. INTRODUÇÃO

A bolota pelas características da sua composição, constitui um bom suplemento energético nas misturas alimentares para os animais (ALMEIDA, 1986). Para a sua fracção energética contribuem fundamentalmente os lípidos, amido e glúcidos solúveis (CARVALHO, 1979). A sua biodisponibilidade é, no entanto, limitada pela presença de taninos (FERREIRA, 1984; LUCAS, 1986; ALMEIDA, 1986). A presença de quantidades apreciáveis de lípidos na sua constituição (10 - 11% MS) constitui adicionalmente factor de interferência, particularmente na digestão da celulose.

O aumento da incorporação de bolota nas misturas alimentares, normalmente traduz-se no aumento das produções cumulativas de gás, a uma taxa mesmo mais elevada que o milho, nas primeiras 12 h (ALMEIDA, 1986). No entanto, às 24 h a produção de gás pela bolota é inferior àquela produzida pelo milho. Esta diferença de comportamento talvez possa ser atribuída à maior riqueza em açúcares solúveis da bolota, que pode conter na sua constituição até 16,5% MS (CARVALHO, 1979), quando o milho não contém açúcares solúveis em quantidades superiores a 2% MS (FREITAS, 1989). Nas primeiras

6 h de fermentação a energia disponível para a fermentação é garantida pela fracção glucídica solúvel.

A bolota em misturas alimentares com aveia x vicia produziu mais gás quando aos meios de incubação se adicionou PEG, sendo este efeito mais marcante às 6 h de incubação (ALMEIDA, 1986). Também os níveis de amónia subiram com a incorporação de PEG nos substratos contendo bolota. O aumento da actividade fermentativa por acção do PEG pode ser devida a três factores distintos:

- adsorção dos taninos em solução;
- libertação da proteína complexada pelos taninos;
- redução da actividade tanante sobre os microorganismos do inóculo-retículo-ruminal em fermentação;
- ou a uma combinação destes três factores.

O nível proteico dos substratos alimentares contendo bolota, parece influenciar o efeito depressivo dos taninos sobre a fermentação no retículo-rumen, particularmente mais manifesto quando a fracção energia se encontra em excesso (ALMEIDA, 1986).

O enriquecimento das misturas alimentares contendo bolota com a incorporação de componentes azotados, amplificou não só as produções de gás, como também aumentou os valores da concentração do $N-NH_4^+$ (ALMEIDA, 1986). Este efeito é particularmente marcante quando a suplementação é feita com bagaço de soja e ureia. Com o bagaço de girassol, as produções de gás diminuíram com o aumento da sua incorporação, se bem que os valores do $N-NH_4^+$ tenham

manifestado tendência contrária, aumentando gradualmente com a incorporação. Aparentemente a fonte proteica parece influenciar a fermentação dos substratos contendo bolota.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Substratos: Todas as amostras de bolota utilizadas nos estudos "in vitro" foram de azinheira (Q. ilex), pertencentes à mesma árvore, e provenientes da Herdade Experimental da Mitra - Universidade de Évora. A palha utilizada nos substratos associada com a bolota, foi também fornecida pela Universidade de Évora. O bagaço de soja faz parte de lotes comerciais adquiridos no mercado local (Vide pg.119 para a composição química). A caseína (Difco) e o PEG 4000 (Koch Light, Lda) foram adquiridos no mercado local.

2.2.2. Análises laboratoriais: A MS, MO, PB e EE das amostras, foram determinados de acordo com os métodos AOAC (1972); os açúcares solúveis e o amido da bolota após hidrólise com ácido perclórico - 52%, foram determinados pelo método do fenol de acordo com HERBERT et al. (1971). O $N-NH_4^+$ foi determinado por destilação, tendo o destilado sido recebido em ácido bórico e titulado com HCl 1/10 N.

Os taninos e os fenóis totais foram determinados como anteriormente por espectrofotometria de absorção molecular (Parte II, pg. 129).

O número de ciliados nos fermentadores foi determinado como anteriormente (Parte II, pg. 128).

O número de bactérias viáveis foi determinado em meio 98-5 + xilano (Parte II - pg.128.) por amostragem às 5 e 24 h de fermentação.

As leituras de gás nos fermentadores foram feitas às 6 e 24 h de fermentação.

No tratamento estatístico dos resultados foram utilizados a análise de variância "one-way" (SNEDECOR e COCHRAN, 1967) e a análise de variância multifactorial (STEEL e TORRIE, 1982) utilizando como factores o estado de maturação da bolota, a sua percentagem de incorporação, a suplementação proteica e a inclusão de PEG nas misturas. A comparação das médias sido feita utilizando o "multirange-test" de Duncan. tratamento por análise de regressão linear simples e múltipla também foram utilizados para testar o nível e significância de algumas variáveis.

2.3. INFLUENCIA DA PERCENTAGEM DE INCORPORAÇÃO DE BOLOTA, DO SEU ESTADO DE MATURAÇÃO E DO PEG NA FERMENTAÇÃO DO CONTEÚDO RETÍCULO-RUMINAL

2.3.1. Introdução: A produção de gás "in vitro" aumenta com a incorporação de bolota nas misturas alimentares com milho (ALMEIDA, 1986), que até às 12 h de fermentação aumenta com a percentagem de incorporação até 100%. As 24 h de incubação a produção de gás aumenta, apenas, até ao nível de incorporação de 60%. Com a incorporação de 100% de bolota a mistura produz menos gás do que ao nível de 20% (ALMEIDA, 1986).

A composição química dos frutos em geral varia com a progressão do seu ciclo de maturação. A adstringência apresentada por alguns frutos, adstringência essa atribuível à presença de taninos na sua constituição (PIERPOINT, 1985), varia ao longo do ciclo de maturação dos frutos. O ciclo de maturação é normalmente acompanhado por uma diminuição da sua adstringência, devido à perda gradual dos taninos extractáveis, por polimerização a formas menos solúveis (GOLDSTEIN e SWAIN, 1963).

2.3.2. Resultados: A evolução da composição química da bolota e da sua MS, vem expressa no Quadro 2.1., onde se pode verificar que a MS dos frutos aumenta de uma forma bastante expressiva ao longo da maturação. Os níveis de PB, EE, açúcares solúveis e amido aumentaram, também, com a maturação dos frutos. A adstringência, medida em equivalentes de ácido tânico, diminui de uma forma muito expressiva, particularmente entre a 2ª e 3ª colheita. A medição dos fenóis totais mostrou uma certa irregularidade na sua evolução.

A produção de gás às 6 h de fermentação foi significativamente influenciada pelo ciclo de maturação ($P < 0,05$), pelo nível de incorporação de bolota ($P < 0,001$) e pela inclusão de PEG ($P < 0,001$). As interações maturação X PEG e nível de incorporação X PEG foram altamente significativas ($P < 0,001$), tendo a interação maturação X PEG apresentado um nível de significância ligeiramente inferior ($P < 0,001$). A

Quadro 2.1. Evolução da MS da bolota e de alguns elementos da sua composição química ao longo da sua maturação expressos em % MS

época de colheita	MS %	PB	EE	Açúcares solúveis	Amido	Fenóis Totais	Taninos Eq. A. tânico
Setembro	46,36	3,16	5,0	9,41	17,98	7,32	9,76
Outubro	53,43	3,26	7,7	10,26	51,64	7,94	7,35
Novembro	58,52	3,69	8,5	13,43	57,28	4,99	2,94

bolota da 2ª fase de maturação produziu mais gás que a bolota da 1ª e 3ª fases (Quadros 2.5, 2.6. e 2.7.). A diferença nas produções de gás foram significativas ($P < 0,05$) apenas entre a bolota da 1ª e 3ª fases de maturação, não havendo diferenças significativas nas produções de gás verificadas entre a bolota da 2ª e 3ª fases de maturação .

A produção de gás às 24 h de fermentação foi influenciada de uma forma altamente significativa ($P < 0,001$) pela fase de maturação da bolota, pela percentagem de incorporação e pela incorporação de PEG. As interações maturação \times incorporação e incorporação \times PEG, foram altamente significativas ($P < 0,001$), tendo a interacção maturação \times PEG sido também muito significativa mas para $P < 0,005$. A bolota da 1ª fase de maturação produziu mais gás que a bolota da 2ª fase e esta mais que a da 3ª fase.

As concentrações de $N-NH_4^+$ foram influenciadas de uma forma altamente significativa ($P < 0,001$) pela fase de maturação, pelo nível de incorporação e pela inclusão de PEG. As interacções maturação \times incorporação, maturação \times PEG e

incorporação X PEG também foram altamente significativas ($P < 0,001$). A evolução dos perfis das concentrações de $N-NH_4^+$ das três bolotas, em função da percentagem de incorporação, é muito semelhante. Contudo, as concentrações foram significativamente diferentes ($P < 0,05$), tendo a bolota da 3ª fase de maturação fornecido valores mais elevados que a bolota de 2ª e 3ª fases. As concentrações foram influenciadas significativamente pela percentagem de incorporação de bolota ($P < 0,05$), mas a diferença entre o 2º e 3º nível de incorporação não diferiram significativamente.

A população de ciliados foi afectada de uma forma altamente significativa ($P < 0,001$) pelo estado de maturação da bolota e pelo nível de incorporação. A inclusão de PEG também afectou significativamente o número de ciliados ($P < 0,01$). As interações apenas foram significativas para a maturação/incorporação ($P < 0,001$) e incorporação/PEG ($P < 0,01$). Conforme pode ser observado nos gráficos (Anexos) a população de ciliados cresce exuberantemente até à incorporação máxima de bolota (100%), independentemente do seu estado de maturação, com excepção da bolota da 1ª fase em que a população apenas cresce até à incorporação de 70%.

Embora a inclusão de PEG tenha provocado alterações nas populações de ciliados, estas apenas foram significativas para a bolota da 1ª fase de maturação na incorporação mais elevada, e para a bolota de 3ª fase nos níveis de incorporação de 70 e 100% (Quadros 2.8. e 2.10.).

Nas produções de gás a acção do PEG fez particularmente sentir a sua acção nos substractos contendo a

bolota da 1ª fase, tanto às 6 como às 24 h (Quadro 2.6.), devido à forte adstringência apresentada pela bolota nesta fase de maturação (Quadro 2.1.). As regressões múltiplas das produções de gás às 6 e 24 h de fermentação expressa de uma forma clara o efeito da adstringência nas várias fases de maturação da bolota (Quadro 2.2.) Onde a influência foi persistentemente significativa foi nos valores do $N-NH_4^+$, independentemente da fase de colheita e do nível de incorporação. Na regressão múltipla dos valores de $N-NH_4^+$ para o nível de incorporação de bolota e inclusão de PEG (Quadro 2.3.), para cada um dos tipos de bolota, a regressão para o PEG apenas não é significativa na bolota de 3ª fase. A regressão múltipla para o nível de incorporação é significativa, independentemente do tipo de bolota. A

Quadro 2.2. Produção de gás às 6 e 24 h em função da % de bolota (X_1) e da incorporação de PEG (X_2)

Tipo de Bolota	Equação de regressão	n	r	$S_{y.x}$
Setembro				
6 h	$Y = 5,53X_1^{***} + 3,41X_2^{***} - 2,29$	24	0,962	1,84776
24 h	$Y = 19,06 + 9,14X_1^{***} + 1,71X_2^*$	24	0,989	1,53727
Outubro				
6 h	$Y = 0,35 + 6,30X_1^{***} + 0,81X_2$	24	0,991	0,98824
24 h	$Y = 22,60 + 8,06X_1^{***} + 0,63X_2$	24	0,991	1,27168
Novembro				
6 h	$Y = 1,69 + 5,99X_1^{***} + 0,25X_2$	24	0,989	1,02633
24 h	$Y = 21,27 + 8,19X_1^{***} + 0,88X_2$	24	0,986	1,57299

regressão múltipla do número de ciliados para o nível de incorporação de bolota e para a incorporação de PEG nas misturas, apenas foi significativa para o nível de incorporação de bolota (Quadro 2.4.).

Quadro 2.3. Concentração de $N-NH_4^+$ em função da % de bolota (X_1) e da incorporação de PEG (X_2).

Tipo de bolota	Equação de regressão	n	r	$S_{y,x}$
Setembro	$Y = 11,42 - 1,18X_1^{***} + 1,84X_2^{**}$	24	0,785	1,26381
Outubro	$Y = 12,01 - 1,06X_1^{***} + 1,36X_2^*$	24	0,742	1,21982
Novembro	$Y = 13,23 - 0,88X_1^{***} + 0,58X_2$	24	0,773	0,83984

Quadro 2.4. Número de ciliados em função da % de incorporação de bolota (X_1) e da inclusão de PEG (X_2)

Tipo de Bolota	Equação de regressão	n	r	$S_{y,x}$
Setembro	$Y = 0,29 + 0,58X_1^{***} + 0,08X_2$	24	0,814	0,45955
Outubro	$Y = 0,74X_1^{***} + 0,12X_2 - 0,16$	24	0,963	0,23769
Novembro	$Y = 0,25 + 0,65X_1^{***} + 0,10X_2$	24	0,818	0,50984

A incorporação de bolota em misturas com palha, independentemente do seu estado de maturação, parece constituir um bom suplemento energético. O aumento da percentagem de incorporação traduziu-se sempre num aumento da produção de gás e esse aumento foi sempre acompanhado por uma pronunciada mobilização do $N-NH_4^+$, muito particularmente a 35% de incorporação. As 6 h de fermentação, no entanto, a produção de gás pelos substractos contendo bolota da primeira colheita (Setembro) produziu sempre menos gás em todos os

níveis de incorporação, de uma forma bem manifesta ao nível de 100% de incorporação. A adstringência mais elevada na

Quadro 2.5. Efeito da incorporação de bolota colhida em Setembro e da inclusão de PEG na produção de gás (ml)($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Bolota %	PEG %	Tempo de incubação (h)	
		6 h	24 h
0	0	7,20 ^a _c \pm 0,06	32,17 ^a _c \pm 0,29
	5	8,10 ^b \pm 0,06	32,17 ^a \pm 0,29
35	0	13,20 ^a _d \pm 0,15	37,00 ^a _d \pm 0,58
	5	14,97 ^b \pm 0,15	39,50 ^b \pm 0,29
70	0	19,47 ^a _e \pm 0,06	46,83 ^a _e \pm 0,44
	5	22,97 ^b \pm 0,37	49,50 ^b \pm 0,29
100	0	19,97 ^a _e \pm 0,25	58,50 ^a _f \pm 0,29
	5	27,47 ^b \pm 0,23	60,17 ^b \pm 0,17

Diferenças significativas devidas ao PEG, letras diferentes em índice superior; diferenças significativas devidas à % de bolota, letras diferentes em índice inferior.

bolota de Setembro, constituiu a razão fundamental para este comportamento, uma vez que a inclusão de PEG nos substratos aumentou as produções de gás, tendo mesmo nalguns casos produzido mais gás que os substratos contendo bolota de Outubro e Novembro (Figs. 2.1., 2.2., 2.3.). Os ciliados parecem ter sido afectados nos fermentadores contendo 100% de bolota de Setembro, devido talvez à quantidade de taninos presentes em solução (0,67 mg/ml), uma vez que a sua população aumentou com a incorporação de PEG. Curiosamente, a bolota de Setembro

a 100% foi a que produziu mais gás às 24 h de fermentação,

Quadro 2.6. Efeito da incorporação de bolota colhida em Outubro e da inclusão de PEG na produção de gás (ml) ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Bolota %	PEG %	Tempo de incubação (h)	
		6 h	24 h
0	0	7,20 ^a _c ± 0,06	32,17 ^a _c ± 0,29
	5	8,10 ^a ± 0,06	32,17 ^a ± 0,29
35	0	13,97 ^a _d ± 0,25	38,5 ^a _d ± 1,32
	5	13,97 ^a ± 0,25	38,33 ^a ± 0,76
70	0	21,70 ^a _e ± 0,58	48,50 ^a _e ± 0,29
	5	21,37 ^a ± 0,33	48,50 ^a ± 0,50
100	0	24,80 ^a _e ± 0,31	54,33 ^a _f ± 0,60
	5	27,47 ^b ± 0,43	57,00 ^b ± 0,58

Diferenças significativas devidas ao PEG, letras diferentes em índice superior; diferenças significativas devidas à % de incorporação de bolota, letras diferentes em índice inferior.

talvez devido à inactivação de uma parte da população de ciliados, sendo metabolicamente substituídos pela população bacteriana mais activa. Interessante notar que onde se conseguiu o maior incremento nas produções de gás tanto às 6 como às 24 h foi com o aumento da incorporação de bolota de 35 para 70 % de bolota, independentemente do seu estado de maturação.

Quadro 2.7. Efeito da incorporação de bolota colhida em Novembro e da inclusão de PEG na produção de gás (ml) ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Bolota %	PEG %	Tempo de fermentação (h)	
		6 h	24 h
0	0	7,20 ^a _c ± 0,06	32,17 ^a _c ± 0,29
	5	8,10 ^b ± 0,06	32,17 ^a ± 0,29
35	0	13,97 ^a _d ± 0,15	36,83 ^a _d ± 0,17
	5	13,96 ^a ± 0,15	37,67 ^b ± 0,17
70	0	21,70 ^a _e ± 0,58	46,50 ^a _e ± 0,29
	5	21,13 ^a ± 0,57	46,33 ^a ± 0,33
100	0	24,80 ^a _e ± 0,31	55,00 ^a _f ± 0,58
	5	25,47 ^a ± 0,15	57,83 ^b ± 0,17

Diferenças significativas devidas ao PEG, letras diferentes em índice superior; diferenças significativas devidas à % de incorporação de bolota, letras diferentes em índice inferior.

Quadro 2.8. Efeito da incorporação de bolota colhida em Setembro e da inclusão de PEG, na concentração de N-NH₄⁺ e no nº de ciliados às 24 h de incubação ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Bolota %	PEG %	N-NH ₄ ⁺	Nº de ciliados
		mg/100 ml	x 10 ⁵ /ml
0	0	14,00 ^a _e ± 0,100	0,57 ^a _c ± 0,020
	5	14,14 ^a ± 0,110	0,57 ^a ± 0,010
35	0	8,61 ^a _c ± 0,003	1,93 ^a _d ± 0,003
	5	11,70 ^b ± 0,003	1,95 ^a ± 0,007
70	0	9,66 ^a _d ± 0,003	2,58 ^a _e ± 0,013
	5	11,48 ^b ± 0,044	2,63 ^b ± 0,013
100	0	8,89 ^a _c ± 0,010	2,15 ^a _d ± 0,032
	5	11,20 ^b ± 0,060	2,39 ^b ± 0,025

Diferenças significativas devidas ao PEG, letras diferentes em índice superior; diferenças significativas devidas à % de incorporação de bolota, letras diferentes em índice inferior.

Quadro 2.9. Efeito da incorporação de bolota colhida em Outubro e da inclusão de PEG, na concentração de $N-NH_4^+$ e no nº de ciliados às 24 h de incubação ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Bolota %	PEG %	$N-NH_4^+$ mg/100 ml	Nº de ciliados $\times 10^5/ml$
0	0	14,00 ^a _e $\pm 0,10$	0,57 ^a _c $\pm 0,02$
	5	14,14 ^a $\pm 0,11$	0,57 ^a $\pm 0,01$
35	0	8,90 ^a _c $\pm 0,06$	1,76 ^a _d $\pm 0,03$
	5	11,76 ^b $\pm 0,03$	1,83 ^a $\pm 0,03$
70	0	10,08 ^a _d $\pm 0,06$	2,05 ^a _e $\pm 0,05$
	5	11,34 ^b $\pm 0,03$	2,44 ^a $\pm 0,06$
100	0	9,80 ^a _{cd} $\pm 0,06$	2,87 ^a _f $\pm 0,21$
	5	11,06 ^b $\pm 0,01$	2,90 ^a $\pm 0,27$

Diferenças significativas devidas ao PEG, letras diferentes em índice superior; diferenças significativas devidas à % de incorporação de bolota, letras diferentes em índice inferior.

Quadro 2.10. Efeito da incorporação de bolota colhida em Novembro e inclusão de PEG, na concentração de $N-NH_4^+$ e no nº de ciliados às 24 h de incubação ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Bolota %	PEG %	$N-NH_4^+$ mg/100 ml	Nº de ciliados $\times 10^5/ml$
0	0	14,00 ^a _d $\pm 0,10$	0,57 ^a _c $\pm 0,02$
	5	14,14 ^a $\pm 0,11$	0,57 ^a $\pm 0,01$
35	0	10,78 ^a _c $\pm 0,01$	2,43 ^a _e $\pm 0,12$
	5	11,62 ^b $\pm 0,02$	2,37 ^a $\pm 0,23$
70	0	10,90 ^a _c $\pm 0,06$	2,24 ^a _d $\pm 0,03$
	5	11,50 ^b $\pm 0,06$	2,62 ^b $\pm 0,06$
100	0	10,64 ^a _c $\pm 0,05$	2,66 ^a _f $\pm 0,03$
	5	11,55 ^b $\pm 0,03$	2,77 ^b $\pm 0,02$

Diferenças significativas devidas ao PEG, letras diferentes em índice superior; diferenças significativas devidas à % de incorporação de bolota, letras diferentes em índice inferior.

2.4. INFLUENCIA DO ESTADO DE MATURAÇÃO DA BOLOTA E DA INCORPORAÇÃO DE PEG, NAS BACTÉRIAS E CILIADOS DO RETÍCULO-RUMEN

2.4.1. Introdução - Os taninos em solução aquosa possuem capacidade para se ligarem com a parede celular dos microorganismos, em particular as bactérias (MARINHO, 1984). Com efeito, foi possível observar a formação de protoplastos em Cellvibrio fulvus por acção do ácido tânico e pela fracção tanino do extracto de alfarroba adicionada aos meios de cultura (McQUILLEN, 1960). HENNIS et al. (1964) constataram modificações importantes na morfologia de associação dos microorganismos, quando eram cultivados na presença de concentrações subinibitórias da tanino de alfarroba.

A parede celular, para além de ser a sede de todas as trocas metabólicas que a célula faz com o seu meio exterior, constitui um organito fundamental no desenvolvimento do processo de divisão celular (STANIER et al., 1977; CHENG et al., 1981).

Com o objectivo de investigar o efeito que os taninos na viabilidade da população bacteriana e da população de ciliados, utilizámos como substrato uma mistura de palha e bolota em duas fases extremas do seu ciclo de maturação, (Setembro e Novembro) nas percentagens relativas de 30 e 70, sem qualquer suplementação proteica.

2.4.2. Resultados - Conforme pode ser verificado nos Quadros 2.11. e 2.12., a incorporação de PEG não só aumentou

Quadro 2.11. Efeito da época de colheita da bolota e do PEG no Nº de bactérias, no Nº de ciliados em divisão celular e na produção de gás às 6 h de incubação ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Bolota	PEG %	Bactérias viáveis $\times 10^7$ /ml	Ciliados em divisão $\times 10^4$ /ml	Produção de gás ml
Setembro	0	1,06 ^a _c \pm 0,06	1,23 ^a _c \pm 0,05	19,56 ^a _c \pm 0,29
	5	2,01 ^b \pm 0,05	2,34 ^b \pm 0,03	23,00 ^b \pm 0,29
Novembro	0	1,12 ^a _d \pm 0,06	1,92 ^a _d \pm 0,06	25,50 ^a _d \pm 0,29
	5	1,44 ^b \pm 0,06	2,52 ^b \pm 0,03	28,67 ^b \pm 0,17

Diferenças significativas devidas à bolota, letras diferentes em índice inferior; diferenças significativas devidas à inclusão de PEG, letras diferentes em índice superior.

Quadro 2.12. Efeito da época de colheita da bolota e da inclusão de PEG no Nº de bactérias, no Nº de ciliados e na produção de gás às 24 h de incubação ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Bolota	PEG %	Bactérias viáveis $\times 10^7$ /ml	Ciliados viáveis $\times 10^5$ /ml	Produção de gás ml
Setembro	0	0,34 ^a _c \pm 0,06	1,18 ^a _c \pm 0,01	43,33 ^a _c \pm 0,44
	5	0,32 ^a \pm 0,03	1,47 ^b \pm 0,03	48,50 ^b \pm 0,17
Novembro	0	0,45 ^a _c \pm 0,04	1,35 ^a _d \pm 0,02	48,33 ^a _d \pm 0,17
	5	0,27 ^b \pm 0,01	1,49 ^b \pm 0,01	51,00 ^b \pm 0,87

Diferenças significativas devidas à bolota, letras diferentes em índice inferior; diferenças significativas devidas à incorporação de PEG, letras diferentes em índice superior.

significativamente ($P < 0,001$) o número de bactérias viáveis às 6 h de fermentação, como também o número de ciliados em processo de divisão celular aumentou significativamente ($P < 0,001$). As diferenças, no entanto, foram mais expressivas nas misturas alimentares contendo bolota de Setembro, onde o número de bactérias viáveis quase duplicou. A inclusão de PEG também aumentou significativamente as produções de gás às 6 e 24 h de incubação ($P < 0,001$), sendo mais expressiva com a bolota verde.

As 24 h o número de bactérias não só baixou, como também não se diferenciou com os tratamentos, tendo apenas sido influenciado significativamente com a inclusão de PEG ($P < 0,01$). O número de ciliados foi influenciado pelo tipo de bolota e pela inclusão de PEG ($P < 0,001$). A produção de gás também foi influenciada significativamente pelo tipo de bolota ($P < 0,001$) e pela inclusão de PEG ($P < 0,001$ - às 6 h; $P < 0,05$ - às 24 h). A produção de gás às 24 h também foi influenciada significativamente ($P < 0,05$) pela interação tipo de bolota/PEG.

2.5. INFLUENCIA DA SUPLEMENTAÇÃO PROTEICA, DA INCORPORAÇÃO DE PEG E DO ESTADO DE MATURAÇÃO DA BOLOTA INCORPORADA A 70%, NA FERMENTAÇÃO PELO CONTEÚDO DO RETÍCULO-RUMINAL

2.5.1. Introdução. A suplementação das misturas alimentares, contendo grandes quantidades de bolota na sua

composição, com uma fonte azotada, traduz-se normalmente num acréscimo do seu potencial fermentativo, que se reflecte na produção de gás e no aumento da concentração do N-NH_4^+ (ALMEIDA, 1986). A evolução destes dois parâmetros parece estar dependente não só do nível de suplementação proteica, como também das características do suplemento. Com efeito, enquanto os incrementos na suplementação com soja se traduziram num aumento progressivo das produções cumulativas de gás e nas concentrações de NH_4^+ , com a ureia a tendência contrária foi aquela que se manifestou para a produção de gás com o aumento progressivo nas concentrações de NH_4^+ (ALMEIDA, 1986). Com o bagaço de girassol a tendência foi para a diminuição nas produções de gás à medida que se incrementou a suplementação, com o aumento consequente nos valores do NH_4^+ . Se bem que a natureza do azoto (solubilidade, perfil de aminoácidos) no suplemento possa fazer sentir a sua acção (TAMMINGA, 1979) (maior solubilidade = maior degradabilidade; melhor perfil = melhor utilização), acreditamos que a substituição da bolota pelo suplemento proteico possa alterar manifestamente a relação N/E, alterando os valores da taxa de fermentação, neste caso expresso na formação de gás. Enquanto a substituição parcial da bolota por soja não deve baixar de uma forma expressiva a energia da mistura (BATH et al. 1986), o mesmo não se deverá passar com o bagaço de girassol. O seu teor em PB (27%) é bastante mais baixo que o teor em PB da soja (47%), obrigando a uma substituição mais expressiva para se conseguirem valores de PB nas misturas superiores a 10%. Outro factor

que poderá influenciar a produção de gás, é a acumulação gradual de NH_4^+ nos fermentadores, que inevitavelmente funcionará como tampão, frenando a mobilização do sistema tampão-bicarbonato por um lado, podendo manifestar propriedades tóxicas em relação aos microorganismos por outro.

A fim de determinar o efeito do PEG₄₀₀₀ e do nível de suplementação proteica e da sua natureza na fermentação de misturas alimentares contendo 70% de bolota, estas foram incubadas com quantidades apropriadas de bagaço de soja, para os níveis de 8,3%, 11,4%, 12,4%, 14,5% e 16,6% de PB.

A caracterização da fermentação foi feita com base nos mesmos parâmetros de leitura referidos em 2.3..

2.5.2. Resultados - A produção de gás às 6 h foi influenciada significativamente ($P < 0,001$) pelo nível de suplementação e com a incorporação de 5% de PEG, não tendo o estado de maturação da bolota influenciado significativamente a produção de gás (Quadro 2.15.). As interações época x incorporação e época x PEG foram altamente significativas ($P < 0,001$), tendo a interação incorporação x PEG sido significativa apenas ao nível de $P < 0,05$).

As 24 h de incubação, a produção de gás apenas foi influenciada significativamente ($P < 0,001$) pelo nível de suplementação (Quadro 2.16.).

Os valores da concentração de NH_4^+ foram influenciados de uma forma altamente significativa ($P < 0,001$)

pela época, nível de suplementação, inclusão de PEG e pelas interacções época x incorporação, época x PEG e incorporação x PEG (Quadro 2.13.).

A população de protozoários ciliados, se bem que de uma forma irregular, foi influenciada significativamente pelo estado de maturação da bolota ($P < 0,01$), pelo nível de suplementação ($P < 0,001$) e pela inclusão de PEG ($P < 0,05$) (Quadro 2.14.). As interacções apresentaram níveis de significância diferentes, tendo a interacção época x incorporação sido significativa para $P < 0,01$, a interacção época x PEG para $P < 0,05$ e a interacção incorporação x PEG para $P < 0,01$).

A produção de gás aumentou com a incorporação de bagaço de soja, independentemente do tipo de bolota utilizada nas misturas. Porém, as produções de gás mais elevadas foram registadas na fermentação dos substratos contendo bolota de Setembro, às 24 h de incubação. As 6 h de fermentação a situação foi exactamente oposta, uma vez que foram os substratos contendo bolota de Novembro na sua composição aqueles que produziram mais gás com a suplementação azotada. A explicação poderá residir no facto de a bolota de Novembro, menos adstringente e mais energética, ter proporcionado aos microorganismos uma mais rápida mobilização do azoto para o seu crescimento. A bolota de Setembro possuindo menos energia e incomparavelmente mais taninos, impediu a população microbiana de crescer a uma taxa tão elevada, por um lado devido ao mais baixo teor em energia disponível, por outro

Quadro 2.13. Efeito do nível de suplementação azotada com bagaço de soja e da inclusão de PEG nos valores da concentração de NH_4^+ (mg/100 ml) ($\bar{X} \pm \text{e.p.m.}$)

Tipo de bolota	PEG %	PB (% MS)					
		4,5	8,3	11,4	12,4	14,5	16,6
Bolota de Setembro	0	7,17 ^a _c ± 0,29	9,77 ^a _c ± 0,06	10,67 ^a _c ± 0,06	11,27 ^a _c ± 0,06	13,12 ^a _c ± 0,03	15,79 ^a ± 0,04
	5	8,67 ^b ± 0,05	13,22 ^b ± 0,11	14,81 ^b ± 0,16	15,35 ^b ± 0,15	17,16 ^b ± 0,07	16,61 ^b ± 0,35
Bolota de Novembro	0	8,50 ^a _d ± 0,10	10,44 ^a _d ± 0,05	11,80 ^a _d ± 0,26	13,80 ^a _d ± 0,20	16,25 ^a _d ± 0,05	17,24 ^a _d ± 0,25
	5	9,34 ^b ± 0,06	12,41 ^b ± 0,09	12,83 ^b ± 0,11	15,37 ^b ± 0,25	17,66 ^b ± 0,13	19,33 ^b ± 0,11

Os valores afectados por letras diferentes em índice superior e inferior diferem significativamente ($P < 0,001$).

Quadro 2.14. Efeito do nível de suplementação azotada com bagaço de soja e da inclusão do PEG no número de ciliados ($\times 10^5/\text{ml}$) ($\bar{X} \pm \text{e.p.m.}$)

Tipo de Bolota	PEG %	PB (% MS)					
		4,5	8,3	11,4	12,4	14,5	16,6
Bolota de Bolota	0	2,88 ^a ± 0,02	3,29 ^a ± 0,07	3,09 ± 0,03	2,91 ^a ± 0,12	2,92 ^a ± 0,08	3,18 ± 0,14
	5	3,40 ^b ± 0,16	2,87 ^b ± 0,03	3,17 ± 0,11	3,39 ^b ± 0,08	3,10 ^b ± 0,07	3,43 ± 0,12
Bolota de Novembro	0	3,30 ± 0,18	3,06 ± 0,29	3,27 ± 0,20	3,45 ± 0,22	3,23 ± 0,08	3,17 ± 0,09
	5	3,09 ± 0,17	2,95 ± 0,05	3,06 ± 0,31	3,66 ± 0,14	3,38 ± 0,13	3,32 ± 0,18

Os valores afectados por letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,01$).

Quadro 2.15. Efeito da suplementação azotada com bagaço de soja e da incorporação de PEG na produção de gás (ml) às 6 h de incubação ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Tipo de Bolota	PEG %	PB (% MS)					
		4,5	8,3	11,4	12,4	14,5	16,6
Bolota de Setembro	0	16,17 ^a _c ± 0,76	16,00 ^a _c ± 0,87	17,00 ^a _c ± 0,87	17,33 ^a _c ± 0,29	19,00 ^a _c ± 0,50	19,83 ^a _c ± 0,29
	5	18,17 ^b ± 0,76	19,00 ^b ± 0,50	20,17 ^b ± 1,04	21,67 ^b ± 0,29	22,33 ^b ± 0,29	22,17 ^b ± 0,76
Bolota de Novembro	0	15,83 ^a _c ± 0,76	17,50 ^a _c ± 0,50	18,83 ^a _d ± 0,29	20,17 ^a _d ± 0,29	19,83 ^a _c ± 0,29	20,17 ^a _c ± 0,29
	5	16,17 ^b ± 0,29	17,50 ^a ± 0,50	19,67 ^b ± 0,29	21,17 ^b ± 0,29	20,00 ^a ± 0,50	20,83 ^a ± 0,58

Valores afectados com letras diferentes em índice superior e inferior, diferem significativamente para $P < 0,05$.

Quadro 2.16. Efeito do nível de suplementação azotada com bagaço de soja e da incorporação de PEG na produção de gás (ml) às 24 h de incubação ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Tipo de Bolota	PEG %	PB (% MS)					
		4,5	8,3	11,4	12,4	14,5	16,6
Bolota de Setembro	0	43,67 ^a _c ± 2,57	47,33 ^a _c ± 0,58	51,17 ^a _c ± 1,53	51,17 ^a _c ± 1,44	51,50 ^a _c ± 0,50	49,67 ^a _c ± 0,29
	5	46,60 ^a ± 1,50	48,17 ^a ± 0,76	50,33 ^b ± 3,33	49,83 ^a ± 0,58	52,17 ^a ± 1,26	49,67 ^a ± 1,53
Bolota de Novembro	0	43,70 ^a _c ± 1,08	47,17 ^a _c ± 2,47	47,50 ^a _d ± 1,32	50,17 ^a _c ± 0,29	48,67 ^a _d ± 0,29	49,33 ^a _c ± 1,04
	5	44,67 ^a ± 0,29	47,33 ^a ± 0,29	47,50 ^a ± 0,50	49,83 ^a ± 0,29	48,67 ^a ± 0,58	49,16 ^a ± 0,29

Valores afectados com letras diferentes em índice superior e índice inferior, diferem significativamente para $P < 0,05$.

terá sido forçada a compensar a inactivação de uma parte da sua população por acção dos taninos.

Na suplementação com soja ao nível de 14,5% PB, o efeito do PEG na fermentação da mistura contendo bolota de Novembro não se fez praticamente sentir na produção de gás, enquanto que na mistura contendo bolota de Setembro ao nível de 16,6% PB, a influência do PEG ainda se fez sentir às 6 h de fermentação, provavelmente porque este nível de proteína ainda não foi suficiente para titular a quantidade de taninos presente em solução.

A incorporação de PEG aumentou as concentrações de NH_4^+ em todos os níveis de suplementação com bagaço de girassol, independentemente do tipo de bolota utilizada nas misturas. No entanto, os níveis de NH_4^+ nas misturas contendo bolota de Novembro foram significativamente superiores, facto que tem necessariamente a ver com o teor mais elevado em PB apresentado por este tipo de bolota.

O comportamento da população de ciliados foi bastante irregular, não permitindo uma caracterização clara relativamente à suplementação azotada. A explicação talvez resida no facto de neste estudo termos trabalhado com inóculos com uma população de ciliados bastante densa, no limiar da saturação do espaço biológico do sistema, que mascarou completamente as situações com manifestações de crescimento críptico.

2.6. EFEITO DA BOLOTA NA FERMENTAÇÃO DE AMOSTRAS ESOFÁGICAS COLHIDAS EM OVINOS NA PASTAGEM DE MONTADO

2.6.1. Introdução - A pastagem de montado na época de Outono/Inverno, coloca à disposição dos ruminantes em regime de pastoreio uma manancial de energia representado pelos frutos de Quercus ilex e Q. suber. Os animais manifestam grande apetência pela bolota, situação perfeitamente manifestada pela modificação do seu comportamento, em que os animais correm de árvore em árvore procurando avidamente as bolotas.

Se bem que não se conheça o nível de ingestão da bolota pelos animais directamente na pastagem, a ingestibilidade deste fruto estará condicionada pela quantidade de bolota disponível no solo, pela qualidade do fruto, pela carga animal e pelo nível de massa verde apresentado pela pastagem. A qualidade do fruto tem a ver com a variedade, se é do tipo amargo ou doce, e com o estado de maturação em que a mesma se encontra. A interacção destes factores pensamos que será determinante para o equilíbrio dietético e fisiológico dos ruminantes em regime de montanhaeira.

Com o objectivo de fazer uma pequena abordagem ao potencial fermentativo da bolota integrada na pastagem, utilizámos ovinos em duas pastagens diferentes, nos quais recolhemos algumas amostras esofágicas que foram caracterizadas quimicamente na sua composição e fermentadas "in vitro". Uma

das pastagens era natural com uma consociação de gramíneas e a outra era uma pastagem semeada, de trevo subterrâneo. Para efeito de caracterização fermentativa utilizámos três amostras esofágicas recolhidas nos ovinos na pastagem natural e duas amostras recolhidas na pastagem de trevo subterrâneo.

2.6.2. Resultados - A composição das amostras utilizadas nas fermentações "in vitro" vem expressa no Quadro 2.17.). A grande diferença nas suas composições reside fundamentalmente na fracção amido que é francamente expressiva nas amostras colhidas nos ovinos alimentados na pastagem natural, estando naturalmente relacionado com a quantidade de bolota ingerida. Com efeito, a distribuição de Quercus sp. nas duas pastagens também difere de uma forma expressiva. A pastagem natural apresenta uma densidade muito mais elevada naquelas formações arbóreas.

Nas amostras esofágicas colhidas na pastagem natural (Amostras 1, 2 e 3), às 6 e 24 h de fermentação a produção de gás foi significativamente ($P < 0,001$) diferente (Quadro 2.18.), tendo a influência do PEG sido significativa ($P < 0,05$) apenas às 6 h de fermentação na amostra nº 1. Os valores de NH_4^+ diferiram significativamente ($P < 0,001$), tendo sido influenciados também de uma forma altamente significativa ($P < 0,001$) pela inclusão de PEG (Quadro 2.19.). No número de ciliados apenas foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,001$) entre a primeira amostra e as restantes (Quadro 2.19.).

Quadro 2.17. Composição química das amostras recolhidas no esôfago dos animais

Amostra esofágica	Nº	M.S. %	P.B. %	Amido %	Fenóis Totais	Taninos Eq. A. tânico %
Pastagem	1	88,42	13,02	10,46	4,47	1,76
natural	2	88,32	11,43	23,32	2,90	-
	3	88,81	12,34	21,61	3,31	-
Pastagem	4	88,60	13,17	3,50	2,82	-
trevo subterrâneo	5	89,59	13,52	5,64	3,21	1,72

Nas amostras esofágicas colhidas na pastagem de trevo subterrâneo, as produções de gás diferiram entre si de uma forma significativa ($P < 0,05$) apenas às 24 h de incubação (Quadro 2.20.), tendo a amostra número 4 sido influenciada significativamente ($P < 0,05$) às 6 h de fermentação. Os valores para a concentração de NH_4^+ foram significativamente diferentes nas duas amostras, tendo a inclusão de PEG também influenciado de uma forma significativa ($P < 0,01$). O número de ciliados foi significativamente superior ($P < 0,001$) na amostra número 5, tendo a inclusão de PEG apenas influenciado significativamente o número de ciliados na amostra número 4 (Quadro 2.21.).

Quadro 2.18. Produções de gás (ml) às 6 e 24 h de incubação na fermentação de amostras esofágicas colhidas em ovinos alimentados numa pastagem natural ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Amostra Nº	PEG %	Tempo de incubação (h)	
		6	24
1	0	5,67 ^a _c ± 0,58	20,92 ^a _c ± 1,89
	5	7,33 ^b ± 0,76	22,75 ^a ± 1,73
2	0	11,50 ^a _d ± 0,50	37,92 ^a _d ± 1,04
	5	11,00 ^a ± 1,00	36,58 ^a ± 1,76
3	0	8,00 ^a _c ± 0,50	28,25 ^a _c ± 0,50
	5	8,00 ^a ± 0,50	29,25 ^a ± 1,00

Diferenças significativas atribuídas ao PEG são referenciadas por letras diferentes em índice superior; diferenças significativas devidas à amostra, são referenciadas por letras diferentes em índice inferior.

Quadro 2.19. Concentrações de $N-NH_4^+$ e número de ciliados na fermentação de amostras esofágicas colhidas em ovinos numa pastagem natural ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Amostra Nº	PEG %	$N-NH_4^+$ mg/100 ml	Ciliados $\times 10^5/ml$
1	0	7,32 ^a _c ± 0,015	1,01 ^a _c ± 0,033
	5	7,95 ^b ± 0,076	1,39 ^b ± 0,017
2	0	4,17 ^a _d ± 0,015	1,79 ^a _d ± 0,006
	5	4,90 ^b ± 0,058	1,48 ^b ± 0,058
3	0	5,83 ^a _e ± 0,015	1,80 ^a _d ± 0,046
	5	6,77 ^b ± 0,033	1,48 ^b ± 0,012

Diferenças significativas devidas ao PEG são referenciadas por letras diferentes em índice superior; diferenças significativas devidas à amostra, são referenciadas por letras diferentes em índice inferior.

Quadro 2.20. Produções de gás (ml) às 6 e 24 h de incubação na fermentação de amostras esofágicas colhidas em ovinos alimentados numa pastagem de trevo subterrâneo ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Amostra Nº	PEG %	Tempo de incubação (h)	
		6	24
4	0	4,67 ^a _c ± 0,58	12,42 ^a _c ± 2,75
	5	5,83 ^b _c ± 0,29	16,42 ^a ± 2,47
5	0	6,67 ^a _d ± 1,15	19,25 ^a _d ± 0,50
	5	6,67 ^a ± 0,29	20,25 ^a ± 0,50

Diferenças significativas atribuídas ao PEG são referenciadas por letras diferentes em índice superior; diferenças significativas devidas à amostra são referenciadas por letras diferentes em índice inferior.

Quadro 2.21. Concentrações de N-NH_4^+ e número de ciliados na fermentação de amostras esofágicas de ovinos numa pastagem de trevo subterrâneo ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Amostra Nº	PEG %	N-NH ₄ ⁺ mg/100 ml	Ciliados x 10 ⁵ /ml
4	0	6,38 ^a _c ± 0,033	0,72 ^a _c ± 0,012
	5	7,18 ^b ± 0,044	0,97 ^b ± 0,087
5	0	6,38 ^a _d ± 0,060	1,05 ^a _d ± 0,029
	5	7,10 ^b ± 0,058	0,97 ^a ± 0,012

Diferenças significativas devidas ao PEG são referenciadas por letras diferentes em índice superior; diferenças significativas devidas à amostra são referenciadas por letras diferentes em índice inferior.

Os animais na pastagem de montado ingerem quantidades importantes de bolota com a forragem, situação perfeitamente evidenciada em algumas das amostras utilizadas neste estudo. Com base nos valores apresentados no Quadro para a composição da bolota madura em amido (50 - 60% MS) é possível fazer uma estimativa da quantidade de bolota ingerida. Assim, para a amostra esofágica contendo 23,32% de amido, podemos estimar que a percentagem de bolota presente nesta amostra se situará muito próxima de 50%.

Interessante notar que os valores apresentados para a PB das várias amostras não difere substancialmente, apesar das grandes diferenças não só no que respeita à participação da bolota, como também o facto de as amostras 4 e 5 terem sido colhidas numa pastagem de trevo. Seria de esperar talvez que as amostras com mais bolota e provenientes da pastagem natural apresentassem valores mais baixos de PB. A insolubilização da mucina por acção dos taninos da bolota (PIERPOINT, 1985; ROBBINS, 1987_a) poderá talvez constituir a justificação para este nivelamento. A adstringência medida nas amostras foi muito baixa, tendo fornecido leitura apenas nas amostras 1 e 5, exactamente aquelas que forneceram dos valores mais elevados na leitura dos fenóis totais.

A as produções de gás tanto às 6 h como às 24 h de incubação aumentaram com o nível de participação de amido nas amostras, confirmando as observações efectuadas em outros estudos (ALMEIDA, 1986; SHORT et al., 1969), da mesma forma como aconteceu com a população de ciliados, que aumentou com o nível de energia da mistura (ABE et al., 1973; NAKAMURA e

KANEGASAKI, 1969). O efeito do PEG nas produções de gás apenas se fez sentir nas amostras 1 e 4, mas apenas às 6 h de fermentação. Na população de ciliados, a sua acção apenas favoreceu o crescimento na amostra nº 1. Os valores da NH_4^+ , embora guardando uma certa relação com o teor em PB das misturas, foram sempre mais baixos na fermentação das amostras contendo mais amido, evidenciando uma mobilização de azoto mais intensa para o crescimento microbiano. A incorporação de PEG incrementou os valores da NH_4^+ na fermentação de todas as amostras.

2.7. DISCUSSÃO

As modificações que acompanham o ciclo de maturação da bolota são, de facto, bastante importantes. O aspecto mais marcante é, sem dúvida, a rápida diminuição da adstringência, cerca de quatro vezes, no espaço de aproximadamente dois meses. A diminuição da adstringência ao longo da maturação é uma situação que se estende a muitos frutos que fazem parte dos nossos hábitos alimentares (PIERPOINT, 1985; GOLDSTEIN e SWAIN, 1963). Os fenóis totais doseados não manifestam a mesma tendência. Embora diminuindo, não acompanham a quebra tão vertiginosa da adstringência determinada pela reactividade dos taninos (PIERPOINT, 1985). Esta diminuição da adstringência, se não na totalidade, pelo menos em parte, deve-se a uma perda gradual de taninos extractáveis, devido à sua polimerização a formas menos reactivas e menos solúveis (GOLDSTEIN e SWAIN, 1963). A

maturação é acompanhada também pela subida vertiginosa da fracção amido e do aumento da sua composição em açúcares solúveis, que conferem o sabor adocicado à bolota madura.

A incorporação de bolota até 100% nas misturas alimentares fermentadas "in vitro", independentemente do tempo de incubação, traduziu-se sempre no aumento da produção de gás, diferentemente dos resultados obtidos por ALMEIDA (1986), que às 24 h de incubação, não encontrou diferenças na produção de gás nas concentrações de bolota entre 20 e 60% e entre 80 e 100%. Nos nossos estudos a bolota colhida em Outubro, a meio do seu ciclo de maturação, revelou melhores características fermentativas, talvez devido a um maior equilíbrio na sua composição química.

Tal como verificado por ALMEIDA (1986), as produções de gás aumentaram com a incorporação de PEG nas misturas. O efeito mais expressivo às 6 h de incubação e com a bolota de Setembro, está concerteza relacionado com a sua elevada adstringência, que limita não só a disponibilidade do substracto, particularmente o azoto, mas também interfere directamente sobre os microorganismos. Às 6 h de incubação os fermentadores contendo PEG apresentaram um número de bactérias viáveis e ciliados em divisão celular, situação mais marcante nas misturas contendo bolota de Setembro, o que parece explicar parcialmente a constatação apresentada por ALMEIDA (1986) de que, quando se adicionava PEG à bolota ou alfarroba, ao fim de 3 h de incubação a produção de gás aumentava de imediato. A actividade microbiana é fortemente condicionada pela presença de taninos

em solução (HENIS et al., 1964; BASARABA, 1966), mais intensamente quando os taninos são do tipo hidrolizável (SINGLETON e KRATZER, 1969 e 1973).

As produções de gás também aumentaram com a suplementação azotada com bagaço de soja, de acordo com as observações feitas por ALMEIDA (1986). Neste estudo, na suplementação com soja ao nível de 14,5% PB, o efeito da adição de PEG na bolota de Novembro, praticamente não se faz sentir na produção de gás, situação completamente diferente nas misturas contendo bolota de Setembro, em que a suplementação ao nível de 16,6% PB ainda deixa perceber a acção do PEG às 6 h de fermentação. ALMEIDA (1986), verificou um efeito apreciável do PEG na produção de gás ao nível de 16% PB, que poderá estar relacionado com a variedade de bolota utilizada ser mais adstringente, ou os baixos teores em NH_4^+ que o autor refere, permitirem mesmo a esse nível de suplementação, a manifestação da acção dos taninos. Estes resultados confirmam a importância da suplementação azotada das dietas ricas em taninos. PRICE e BUTLER (1980) referem que os efeitos nutricionalmente deletéreos conferidos pelos taninos, são aliviados com a suplementação das dietas com níveis elevados de PB.

A produção mais elevada de NH_4^+ nos fermentadores contendo PEG foi especialmente destacada nas misturas contendo bolota de Setembro. O teor em PB mais baixo nesta bolota, associado a uma maior indisponibilidade devido à elevada quantidade de taninos, constituirão a razão fundamental para este comportamento. Com efeito, o ácido

tânico ao nível de 5% inibiu a degradação do azoto do milho, tendo a inibição sido aleviada com a inclusão de PEG (ALMEIDA, 1986).

CAPÍTULO 2

ANEXOS

Fig-2-1-

Efeito da % de incorporação de bolota de Sektombro e do PEG na produção de gás às 6 e 24 h

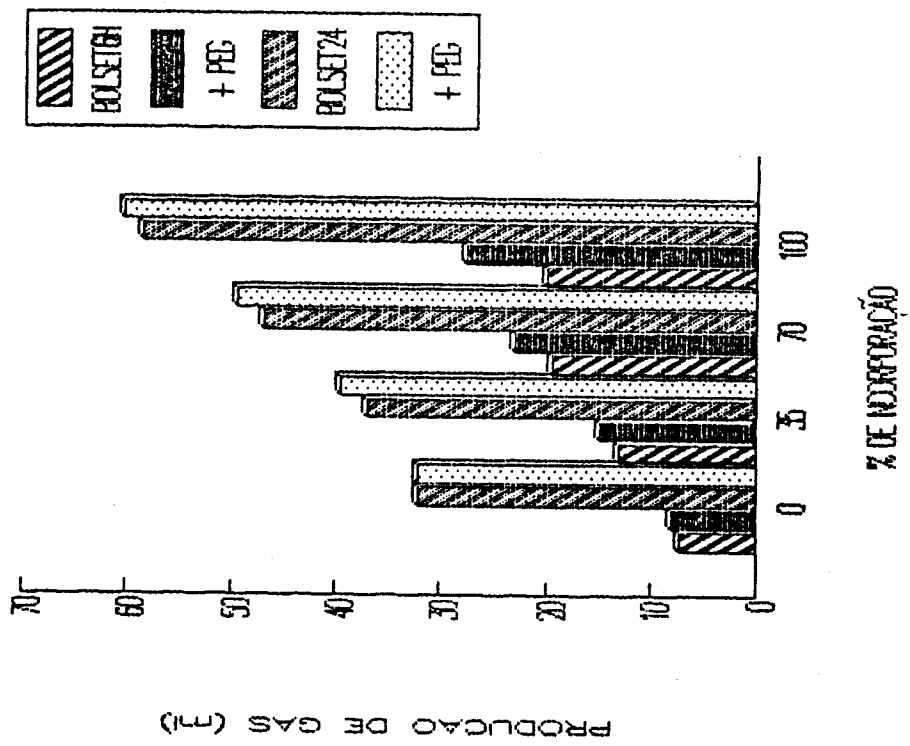
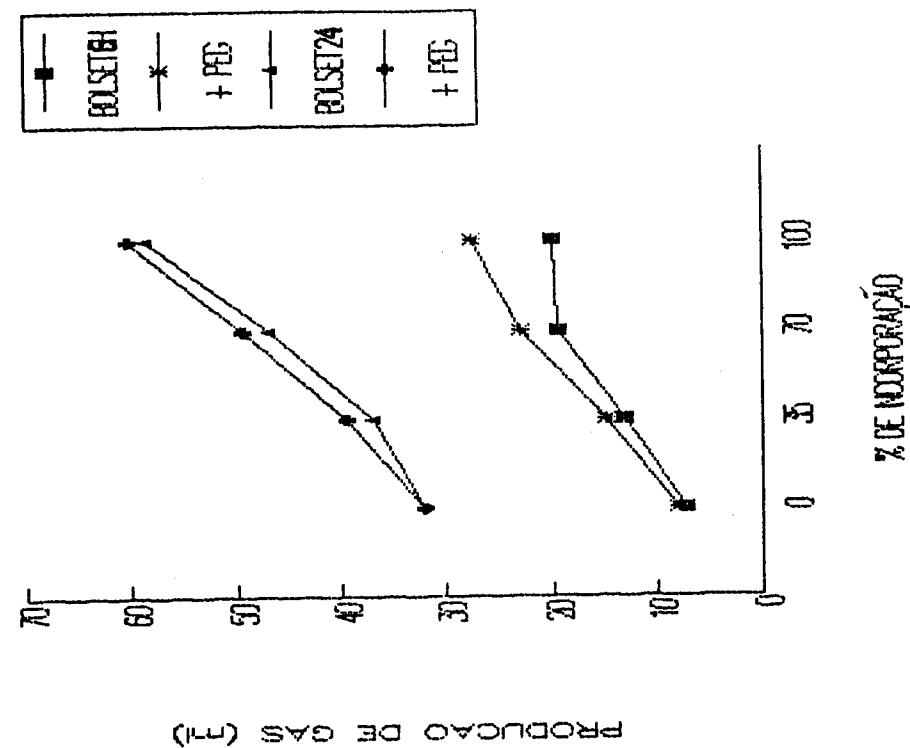


Fig-2.2-

Efeito da % de incorporação de bolota de Outubro e do PEG na produção de gás às 6 e 24 h

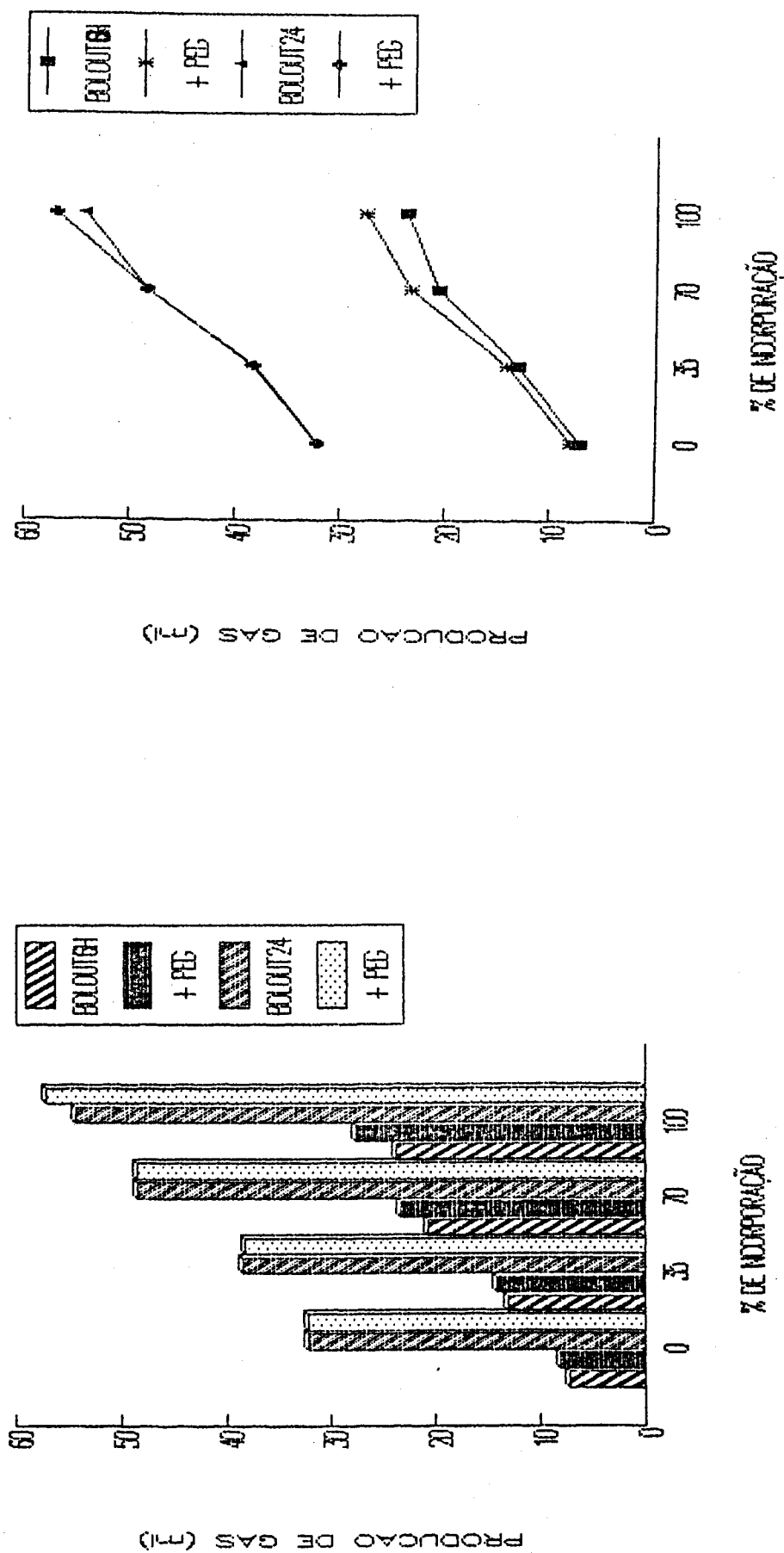


Fig-2.3-

Efeito da % de incorporação de bolota de No-
vembro e do PEG na produção de gás às 6 e 24 h

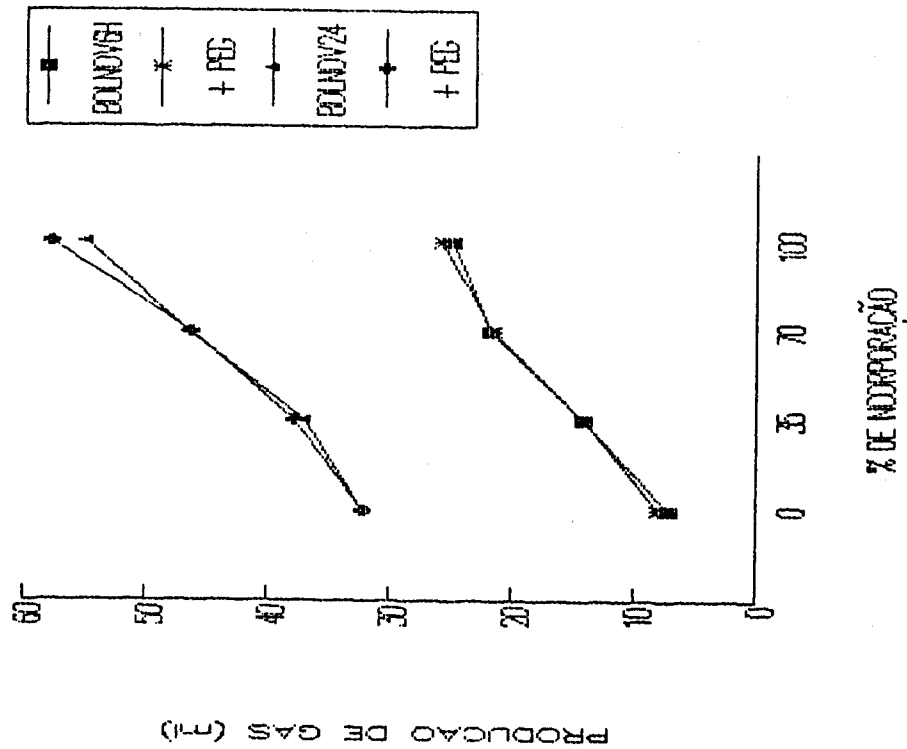
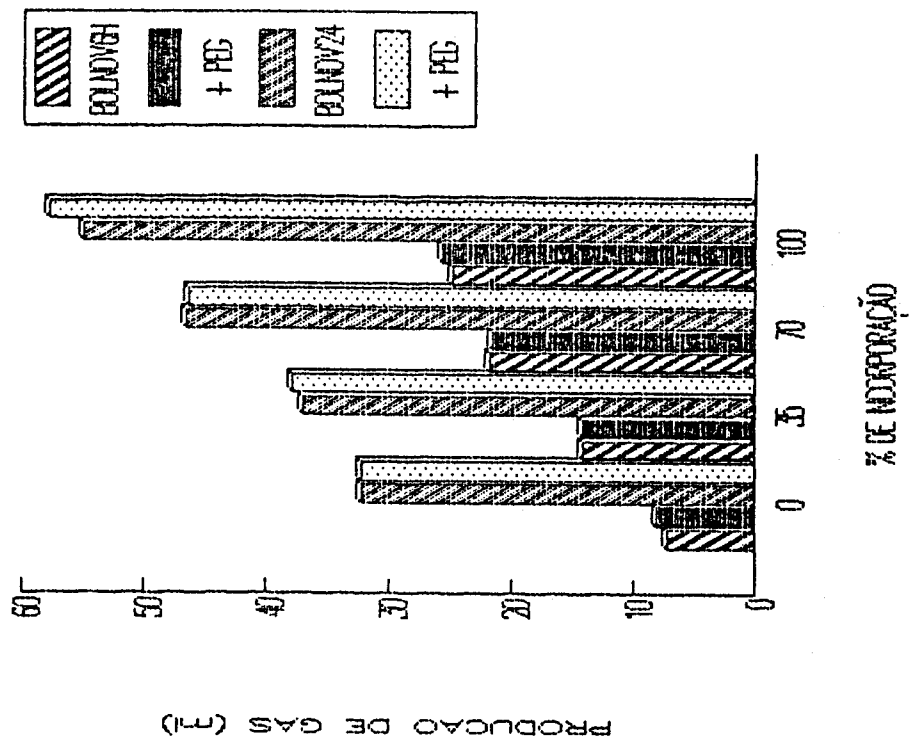
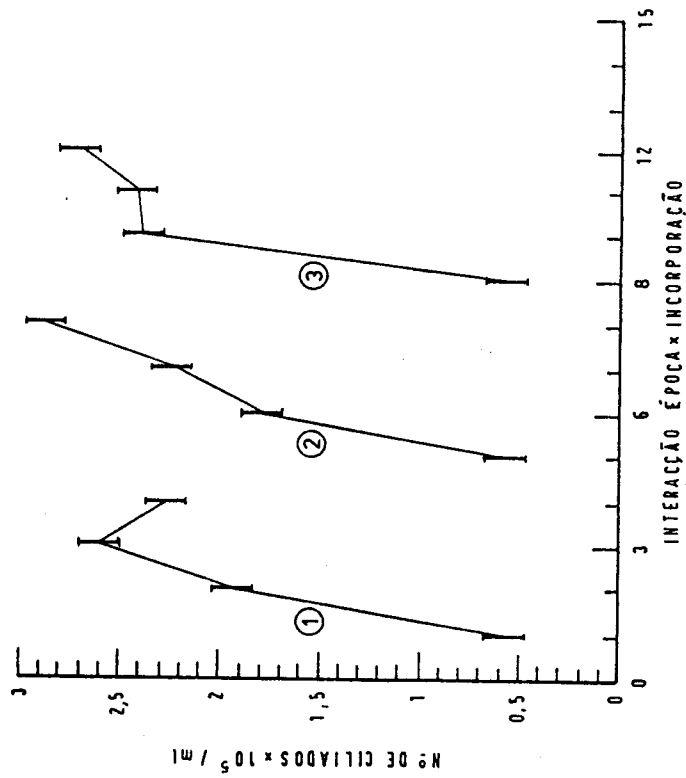


FIG-2-4-

Efeito da % de incorporação de bolota e do seu estado de maturação na população de ciliados.



LEGENDA

① - BOLOTA COLHIDA EM SETEMBRO ② - BOLOTA COLHIDA EM OUTUBRO ③ - BOLOTA COLHIDA EM NOVEMBRO

FIG-2-5-

Efeito do estado de maturação da bolota e da incorporação de PEG na população de ciliados.

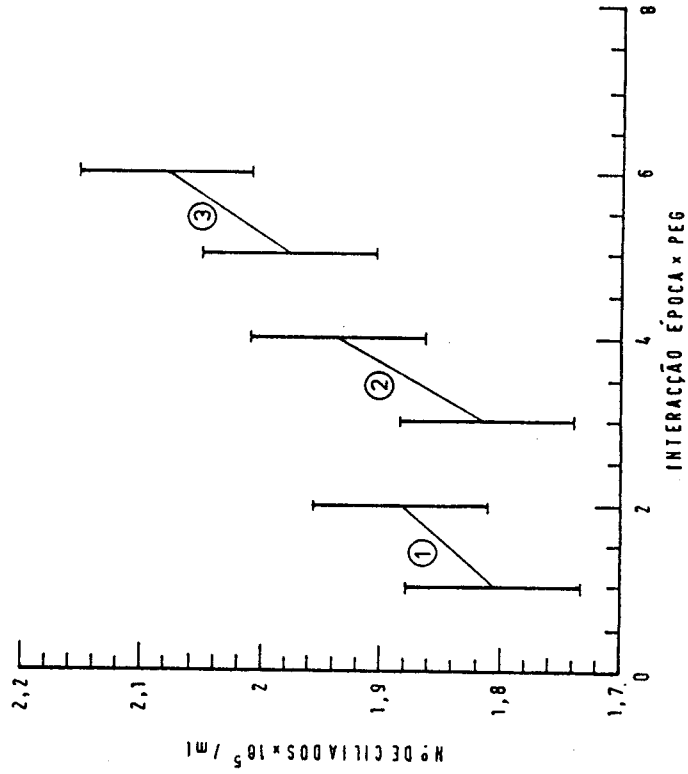


Fig-2-6-

Efeito do estado de maturação da bolota na população de ciliados.

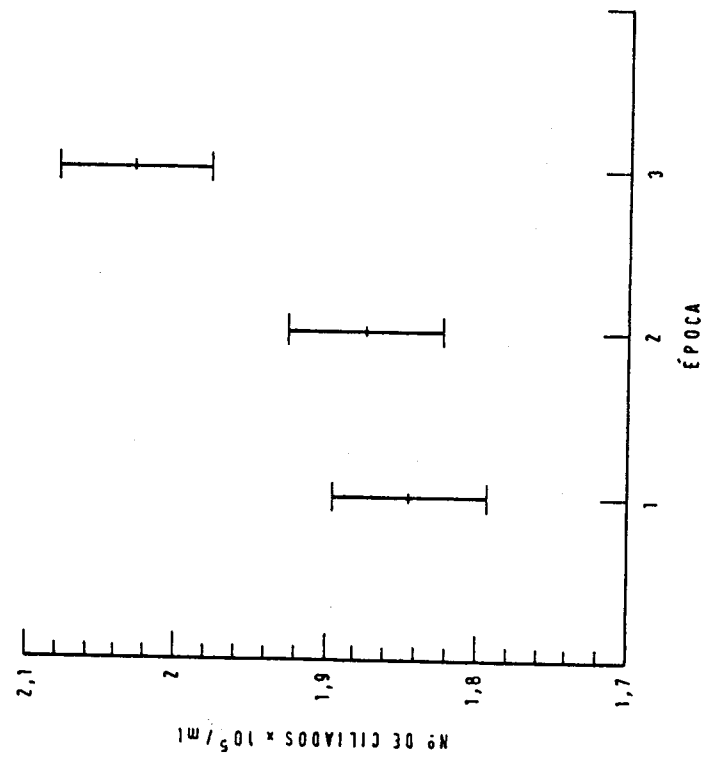
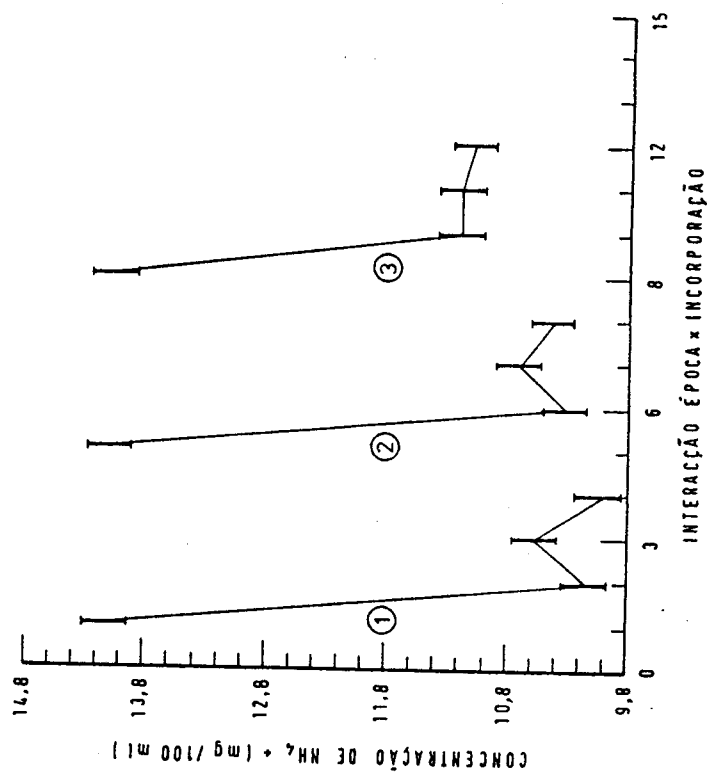


Fig-2-7-

Efeito da % de incorporação de bolota e do estado de maturação nas concentrações de N-NH₄.



LEGENDA

- ① - BOLOTA COLHIDA EM SETEMBRO
- ② - BOLOTA COLHIDA EM OUTUBRO
- ③ - BOLOTA COLHIDA EM NOVEMBRO

Fig-2-8-

Efeito da % de incorporação de bolota e da inclusão de PEG nas concentrações de $N-NH_4$.

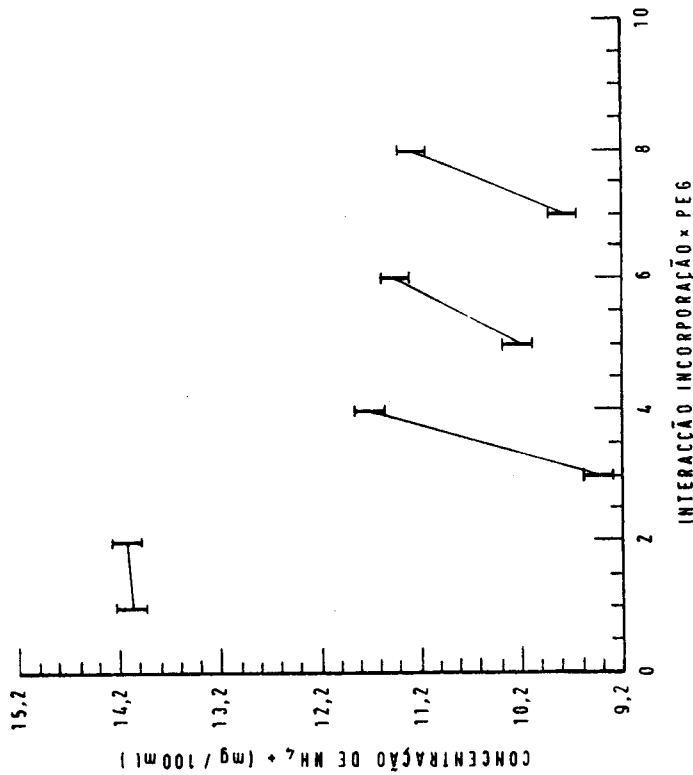
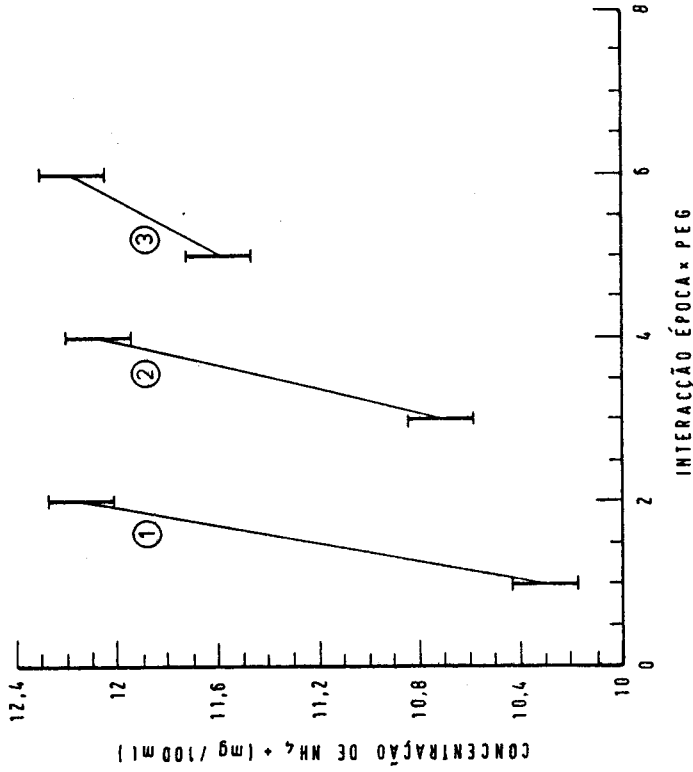


Fig-2-9-

Efeito do estado de maturação da bolota e da inclusão de PEG nas concentrações de $N-NH_4$.



LEGENDA

- ① - BOLOTA COLHIDA EM SETEMBRO
- ② - BOLOTA COLHIDA EM OUTUBRO
- ③ - BOLOTA COLHIDA EM NOVEMBRO

Fig-2-10-

Influência da suplementação proteica e da inclusão de PEG nas misturas contendo bolota de Setembro, nas produções de gás às 6 e 24 h.

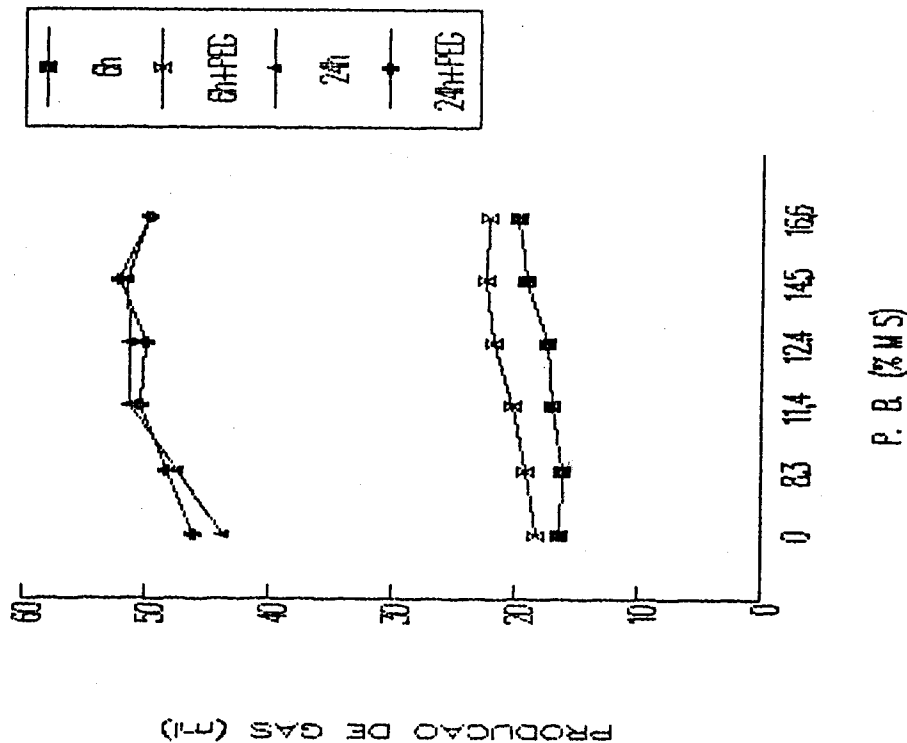
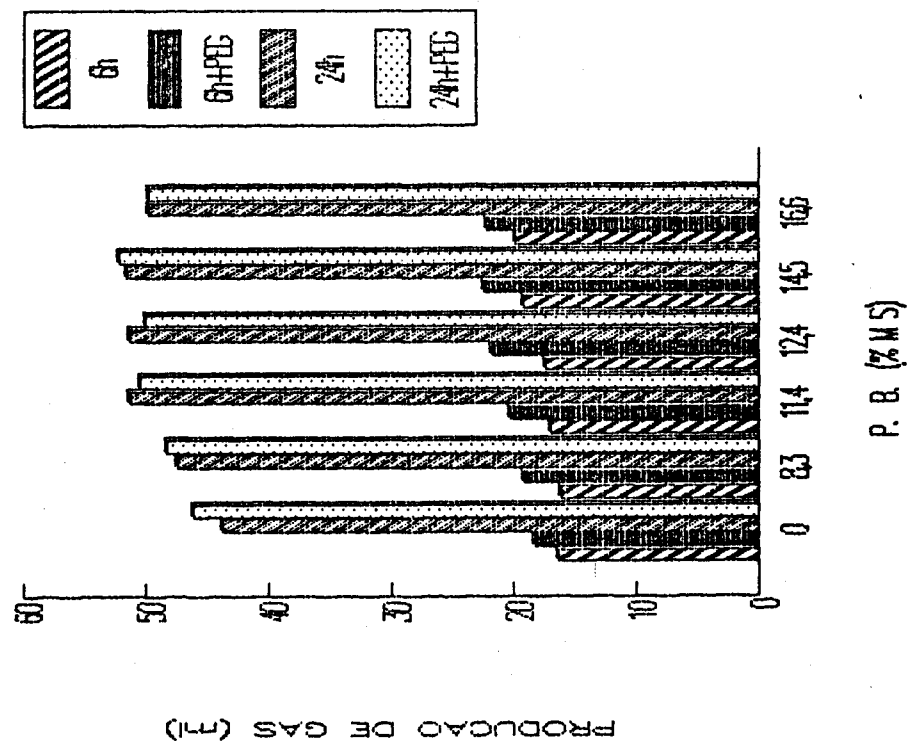


Fig-2-11.

Influência da suplementação proteica e da inclusão de PEG nas misturas contendo bolota de Novembro nas produções de gás às 6 e 24 h de incubação.

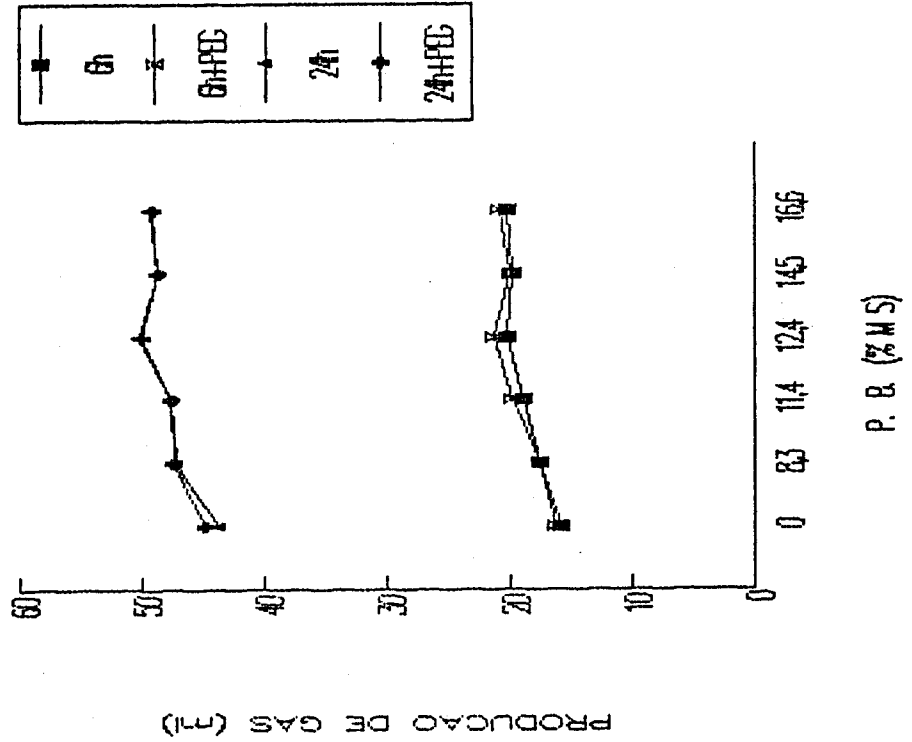
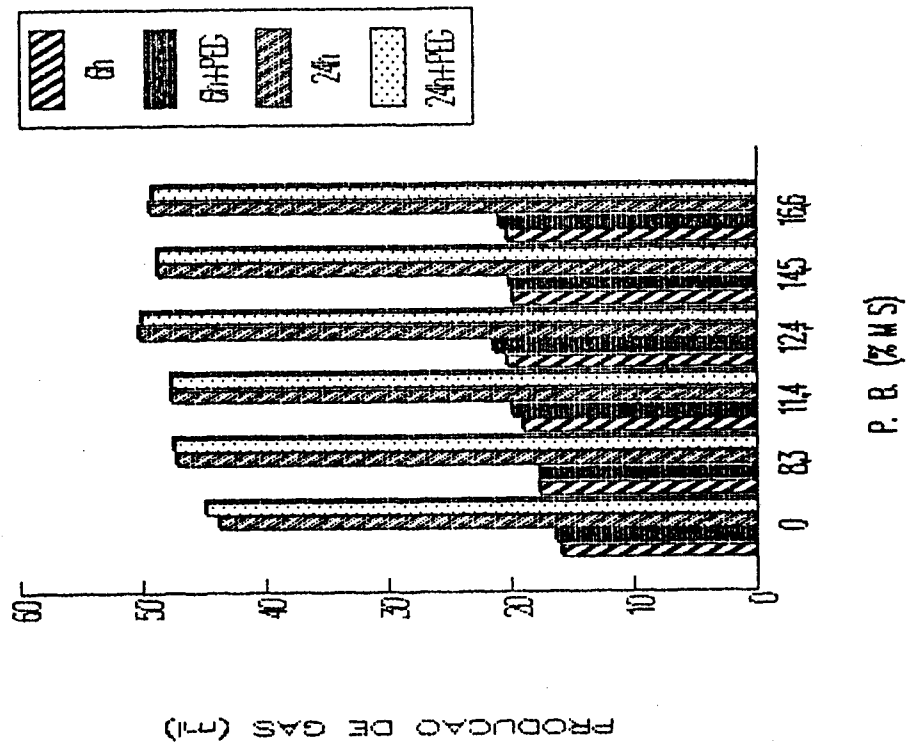


Fig. 2-12.

Produções de gás às 6 e 24 h de incubação na fermentação de amostras esofágicas colhidas em ovinos numa pastagem natural.

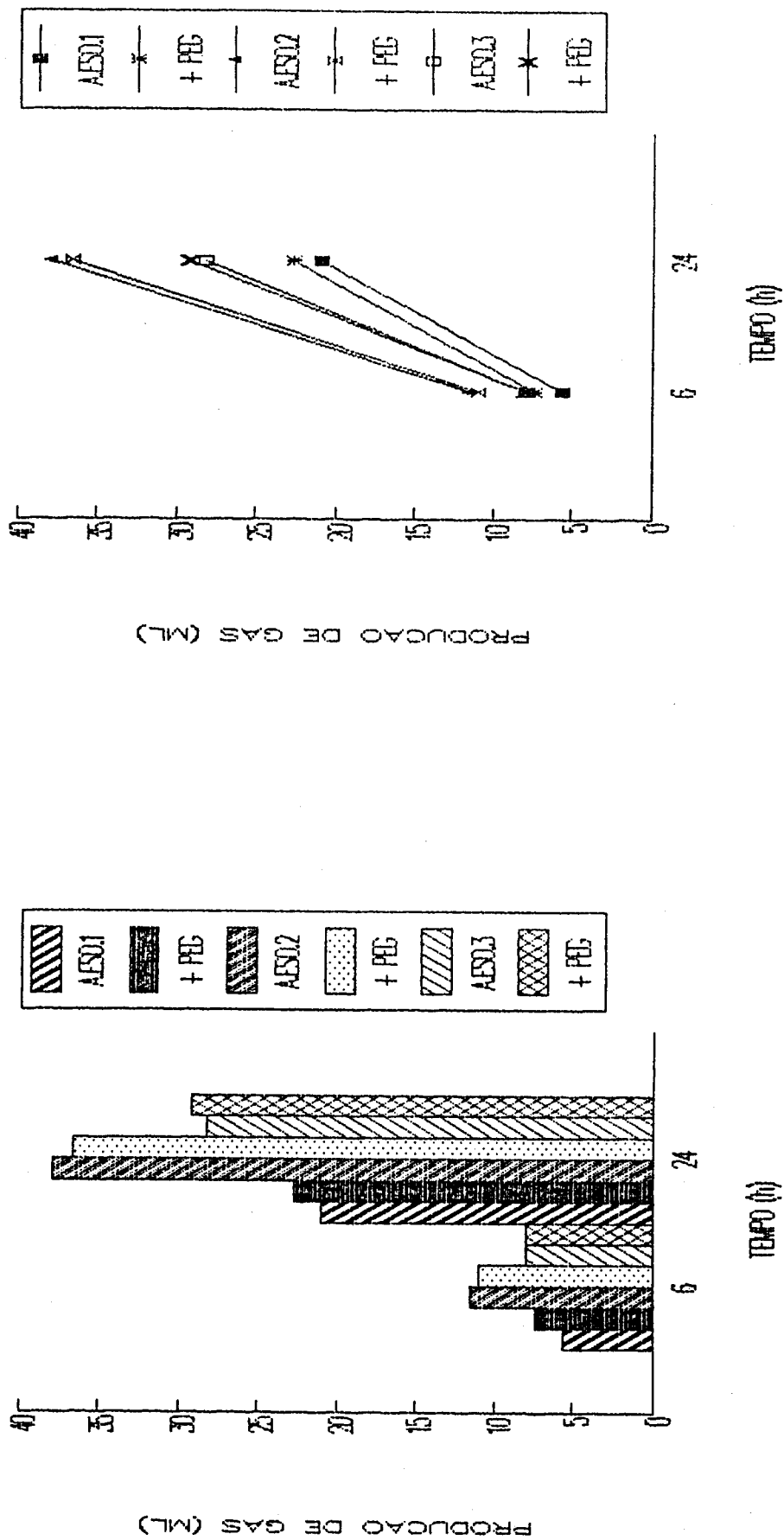
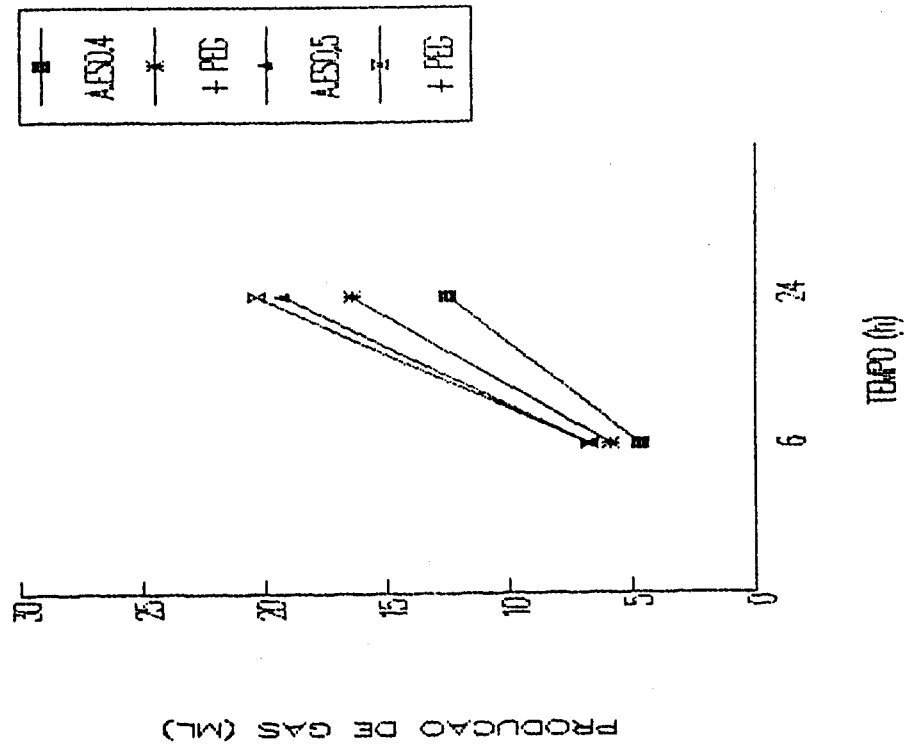
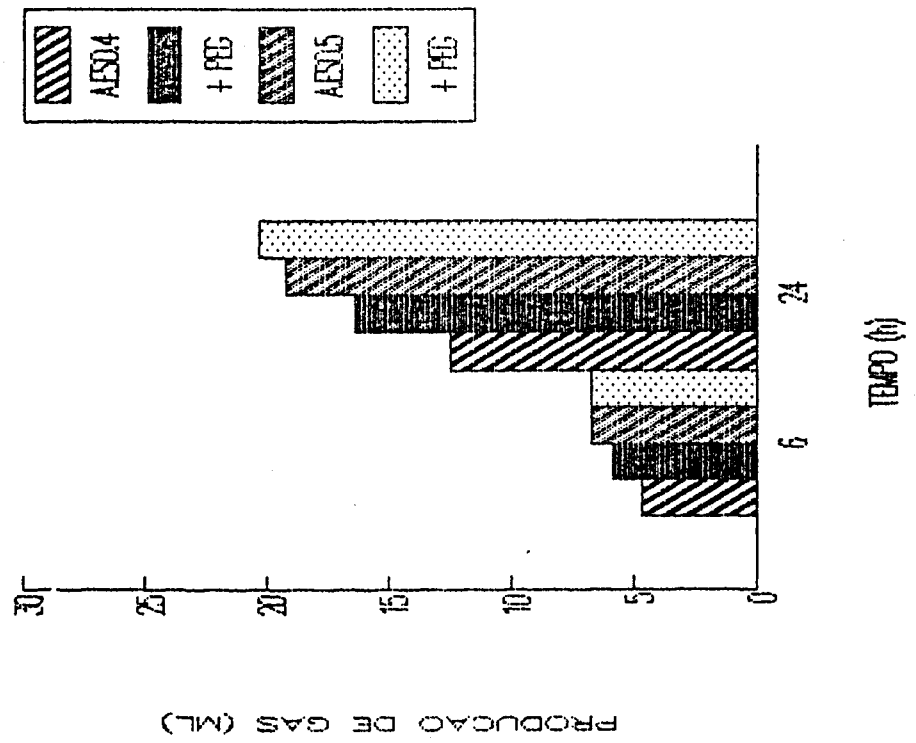


Fig-2-13-

Produções de gás às 6 e 24 h de incubação na fermentação de amostras esofágicas colhidas em ovinos numa pastagem de trevo subterrâneo.



CAPÍTULO 3

ESTUDO DO EFEITO DA FRACÇÃO LIPÍDICA DA BOLOTA NA FERMENTAÇÃO DO CONTEÚDO RETÍCULO-RUMINAL "IN VITRO"

3.1. INTRODUÇÃO

Os microorganismos do retículo-rumen, são responsáveis pela forte acção hidrolítica sobre os lípidos triacilglicéridos (GARTONM et al., 1958; GARTON et al., 1961), acção que se estende, também, aos fosfolípidos, que são hidrolisados libertando ácidos gordos, glicerol e bases azotadas (DAWSON, 1959).

Esta actividade hidrolítica sobre os lípidos que penetram no retículo-rumen com a ingesta pode, em determinadas circunstâncias, ter consequências negativas para o funcionamento metabólico do ecossistema. Com efeito, os ácidos gordos de cadeia longa (AGCL) libertados na lipólise, quando em concentrações elevadas, podem interferir na digestão de outros componentes da dieta, muito particularmente na digestão da celulose (BROOKS et al., 1954; WARD et al., 1957). Paralelamente existem indicações de que os AGCL inibem a actividade bacteriana em cultura pura (HENDERSON, 1973), complexando-se com as paredes celulares bacterianas (MAXCY e DILL, 1967; HENDERSON, 1973; WIEMAN, 1954).

A bolota, particularmente a de azinho (Q. ilex), apresenta na sua constituição química um teor apreciável em

lípidos, que podem representar cerca de 11% MS (CARVALHO, 1979). Estes lípidos são fundamentalmente triacilglicéridos com baixo índice de saturação, fundamentalmente definidos na sua constituição por ácido oleico (C_{18}^1 - 66,95%), ácido linoleico (C_{18}^{2-} - 15,69%) e ácido palmítico (C_{16} , 14,06 %) (CARVALHO, 1979). Com a bolota, os animais podem ingerir grandes quantidades de lípidos (8% MS), ultrapassando os limites de tolerância para os ruminantes, que se situam na ordem de 4 - 5% MS (CHURCH, 1979). Esta situação agrava-se ainda mais quando a bolota se encontra parasitada por lagartas, onde o extracto etéreo (EE) pode fornecer valores da ordem de 15% MS (FERREIRA, 1984). Este facto, colocou-nos o imperativo de estudar o efeito do EE da bolota na digestão dos constituintes fundamentais da parede celular vegetal, procurando simular as condições do montado em anos secos.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Nestes estudos foi utilizada bolota de azinho (*Q. ilex* L) proveniente de uma herdade pertencente ao concelho de Beja. A palha e feno de pastagem natural, foram fornecidos pela Herdade Experimental da Mitra da Universidade de Évora.

Os extractos lipídicos foram obtidos a partir da referida bolota, utilizando como extractante éter do petróleo. O éter foi posteriormente volatilizado em corrente de azoto, atmosfera em que o extrato foi mantido em ambiente refrigerado até à sua posterior utilização.

O método dos detergentes (VAN SOEST, 1982.) foi utilizado para tratar a palha e o feno, para a obtenção da fibra insolúvel no detergente neutro (NDF) e da fibra insolúvel no detergente ácido (ADF).

O conteúdo retículo-ruminal para os fermentadores, foi fornecido pelos mesmos animais, conforme anteriormente referido no texto (Parte III - Cap.1). Porém, os animais foram previamente suplementados na sua dieta com óleo vegetal, que foi introduzido no compartimento ruminal através da cânula, a fim de garantir uma maior capacidade lipolítica.

Misturas de bolota + palha (70:30), palha (inteira e fracções NDF e ADF) e feno (inteiro e fracções NDF e ADF), na quantidade de 200 mg, foram os substratos utilizados nas fermentações. Adicionalmente foram utilizados também celulose pura (papel de filtro Whatman nº1), xilano (Sigma), pectina (Sigma) e amido de arroz (BDH), também na mesma quantidade. A todos os substratos (a bolota sem lípidos) foi adicionado o EE da bolota nas quantidades calculadas para simularem a bolota com 0, 5, 10 e 15% de EE na MS.

A fim de testar o efeito dos AGCL libertados na hidrólise dos lípidos da bolota, na degradação dos mesmos substratos, foi utilizado como tratamento fluido ruminal incubado anaerobicamente durante três dias, com o EE de bolota. Foram utilizados 4 níveis de incorporação do fluido ruminal fermentado, em substituição da água utilizada na preparação da mistura mineral destinada aos fermentadores.

A produção de gás total foi medida directamente nos fermentadores. O $N-NH_4^+$ foi determinado por destilação como

anteriormente, mas a leitura foi feita às 48 h. O número de ciliados foi determinado, de acordo com a metodologia anteriormente proposta (pg.128), apenas nas fermentações das misturas alimentares contendo bolota.

Foram colhidas amostras de gás às 24 h de incubação, directamente a partir dos fermentadores, que foram posteriormente analisadas para o metano (CH_4) e para o dióxido de carbono (CO_2), em cromatógrafo de gás Perkin-Elmer munido de um detector de termocondutividade, utilizando N_2 como gás vector.

Os resultados foram tratados por análise de variância "one-way" (SNEDECOR e COCHRAN, 1967) e por regressão linear simples (STEEL e TORRIE, 1982).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Efeito do EE da bolota. Conforme se pode verificar no Quadro 3.1., a mistura contendo bolota tratada produziu significativamente mais gás ($P < 0,001$) que a mistura contendo bolota integral, tendo produzido também, significativamente mais NH_4^+ ($P < 0,001$). A incorporação de EE de bolota, diminuiu significativamente a produção de gás ($P < 0,001$), sendo o efeito mais pronunciado às 48 h de incubação. Os valores da concentração para a NH_4^+ também foram afectados significativamente pelos tratamentos ($P < 0,001$) (Vidé Anexos).

Na fermentação da palha e da sua fracção NDF a produção de gás foi significativamente influenciada pelos

tratamentos. A produção de gás diminuiu com os tratamentos.

Quadro 3.1.. Efeito do E.E da bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação de misturas contendo bolota (70%) + palha (30%) ($\bar{x} \pm e.p.m.$).

E.E. de Bolota (mg)	Tempo de incubação (H)			
	6	12	24	48
M.R.*	18,00 ^a ± 0,20	25,63 ^a ± 0,20	34,76 ^a ± 0,31	43,00 ^b ± 0,54
0	20,25 ^c ± 0,32	28,13 ^b ± 0,41	36,13 ^b ± 0,63	45,25 ^c ± 0,72
7	19,38 ^b ± 0,24	27,51 ^b ± 0,38	34,63 ^a ± 0,60	41,00 ^a ± 0,50
14	19,25 ^b ± 0,43	27,88 ^b ± 0,32	35,26 ^{ab} ± 0,43	40,13 ^a ± 0,77
21	19,83 ^{bc} ± 0,12	28,30 ^b ± 0,12	35,38 ^{ab} ± 0,20	40,50 ^a ± 0,20

* Mistura contendo bolota não tratada pelo éter.

Valores afectados por letras diferentes diferem significativamente para $P < 0,001$.

de uma forma bastante significativa, às 24 e 48 h ($P < 0,001$). Na fermentação do NDF a regressão da produção de gás (Quadro 3.11.) foi muito significativa, tanto às 24 como às 48 h de incubação ($P < 0,001$). Na fermentação do ADF da palha os tratamentos influenciaram as produções de gás de uma forma bastante significativa às 12, 24 e 48 h ($P < 0,001$). As produções foram, no entanto, negativas pelo facto de terem produzido menos gás que os brancos. De salientar o facto de o ADF tratado com o nível mais elevado de incorporação de EE ter produzido mais gás que o terceiro nível de incorporação, diferença que foi significativa ($P < 0,001$) às 6, 12, 24 e 48 h de incubação (Vidé Anexos).

Na fermentação do feno inteiro a produção de gás foi influenciada significativamente às 24 h ($P < 0,01$) e 48 h ($P < 0,05$) de incubação (Quadro 3.2.). A regressão também

Quadro 3.2. Efeito do E.E. da bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação de um feno ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

E.E. de Bolota (mg)	Tempo de fermentação (H)			
	6	12	24	48
0	25,34 ^a ± 0,17	39,00 ^a ± 1,66	48,67 ^c ± 0,17	50,67 ^{ab} ± 0,17
7	25,00 ^a ± 0,73	38,33 ^a ± 0,60	46,51 ^d ± 0,44	51,67 ^d ± 0,44
14	24,50 ^a ± 0,44	35,33 ^a ± 2,68	45,84 ^{ab} ± 0,58	51,50 ^d ± 1,04
21	24,17 ^a ± 1,15	37,00 ^a ± 1,15	44,67 ^a ± 0,73	48,67 ^a ± 0,44

Valores referenciados com letras diferentes, diferem significativamente.

Quadro 3.3.. Efeito do E.E. da bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação da fracção NDF de um feno ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

E.E. de Bolota (mg)	Tempo de fermentação (H)			
	6	12	24	48
0	4,67 ^b ± 0,25	16,67 ^b ± 1,01	39,17 ^b ± 0,73	54,50 ^b ± 0,29
7	4,17 ^b ± 0,30	16,67 ^b ± 0,33	40,34 ^b ± 0,76	56,00 ^b ± 0,58
14	2,67 ^a ± 0,29	12,17 ^a ± 0,67	34,84 ^a ± 0,76	51,17 ^a ± 0,83
21	2,84 ^a ± 0,17	13,17 ^a ± 0,60	36,01 ^a ± 0,73	51,33 ^a ± 0,83

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

Quadro 3.4. Efeito do E.E. da bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação da fracção ADF de um feno ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

E.E. de Bolota (mg)	Tempo de fermentação (H)			
	6	12	24	48
0	1,00 ^a ± 0,88	2,17 ^a ± 1,17	1,84 ^a ± 1,15	-1,67 ^{ab} ± 1,17
7	0,50 ^a ± 0,33	2,33 ^a ± 0,33	2,17 ^a ± 0,33	-1,00 ^{ab} ± 0,50
14	-1,00 ^a ± 0,60	0,00 ^a ± 0,50	0,00 ^a ± 0,67	-3,00 ^a ± 0,76
21	0,00 ^a ± 0,67	2,33 ^a ± 0,67	2,34 ^a ± 0,76	0,33 ^b ± 1,01

valores afectados com letras diferentes, diferem significativamente

Quadro 3.5. Efeito do E.E. da bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação de celulose pura ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

E.E. de Bolota (mg)	Tempo de fermentação (H)		
	12	24	48
0	11,84 ^a ± 0,44	51,67 ^a ± 0,29	75,33 ^a ± 0,44
7	9,00 ^a ± 0,93	50,50 ^{ab} ± 0,93	75,33 ^a ± 0,44
14	12,50 ^a ± 0,44	49,84 ^{ab} ± 1,67	73,00 ^b ± 0,50
21	11,34 ^a ± 0,33	48,67 ^b ± 0,76	70,83 ^c ± 0,73

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

foi influenciada significativamente às 24 h ($P < 0,01$) e 48 h ($P < 0,05$) de incubação (Quadro 3.10.). A regressão também foi muito significativa ($P < 0,001$) às 24 h de incubação. As concentrações de $N-NH_4^+$ apresentaram diferenças entre os tratamentos que foram muito significativas entre si ($P < 0,001$), tendo a regressão sido também muito significativa ($P < 0,001$). A produção de gás na fermentação da fracção NDF do feno foi influenciada significativamente pelos tratamentos ($P < 0,01$) (Quadro 3.3.), contudo, entre os tratamentos as diferenças não foram significativas entre o primeiro e o segundo tratamento, e entre o terceiro e o quarto tratamento. As concentrações de NH_4^+ não diferiram significativamente com os tratamentos. A fermentação do ADF do feno não apresentou diferenças significativas na produção de gás, fornecendo valores negativos para a produção de gás. As concentrações de NH_4^+ foram influenciadas significativamente pelos tratamentos ($P < 0,001$). Foram encontradas diferenças significativas na concentração de NH_4^+ apenas entre o primeiro tratamento e

Quadro 3.6. Efeito do E.E. da bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação de uma palha ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

E.E. de Bolota (mg)	Tempo de fermentação (H)			
	6	12	24	48
0	4,25 ^a ± 0,32	15,50 ^a ± 0,32	30,75 ^{bc} ± 0,37	39,01 ^a ± 0,31
7	5,75 ^{bc} ± 0,14	17,25 ^c ± 0,20	32,01 ^c ± 0,24	39,38 ^a ± 0,29
14	6,25 ^b ± 0,14	16,83 ^{bc} ± 0,24	29,35 ^b ± 0,60	34,28 ^a ± 1,30
21	5,13 ^c ± 0,38	15,83 ^{ab} ± 0,52	25,23 ^a ± 1,14	26,90 ^a ± 2,67

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

Quadro 3.7. Efeito do E.E. de bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação da fracção NDF de uma palha ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

E.E. de Bolota (mg)	Tempo de fermentação (H)			
	6	12	24	48
0	0,88 ^b ± 0,99	16,70 ^b ± 2,74	38,98 ^c ± 3,56	49,28 ^c ± 4,23
7	1,50 ^b ± 0,68	17,33 ^b ± 1,09	35,73 ^c ± 1,43	45,03 ^c ± 1,88
14	2,00 ^b ± 0,25	15,33 ^b ± 0,71	25,35 ^b ± 1,01	30,78 ^b ± 1,14
21	-3,25 ^a ± 1,79	7,45 ^a ± 3,09	16,60 ^a ± 2,98	16,40 ^a ± 4,42

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

Quadro 3.8. Efeito do E.E. da bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação da fracção ADF de uma palha ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

E.E. de Bolota (mg)	Tempo de fermentação (H)			
	6	12	24	48
0	-4,66 ^c ± 1,96	-4,83 ^c ± 2,16	-6,33 ^c ± 2,46	-8,67 ^c ± 3,07
7	-13,16 ^{ab} ± 0,24	-15,33 ^a ± 0,24	-17,99 ^a ± 0,24	-22,17 ^a ± 0,12
14	-14,33 ^a ± 0,50	-16,67 ^a ± 0,12	-19,16 ^a ± 0,35	-23,33 ^a ± 0,12
21	-10,33 ^b ± 0,20	-11,25 ^b ± 0,31	-13,16 ^b ± 0,41	-16,50 ^b ± 0,61

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

Quadro 3.9. Efeito do E.E. da bolota nos valores do $N-NH_4^+$ (mg/100 ml) na fermentação de uma mistura Bolota (70%) + Palha (30%), numa palha e de um feno, às 48 h de incubação ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

E.E. de Bolota (mg)	Substracto		
	Bolota + Palha	Palha	Feno
0	5,78 ^c ± 0,014	25,32 ^a ± 0,610	32,06 ^c ± 0,320
7	5,04 ^b ± 0,171	26,58 ^b ± 0,100	33,43 ^d ± 0,510
14	4,22 ^a ± 0,020	25,83 ^{ab} ± 0,260	30,66 ^b ± 0,840
21	5,51 ^c ± 0,004	26,40 ^{ab} ± 0,310	25,73 ^a ± 0,300

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

todos os outros e entre o segundo e terceiro tratamentos.

Na fermentação da celulose pura, as produções de gás foram influenciadas pela incorporação de EE de bolota, tendo as diferenças sido muito significativas ($P < 0,001$) às 48 h de incubação (Quadro 3.5.) (Vidé anexos). As regressões às 24 e 48 h de incubação (Quadro 3.11.) foram também altamente

Quadro 3.10. Efeito de E.E da bolota no Nº de ciliados e na percentagem relativa de CO_2 e CH_4

E.E. de Bolota (mg)	Ciliados $\times 10^5/ml$	% da mistura dos dois gases	
		CH_4	CO_2
0	1,80 ^b ± 0,01	49,71 ^b ± 1,06	50,25 ^b ± 1,45
7	2,14 ^c ± 0,04	42,20 ^a ± 0,58	57,76 ^b ± 0,60
14	1,89 ^b ± 0,10	42,37 ^a ± 0,49	57,61 ^b ± 0,44
21	1,38 ^a ± 0,01	47,76 ^b ± 0,61	52,23 ^a ± 0,16

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

significativas, respectivamente para $P < 0,01$ e $P < 0,001$).

As fermentações do amido, xilano e pectina, não foram influenciados pela incorporação de EE de bolota.

A população de ciliados, estimada nas misturas bolota + palha, foi influenciada significativamente ($P < 0,001$) apenas

Quadro 3.11. Produção de gás às 24 e 48 h em função da quantidade de E.E. adicionado ($Y = \text{PG H}$, $X = \text{mg de E.E.}$)

Substrato	Equação de regressão	n	r	$S_{y.x}$
Celulose (24 h)	$Y = 52,59 - 0,97X$ **	12	-0,772	0,973824
Celulose (48 h)	$Y = 77,58 - 1,58X$ ***	12	-0,875	1,070440
Feno (24 h)	$Y = 49,59 - 1,27X$ ***	12	-0,868	0,886002
Palha (24 h)	$Y = 34,14 - 1,92X$ ***	16	-0,765	1,935110
Palha (48 h)	$Y = 45,25 - 4,14X$ ***	16	-0,818	3,484640
NDF-Palha (24 h)	$Y = 48,54 - 7,75X$ ***	16	-0,882	4,936650
NDF-Palha (48 h)	$Y = 63,59 - 11,29X$ ***	16	-0,896	6,700650

com a incorporação do nível mais elevado de EE (Quadro 3.10).

A percentagem relativa de CH_4 e de CO_2 na fase gasosa dos fermentadores com bolota tratada + palha variou com os tratamentos. A percentagem relativa de CH_4 baixou significativamente ($P < 0,001$) com a incorporação de EE (Quadro 3.10.).

3.3.1. Efeito da incorporação de AGCL. Na fermentação da palha a incorporação de AGCL influenciou significativamente ($P < 0,001$) a produção de gás às 6, 12, 24 e 48 h de incubação, que diminuiu com a incorporação de AGCL (Quadro 3.12.). No entanto, às 48 h de incubação os fermentadores com a incorporação mais elevada de AGCL foram os que produziram mais gás ($P < 0,001$). As regressões foram também muito

significativas às 6, 12 e 24 h de incubação ($P < 0,001$) (Quadro 3.19). As concentrações de $N-NH_4^+$ foram também afectadas significativamente ($P < 0,001$) pela incorporação de AGCL (Quadro 3.17.). Na fermentação do NDF da palha a

Quadro 3.12. Efeito dos AGCL da bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação de uma palha ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Mistura de AGCL	Tempo de fermentação (H)			
	6	12	24	48
Nível 1	4,83 ^c \pm 0,17	11,67 ^d \pm 0,29	27,00 ^c \pm 0,29	30,17 ^c \pm 0,29
Nível 2	3,67 ^b \pm 0,17	10,17 ^c \pm 0,29	25,50 ^c \pm 0,29	28,67 ^b \pm 0,29
Nível 3	2,67 ^b \pm 0,33	8,34 ^b \pm 0,33	23,33 ^b \pm 0,44	26,00 ^a \pm 0,58
Nível 4	0,83 ^a \pm 0,44	5,67 ^a \pm 0,58	19,67 ^a \pm 0,73	31,67 ^d \pm 0,58

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

Quadro 3.13. Efeito dos AGCL da bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação da fracção NDF de uma palha ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Mistura de AGCL	Tempo de fermentação (H)			
	6	12	24	48
Nível 1	1,67 ^b \pm 0,17	10,00 ^c \pm 0,17	35,00 ^a \pm 0,50	54,17 ^a \pm 0,29
Nível 2	1,17 ^{ab} \pm 0,83	9,50 ^{bc} \pm 1,48	34,17 ^a \pm 2,13	52,34 ^a \pm 3,11
Nível 3	0,00 ^{ab} \pm 0,50	6,84 ^{ab} \pm 0,69	31,00 ^a \pm 1,50	38,84 ^b \pm 1,86
Nível 4	-0,33 ^a \pm 0,17	6,67 ^a \pm 0,50	31,00 ^a \pm 0,50	48,34 ^c \pm 0,44

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

produção de gás diminuiu com o aumento de incorporação de AGCL, diminuição que apenas foi significativa às 6 h de

incubação ($P < 0,05$). As concentrações de $N-NH_4^+$ foram significativamente afectados pelos tratamentos ($P < 0,001$), apresentando um perfil muito semelhante com o da fermentação da palha inteira (Vidé Anexos).

Na fermentação do feno a produção de gás foi

Quadro 3.14. Efeito dos AGCL da bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação de um feno ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Mistura de AGCL	Tempo de fermentação (H)			
	6	12	24	48
Nível 1	17,50 ^b \pm 0,29	29,00 ^{ab} \pm 0,33	40,50 ^{ab} \pm 0,29	47,84 ^{ab} \pm 0,44
Nível 2	18,67 ^c \pm 0,44	29,84 ^b \pm 0,60	40,50 ^b \pm 1,04	49,17 ^b \pm 1,50
Nível 3	15,50 ^a \pm 0,50	28,34 ^a \pm 0,17	39,17 ^a \pm 0,33	45,84 ^a \pm 0,60
Nível 4	16,33 ^a \pm 0,33	28,34 ^a \pm 0,44	39,00 ^a \pm 0,29	45,84 ^a \pm 0,60

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

Quadro 3.15. Efeito dos AGCL da bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação da fracção NDF de um feno ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Mistura de AGCL	Tempo de fermentação (H)			
	6	12	24	48
Nível 1	2,17 ^c \pm 0,17	7,34 ^b \pm 0,17	33,33 ^b \pm 1,09	53,84 ^c \pm 0,67
Nível 2	2,83 ^d \pm 0,17	9,50 ^c \pm 0,17	37,17 ^c \pm 0,33	57,17 ^d \pm 0,76
Nível 3	0,83 ^a \pm 0,17	4,17 ^a \pm 0,29	30,50 ^a \pm 0,58	38,67 ^a \pm 0,87
Nível 4	1,50 ^b \pm 0,25	4,84 ^a \pm 0,33	30,83 ^a \pm 0,60	48,17 ^b \pm 0,50

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

significativamente influenciada pelos tratamentos apenas às 6h de incubação ($P < 0,001$) e às 24 h de incubação ($P < 0,05$) (Quadro 3.14.). As concentrações de NH_4^+ baixaram

(Quadro 3.17.), tendo a regressão sido também muito significativa ($P < 0,001$). Na fermentação do NDF da palha, as produções de gás foram influenciadas significativamente ($P < 0,001$) pelos tratamentos (Quadro 3.13.),

Quadro 3.16..Efeito dos AGCL da bolota na produção de gás (ml) a partir da fermentação da celulose pura ($\bar{X} \pm e.p.m.$).

Mistura de AGCL	Tempo de fermentação (H)		
	12	24	48
Nível 1	10,84 ^c \pm 0,29	54,50 ^c \pm 0,33	75,84 ^b \pm 0,33
Nível 2	11,84 ^c \pm 0,58	54,50 ^c \pm 0,73	76,17 ^b \pm 0,76
Nível 3	8,01 ^b \pm 0,44	49,17 ^b \pm 0,87	72,00 ^a \pm 0,73
Nível 4	5,67 ^a \pm 0,60	44,67 ^a \pm 0,87	72,34 ^a \pm 0,60

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

Quadro 3.17. Efeito dos AGCL da bolota nos valores do $N-NH_4^+$ (mg/100 ml) na fermentação duma palha e de um feno, às 48 h de incubação ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Mistura de AGCL	Substracto	
	Palha	Feno
Nível 1	35,63 ^b \pm 0,36	46,03 ^c \pm 0,46
Nível 2	39,31 ^c \pm 0,06	44,73 ^{bc} \pm 0,61
Nível 3	35,81 ^b \pm 0,14	43,05 ^b \pm 0,61
Nível 4	33,74 ^a \pm 0,16	38,75 ^a \pm 0,46

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

Quadro 3.18. Efeito dos AGCL da bolacha no N^o de células

Mistura de AGCL	N ^o de células $\times 10^5 / \text{ml} (\bar{x} \pm \text{e.p.m.})$
Nível 1	1,33 ^A \pm 0,03
Nível 2	1,08 ^B \pm 0,02
Nível 3	0,79 ^C \pm 0,01
Nível 4	1,13 ^D \pm 0,02

Valores afectados por letras diferentes, diferem significativamente.

Quadro 3.19. Produção de gás em função do nível de AGCL incorporados, para alguns substractos

Substracto	Equação de regressão	n	r	S _{y.x}
Celulose (12 h)	Y = 13,92 - 1,93X ^{***}	12	-0,857	1,420680
Celulose (24 h)	Y = 59,42 - 3,48X ^{***}	12	-0,919	1,836440
Palha (6 h)	Y = 6,25 - 1,30X ^{***}	12	-0,952	0,514782
Palha (12 h)	Y = 13,92 - 1,78X ^{***}	12	-0,962	0,687386
Palha (24 h)	Y = 29,92 - 2,42X ^{***}	12	-0,952	0,946485

apresentando um perfil muito semelhante com a fermentação da palha. O segundo tratamento foi o que apresentou maiores produções de gás, e a produção mais baixa foi apresentada pelo terceiro tratamento. As concentrações de N-NH_4^+ foram significativamente diferentes ($P < 0,001$) entre os quatro tratamentos (Quadro 3.17.), tendo a regressão sido, de igual forma sido muito significativa ($P < 0,001$).

3.3.2. Substractos purificados - As produções de gás nas fermentações do amido, pectina e xilano não foram afectadas pelos tratamentos. Na fermentação da celulose, as produções de gás foram influenciadas significativamente ($P < 0,001$) pela

incorporação de AGCL (Quadro 3.16.). As diferenças entre os tratamentos apenas foram significativas entre os 2º, 3º e 4º tratamentos ($P < 0,001$). Tal como sucedeu com o NDF do feno, o segundo tratamento produziu mais gás que o primeiro e o quarto tratamento mais que o terceiro, não sendo as diferenças, no entanto, significativas.

3.4. DISCUSSÃO

Sem dúvida nenhuma que o E.E. da bolota interfere na fermentação retículo-ruminal de alguns componentes das misturas alimentares onde aparecem. A mistura contendo bolota não tratada pelo éter, produziu menos gás que a mistura contendo bolota tratada pelo éter. De igual forma a suplementação desta última com EE de bolota, baixou gradualmente a produção de gás e a relação $CO_2:CH_4$, diminuiu as concentrações de NH_4^+ , e o número de protozoários ciliados também baixou com a suplementação mais elevada.

A diminuição das produções de gás total, metanogénese e dos ciliados, estão em perfeito acordo com as observações efectuadas por outros autores (CZERKAWSKI, 1973). A tendência manifestada pelos valores da NH_4^+ , no entanto, desacorda com as observações efectuadas por outros autores, designadamente ROBERTSON e HAWKE (1964).

A diminuição da fermentabilidade da celulose pura e da fracção lenhina/celulose da palha e do feno, confirma as observações efectuadas por vários autores (BROOKS et al., 1954; DAWSON e WOODS, 1960).

O tratamento das fermentações com fluido reticulo-ruminal enriquecido com AGCL proveniente da hidrólise microbiana do EE da bolota, mostra claramente que são estes os verdadeiros inibidores da fermentação, que já às 6 h de fermentação interferem na digestão da fracção solúvel da palha e do feno. Esta actividade, provavelmente, será devida à interferência que os AGCL exercem nas células dos microorganismos (NIEMAN, 1954), por acção bacteriostática, ou por qualquer inibição competitiva que os AGCL exercem relativamente à síntese microbiana de AGCL, essenciais como elementos estruturais da parede celular (KODICEK e WORDEN, 1945; GALBRAITH et al., 1971).

De salientar, no entanto, que o primeiro nível de incorporação da mistura aumentou a produção de gás na fermentação da celulose, do feno e do NDF-Feno, tendo os AGCL da mistura funcionado, talvez, como factores estimulantes do crescimento microbiano (HENDERSON, 1973). Com efeito, o crescimento de Butyrivibrio fibrisolvens em cultura pura foi estimulado com a incorporação nos meios de cultura, de concentrações baixas de $C_{18}:0$, $C_{14}:0$ e $C_8:0$. O facto de nem a fermentação da palha, nem a fermentação do NDF-Palha terem manifestado o mesmo comportamento que a as fermentações da celulose e do feno, pode estar relacionado com as espécies bacterianas envolvidas na digestão da celulose. Na degradação da celulose das palhas, celulos com elevado índice de cristalinidade, a espécie Bacteroides succinogenes é a bactéria celulolítica que aparece associada com a sua degradação (HUNGATE, 1966).

Os protozoários ciliados baixaram gradualmente a sua população com a elevação do nível de incorporação de AGCL, provavelmente não a uma acção directa, mas devido à diminuição da população bacteriana (COLEMAN, 1975).

A relação $CO_2:CH_4$ não foi praticamente alterada com a incorporação da mistura AGCL. Com efeito, o grau de saturação dos AGCL era já bastante elevado, pelo que não seria de esperar grandes modificações naquela relação, pois é a presença dos ácidos insaturados que interfere na metanogénese (CZERKAWSKI et al., 1966; CZERKAWSKI, 1973). Um facto bastante marcante ressalta das observações feitas na fermentação dos ADF-Feno e ADF-palha. Com efeito, estes substratos desenvolveram persistentemente uma fermentação de tipo negativo, isto é, tal como anteriormente referido, produziram menos gás que os fermentadores sem substrato. Tal facto deve-se, porventura, à presença de muitos radicais fenólicos da lenhina expostos por acção do tratamento com o detergente ácido, os quais funcionam como inibidores do crescimento microbiano (CRAMPTON e MAYNARD, 1938).

CAPÍ TULO 3

ANEXOS

Fig-3-1-

Produções de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação de substratos contendo bolota não tratada (nr) e bolota tratada com éter e suplementada com 0, 7, 14 e 21 mg EE.

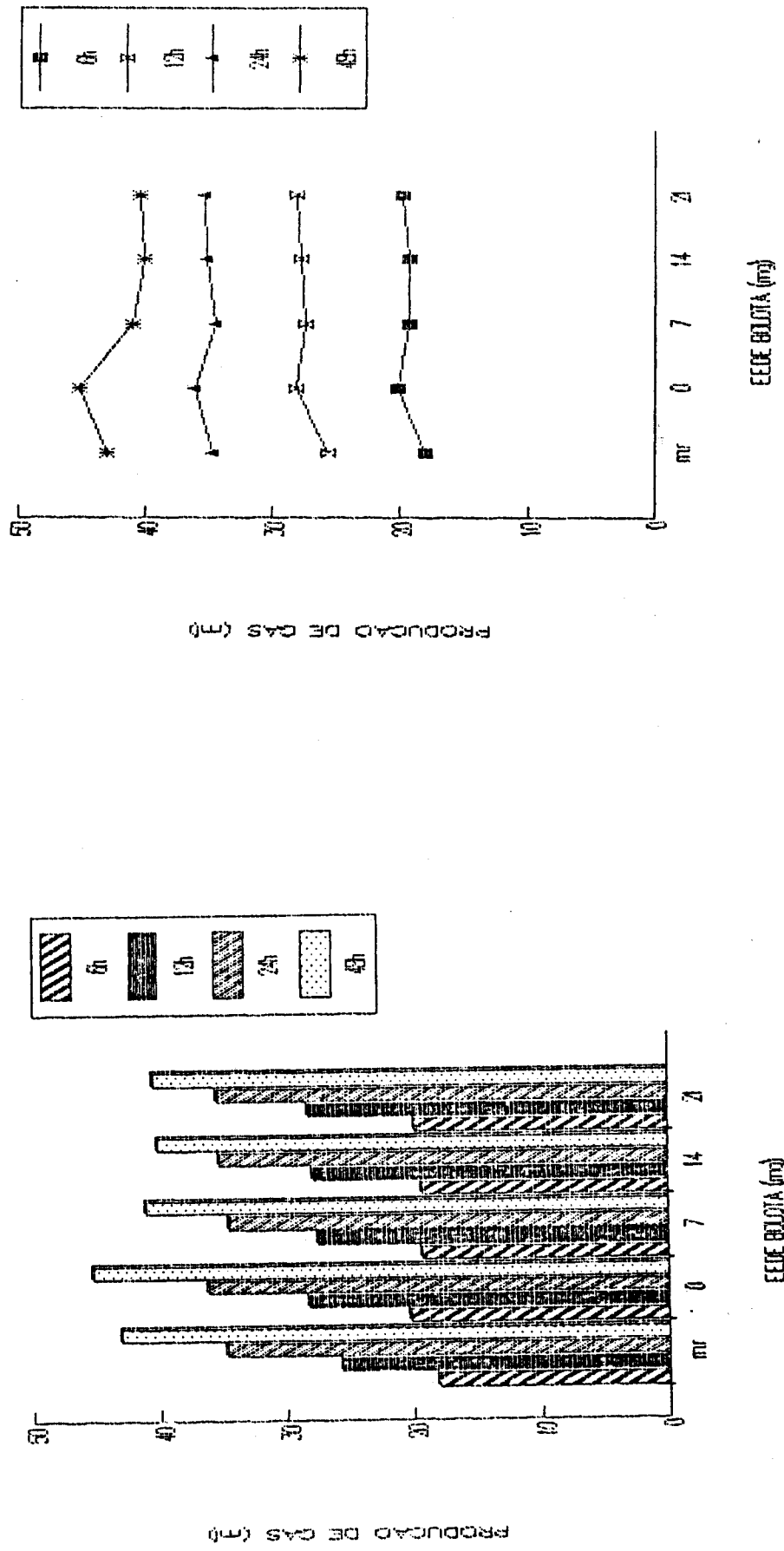


Fig-3-2-

Produção de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação de palha integral suplementada com 0, 7, 14 e 21 mg EE.

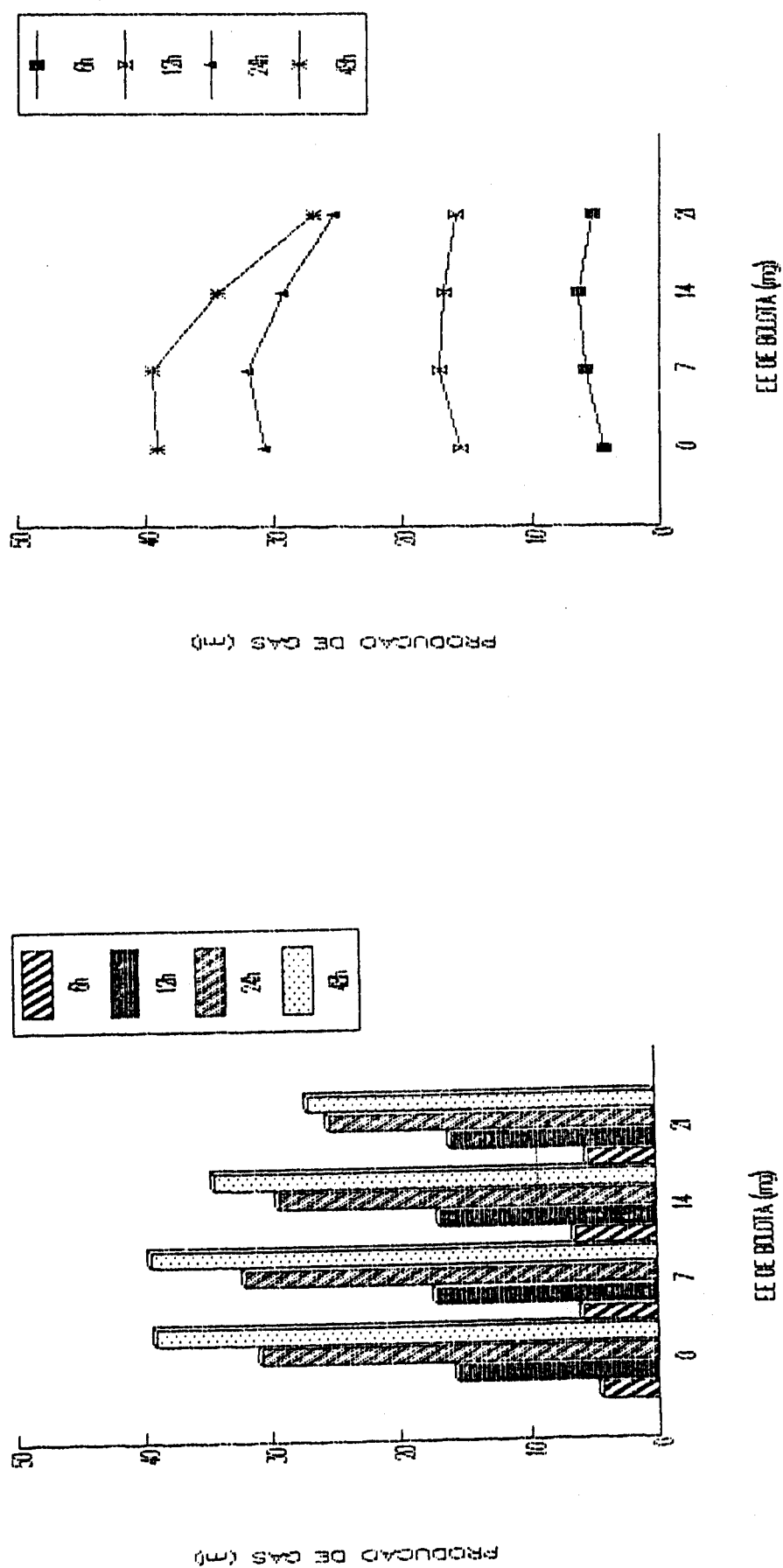


Fig. 3-3-

Produção de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação da fracção NDF da palha suplementada com 0, 7, 14 e 24 mg EE.

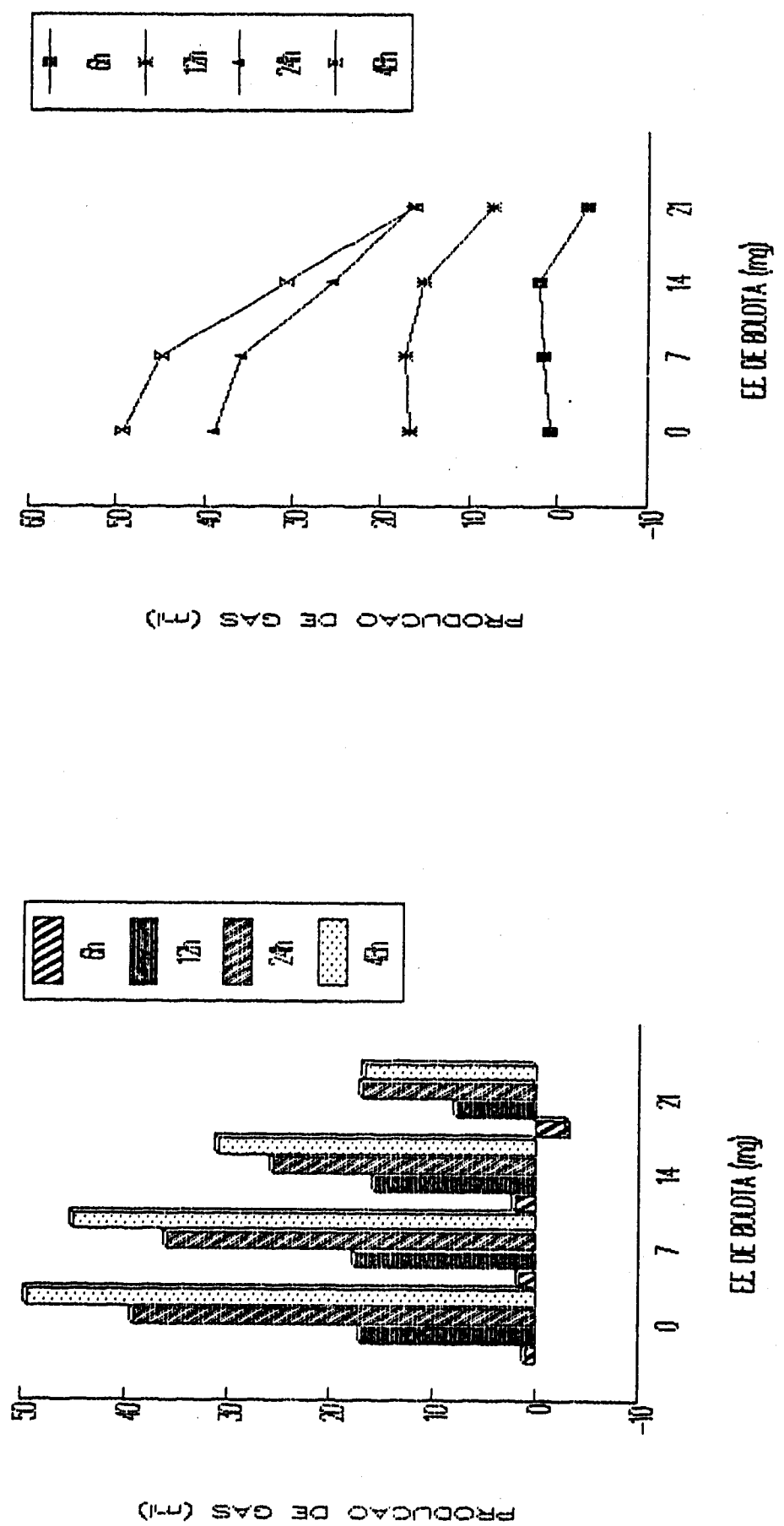


Fig. 3-4-

Produção de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação da fracção ADF da palha suplementada com 0, 7, 14 e 21 mg EE.

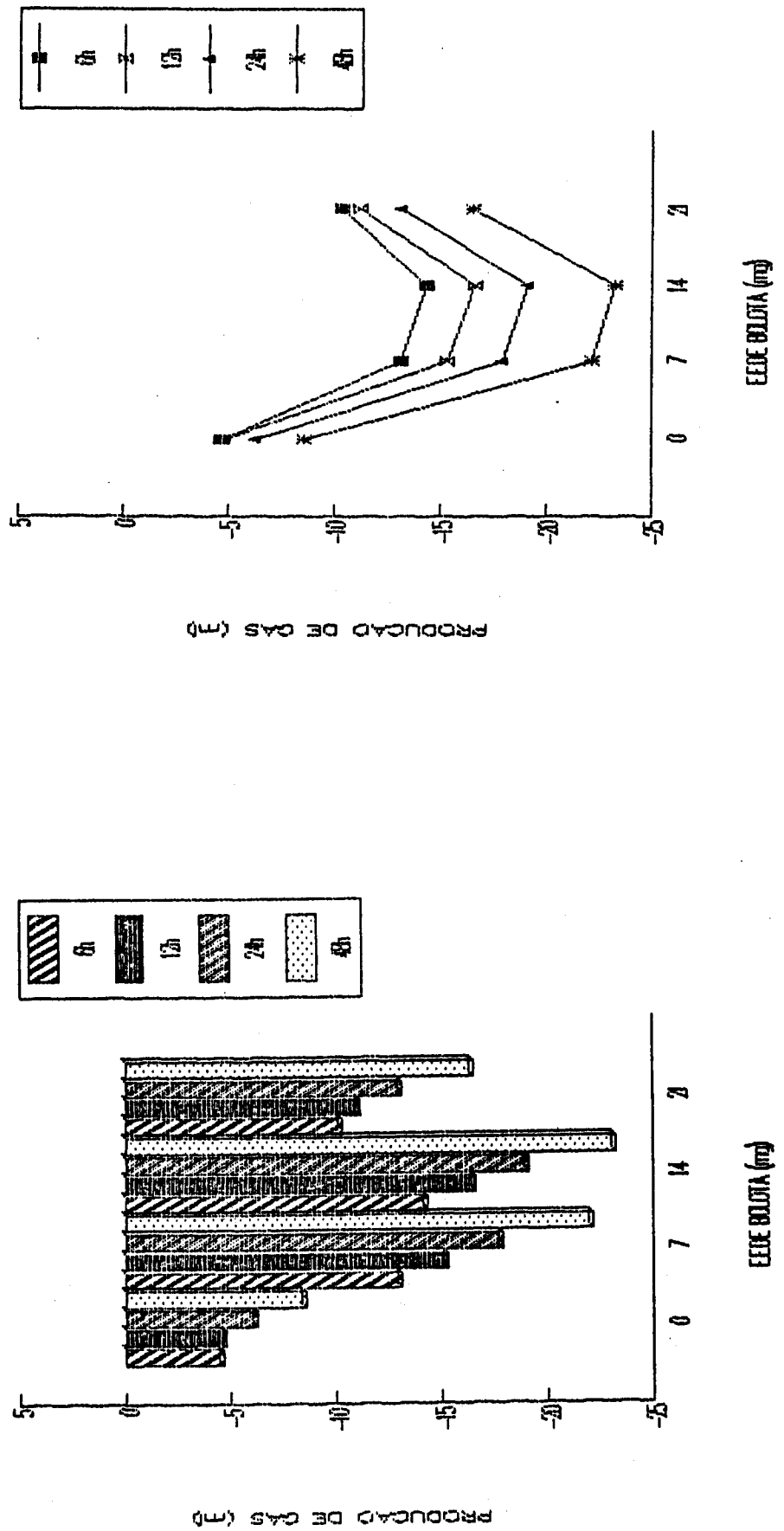


Fig-3-5-

Produção de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação de um feno de gramínea suplementado com 0, 7, 14 e 21 mg EE.

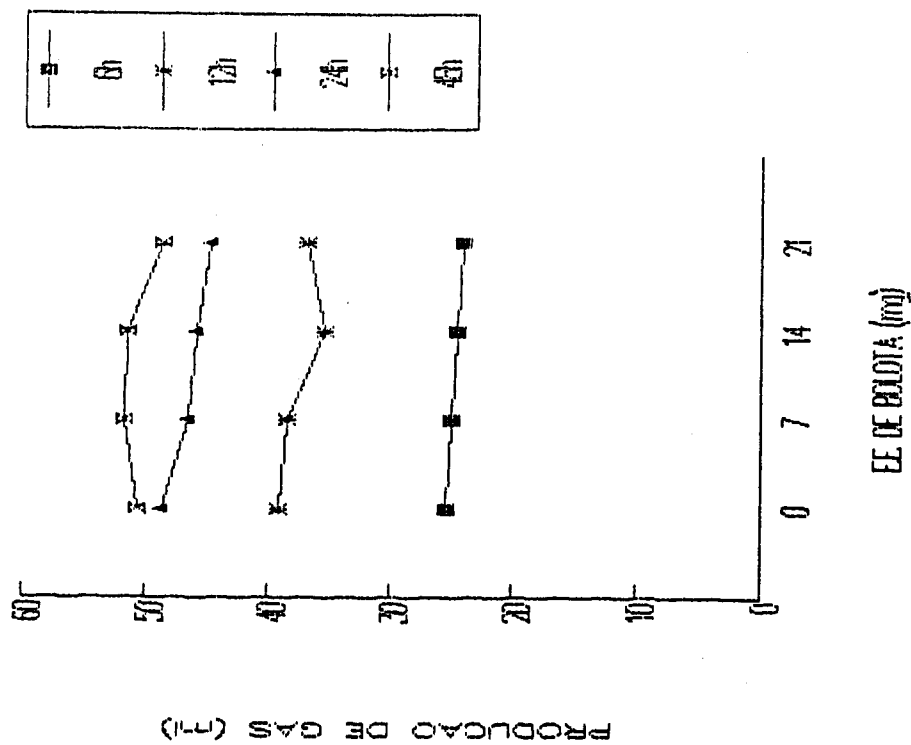
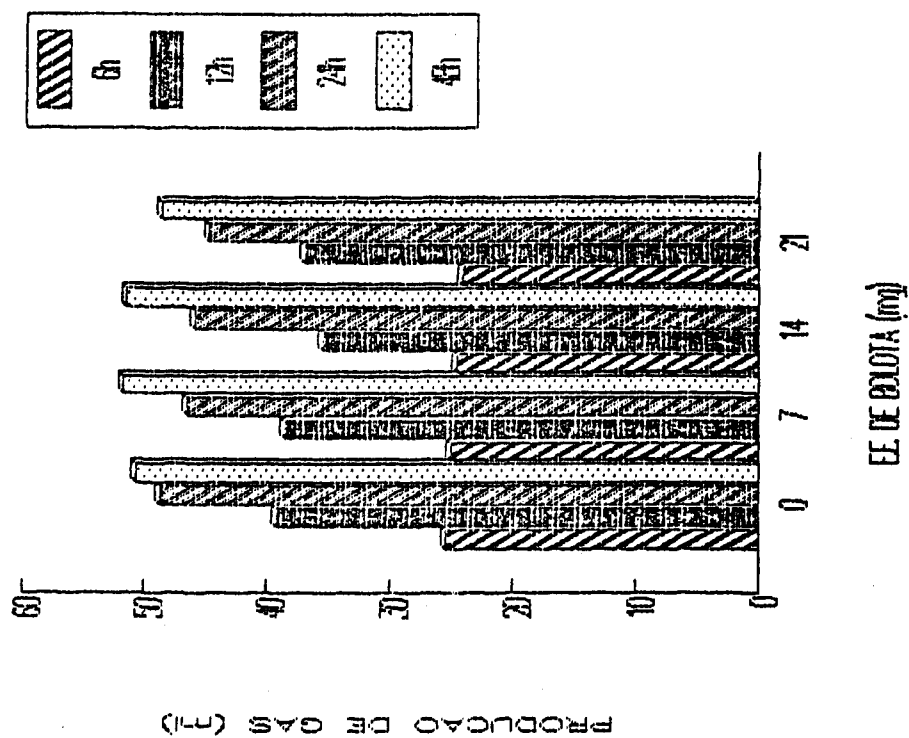


Fig-3-6-

Produção de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação da fraçãoção NDF de um feno de gramineas suplementada com 0, 7, 14 e 21 mg EE.

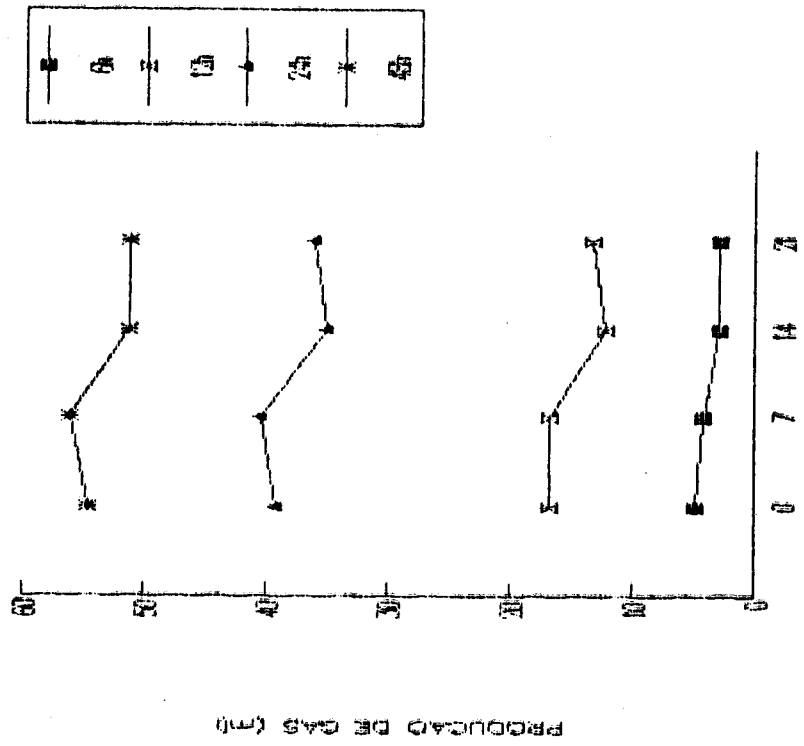
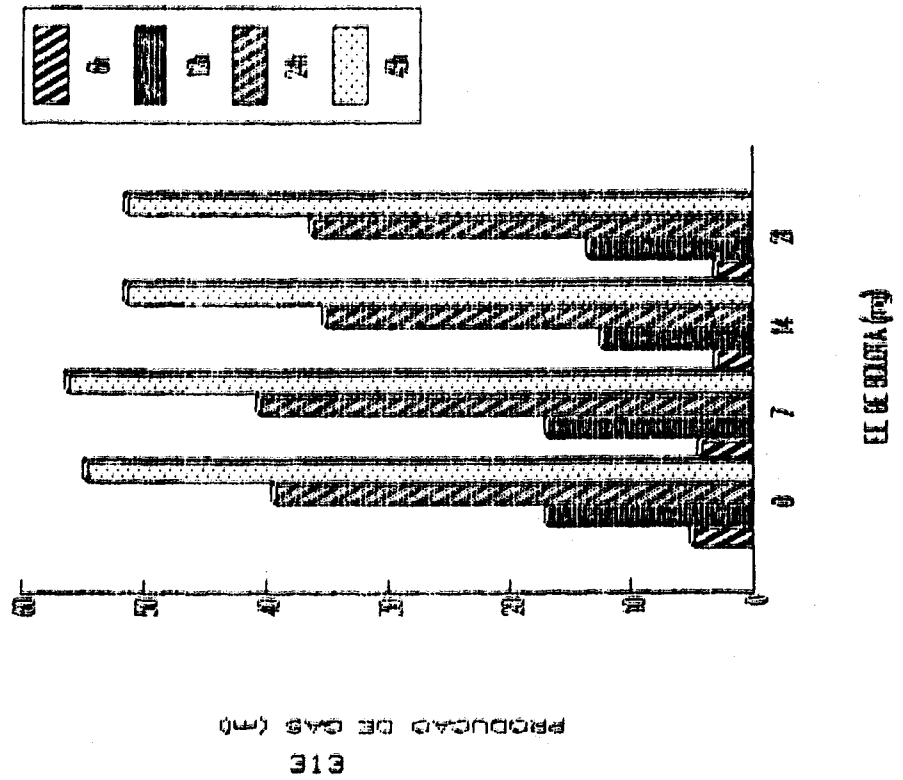


Fig-3-7-

Produção de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação da fracção ADF de um feno de gramínea suplementada com 0, 7, 14 e 21 mg EE.

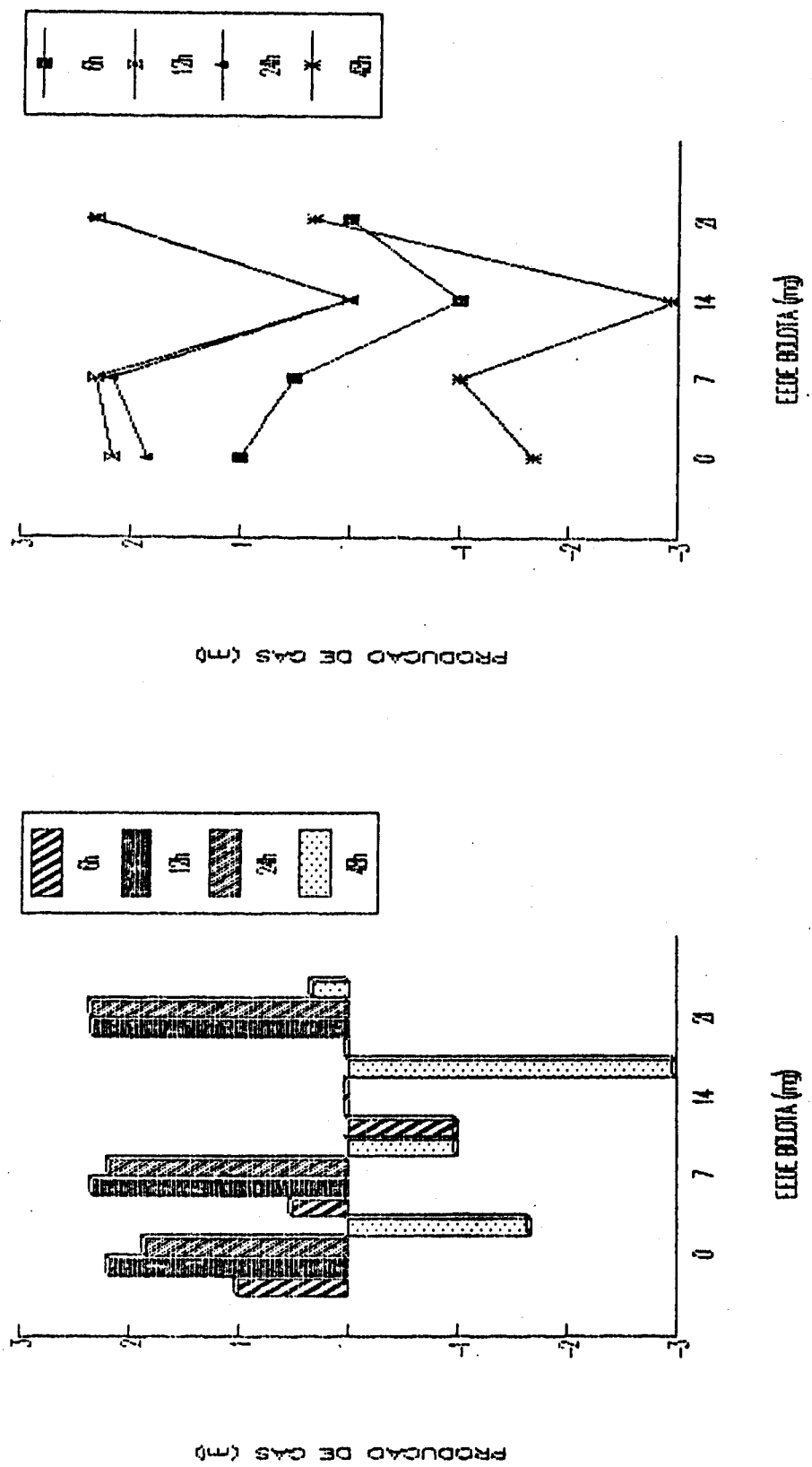


Fig-3-8-

Produção de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação de celulose pura suplementada com 0, 7, 14 e 21 mg EE.

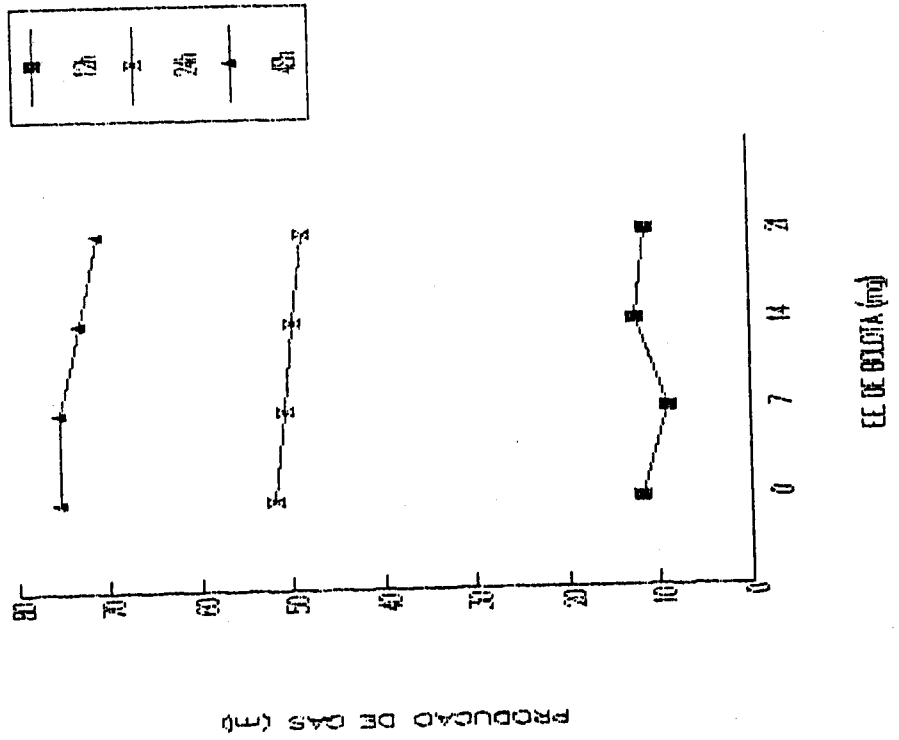
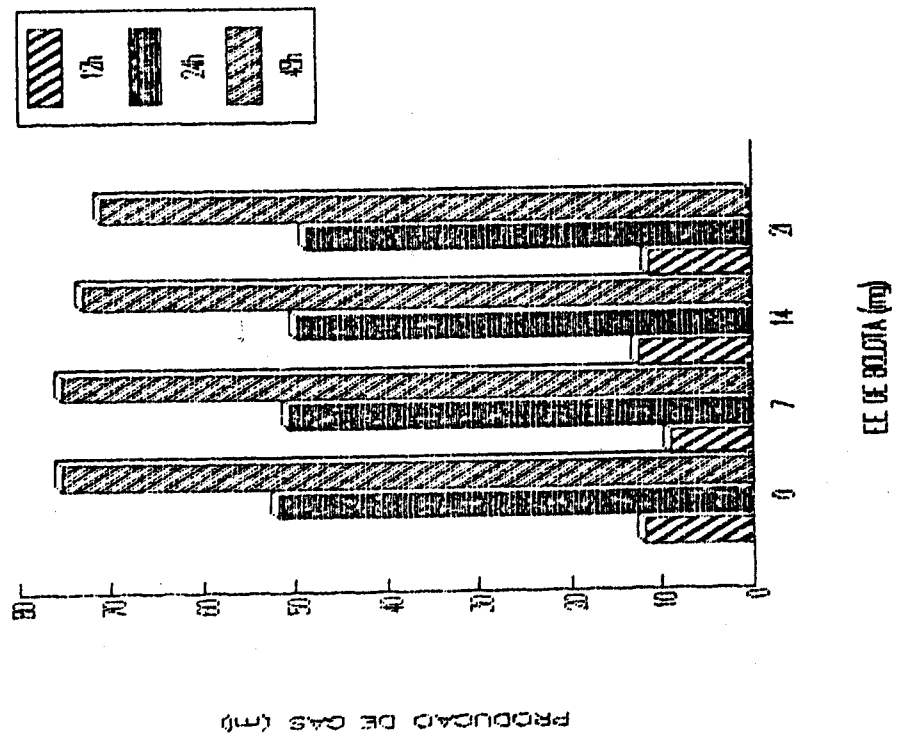


Fig - 3 - 9 -

Produção de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação de palha integral suplementada com níveis crescentes de um digesto retículo-ruminal contendo AGCL de bolota.

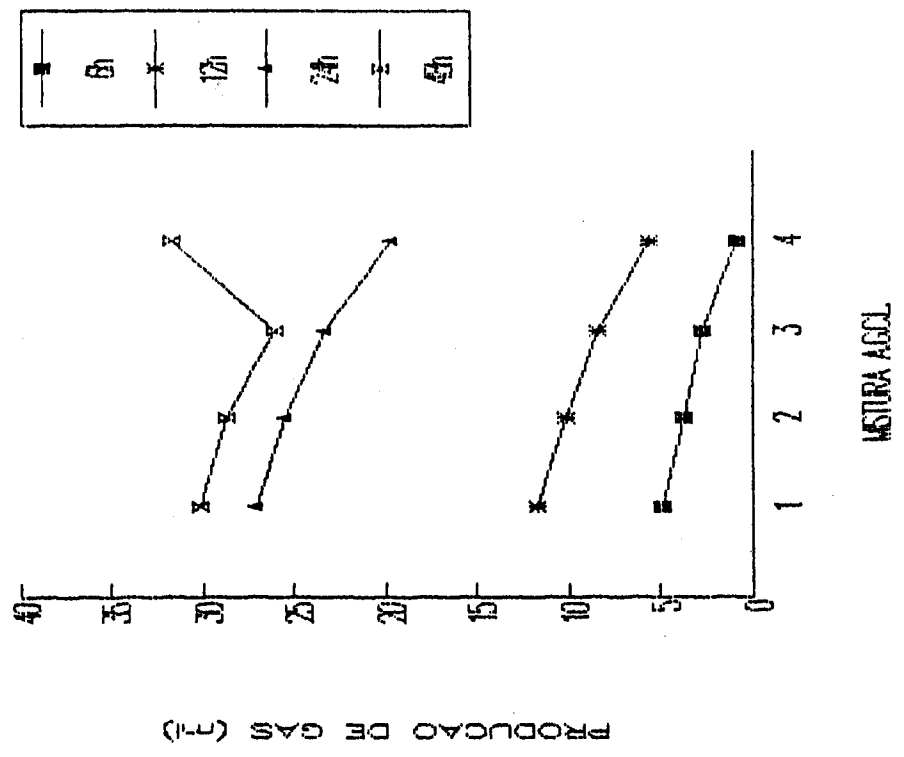
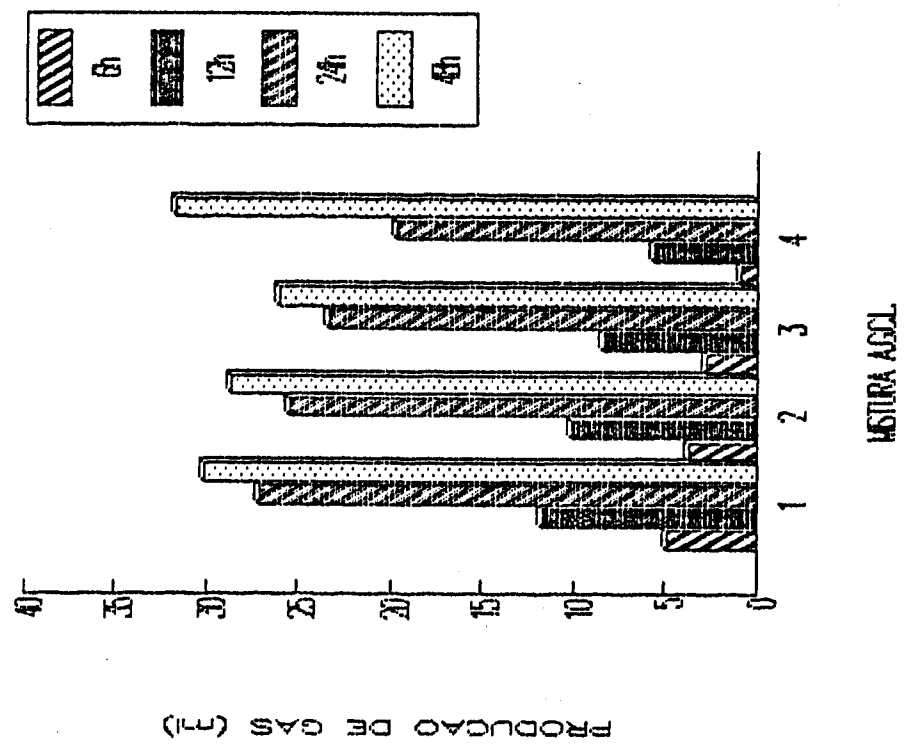


FIG - 3 - 10 -

Produção de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação da fracção NDF da palha suplementada com níveis crescentes de um digesto retículo-ruminal contendo AGCL de bota.

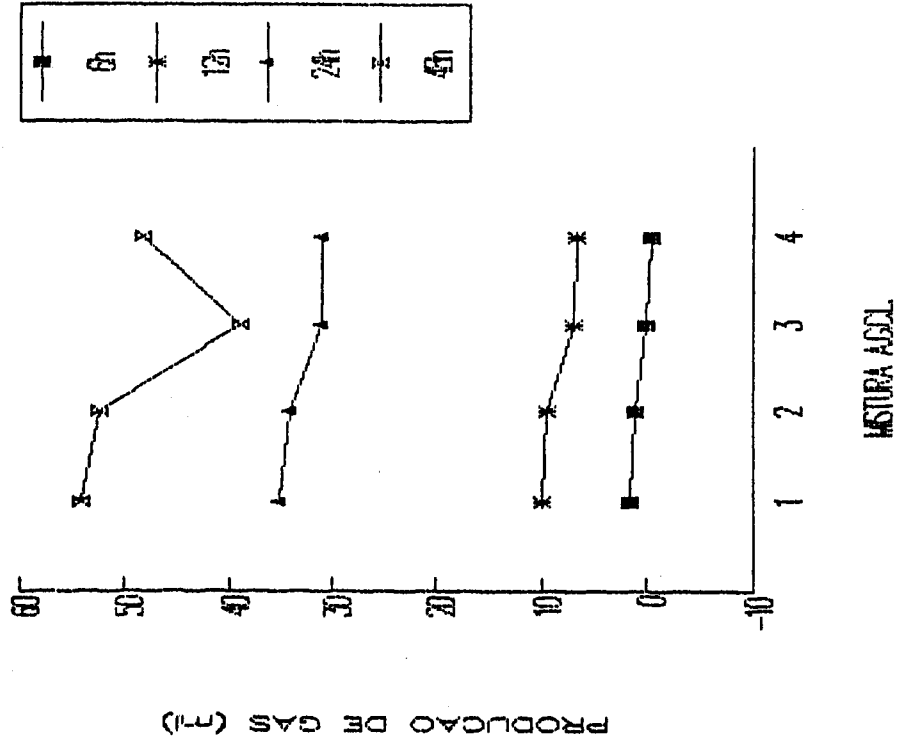
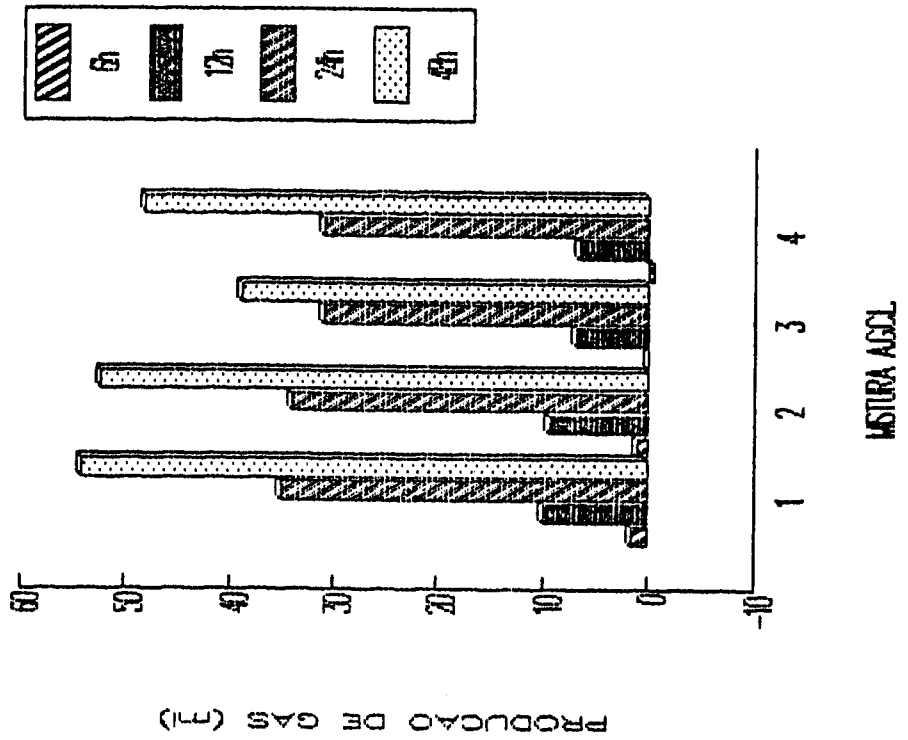


Fig - 3 - 11 -

Produção de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação de um feno de graminea suplementado com quantidades crescentes de um digesto retículo-ruminal contendo AGCL de bolota.

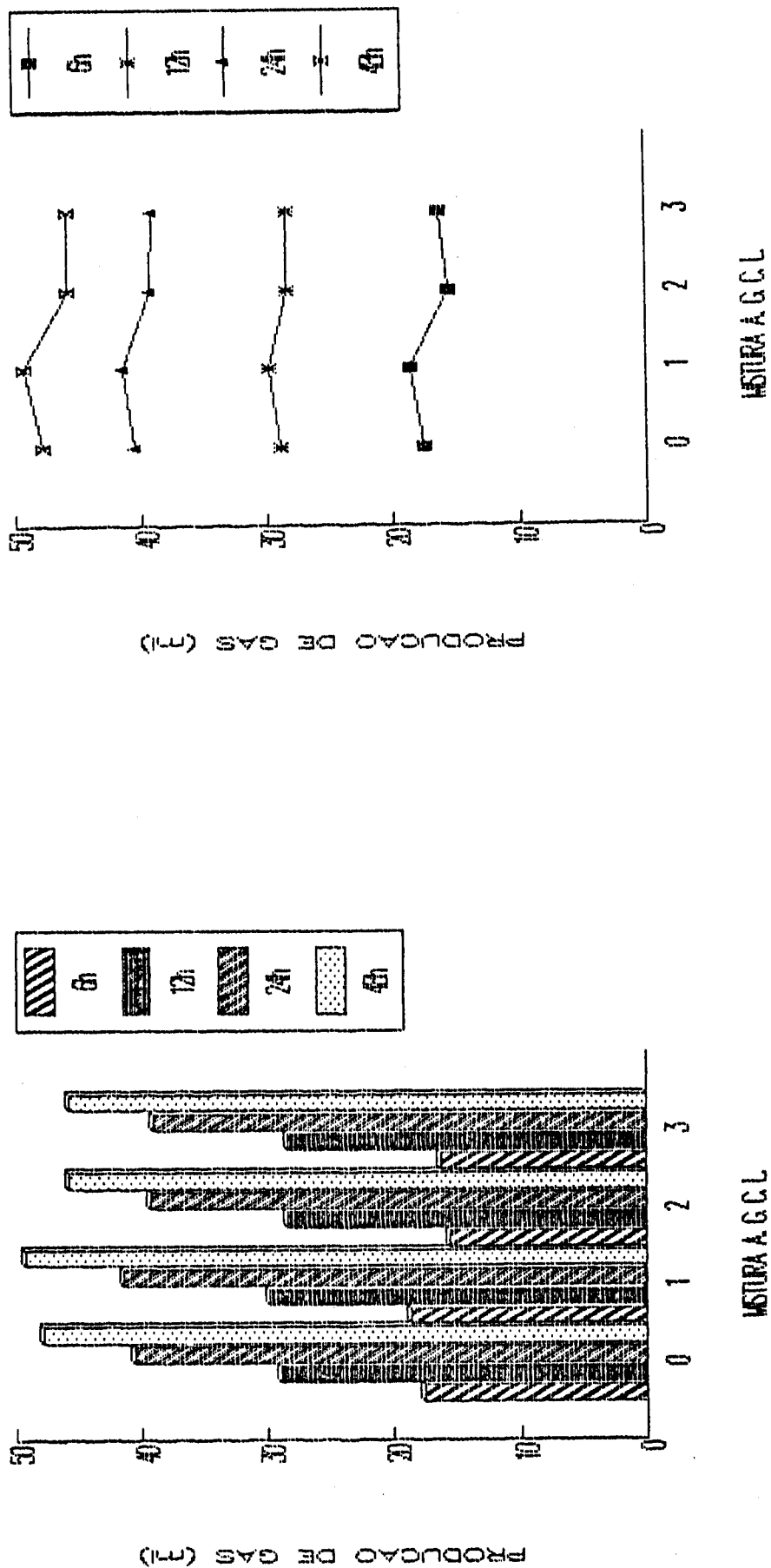


Fig-3-12-

Produção de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação da fracção NDF de um feno de graminea suplementada com quantidades crescentes de um digesto reticulo-ruminal contendo AGCL de bolota.

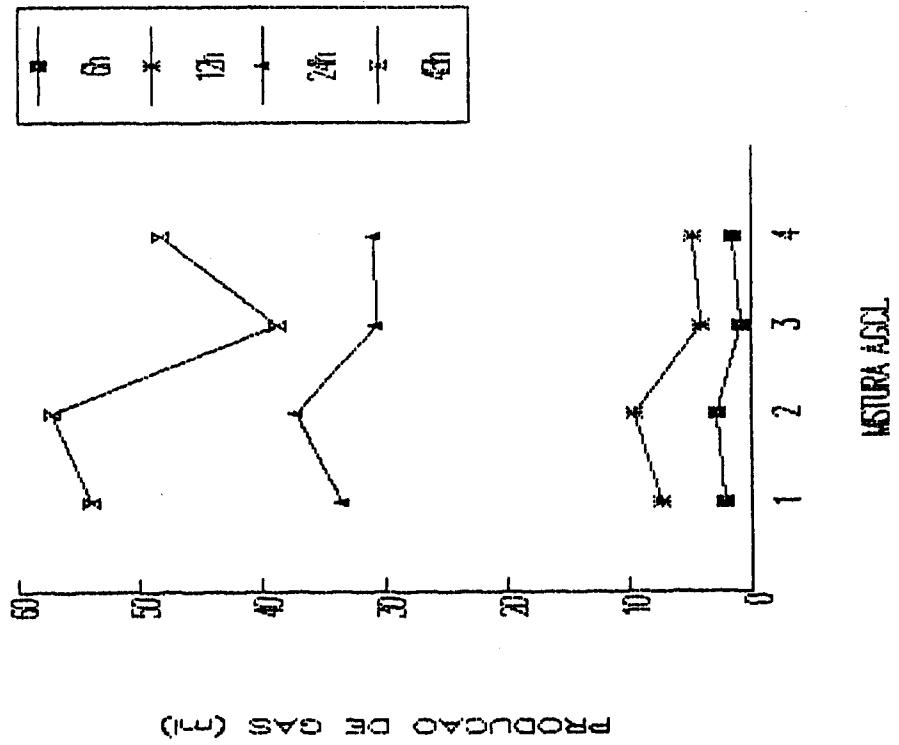
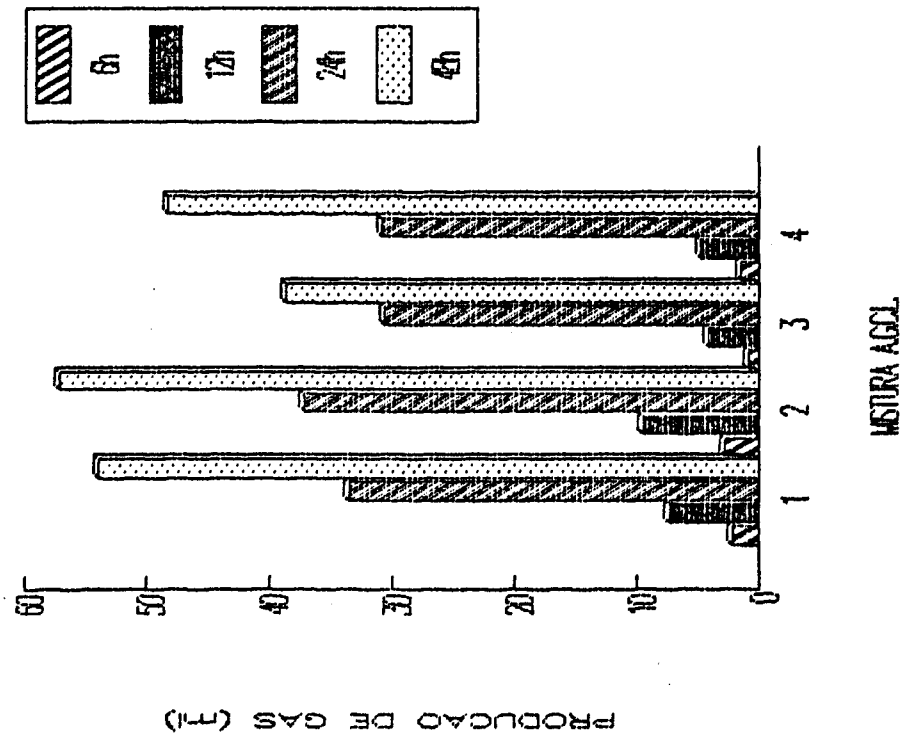
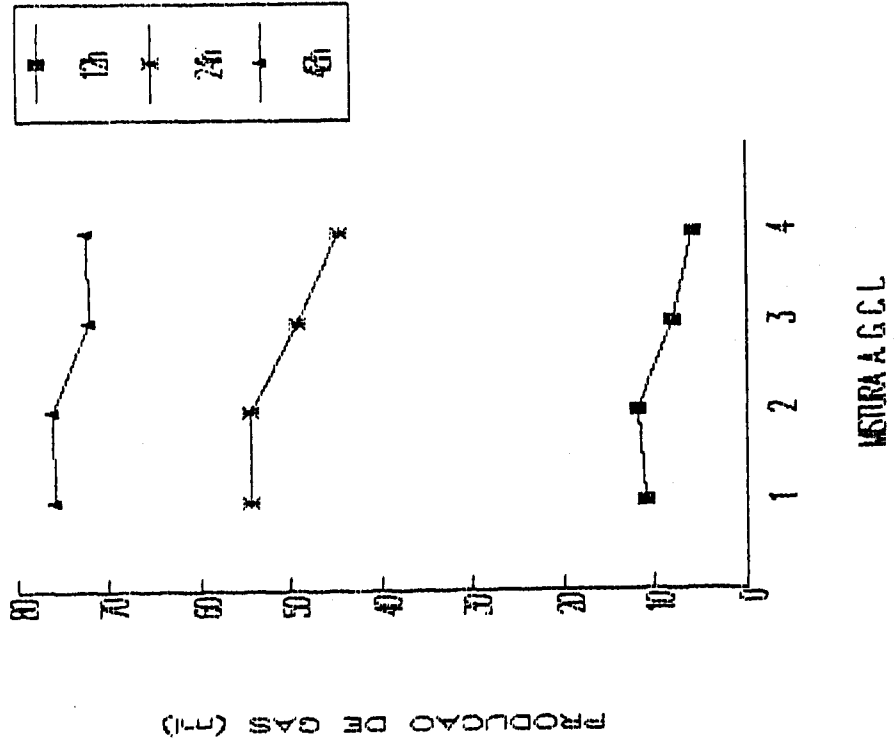
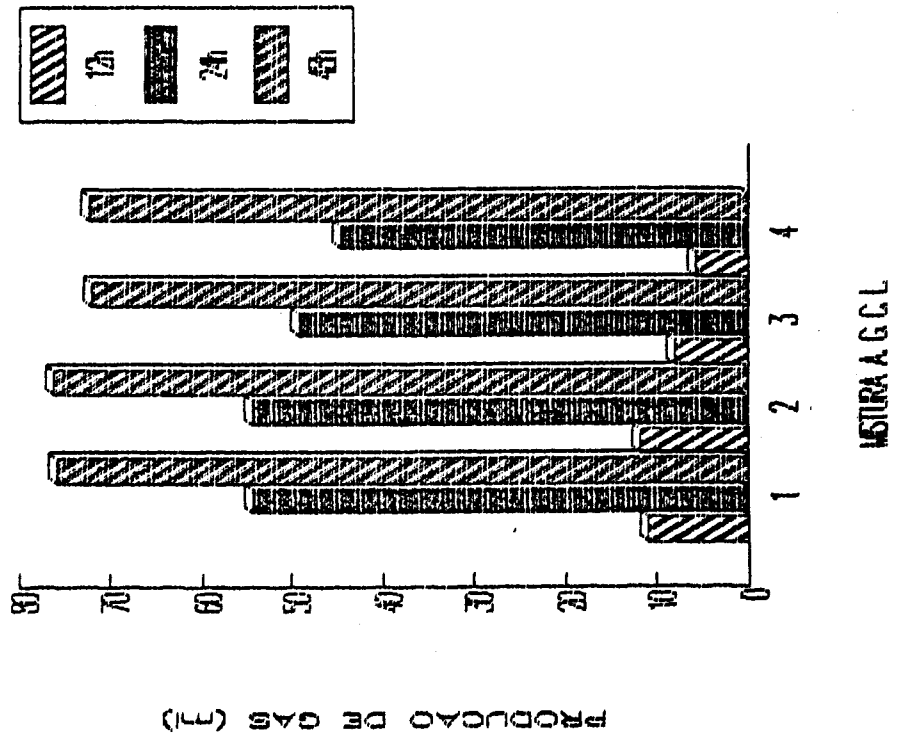


Fig-3-13-

Produção de gás (6, 12, 24 e 48 h) na fermentação de celulose pura suplementada com quantidades crescentes de um digesto retículo-ruminal contendo AGCL de bolota.



3.1. - Composição química dos elementos que integraram os substractos utilizados nas fermentações (% MS).

Constituintes	Bolota	Palha	Feno
N (x 6,25)	5,05 ± 0,04	3,27 ± 0,19	15,11 ± 0,62
NDF	21,82 ± 1,80	74,88 ± 0,53	48,55 ± 0,43
ADF	19,02 ± 0,56	54,68 ± 0,22	46,42 ± 0,39
ADL	7,40 ± 0,03	5,24 ± 0,10	5,85 ± 0,14
Cinzas totais	6,30 ± 0,42	7,82 ± 0,08	0,03 ± 0,01

CAPÍTULO 4

EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO GRADUAL DE PALHA POR FOLHAS DE AZIHEIRA (Quercus ilex), SOBREIRO (Q. suber) e OLIVEIRA (Olea europea) NA FERMENTAÇÃO RETÍCULO-RUMINAL

4.1. INTRODUÇÃO

A escassez de forragens em anos secos, destaca a importância que os ramos das árvores podem ter na alimentação dos animais. Análises praticadas e já realizados vieram confirmar as vantagens no seu aproveitamento (RODRIGUEZ, 1923). A confirmar este facto REDDY e REDDY (1987) publicaram uma pequena revisão sobre a utilização de folhas de árvores na alimentação de ruminantes.

Em algumas regiões do Globo o carvalho (Quercus sp.), surge como parte integrante da pastagem, sendo utilizado pelos animais, por vezes com consequências bastante negativas, principalmente na Primavera quando aparecem as folhas jovens com grandes quantidades de taninos na sua constituição (NEGI et al., 1979; NESER, et al., 1982; LOHAN et al., 1983; MAKKAR et al., 1987). Os nutricionistas indianos vêm dedicando, de há uns anos a esta parte, estudos bastantes intensos relacionados com a utilização das folhagens de Quercus incana. Com efeito, existe nas regiões montanhosas da Índia uma grande disponibilidade em folhas de carvalho que no Inverno, quando normalmente os animais deparam com uma grande escassez forraginosa, poderiam providenciar

uma grande fonte de nutrientes, desde que se providenciasse um processo de destanificação simples e economicamente viável (MAKKAR et al., 1988). Os taninos constituem, por conseguinte, o grande factor limitante na utilização das folhas de várias espécies de árvores e arbustos.

RODRIGUEZ (1923) refere que não existe nenhum agricultor que não saiba que a rama da oliveira é um alimento muito útil e que é bastante apreciado pelos bovinos e ovinos. Na apanha da azeitona por varejamento, ficam no solo uma grande quantidade de folhas, que os animais utilizam com grande apetência, quando em estado verde. A composição química da folha de oliveira vem expressa no Quadro seguinte (GIVERD - cit. por RODRIGUEZ, 1923):

	Folhas verdes	Folhas secas
Água	35	12
Cinzas	4,28	5,79
E.E.	2,87	3,89
PB	8,39	11,36
Celulose	5,80	7,85

As grandes extensões de azinheiros ou chaparraís, bastante abundantes por toda a Península Ibérica, fazem com que aproveitamento das suas ramas seja de grande interesse.

RODRIGUEZ (1923) destaca particularmente a riqueza

nutritiva apresentada pelas folhas bastante jovens, no seu estado natural, onde se destacam valores de 15% para a PB, extremamente importantes.

A rama de sobreiro é mais suave que a da azinheira e todos os animais a preferem (RODRIGUEZ, 1923). Os bovinos utilizam-na bastante bem, constituindo um grande suporte nutritivo para estes animais no tempo das geadas.

A rama de todos os carvalhos pode ser utilizada na alimentação dos animais (RODRIGUEZ, 1923). Quercus pedunculatu, vulgarmente conhecido como carvalho branco ou carvalho freixial, é considerado dos melhores e encontra-se com abundância no norte e noroeste de Espanha e em Portugal nas Beiras e Trás-os-Montes. A rama de carvalho, mesmo em estado seco, serve de alimento aos animais nestas regiões. Os ramos novos colhidos na Primavera, podem apresentar teores em PB tão elevados como 14,38% (RODRIGUEZ, 1923).

Nas explorações agrícolas do Alentejo, possuidoras de importantes áreas de montado de sobreiro ou azinho, os agricultores tradicionalmente colocam à disposição dos seus efectivos animais as folhagens das quercíneas, especialmente em anos de pastagem seca (MARINHO, 1984). Não se conhecem, porém, as verdadeiras consequências para o equilíbrio fisiológico dos animais.

Apesar das pastagens arbustivas sustentarem com toda a eficácia a fisiologia dos ruminantes "browsers" sem qualquer perturbação aparente, pareceu-nos importante fazer uma abordagem ao problema da utilização de pastagens arbustivas na alimentação de ruminantes que tradicionalmente

não evoluíram com base na sua utilização, se bem que "in vitro", com todas as limitações inerentes à utilização deste modelo.

3.2. - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas folhas de oliveira, sobreiro e azinheira colhidas em Outubro de 1987 na Herdade Experimental da Mitra.

Todas as análises da sua composição química foram feitas no Laboratório de Nutrição da Universidade de Évora, de acordo com os métodos AOAC (1975).

Na determinação da digestibilidade "in vitro" das amostras foi utilizado o método de TILLEY e TERRY (1963) modificado por ALEXANDER e MCGOWAN, 1966).

A caracterização fermentativa foi feita com base na leitura dos mesmos parâmetros, de acordo com os métodos descritos no Capítulo 1 (Parte III).

Foram considerados 4 níveis de incorporação das folhas em misturas com palha: 0%, 25%, 50% e 75% de incorporação.

Os resultados foram tratados estatisticamente utilizando a análise de variância multifactorial (STEEL e TORRIE, 1982) e "one way analysis of variance" (SNEDECOR e COCHRAN, 1967).

4.3. - RESULTADOS

Os resultados da composição química das amostras de folhas de oliveira, sobreiro, e da palha vem expressos no Quadro 4.1., onde se pode verificar que as folhas de azinheira apresentaram os níveis de PB mais elevados (18%), a

Quadro 4.1. Composição química da palha e das folhas de azinheira, sobreiro e oliveira (% MS)

	PB %	NDF %	ADF %	Celulose %	Cinzas %	Taninos Eq. A. tânico %
Palha	3,27	78,78	74,68	50,09	7,62	-
Folha de azinheira	19,49	50,81	39,61	23,29	4,55	10,65
Folha de sobreiro	10,34	48,48	41,05	20,76	3,67	11,70
Folha de oliveira	13,51	65,87	64,86	26,98	8,40	3,50

adstringência mais elevada das folhas de sobreiro e a pouco expressiva adstringência apresentada pelas folhas de oliveira.

Na fermentação das misturas contendo folhas de azinheira (Quadro 4.2.) a produção de gás foi influenciada significativamente ($P < 0,001$) pelo nível de incorporação às 6 e 24 h de fermentação, tendo a influência do PEG sido significativa ($P < 0,01$) apenas às 24 h de fermentação. Os valores do $N-NH_4^+$ foram influenciados significativamente ($P < 0,001$) quer pelo nível de incorporação, quer pela inclusão de PEG, o mesmo sucedendo com a população de ciliados.

Na fermentação das misturas contendo folhas de

Quadro 4.2. Efeitos da associação de folhas de azinheira com palha e do PEG na produção cumulativa de gás ($\bar{x} \pm e.p.m.$)

Incorporação %	PEG %	Tempo de fermentação (h)	
		b	24
0	0	4,34 ^a _c \pm 0,16	30,00 ^a _c \pm 0,58
	5	3,67 ^a \pm 0,29	30,00 ^a \pm 0,58
25	0	5,04 ^a _d \pm 0,44	30,20 ^a _c \pm 0,14
	5	6,50 ^a _d \pm 0,88	31,83 ^a \pm 1,36
50	0	8,84 ^a _e \pm 0,17	31,34 ^a _{cd} \pm 0,17
	5	9,17 ^a \pm 0,50	34,34 ^b \pm 0,88
75	0	11,34 ^a _f \pm 0,17	32,75 ^a _d \pm 0,60
	5	11,67 ^a \pm 0,50	36,17 ^b \pm 0,76

Diferenças significativas por efeito do PEG, letras diferentes em índice superior; diferenças significativas por efeito da % de incorporação, letras diferentes em índice inferior.

Quadro 4.3. Efeitos da associação de folhas de azinheira com palha e do PEG no $N-NH_4^+$ e no nº de cílios ($\bar{x} \pm e.p.m.$)

Incorporação %	PEG %	$N-NH_4^+$	Nº de cílios
		ng/100 ml	$\times 10^3/ml$
0	0	3,03 ^a _c \pm 0,07	36,60 ^a _c \pm 0,83
	5	2,87 ^a \pm 0,03	36,23 ^a \pm 0,15
25	0	3,64 ^a _d \pm 0,02	64,43 ^a _d \pm 0,30
	5	4,35 ^b \pm 0,09	31,43 ^b \pm 0,87
50	0	4,83 ^a _e \pm 0,03	78,00 ^a _e \pm 0,58
	5	5,67 ^b \pm 0,19	80,40 ^a \pm 1,40
75	0	6,10 ^a _f \pm 0,12	82,03 ^a _f \pm 1,28
	5	7,60 ^b \pm 0,06	85,00 ^a \pm 0,58

Diferenças significativas por efeito do PEG, letras diferentes em índice superior; diferenças significativas por efeito da incorporação de folhas, letras diferentes em índice inferior.

Quadro 4.4. Efeitos da associação de folhas de sobreiro com palha e do PEG na produção cumulativa de gás ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Incorporação %	PEG %	Tempo de fermentação (h)	
		6	24
0	0	4,34 ^a _c \pm 0,17	30,00 ^a _c \pm 0,58
	5	3,67 ^a \pm 0,29	30,00 ^a \pm 0,58
25	0	3,67 ^a _c \pm 0,17	21,17 ^a _d \pm 0,58
	5	5,00 ^b \pm 0,17	23,04 ^a \pm 0,93
50	0	4,00 ^a _c \pm 0,44	14,04 ^a _e \pm 0,44
	5	6,00 ^b \pm 0,17	20,04 ^b \pm 0,83
75	0	3,67 ^a _c \pm 0,29	10,00 ^a _f \pm 0,12
	5	7,17 ^b \pm 0,02	20,00 ^b \pm 0,58

Diferenças significativas por efeito do PEG, letras diferentes em índice superior; diferenças significativas por efeito da incorporação, letras diferentes em índice inferior.

Quadro 4.5. Efeitos da associação de folhas de sobreiro com palha e do PEG no $N-NH_4^+$ e no nº de ciliados ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Incorporação %	PEG %	$N-NH_4^+$	Nº de ciliados
		mg/100 ml	$\times 10^3/ml$
0	0	3,03 ^a _c \pm 0,07	36,60 ^a _c \pm 0,83
	5	2,87 ^a \pm 0,03	36,23 ^a \pm 0,15
25	0	2,59 ^a _d \pm 0,05	24,00 ^a _c \pm 0,76
	5	2,95 ^a \pm 0,36	29,03 ^b \pm 0,99
50	0	2,65 ^a _d \pm 0,05	10,80 ^a _e \pm 0,60
	5	3,92 ^b \pm 0,06	19,20 ^b \pm 0,80
75	0	3,23 ^a _c \pm 0,13	6,75 ^a _f \pm 0,14
	5	4,67 ^b \pm 0,09	10,66 ^b \pm 0,89

Diferenças significativas atribuídas ao PEG, letras diferentes em índice superior; diferenças significativas por efeito da incorporação de folhas, letras diferentes em índice inferior.

sobreiro (Quadro 4.4.), enquanto a produção de gás às 6 h de fermentação aumentou significativamente ($P < 0,001$) com a percentagem de incorporação e com a inclusão de PEG, diminuindo significativamente ($P < 0,001$) às 24 h de incubação, tendo o PEG aumentado significativamente ($P < 0,001$) a produção de gás em cada nível de incorporação de folhas. Os valores de $N-NH_4^+$ aumentaram significativamente ($P < 0,001$) com a incorporação de folhas e em cada nível de incorporação aumentaram significativamente ($P < 0,001$) com a inclusão de PEG. A população de ciliados diminuiu significativamente ($P < 0,001$) com o nível de incorporação e em cada nível aumentou significativamente ($P < 0,001$) com a inclusão de PEG.

Na fermentação das misturas contendo folhas de oliveira a produção de gás aumentou significativamente ($P < 0,001$) às 6h de incubação com o nível de incorporação de folhas, não sendo influenciada significativamente com a inclusão de PEG na mistura. Contudo, a produção de gás às 24 h de fermentação diminuiu significativamente ($P < 0,001$), não tendo também, sido influenciada significativamente com a inclusão de PEG (Quadro 4.6.). Os valores do $N-NH_4^+$ não diferiram (Quadro 4.7.) significativamente entre os tratamentos por influência dos níveis de incorporação, mas a incorporação de PEG influenciou significativamente ($P < 0,05$) as concentrações, tendo baixado nos dois primeiros níveis e aumentado nos dois últimos. A população de ciliados aumentou significativamente ($P < 0,001$) com o nível de incorporação, tendo a inclusão de PEG aumentado significativamente ($P < 0,01$) o número de ciliados.

Os valores das digestibilidades para os três tipos

Quadro 4.6. Efeitos, da associação de folhas de oliveira com palha, e do PEG na produção cumulativa de gás ($\bar{x} \pm e.p.m.$)

Incorporação %	PEG %	Tempo de fermentação (h)	
		6	24
0	0	4,34 ^a _c ± 0,17	30,00 ^a _c ± 0,58
	5	3,67 ^a ± 0,29	30,00 ^a ± 0,58
25	0	5,33 ^a _c ± 0,88	27,84 ^a _d ± 0,17
	5	6,18 ^a ± 0,50	27,50 ^a ± 0,88
50	0	7,50 ^a _d ± 0,73	26,84 ^a _{de} ± 0,72
	5	6,84 ^a ± 0,17	26,31 ^a ± 0,32
75	0	9,17 ^a _d ± 0,58	25,00 ^a _e ± 0,58
	5	9,17 ^a ± 0,29	25,00 ^a ± 0,58

Diferenças significativas atribuídas ao PEG, letras diferentes em índice superior; diferenças significativas por efeito do nível de incorporação de folhas, letras diferentes em índice inferior.

Quadro 4.7. Efeitos, da associação de folhas de oliveira com palha, e do PEG no $N-NH_4^+$ e no nº de ciliados ($\bar{x} \pm e.p.m.$)

Incorporação %	PEG %	$N-NH_4^+$	Nº de ciliados
		mg/100 ml	$\times 10^5/ml$
0	0	3,03 ^a _c ± 0,07	36,60 ^a _c ± 0,83
	5	2,87 ^a ± 0,03	30,23 ^a ± 0,15
25	0	3,08 ^a _c ± 0,10	33,97 ^a _d ± 0,56
	5	2,95 ^a ± 0,10	40,20 ^b ± 0,21
50	0	2,70 ^a _d ± 0,06	46,23 ^a _e ± 0,15
	5	3,17 ^b ± 0,15	46,83 ^a ± 0,83
75	0	2,72 ^a _d ± 0,10	48,00 ^a _e ± 1,00
	5	3,26 ^b ± 0,06	49,07 ^a ± 1,03

Diferenças significativas devidas ao PEG, letras diferentes em índice superior; diferenças significativas atribuídas à incorporação de folhas, letras diferentes em índice inferior.

Quadro 4.8. Valores para a digestibilidade "in vitro" de folhas de azinheira, sobreiro e oliveira ($\bar{X} \pm e.p.m.$)

Tipo de folha	PEG 0%	PEG 5%
Azinheira	59,01 ^a _c \pm 0,41	60,25 ^a \pm 1,23
Sobreiro	24,61 ^a _d \pm 0,90	32,52 ^b \pm 3,85
Oliveira	46,73 ^a _e \pm 1,56	50,19 ^a \pm 0,73

Valores afectados por letras diferentes em indice superior, influenciados significativamente pelo PEG; valores afectados por letras diferentes em indice inferior, influenciados significativamente pela natureza da folha.

de folha diferiram de uma forma bastante significativa ($P < 0,001$) (Quadro 4.8.), tendo a inclusão de PEG influenciado significativamente ($P < 0,05$) os valores da digestibilidade das folhas de sobreiro.

4.4. - DISCUSSÃO

A composição química apresentada pelas estruturas foliares de Quercus ilex, Q. suber e Olea europea manifestam um potencial nutritivo de forma nenhuma negligenciável, especialmente no que refere ao seu valor azotado. Contudo, tal como sucede com folhas de muitas outras espécies de árvores e arbustos, as actividades digestivas de natureza enzimática e microbiana defrontam-se com a presença de taninos, que em maior ou menor grau limitam a degradação de alguns componentes, nomeadamente a celulose e proteína (LOHAM et al., 1981). SMART et al. (1961) e COPE et al. (1971) fazem

referência à inibição da celulólise provocada por uma substância hidrossolúvel presente nas folhas de S. lespedeza. LYFORD et al. (1967) observaram que esta substância inibidora constituía uma parte da fracção tanino. MAKKAR et al. (1988), utilizando "nylon bags" referem a inibição da actividade ureásica, carboximetilcelulásica, glutâmico desidrogenásica e alanino aminotransferásica pelos taninos das folhas de Q. incana.

O grau de interferência que os taninos exercem nas actividades enzimáticas está estreitamente relacionado com a sua concentração. SINGH (1977 e 1978) apenas encontrou repressão da produção de AGVs pelo conteúdo retículo-ruminal, quando trabalhou com concentrações de ácido tânico dez vezes superiores àquela encontrada em Shorea robusta (13,3%). Sem dúvida que o facto de não haver repressão na produção de AGVs quando os taninos se encontram em solução nas concentrações de 13,3% não significa que não haja interferência nos mecanismos de digestão. Com efeito, as células podem estar bloqueadas no seu crescimento, continuando a mobilizar a energia para as suas necessidades de manutenção. Os taninos limitam muito particularmente a disponibilidade, quer complexando-se com ela (ALMEIDA, 1986), quer limitando a actividade de enzimas directamente envolvidas na mobilização anabólica do azoto, como a glutâmico desidrogenase (MAKKAR et al, 1988) da qual dependem as bactérias do conteúdo retículo-ruminal, para a assimilação de NH_4^+ na sua proteossíntese (BHATIA et al., 1980).

No presente estudo as folhas de azinheira

apresentaram-se como o melhor substituinte da palha, comparativamente às folhas de sobreiro e oliveira. O seu elevado teor em proteína constitui talvez a grande justificação para este comportamento. A elevada concentração de taninos não manifestou efeitos deletéreos de uma forma tão expressiva como na fermentação das folhas de sobreiro, onde nem mesmo a incorporação de PEG conseguiu aumentar as produções de gás relativamente à fermentação da palha integral. A relação tanino:proteína parece desempenhar aqui um papel importante na evolução do processo fermentativo. Com efeito, a relação tanino:proteína nos três substractos foliares foi de 0,52 , 1,13 e 0,25 , respectivamente azinheira, sobreiro e oliveira. ALMEIDA (1986) refere que a precipitação do tanino é praticamente completa para uma relação tanino:proteína de 0,5. Partindo deste pressuposto sem dúvida que as misturas palha + azinheira aumentam o seu teor em proteína disponível com o aumento progressivo da participação da azinheira na mistura, o mesmo sucedendo com as misturas contendo folha de oliveira. ALMEIDA (1986) refere também que, embora a quantidade de hemoglobina libertada dos complexos tanino:proteína tivesse aumentado até à relação tanino:PEG 0,7 - 0,8, mesmo para uma relação tanino:PEG 0,5 a hemoglobina libertada, aparentemente , nunca foi completa. A quantidade de PEG que estabelecemos para incorporação foi de 5%, o que mesmo na incorporação mais baixa de folhas de sobreiro, a relação tanino:PEG foi de 0,58 , aparentemente incapaz de deslocar completamente as proteínas dos complexos que eventualmente se tenham formado quando a mistura foi

hidratada pelo inóculo fermentativo.

As misturas contendo folhas de oliveira, apesar de esta apresentar na sua composição uma relação tanino:proteína 0,25 e na incorporação mais baixa da mistura apresentar uma relação tanino:PEG 0,88, o seu comportamento fermentativo sob a forma de produção de gás às 6 h de incubação foi bastante diferente relativamente às 24 h de incubação. Enquanto às 6 h de incubação a produção de gás aumentou com a percentagem de incorporação de folhas na mistura, às 24 h de incubação a tendência foi exactamente a oposta, não tendo a incorporação de PEG alterado a tendência fermentativa, apesar de ter incrementado os valores do $N-NH_4^+$. Provavelmente esta diferença de comportamento está relacionada com a disponibilidade em energia da mistura. Nas primeiras 8 - 12 h a fermentação é energeticamente suportada pelos componentes solúveis, que existirão em maior quantidade nas folhas de oliveira do que na palha. Das 12 h para as 24 h a fracção celulose desempenha um papel fundamental como suporte energético da actividade fermentativa do inóculo. Os teores em celulose das folhas de oliveira são bastante mais baixos que os da palha, pelo que a substituição gradual da palha por folhas de oliveira diminui expressivamente a fracção energética que suporta a fermentação na sua fase tardia. Este facto por si só não bastaria para explicar este tipo de comportamento fermentativo, uma vez que as folhas de azinheira também possuem menos bastante menos celulose que a palha na sua composição. Prém, o teor em lenhina das folhas de oliveira (37,89 % MS), não só é muitíssimo superior ao da

palha (5,24), como é manifestamente mais elevado que o das folhas de azinheira (11,77 % MS). O provável aumento progressivo dos fenóis em solução, provenientes da degradação da lenhina (THEODOROU, et al., 1987), parecem neste caso ter interferido fortemente na fermentação como é possível verificar nos gráficos das Figs. 4.3. e 4.5.

Apesar do seu valor proteico e baixa adstringência, os resultados conseguidos neste estudo sugerem que as folhas de oliveira constituem um recurso alimentar de características nutritivas bem inferiores às das folhas de azinheira sendo, no entanto, superior às das folhas de sobreiro.

CAPÍTULO 4

ANEXOS

Fig - 4 - 1 -

Efeito da % de incorporação de folhas de azinhreira e do PEG nas produções de gás às 6 e 24 h de incubação.

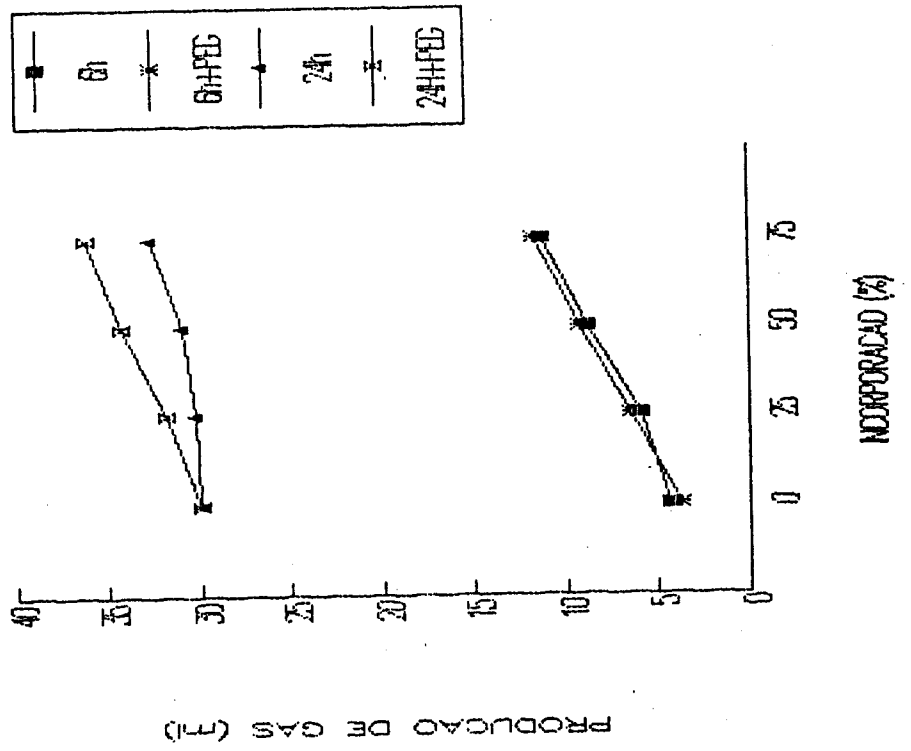
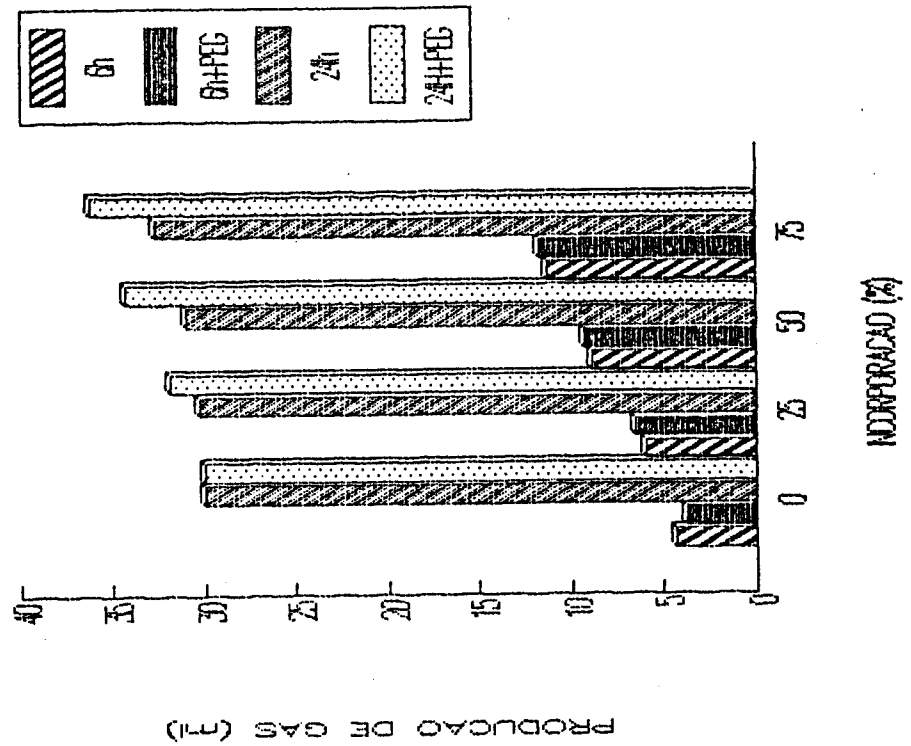


Fig - 4 - 2 -

Efeito da % de incorporação de folhas de sobreiro e do PEG nas produções de gás às 6 e 24 h de incubação.

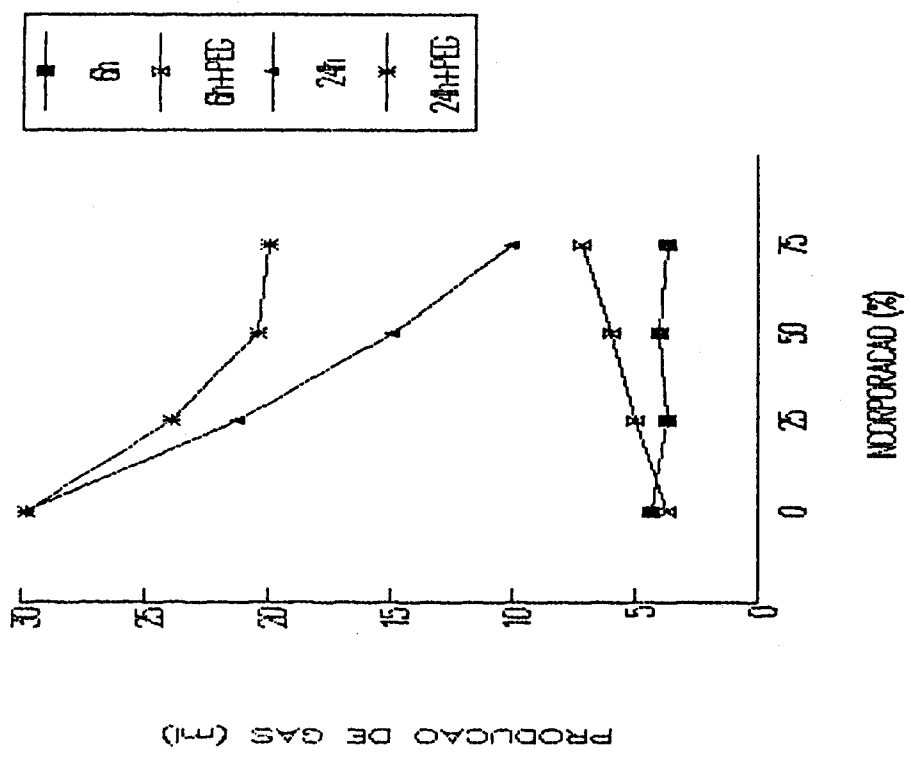
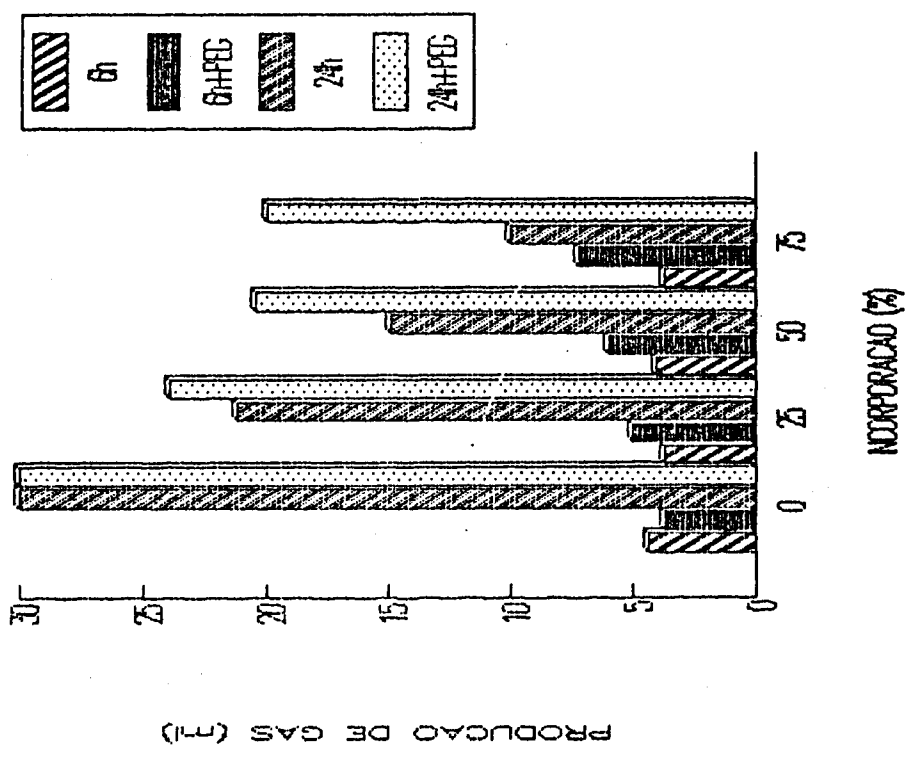


Fig-4-3-

Efeito da % de incorporação de folhas de oliveira e do PEG nas produções de gás às 6 e 24 h de incubação.

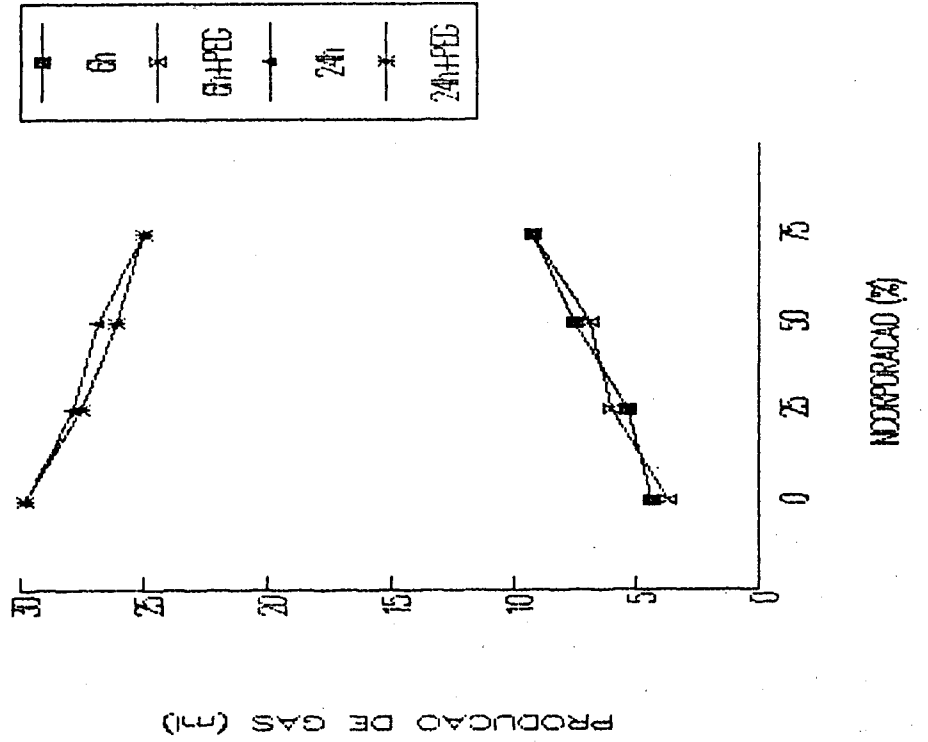
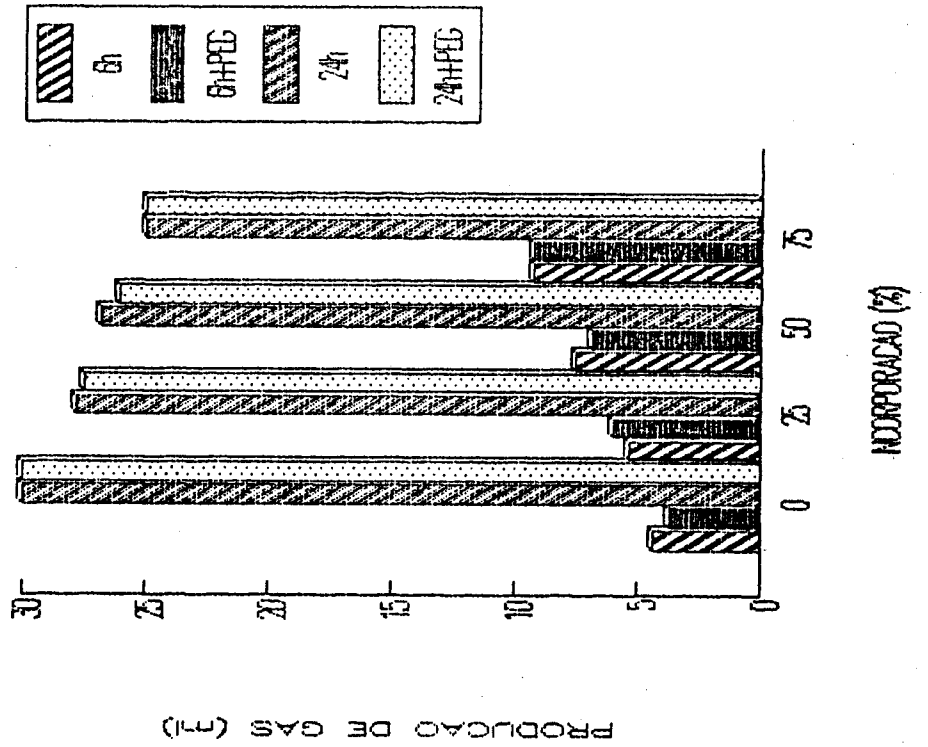


FIG - 4 - 4 -

Efeito da % de incorporação de folhas de azinhreira, sobreiro, oliveira e do PEG nas produções de gás às 6 h de incubação.

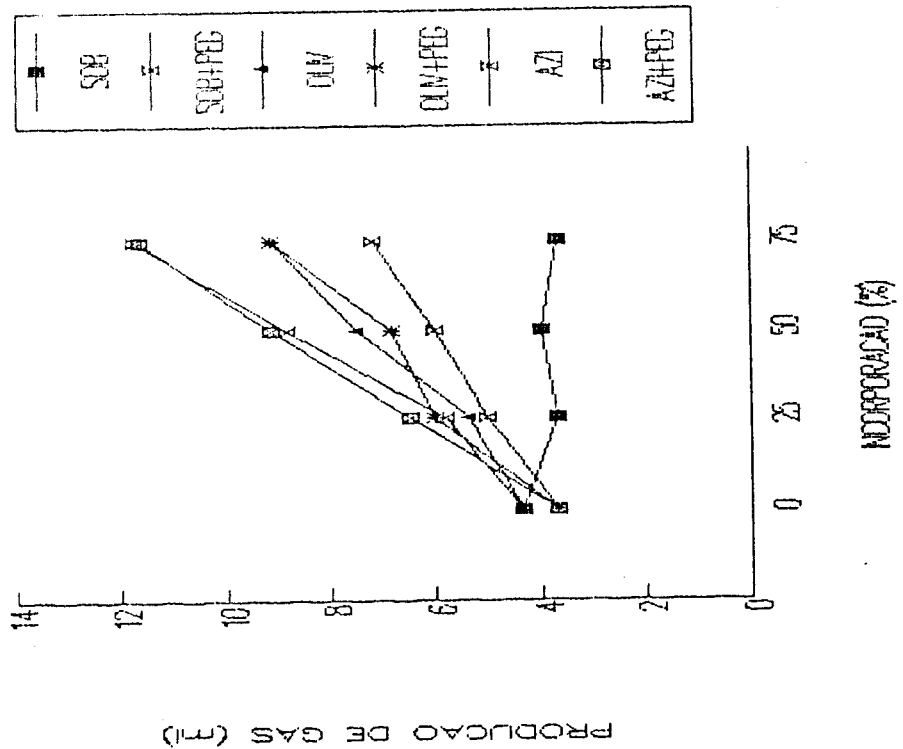
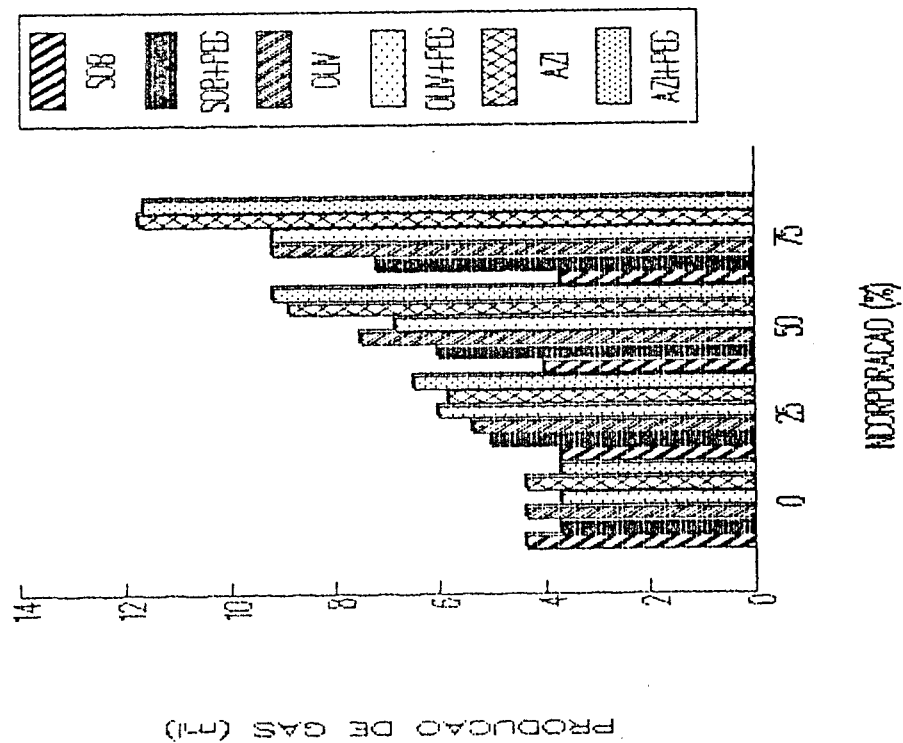
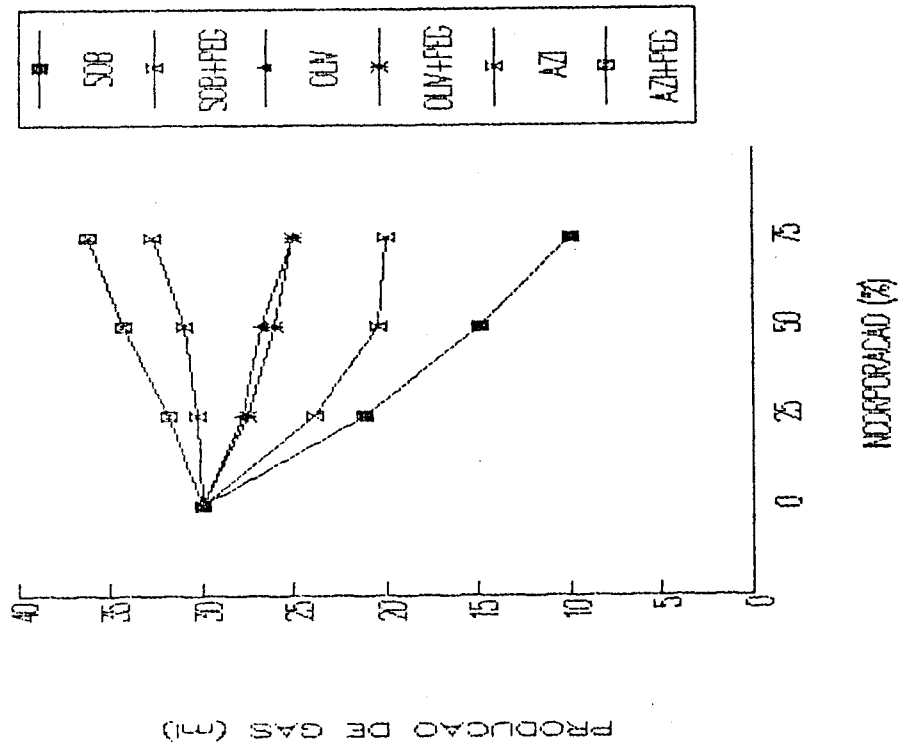
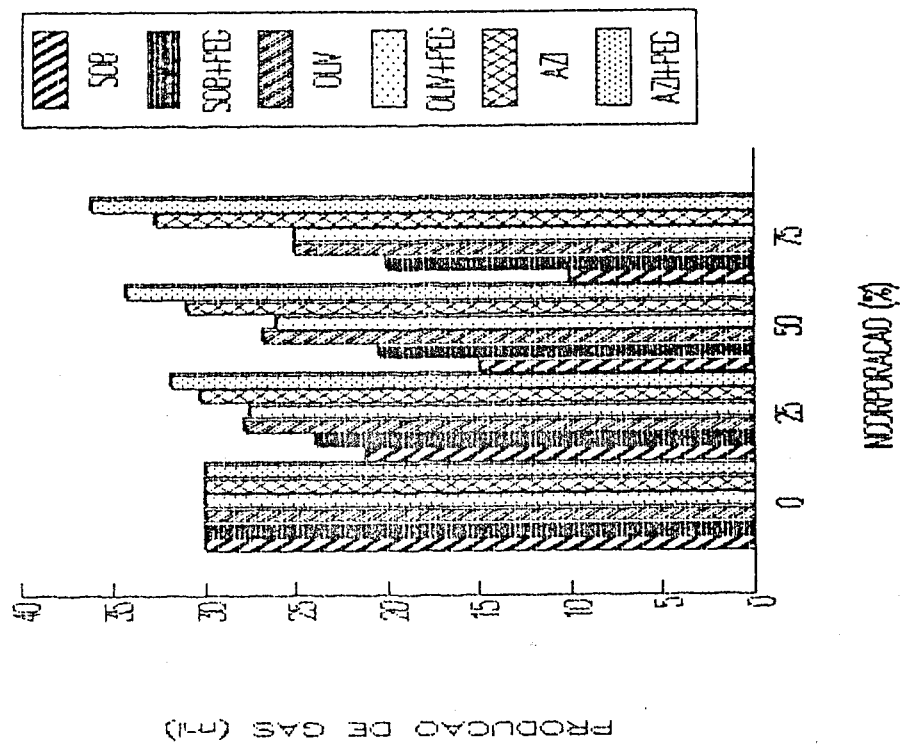


Fig - 4 - 5 -

Efeito da % de incorporação de folhas de azinhreira, sobreiro, oliveira e do PEG nas produções de gás às 24 h de incubação.



PARTE IV

DISCUSSÃO GLOBAL E CONCLUSÕES

1. DISCUSSÃO GLOBAL E CONCLUSÕES

A ingestão de elevados níveis de bolota pelos ovinos provoca importantes alterações na biocenose retículo-ruminal, que se traduzem no desaparecimento de grupos de ciliados que, pelo nicho que ocupam no ecossistema, provocam também profundas alterações no metabolismo global.

O desaparecimento dos Diplodiniinae modifica a estratégia do ecossistema relativamente à degradação da fibra celulósica, que passa a depender exclusivamente da microflora específica, que segundo observações de vários autores, não parece ser tão eficiente quando comparado com o ecossistema com a sua dotação ciliada completa, situação que foi possível observar também quando procedemos à reimplantação no retículo-rumen dos grupos desaparecidos na fase de adaptação. Pensamos que esta situação será muito mais manifesta em animais ingerindo dietas com elevado teor glúcido na sua composição, onde as variações de pH são muito mais pronunciadas, situando-se os valores de pH persistentemente abaixo dos parâmetros de funcionamento dos microorganismos celulolíticos. A eficiente capacidade de competição, que estes ciliados apresentam na utilização do amido, relativamente às bactérias substracto específicas por um lado, o microambiente que colocam à disposição das bactérias celulolíticas no interior do seu saco gástrico, conferem-lhe de facto um estatuto privilegiado dentro do ecossistema.

O desaparecimento dos *Isotrichidae* e *Ophryoscolecinae*, apesar das suas vocações específicas, aparentemente parecem não provocar, pelo menos aparentemente, alterações de montan nos principais parâmetros digestivos no retículo-rumen.

As causas apontadas para o desaparecimento destes grupos de ciliados, em face das nossas observações, parece ter sido a relação azoto:energia, que acima do nível de 60 % de incorporação provocou um grande desajustamento naqueles dois factores que bloquearam a sua actividade. O desaparecimento de *Ophryoscolex sp.* e a impossibilidade na sua reimplantação em condições bastante mais favoráveis, traduzem a existência de um outro eventual factor, ou grupo de factores que impediram a sua manutenção no ecossistema modificado. Nós pensamos que a fracção lipídica talvez possa ter sido determinante para o seu afastamento, uma vez que este grupo de ciliados participam de uma forma bastante activa no metabolismo digestivo sobre os lípidos, particularmente no que se refere à hidrogenação dos ácidos insaturados.

Se bem que os *Entodiniinae* não tenham desaparecido do retículo-rumen, não só a sua expressão populacional foi bastante diminuída, como também sofreram uma muito profunda modificação na sua composição específica. Desapareceram as formas de pequena dimensão e em contraposição desenvolveu-se uma população de ciliados de grandes dimensões celulares. Com esta modificação, a actividade metabólica da fracção de ciliados baixa, uma vez que quanto maior o tamanho celular, menor será o intercâmbio metabólico das células com o seu

meio exterior e maior também o seu tempo de geração, tornando-as mais sequestráveis no compartimento retículo-ruminal, baixando a sua contribuição para economia proteica do ruminante, com a agravante de que são formas que predam sobre outras, acrescentando mais um elo à cadeia alimentar.

Para baixos níveis de proteína, e para manter a eficiência produtiva, pensamos que os animais não deverão ingerir quantidades de bolota muito superiores a 30%.

A elevação dos níveis de proteína foi determinante na modificação quantitativa e qualitativa da micropopulação e de todos os parâmetros digestivos com ela relacionados. Apesar de os níveis de ácido láctico no conteúdo retículo-ruminal terem subido francamente, ficaram muito aquém dos valores registados por vários autores trabalhando com concentrados energéticos convencionais. O retículo-rumen nunca manifestou tendências para ser dirigido para uma fermentação de tipo propiónico. A forma física segundo a qual a bolota é ingerida pelos animais (inteira), retarda a sua digestão. O animal poderá beneficiar deste facto não ficando tão exposto à acidose, no entanto, por outro lado, poderá baixar os coeficientes de ingestibilidade. Não se conhecem ainda valores para a taxa de degradação do amido da bolota, que terá as suas particularidades específicas. Permitimo-nos, contudo, referir que os valores para a digestibilidade aparente do amido estimado nos nossos animais, foram equiparáveis aos valores registados por outros autores utilizando vários tipos de amido (>90 %). Estes valores traduzem no entanto apenas o seu desaparecimento no

compartimento digestivo, não possibilitando uma imagem real do seu aproveitamento. Não podemos esquecer que o sistema digestivo conta com a existência de um compartimento a jusante da zona de intervenção enzimática do hospedeiro, onde se processa uma actividade fermentativa de natureza microbiana sobre todos os remanescentes digestivos. Uma boa parte do amido pode escapar à actividade das amilases pancreáticas e ficar, desta forma, disponível para a fermentação no cego/colon, que embora beneficiando o hospedeiro adicionalmente com mais AGVs, mas provocando uma mobilização de azoto a partir do sangue do hospedeiro, aumentando assim a sua excreção fecal.

Em nossa opinião, consideramos imperativo a realização de estudos para a caracterização do amido da bolota no que refere aos coeficientes de utilização digestiva nos vários sectores do tracto digestivo dos ruminantes, à semelhança do que foi feito por ORSKOV et al., (1986), para uma mais completa avaliação das características nutritivas da bolota.

Ao nível de 8,5% PB nas dietas não encontramos qualquer interferência nos vários parâmetros lidos, que possam ser atribuídos à ingestão de taninos, situação também verificada nos estudos efectuados "in vitro", particularmente nas condições de utilização de bolota em adiantada fase de maturação e com baixa adstringência. Contudo, sem qualquer suplementação azotada, e nas condições aproximadas do montado seco, foi possível verificar "in vitro" uma interferência bastante significativa por parte dos taninos, no desenvolvimento e actividade tanto das bactérias como dos

ciliados, mesmo com bolota em fase de maturação adiantada. Desta forma reforçamos aqui as recomendações de ALMEIDA (1987), no sentido de garantirem uma suplementação proteica mínima para os animais em pastagem no montado seco e com grande disponibilidade em bolota.

O retículo-rumen adaptado ao consumo elevado de bolota possui elevada tolerância relativamente à presença de taninos, apresentando na composição da sua microflora em 4% dos seus elementos toleram níveis de ácido tânico tão elevados como 5 - 8 mg/ml. Seria interessante verificar se esta fracção seria capaz de utilizar o ácido tânico como fonte de carbono e energia e fazer a caracterização bacteriológica dos seus componentes.

Os animais nas nossas condições experimentais ingeriram uma quantidade de lípidos superiores aos limites tolerados pelo ecossistema retículo-ruminal. Pudémos verificar "in vitro" um elevado grau de interferência na digestão dos componentes da fibra celulósica e na população de ciliados, quando utilizámos EE de bolota na quantidade em que os animais ingeriram ao longo de toda a experimentação. A situação poderia ser atenuada se a bolota não apresentasse um nível de cálcio tão baixo na sua constituição, uma vez que a sua presença em grandes quantidades conferiria uma capacidade saponificante que baixaria consideravelmente o grau de interferência na digestão da celulose.

A utilização de arbustivas do montado parece oferecer algumas possibilidades na sua utilização, mas numa perspectiva de recurso para manutenção dos efectivos animais

em situações de penúria forraginosa. O estudo por nós efectuado "in vitro" mostrou que a utilização das folhas de azinheira oferece grandes possibilidades para a utilização pelos animais, parecendo, mesmo substituir com vantagem a palha, o que não foi possível verificar com as folhas de oliveira e sobreiro, particularmente esta última pela elevada adstringência que manifestou.

Relativamente à utilização de PEG₄₀₀₀ como agente despistante dos taninos, podemos concluir que embora quimicamente inerte comportou-se, particularmente nas experiências "in vivo", como agente osmoticamente activo, comportamento assinalado já por outros autores. A sua introdução no retículo-rumen, modificou as taxas de "out-flow" do marcador da fase líquida Cr.EDTA, embora de uma forma não significativa, e terá sido responsável pela diminuição das populações de ciliados e consequente aumento nas populações bacterianas. "In vitro", a sua utilização pareceu-nos bastante eficiente no bloqueamento dos taninos em solução, se bem que em algumas situações nos tenha sugerido um certo grau interferência no comportamento dos ciliados. Quando os substractos possuem quantidades expressivas de taninos na sua constituição, a presença de PEG é de facto extremamente importante no seu despiste.

BIBLIOGRAFIA

- ABE, M., SHIBUI, T; KUMENO, F., 1973. Relation between diet and protozoal population in the rumen. Br. J. Nutr., **29**, 197.
- ABE, M.; IRIKI, T., 1978. Effects of diet on the protozoa population in permeable continuous cultures of rumen contents. Br. J. Nutr., **39**, 255.
- ABE, M.; IRIKI, T.; TOBE, N.; SHIBUI, H., 1981. Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 758.
- ABOU AKKADA, A. R.; BARTLEY, E. E.; FINA, L.R., 1969. Ciliate protozoa in the rumen of the lactating cow. J. Dairy Sci., **52**, 1088.
- ABOU AKKADA, A. R.; EADIE, J. M.; HOWARD, B. H., 1963. The biochemistry of rumen protozoa: 7. The carbohydrases of Polyplastron multivesiculatum. Biochem. J., **89**, 268.
- ABOU AKKADA, A. R.; HOBSON, P. N.; HOWARD, B. H., 1959. Carbohydrate fermentation by rumen protozoa of genus Entodinium. Biochem. J., **73**, 44.
- ABOU-AKKADA, A. R.; EL-SHAZLY, K., 1964. Effect of absence of ciliate protozoa from the rumen on microbial activity and growth of lambs. Appl. Microbiol., **12**, 384.
- ABOU-AKKADA, A. R.; HOWARD, B. H., 1960. The biochemistry of rumen protozoa. 3. The carbohydrate metabolism of Entodinium. Biochem. J., **76**, 445.
- ABOU-AKKADA, A. R.; HOWARD, B. H., 1961. The biochemistry of rumen protozoa. 4. Decomposition of pectic substances. Biochem. J., **78**, 512.
- AKIN, D. E., 1980. Attack on lignified grass cell walls by a facultatively anaerobic bacterium. Appl. Environ. Microbiol., **40**, 809.
- AKIN, D. E.; RIGSBY, L. L., 1987. Mixed fungal populations and lignocellulosic tissue degradation in the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol., **53**, 1987.
- ALLISON, M. J., 1969. Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms. J. Anim. Sci., **29**, 797.
- ALLISON, M. J., 1970. Nitrogen metabolism of ruminal microorganisms. In "Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant", 456. PHILLIPSON, A. T. et al.(ed), Oriel Press, Newcastle Upon Tyne.
- ALLISON, M. J.; BRYANT, M. P., 1963. Biosynthesis of branched-chain amino acids from branched-chain fatty acids by rumen bacteria. Arch. Biochem. Biophys., **101**, 269.
- ALLISON, M. J.; BRYANT, M. P.; DOETSCH, R. N., 1958. A volatile fatty acid growth requirement for cellulolytic cocci of the bovine rumen. Science, **128**, 474.
- ALLISON, M. J.; BRYANT, M. P.; DOETSCH, R. N., 1962. J. Bacteriol., **83**, 523.
- ALLISON, M. J.; BUCKLIN, J. A.; DOUGHERTY, R. W., 1964. Ruminal changes after overfeeding with wheat and the effect of intraruminal inoculation on adaptation to a ration containing wheat. J. Anim. Sci., **23**, 1164.
- ALLISON, M. J.; PEEL, J. L., 1971. The biosynthesis of valine from isobutyrate by Peptostreptococcus elsdenii

- and Bacteroides ruminicola. Biochem. J., 121, 431.
- ALLISON, M. J.; ROBINSON, I. M.; DOUGHERTY, R. W.; BUCKLIN, J. A., 1975. Grain overload in cattle and sheep: changes in microbial populations in the cecum and rumen. Am. J. Vet. Res., 36, 181.
- ALMEIDA, J. A. A., 1986. Influência dos taninos de frutos Quercus ilex L. e Quercus suber L. sobre a fermentação retículo-ruminal e a digestão enzimática das proteínas. Tese de doutoramento. Universidade de Évora.
- AMOS, H. E.; AKIN, D. E., 1978. Rumens protozoal degradation of structurally intact forage tissues. Appl. Environ. Microbiol., 36, 513.
- ANNISON, E. F., 1975. Microbial protein synthesis in relation to amino acid requirements. In "Tracers Studies on Non-Protein Nitrogen for Ruminants", 141. IAEA, Vienna, Austria.
- ARAMBEL, M. J.; BARTLEY, E. E.; DUFVA, G. S.; NAGARAJA, T. G.; DAYTON, A. D., 1982. Effect of diet on amino and nucleic acids of rumen bacteria and protozoa. J. Dairy Sci., 65, 2095.
- ARMSTRONG, D. G., 1969. Cell bioenergetics and energy metabolism". In "Handbuch der tierernahrung", vol. 1, 390. CRASEMAN, E. (ed). Paul Parey Verlag.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1975. Methods of Analysis AOAC .12th ed.. Washington, D. C.
- BAKER, F.; HARRIS, S. T., 1947. Microbial digestion in the rumen (and caecum) with special reference to the decomposition of structural cellulose. Nutr. Abstr. Rev., 17, 3.
- BAKER, F.; NAAR, H.; MORRICE, F.; BRUCE, J., 1950. Bacterial breakdown of structural starches and starch products in the digestive tract of ruminant and non-ruminant mammals. J. Pathol. Bacteriol., 62, 617.
- BALDWIN, R. L., 1968. Estimation of theoretical calorific relationships as a teaching technique. A review. J. Dairy Sci., 51, 104.
- BALDWIN, R. L.; ALLISON, M. J., 1983. Rumens metabolism. J. Anim. Sci., 57, 461.
- BARRY, T. N.; DUNCAN, S. J., 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of Lotus pedunculatus for sheep. 1. Voluntary intake. Br. J. Nutr., 51, 485.
- BARRY, T. N.; DUNCAN, S. J., 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of Lotus pedunculatus for sheep. 1. Voluntary intake. Br. J. Nutr., 51, 485.
- BARRY, T. N.; MANLEY, T. R., 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of Lotus pedunculatus for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. Br. J. Nutr., 51, 493.
- BARRY, T. N.; MANLEY, T. R., 1986. Interrelationships between the concentrations of total condensed tannin, free condensed tannin and lignin in Lotus sp. and their possible consequences in ruminant nutrition. J. Sci. Agric., 37, 248.
- BARRY, T. N.; MANLEY, T. R.; DUNCAN, S. J., 1986. The role

- of tannins in the nutritional value of Lotus pedunculatus for sheep. 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. Br. J. Nutr.,
- BARRY, T. N.; REID, C. S. W., 1984. Nutritional effects to condensed tannins, cyanogenic glycosides and oestrogenic compounds in New Zealand Forages. In "Forage Legumes for Energy-Efficient Animal Production". Proceedings.
- BASARABA, J., 1966. Effects of vegetable tannins on glucose oxidation by various microorganisms. Can. J. Microbiol., 12, 787.
- BASDEN, K. W.; DALVI, R. R., Determination of total phenolics in acorns from different species of oak trees in conjunction with acorn poisoning in cattle. Veterinary and Human Toxicology, 29, 305.
- BAUCHOP, T., 1979a. The rumen anaerobic fungi: colonizers of plant fibre. Ann. Rech. Vétérinaires, 10, 246.
- BAUCHOP, T., 1979b. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. Appl. Environ. Microbiol., 38, 148.
- BAUCHOP, T., 1981. The anaerobic fungi in rumen fiber digestion. Agric. Environ., 6, 339.
- BAUCHOP, T.; CLARKE, R. T. J.; NEWHOOK, J. C., 1975. Scanning electron microscope study of bacteria associated with the rumen epithelium of sheep. Appl. Environ. Microbiol., 30, 668.
- BEGOVIC, S.; DUZIC, E., 1977. Isolating tannase from mucosa of rumen of cattle and comparison activity. Nutr. Abstr. and Rev. Series B, 1979.
- BEGOVIC, S.; DUZIC, E.; ALMASA, S.; TAFRO, A., 1979. Variations in tannase activity in the rumen contents and rumen mucose of goats given oak leaves and during intraruminal application of 3 to 10% tannic acid. Nutr. Abstr. and Rev., Series B, 1981.
- BELLETT, B., 1984. Etude des variations de la microflore ruminale des ovins et caprins en fonction de differents regimes. These. Université de Dijon.
- BEN-GHEDALIA, D.; TAGARI, H., 1977. Digestive and ruminal metabolism of sheep fed sorghum (S. vulgare) and maize (Z. mais) silages. Nutrition Reports International, 16, 657.
- BENOIT, R. E.; STARKEY, R. L.; BASARABA, J., 1968. Effect of purified plant tannin on decomposition of some organic compounds and plant materials. Soil Science, 105, 153
- BIGHAM, M. L.; McMANUS, W. R., 1975. Whole wheat grain feeding of lambs. V. Effects of roughage and wheat grain mixtures. Aus. J. Agric. Res., 26, 1053.
- BLACKBURN, T. H.; HOBSON, P. N., 1960. Proteolysis in the sheep rumen by whole and fractionated rumen contents. J. Gen. Microbiol., 22, 272.
- BLANCO, M. M.; MACARRO, J. B. A., 1965. Utilización de harina de bellota (Quercus ilex) en la ración de pollos para carne". Revista de Nutricion Animal, III, 258.

- BOND, D. A., 1976. In vitro digestibility of the testa in tannin-free field beans (*Vicia faba* L.) . J. Agric. Science (Camb.), 86, 561.
- BONHOMME, A. et M. DURAND, 1974. Variations qualitatives et quantitatives de la faune du rumen du mouton en fonction de la nature du régime . Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 14, 679.
- BONHOMME, A., 1974. Contribution a l'étude de la physiologie des ciliés Entodiniomorphes endocommensaux des ruminants et des équids . Thèse, Université de Reims.
- BONHOMME, A.; FONTY, G.; WEBER, M.; ROBBIC, J., 1983. Activité cellulolytique de *Polyplastron multivesiculatum*" . J. Protozool., 30, 63.
- BONHOMME-FLORENTIN, A., 1975. Activité cellulolytique des ciliés entodiniomorphes . J. Protozool., 22, 445.
- BOOTH, A. N.; BELL, T. A., 1968. Physiological effects of sericea tannin in rats . Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 128, 800.
- BORHAMI, B. E. A.; EL-SHAZLY, K.; ABOU-AKKADA, A. R.; AHMED, I. A., 1967. Effect of early establishment of ciliate protozoa in the rumen on microbial activity and growth of early weaned buffalo calves . J. Dairy Sci., 50, 1654
- BORNEMAN, S.; AKIN, D. E., 1985. Phenolic compounds and rumen bacteria . Report on XVIII Conference on Rumen Function, Chicago.
- BOYNE, A. W.; EADIE, J. M.; RAITT, K., 1957. The development and testing of a method of counting rumen ciliate protozoa . J. Gen. Microbiol., 45, 213.
- BOZA, J., J. FONOLLA et G. VARELA, 1966. Digestibilidad y valor nutritivo de la harina de bellota desecada y entera en óvidos . Advances Aliment. Mejora Animal, Vol. 7.
- BRIGGS, P. K.; HOGAN, J. P.; REID, R. L., 1957. The effect of volatile fatty acids, lactic acid and ammonia on rumen pH in sheep . Aust. J. Agric. Res., 8, 674.
- BROUGHT, B. E.; HOWARD, B. H., 1971. The biochemistry of the rumen bacterium Quin's Oval. Part 2 . N. Z. J. Sci., 13, 576.
- BRUGGEMANN, J.; GIESECKE, D., 1967. The effect of urea on rumen microbiology and metabolism. In Urea as a protein supplement. BRIGGS, M. H. (ed). Pergamon Press, New York.
- BRYANT, M. P., 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria . Am. J. Clin. Nutr., 25, 1324.
- BRYANT, M. P., 1973. Nutritional requirements of the predominant cellulolytic bacteria . Fed. Proc., 32, 1809.
- BRYANT, M. P., 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria . 12th Annual Ruminant nutrition Conference.
- BRYANT, M. P., 1977. Microbiology of the rumen . In Duke's Physiology of Domestic Animals, SIVENSON, M. J. (ed), 9th ed., Cornell University.

- BRYANT, M. P.; BOUMA, C.; ROBINSON, I., 1958. Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves . J. Dairy Sci., 41, 1747.
- BRYANT, M. P.; BURKEY, L. A., 1953. Numbers and some predominant groups of bacteria in the rumen of cows fed different rations . J. Dairy Sci., 36, 218.
- BRYANT, M. P.; BURKEY, L., 1953. Cultural methods and some characterization of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen . J. Dairy Sci., 36, 205.
- BRYANT, M. P.; DOETSCH, R. N., 1955. Factors necessary for the growth of Bacteroides succinogenes in volatile acid fraction of rumen fluid . J. Dairy Sci., 38, 340.
- BRYANT, M. P.; ROBINSON, I. M., 1961. An improved nonselective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen . J. Dairy Sci., 44, 1446.
- BRYANT, M. P.; ROBINSON, I. M., 1962. Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria . J. Bacteriol., 84, 605.
- BRYANT, M. P.; SMALL, N., 1960. Observations on the ruminal microorganisms of isolated and inoculated calves . J. Dairy Sci., 43, 6540.
- BUCKLEY, K. E.; DELVIN, T. J.; MARQUARDT, R. R., 1983. Factors affecting in vitro rumen digestion of faba bean cultivars (Vicia faba L.) . Canadian J. Anim. Science, 63, 89.
- BURNS, J. C.; COPE, W. A., 1974. Nutritive value of crownvetch forage as influenced by structural constituents and phenolic and tannin compounds. Agronomy J., 66, 195.
- C.O.C.S.A., 1967. Avenida de Baviera, 6, Madrid 2, Espana.
- CAFANTARIS, B., 1981. Einflub von antibiotika auf die mikrobielle garung im pansensaft in vitro. Dissertation, Hohnheim.
- CARVALHO, J. S., 1979. Perspectivas de industrializaçao da bolota. Perspectivas de racionalizaçao do aproveitamento das bolotas de Q. ilex e Q. suber". Conferencia.
- CATYD, 1979. "Cria, alimentacion animal, transformacion industrial y derivados. S. A. Apartado 1.016, Sevilla, Espana.
- CHALMERS, M. I., 1969. Nitrogen nutrition for lactation . In Lactation, p. 379. FALCONER, I. R. (ed). Butterworth, London.
- CHALUPA, W.; RICKABAUGH, B.; KRONFELD, D. S.; SKLAN, D., 1984. Rumen fermentation in vitro as influenced by long chain fatty acids . J. Dairy Sci., 67, 1439.
- CHENG, K. J.; FAY, J. P.; COLEMAN, R. N.; MILLIGAN, L. P.; COSTERTON, J. W., 1981. Formation of bacterial microcolonies on feed particles in the rumen. Appl. Environ. Microbiol., 41, 298.
- CHENG, K. J.; IRVIN, R. T.; COSTERTON, J. W., 1981. Autochthonous and pathogenic colonization of animal

- tissues by bacteria. Can. J. Microbiol., 27, 461.
- CHENG, K. J.; JONES, G. A.; SIMPSON, F. J.; BRYANT, M. P., 1969. Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic rutin degradation. Can. J. Microbiol., 15, 1365.
- CHENG, K. J.; KRISHNAMURTY, H. G.; JONES, G. A.; SIMPSON, F. J., 1971. Identification of products produced by the anaerobic degradation of naringin by Butyrivibrio sp.. Can. J. Microbiol., 17, 129.
- CHENG, K. J.; McCOWAN, R. P.; COSTERTON, J. W., 1974. Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. Am. J. Clin. Nutr., 32, 139.
- CHENG, K. J.; McCOWAN, R. P.; COSTERTON, J. W., 1980. Distribution and enzyme activity of the bacterial population adherent to the epithelium of the bovine rumen. (Abstr.), Ann. Meet., Agric. Can. Res. Stat. Lethbridge, Alberta and Univ. Calgary.
- CHENG, K. J.; STEWART, C. S.; DINSDALE, D.; COSTERTON, J. W., 1983/1984. Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant cell walls. Anim. Feed. Sci. Technol., 10, 93.
- CHRISTIANSEN, W. C., 1963. Nutrient and other environmental influences upon rumen protozoal growth and metabolism. Ph.D. Thesis Iowa State University, Ames-Iowa.
- CHRISTIANSEN, W. C.; KAWASHIMA, R.; BURROUGHS, W., 1965. Influence of protozoa upon rumen acid production and liveweight gains in lambs. J. Anim. Sci., 24, 730.
- CHRISTIANSEN, W. C.; WOODS, W.; BURROUGHS, W., 1964. Ration characteristics influencing rumen protozoal population. J. Anim. Sci., 23, 984.
- CLARKE, R. T. J., 1964. Ciliates of rumen of domestic cattle Bos taurus L.. N. Z.J. Agric. res., 7, 248.
- CLARKE, R. T. J., 1964. Studies on the flora and fauna of bovine rumen". Doctoral Thesis. Massey Univ. of Manawata, New Zealand.
- CLARKE, R. T. J., 1977. Methods for studying gut microbes. In Microbiological Ecology of the gut, 1-33. CLARKE, R. T. J. and BAUCHOP, T. (ed).
- CLARKE, R. T. J., 1979. Niche in pasture-fed ruminants for the large rumen bacteria Oscillospira, Lamprospira, and Quin'Oval. Appl. Environ. Microbiol., 37, 654.
- COLBERG, P. J.; YOUNG, L. Y., 1985. "Aromatic and volatile acid intermediates observed during anaerobic metabolism of lignin-derived oligomers. Appl. Environ. Microbiol., 49, 350.
- COLEMAN, G. S., 1975. "The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria". In Digestion and Metabolism in the Ruminant, 149. McDONALD, I. W. and WARNER, A. C. I. (ed). The University of New England Publishing Unit, Armidale"
- COLEMAN, G. S., 1980. Rumen ciliate protozoa. In Advances in Parasitology, vol. 18, 121-173. MULLER, H. R. and BAKER, J. R. (ed). Academic Press, London.

- COLEMAN, G. S.; LAURIE, J. I.; BAILEY, J. E.; HOLDGATE, S. A., 1976. The cultivation of cellulolytic protozoa isolated from the rumen. J. Gen. Microbiol., **95**, 144.
- COLEMAN, G. S.; REYNOLDS, D. J., 1982. The uptake of bacteria and aminoacids by Ophryoscolex caudatus, Diploplastron affine and some other rumen Entodiniomorphid protozoa. J. Appl. Bact., **52**, 135.
- COLEMAN, G. S.; SANDFORD, D.C., 1979. The engulfment and digestion of mixed rumen bacteria and individual bacterial species by single and mixed species of rumen ciliate protozoa grown in vivo. J. Agric., Camb., **92**, 729.
- COMBS, G. E.; WALLACE, H. D., 1976. Grain sorghum in starter and grower diets. Res. Report n^o A1 - 1976, Florida Agricultural Experimental Station, USA.
- COPE, W. A.; BELL, T. A.; SMART, W. W. G., 1971. Seasonal changes in an enzyme inhibitor and tannin content in Sericea lespedeza. Crop Science, **11**, 893.
- COPE, W. A.; BURNS, J. C., 1971. Relationship between tannin levels and nutritive value of sericea. Crop Science, **11**, 231.
- COSTERTON, J. W.; GEESSEY, G. G.; CHENG, K. J., 1978. How bacteria stick. Scientific American, **238**, 86.
- CRAIG, W. M.; BRODERICK, G. A.; RICKER, D. B., 1987. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. J. Nutr., **117**, 56.
- CRAIG, W. M.; HONG, B. J.; BRODERICK, G. A.; BULA, R. J., 1984. In vitro inoculum enriched with particle-associated microorganisms for determining rates of fiber digestion and protein degradation. J. Dairy Sci., **67**, 2902.
- CZERKAWSKI, J. W., 1973. Effect of linseed oil on rumen fermentation in sheep. J. Agric. Sci. Camb., **81**, 517.
- CZERKAWSKI, J. W., 1979. Compartmentation in the rumen. H.R.I. Annual Report, **1138**, 69.
- CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, G., 1969. The fermentation of shugar-beet pulp and sucrose in an artificial rumen, and the effect of linseed oil fatty acids on the fermentation. Br. J. Nutr., **23**, 51.
- CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, G., 1977. Design and development of a long term rumen simulation technique (Rusitec). Br. J. Nutr., **38**, 371.
- CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, G., 1979a. Experiments with the long term rumen simulation technique (Rusitec); response to supplementation of basal rations. Br. J. Nutr., **42**, 217.
- CZERKAWSKI, J. W.; BRECKENRIDGE, G., 1979b. Experiments with the long term rumen simulation technique (Rusitec); use of soluble food and an inert matrix. Br. J. Nutr., **42**, 229.
- DAGLEY, S., 1971. Catabolism of aromatic compounds by microorganisms. Adv. Microbiol. Physiol., **6**, 1.
- DAVIES, C. H., 1977. Production feeding of weaner sheep. Wool Technol. Sheep Breed, **25**, 3.

- DEHORITY, B. A., 1970. Occurrence of ciliate protozoa Buetchlia parva Shuberg in the rumen of the ovine. Appl., Microbiol., 19, 179.
- DEHORITY, B. A., 1974a. Rumen ciliate protozoa of Alaskan reindeer and caribou (Rangifer tarandus L.). 1st Int. Reindeer/Caribou Symp., Proc., University of Alaska.
- DEHORITY, B. A., 1974b. Rumen ciliate fauna of Alaskan moose (Alces americana), musk-ox (Ovibos moschatus) and dall mountain sheep (Ovis dalli). J Protozool., 21, 26.
- DEHORITY, B. A.; GRUBB, J. A., 1976. Basal medium for the selective enumeration of rumen bacteria utilizing specific energy sources. Appl. Environ. Microbiol., 32, 703.
- DEHORITY, B. A.; GRUBB, J. A., 1980. Effect of short term chilling of rumen contents on viable bacterial numbers. Appl. Environ. Microbiol., 39, 376.
- DEHORITY, B. A.; GRUBB, J. A., 1981. Bacterial population adherent to the epithelium on the roof of the dorsal rumen of sheep. Appl. Environ. Microbiol., 41, 1424.
- DEMEIJER, D. I., 1976. Een kwantitatieve studie van her metabolisme van pensmaaginhoud. Thesis State, Univ. Ghent, Belgium.
- DEMEYER, D. I., 1981. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. Agric. Environ., 6, 295.
- DEMEYER, D. I.; VAN NEVEL, C. J., 1979. Effect of defaunation on the metabolism of rumen microorganisms. Br. J. Nutr., 43, 515.
- DENNIS, S. M.; ARAMBEL, M. J.; BARTLEY, E.E.; DAYTON, A. D., 1983. Effect of energy concentration and source of nitrogen on numbers and types of rumen protozoa. J. Dairy Sci., 66, 1248.
- DEVENDRA, C.; LEWIS, D., 1974. The interaction between dietary lipids and fibre in the sheep. 2. Digestibility studies. Anim. Prod., 19, 67.
- DINSDALE, D.; CHENG, K. J.; WALLACE, R. J.; GOOLAD, R. A., 1980. Digestion of epithelial tissues of the rumen wall by adherent bacteria in infused and conventionally fed sheep. Appl. Environ. Microbiol., 39, 1059.
- DINSDALE, D.; MORRIS, E. J.; BACON, J. S. D., 1978. Electron microscopy of the microbial populations present and their modes of attachment on various cellulosic substrates undergoing digestion in the sheep rumen. Appl. Envi. Mic., 36, 160
- DONNELLY, E. D.; ANTHONY, W. B., 1969. Relationship of tannin, dry matter digestibility and crude protein in Sericea lespedeza (fistulated steers). Crop Sci., 9, 361.
- DONNELLY, E. D.; ANTHONY, W. B., 1970. Effect of genotype and tannin on dry matter digestibility in Sericea lespedeza. Crop Science, 10, 200.
- DUNLOP, R. H.; HAMMOND, P. B., 1965. D-Lactic acidosis of ruminants. Ann. New York Academ. Sci., 119, 1109.
- DUNLOP, R. H., 1972. Pathogenesis of ruminant lactic acidosis. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 16, 259.
- E.Z.N., 1956. Composição química e valor nutritivo de

- algumas forragens nacionais. Estação Zootécnica Nacional, Fonte Boa, Portugal.
- EADIE, J. M., 1962. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. J. Gen. Microbiol., 29, 563.
- EADIE, J. M., 1962a. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. J. Gen. Microbiol., 29, 563.
- EADIE, J. M.; HOBSON, P. N., 1962. Effect of the presence or absence of rumen ciliate protozoa on the rumen bacterial count in lambs. Nature, London, 193, 503.
- EADIE, J. M.; HOBSON, P. N.; MANN, S. O., 1959. A relationship between some bacteria, protozoa and diet in early weaned calves. Nature, 183, 624.
- EADIE, J. M.; HOBSON, P. N.; MANN, S. O., 1967. A note on some comparisons between the rumen content of barley-fed steers and that of young calves also fed on a high concentrate ration. Anim. Prod., 9, 247.
- EADIE, J. M.; HYLDGAARD-JENSEN, J.; MANN, S. O.; REID, R. S.; WHITELAW, F. G., 1970. Observations on the microbiology and biochemistry of the rumen in cattle given different quantities of a pelleted barley ration. Br. J. Nutr., 24, 157.
- EADIE, J. M.; MANN, S. O., 1970. Development of the rumen microbial population; high starch diets and instability. In Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant, PHILIPSON, A. T. (ed). Oriel Press, Newcastle upon Tyne, 335.
- EL-SHAZLY, K.; AHMED, E. I. A.; NAGA, M. A.; BORHAMI, B. E. A, 1976. A colorimetric technique using chromium-ethylene diamine tetra acetate for measuring rumen volume. J. Agric. Sci., Camb., 87, 369.
- ELKIN, R. G.; FEATHERSTON, W. R.; ROGLER, J. C., 1978. Investigations of leg abnormalities in chicks consuming high tannin sorghum grain diets. Poultry Sci. 57, 757.
- ELKIN, R. G.; ROGLER, J. C.; FEATHERSTON, W. R., 1978. Influence of sorghum grain tannins on methionine utilization in chicks. Poultry Sci., 57, 704.
- EVANS, W. C., 1977. Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. Nature, 270, 17.
- FAUCONNEAU, G.; GAUSSERES, B., 1961. Les bactéries et les protozoaires libres du rumen. Variation avec le régime alimentaire et le repas. Festsch.zum. VIII. Intern. Tierzuchtkongress in Hamburg, 32.
- FEENEY, P. P., 1969. Inhibitory effect of oak leaf tannins on the hydrolysis of proteins by trypsin. Phytochemistry, 8, 2119.
- FERREIRA, M. F. et L. V. CASTRO, 1966. A farinha de bolota na alimentaço das aves em crescimento. Direcção Geral dos Serviços Pecuários de Lisboa.
- FERREIRA, M. S. V., 1984. Estudo in vivo da digestibilidade da bolota. Trabalho de fim de curso. Universidade de

- Évora.
- FFOULKES, D.; LENG, R. A., 1988. Dynamics of protozoa in the rumen of cattle. Br. J. Nutr., 59, 429.
- FONTY, G.; GOUET, Ph.; JOUANY, J. P.; SENAUD, J., 1982. Ecological factors determining establishment of cellulolytic bacteria and protozoa in the rumen of meroxenic lambs. Submetido a publicação no Br. J. Nutrition.
- FONTY, G.; GOUET, Ph.; JOUANY, J. P.; SENAUD, J.; GRAIN, J.; THIVEND, P.; BONHOMME, a., 1981. Implantation of cellulolytic bacteria and protozoa in meroxenic lambs. In. Recent Advances in Germfree Research, 189, SASAKI et al. (ed). Tokai.
- FONTY, G.; JOUANY, J. P.; SENAUD, J.; GOUET, Ph.; GRAIN, J., 1984. The evolution of microflora, microfauna and digestion in the rumen of lambs from birth to 4 months. Can J. Anim. Sci., 64, 165.
- FORD, J. E.; HEWIIT, D., 1979. Protein quality in cereals and pulses. 3. Bioassays with rats and chickens on sorghum (Sorghum vulgare Pers.), barley and field beans (Vicia faba L.). Influence of Polyethyleneglycol on digestibility on the protein in high tannin grain. Br. J. Nutr., 42, 325.
- FORSBERG, C. W.; LAM, K., 1977. Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. Appl. Environ. Microbiol., 33, 528.
- FORSBERG, C. W., 1978. Some effects of arsenic on the rumen microflora; an "in vitro" study. Can. J. Microbiol., 24, 36.
- FREITAS, A. B., 1989. Valor nutritivo de cereais nacionais como fonte alimentar para aves. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa."
- FULGHUM, R. S.; MOORE, W. E. C., 1963. Isolation, enumeration, and characteristics of proteolytic ruminal bacteria. J. Bacteriol., 85, 808.
- FULGHUM, R. S.; MOORE, W. E., 1963. Isolation, enumeration and characteristics of proteolytic ruminal bacteria. J. Bact., 85, 808.
- GIESECKE, D.; LAWLOR, M. J.; WALSER-KARST, K., 1966. Comparative studies on the digestive physiology of sheep fed on semi-purified or roughage-concentrate diet. 2. Microbial investigations. Br. J. Nutr., 20, 383.
- GLICK, Z.; JOSLYN, M. A., 1970. Effect of tannic acid and related compounds on the absorption and utilization of proteins in the rat. J. Nutr., 100, 516.
- GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T., 1963. Changes in the tannins in ripening fruit. Phytochemistry, 2, 371.
- GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T., 1965. The inhibition of enzymes by tannins. Phytochemistry, 4, 185.
- GRAIN, J.; GROLIERE, C. A.; SENAUD, J.; PUYTORAC, P.; ZAINAB, B.; JOUANY, J. P., 1979. "Ciliate implantation in the rumen: influence of inoculated genus and type of diet". Ann. Rech. Vét., 10, 264.

- GRAIN, J.; SENAUD, J., 1984. New data on the degradation of fresh lucern fragments by the rumen ciliate Epidinium ecaudatum: attachment, ingestion and digestion. Can. J. Anim. Sci., 64, 26.
- GRAIN, J.; SENAUD, J.; JOUANY, J. P.; De PUYTORAC, P., 1975. Influence du nombre de repas de l'hôte sur les variations de l'effectif d'une population de Polyplastron, Cilié Ophryoscolecidae de la panse des Ruminants. J. Protozool., 24.
- GRANT, W. D., 1976. Microbial degradation of condensed tannin. Science, 193, 1137.
- GREEN, V. E. JR., 1974. Yield and digestibility of bird resistant and non-resistant grain sorghum. Soil Cro Sci. Fla. Proc., 33, 13.
- GRUBB, I. A.; DEHORITY, B. A., 1975. Effects of an abrupt change in ration from all roughage to high concentrate upon rumen microbial numbers in sheep. Appl. Microbiol., 30, 404.
- GRUBB, J. A.; DEHORITY, B. A., 1975. Effects of an abrupt change in ration from all roughage to high concentrate upon rumen microbial numbers in sheep. Appl. Microbiol., 3, 404.
- GULATI, S. K.; ASHES, J. R.; GORDON, G. L. R.; PHILLIPS, M. W., 1985. Possible contribution of rumen fungi to fibre digestion in sheep. Proceedings of Nutrition Society Australia, 10.
- GUSTAVSON, K. H., 1956. The chemistry of tanning processes, pg. 403. Academic Press, New York.
- GUSTAVSON, K. H., 1954. Interaction of vegetable tannins with polyamides as proof of the dominant function of the peptide bond of collagen for its binding of tannins. J. Polymer Sci., 12, 317.
- GUTIERREZ, J., 1955. Experiments on the culture and physiology of holotrichs from the bovine rumen. Bioch. J., 60, 516.
- GUTIERREZ, J.; HUNGATE, R. E., 1957. Interrelationship between certain bacteria and the rumen ciliate Dasytricha ruminantium. Science, 126, 511.
- HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G., 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. J. Agric. Food Chemistry, 26, 809.
- HALL, D. G.; WOOLFOLK, P. G., 1952. Comparison of different length preliminary and collection periods in digestion trials with lambs fed chopped alfalfa hay. J. Anim. Sci., 11, 762.
- HAMLIN, L. J.; HUNGATE, R. E., 1956. Culture and physiology of a starch-digesting bacterium (Bacteroides amylophilus n. sp.) from the bovine rumen. J. Bacteriol., 72, 548.
- HAQUE, H.; RUSSELL, A. D., 1974. Effect of ethylenediaminetetracetic acid and related chelating agents on whole cells of Gramnegative bacteria. Antimicrob. Agents Chemother., 5, 447.
- HARFOOT, C. G., 1978. Lipid metabolism in the rumen. Prog. Lipid Res., 17, 21.
- HARFOOT, C. G.; CROUCHMAN, M. L.; NOBLE, R. C.; MOORE, J. H.,

1974. Competition between food particles and rumen bacteria in the uptake of long-chain fatty acids and triglycerides. J. Appl. Bact., 37, 633.
- HARPER, W. J.; RANDOLPH, H. E., 1960. Lactic acid in cheese. Am. Milk Rev., 22, 6.
- HARRISON, D. G.; BEEVER, D. E.; OSBOURN, D. F., 1979. The contribution of protozoa to the protein entering the duodenum of sheep. Br. J. Nutr., 41, 521.
- HARRISON, D. G.; McALLAN, A. B., 1980. Factors affecting microbial growth yields in the reticulo-rumen. In Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants, RUCKEBUSCH and THIVEND (ed).
- HASLAM, E., 1966. Chemistry of vegetable tannins. Academic Press, New York.
- HEALD, P. J.; OXFORD, A. E., 1953. Fermentation of soluble sugars by anaerobic holotrich ciliate protozoa of genera Isotricha and Dasytricha. Biochem. J., 53, 506.
- HEALY, J. B.; YOUNG, L. Y., 1979. Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol., 38, 84.
- HEALY, J. B.; YOUNG, L. Y.; REINHARD, M., 1980. Methanogenic decomposition of ferulic acid, a model lignin derivative. Appl. Environ. Microbiol., 39, 436.
- HENDERICKX, H. K., 1962. Onderzoekingen over het stikstof metabolisme in de pensmaag der herkauwers met behulp van de kunstmatige pens. Thesis State Univ. Ghent, Belgium.
- HENDERICKX, H. K., 1973. Stoffwechesel der stikstoffverbindingen im pansen. In Biologie und Biochimie der Mikrobiellen Verdauung, pg.168. GIESECKE, D. und HENDERCKX, H. K. (ed). BLV Verlagsgesellschaft, Munchen.
- HENDERICKX, H. K.; DEMEIJER, D. I., 1967. Ammonia production by rumen microbes" in vitro". Naturwissenschaften, 14, 369.
- HENDERSON, C., 1973. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. J. Agric. Sci., Camb., 81, 107.
- HENDERSON, C., 1975. The isolation and characterization of strains of lipolytic bacteria from the ovine rumen. J. Appl. Bact., 39, 101.
- HENNING, P. A.; VAN DER WALT, 1978. Inclusion of xylan in a medium for the enumeration of the total culturable bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 35, 1008.
- HENNIS, Y.; TAGARI, H.; VOLCANI, R., 1964. Effect of water extracts of carob pods, tannic acid, and their derivatives on the morphology and growth of microorganisms. Appl. Microbiol., 12, 204.
- HERBERT, D.; PHIPPS, P. J.; STRANGE, R. E., 1971. chemical analysis of microbial cells. In Methods in Microbiology, NORRIS & RIBBONS (ed), vol. 5B, 210.
- HESPELL, R. B., 1981. Ruminal microorganisms - their significance and nutritional value. Developments in Industrial Microbiology, 22, 261.
- HIBBERD, C. A.; WAGNER, D. G.; SCHEMM, R. L.; MITCHELL, E.

- D.; HINTZ, R. L.; WEIBEL, D. E., 1982. Nutritive characteristics of different varieties of sorghum and corn grains. J. Anim. Science, 55, 665.
- HOBSON, P. N., 1969. The Rumen bacteria. In Norris, J. R., RIBBONS, D. W. Methods in Microbiology, vol. 3B, 133, Academic Press Inc, New York."
- HOBSON, P. N., 1972. Physiological characteristics of rumen microbes and relation to diet and fermentation patterns. Proc. Nutr. Soc., 31, 135.
- HOBSON, P. N.; HOWARD, B. H., 1969. Microbial transformations. In Handbuch der Tierernahrung, LENKEIT, W., BREIREM, K. and CRASEMANN, E. (ed).
- HOBSON, P. N.; MANN, S. O., 1961. The isolation of glycerol-fermenting and lipolytic bacteria from the rumen of sheep. J. Gen. Microbiol., 25, 227.
- HOBSON, P. N.; MANN, S. O., 1971. Isolation of cellulolytic and lipolytic organisms from the rumen. In Isolation of Anaerobes, pg. 149, SHAPTON, D. A. and BOARD, R. G. (ed), Academic Press.
- HOBSON, P. N.; WALLACE, R. J., 1982. Microbial ecology and activities in the rumen. CRC Crit. Rev. Microbiol., 9, 165; 253.
- HOSKINS, J. K., 1934. Most probable numbers for evaluation of coli-aerogenes tests by fermentation tube. U. S. Publ. Hlth. Rep., 49, 393.
- HUBER, T. H.; COOLEY, J. H.; GOETSCH, D. D.; DAS, N. K., 1976. Lactic-acid-utilizing bacteria in ruminal fluid of a steer adapted from hay feeding to a high grain ration. Amer. J. Vet. Res., 37, 611.
- HUNGATE, R. E., 1943. Further experiments on cellulose digestion by the protozoa in the rumen of cattle. Biol. Bull., 84, 157.
- HUNGATE, R. E., 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, New York.
- HUNGATE, R. E., 1975. The rumen microbial ecosystem. Ann. Rev. Ecol. Syst., 6, 39.
- HUNGATE, R. E., 1978. The rumen protozoa. In Parasitic protozoa, KREIER, J. P.. Academic Press.
- HUNGATE, R. E.; DOUGHERTY, R. W.; BRYANT, M. P.; CELLO, R. M., 1952. Microbiological and physiological changes associated with acute indigestion in sheep. Cornell Vet., 42, 243.
- HUNTINGTON, G. B.; BRITTON, R. A., 1979. Effect of dietary lactic acid on rumen lactate metabolism and blood acid-base status of lambs switched from low to high concentrate diets. J. Anim. Sci., 49, 1569.
- IMAI, S.; TSUNODA, K., 1972. Scanning microscopic observations on the surface structures of ciliated protozoa in sheep rumen. Nat. Inst. Ani., Hlth. Quart., 112, 74.
- IMAI, S.; OGIMOTO, K., 1978. Scanning electron and fluorescent microscopic studies on the attachment of spherical bacteria to ciliate protozoa in the ovine rumen. Jap. J. Vet. Sci., 40, 9.
- IVAN, M.; VEIRA, D. M.; KELLEHER, C. A., 1986. The

- alleviation of chronic copper toxicity in sheep by ciliate protozoa. Br. J. Nutr., 55, 361.
- IVERSON, W. G.; MILLIS, N. F., 1977. Sucession of Streptococcus bovis strains with differing bacteriophage sensitivities in the rumen of two fistulated sheep. Appl. Environ. Microbiol., 33, 810.
- JACOB, F. H. P.; MARIE, C., 1975. "Yeast-tannin interaction". Study in a tannin medium of some tannic acid hydrolysing yeasts. Mycopathologia, 57, 139.
- JARRIGE, R., 1978. Digestion. In Alimentation des Ruminants. Ed. INRA, Publ. Route de Saint-Cyr, 7800 versailles, 23.
- JENKINS, T. C., 1987. "Effect of fats and fatty acid combinations on ruminal fermentation in semi-continuous in vitro cultures. J. Anim. Sci., 64, 1526.
- JILG, T., 1982. Untersuchungen zum proteinabbau im kunstlichen pansen unter be-ruecksichtigung der pepsin-HCl-loeslichkeit. Diplomarbeit, Univer. Hohnheim, Inst F. Tierernahrung, W. Germany.
- JOBLIN, K. N., 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. Appl. Environ. Microbiol., 42, 1119.
- JONES, E. T.; MANGAN, J. L., 1977. Complexes of the condensed tannins of sanfoin (Onobrychis viciifolia Scop.) with fraction I leaf protein and with submaxillary mucoprotein and reversal by polyethylene glycol and pH. J. Sci. Food and Agric., 28, 126.
- JOSLYN, M. A.; GLICK, Z., 1969. Comparative effects of gallic acid and related phenolics on the growth of rats. J. Nutr., 98, 119.
- JOUANY, J. P., 1978. Contribution à l'étude des protozoaires ciliés du rumen: leur dynamique, leur rôle dans la digestion et leur intérêt pour le ruminant. Thèse d'état, Université de Clermont-Ferrand.
- JOUANY, J. P., 1981. Microbiologie du rumen. Bull. Tech. C.R.Z.V. theix, I.N. R.A., 45, 51.
- JOUANY, J. P., 1982. Volatile fatty acid and alcohol determination in digestive contents, silage juices, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. Sciences des Aliments, 2, 131.
- JOUANY, J. P.; SENAUD, J., 1979. Role of rumen protozoa in the digestion of food cellulosic materials. Ann. Rech. Vét., 10, 261.
- JOUANY, J. P.; ZAINAB, B.; SENAUD, J.; GROLIERE, C. A.; GRAIN, J.; THIVEND, P., 1981. Rôle of the rumen ciliate protozoa Polyplastron multivesiculatum, Entodinium sp. and Isotricha prostoma in the digestion of a mixed diet in sheep. Repro. Nutr. Dévelop., 21, 39.
- JUNG, H-J. G.; FAHEY, G. C.; MERCHEN, N. R., 1983. Effects of ruminant digestion and metabolism on phenolic monomers of forages. Br. J. Nutr., 50, 637.
- JUNG, H. G.; FAHEY, G. C., 1983. Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: a Review. J. Anim. Sci., 57, 206.
- JUNG, H. G.; FAHEY, G. C.; GARST, J. E., 1983. Simple

- phenolic monomers of forages and effects of in vitro fermentation on cell wall phenolics. J. Anim. Sci., 57, 1294.
- JUNG, H. J. G.; FAHEY, G. O. C., 1983. Effect of phenolic compounds removal on in vitro forage digestibility. J. Agric. Food Chem., 29, 817.
- JUNG, H.-J. G.; FAHEY, G. C.; MERCHEN, N. R.-, 1983. Effects of ruminant digestion and metabolism on phenolic monomers of forages. Br. J. Nutr., 50, 637.
- KAISER, J. P.; HANSELMANN, K., 1983. Fermentative metabolism of substituted monoaromatic compounds by a bacterial community from anaerobic sediments. Arch. Microbiol., 133, 185.
- KANG-MEZNARICH, J. H.; BRODERICK, G. A., 1981. Effects of incremental urea supplementation on ruminal ammonia concentration and bacterial protein formation. J. Anim. Sci., 51, 422.
- KAUFFMANN, W.; HAGEMEISTER, H.; DIRKSEN, G., 1980. In RUCKEBUSCH, Y., THIVEND, P., Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants, pg. 587, MTP Press, RUCKEBUSCH and THIVEND, Lancaster.
- KEMP, P.; WHITE, R. W.; LANDER, D. J., 1975. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. J. Gen. Microbiol., 90, 100.
- KLOPFENSTEIN, T. J.; PURSER, D. B.; TYZNIK, W. J., 1966. Effects of defaunation on feed digestibility, rumen metabolism, and blood metabolites. J. Anim. Sci., 25, 765.
- KRISHNAMURTY, H. G.; CHENG, K. J.; JONES, G. A.; SIMPSON, F. J.; WATKIN, J. E., 1970. Identification of products produced by anaerobic degradation of rutin and related flavonoids by Butyrivibrio sp. C3. Can. J. Microbiol., 16, 759.
- KROGH, N., 1959. Studies on alterations in the rumen fluid of sheep, especially concerning the microbial composition, when readily available carbohydrates are added to the food. I. Sucrose. Acta Vet. Scand., 1, 74.
- KROGH, N., 1961. Studies on alterations in the rumen fluid of sheep, especially concerning the microbial composition, when readily available carbohydrates are added to the food. III. Starch. Act. Vet. Scand., 2, 103.
- KROGH, N., 1963. Clinical and microbiological studies on spontaneous cases of acute indigestion in ruminants. Act. Vet. Scand., 4, 27.
- KRUMHOLZ, L. R.; BRYANT, M.P., 1985. Some new rumen bacteria capable of phenolic conversions. Report on XVIII Conference on Rumen Function, Chicago.
- KRUMHOLZ, T. J.; FORSBERG, C. W.; VEIRA, D. M., 1983. Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. Can J. Microbiol., 29, 676.
- KUMAR, R.; SINGH, M., 1984. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. J. Agric. Food Chem., 32, 447.

- LAMPILA, M.; POUTIAINEN, E., 1966. Systematic differences in the composition of the bovine rumen fluid between different parts of the rumen. Ann. Agric., 5, 279.
- LATHAM, M. J.; BROOKER, B. E.; PETTIPHER, G. L.; HARRIS, P. J., 1978a. Ruminococcus flavefaciens cell coat and adhesion to cotton cellulose and to cell walls in leaves of perennial ryegrass (Lolium perenne). Appl. Environ. Microbiol., 35, 156.
- LATHAM, M. J.; BROOKER, B. E.; PETTIPHER, G. L.; HARRIS, P. J., 1978. Adhesion of Bacteroides succinogenes in pure culture and in the presence of Ruminococcus flavefaciens to cell walls in leaves of perennial ryegrass (Lolium perenne). Appl. Environ. Microbiol., 35, 1166.
- LATHAM, M. J.; SHARPE, E. M.; SUTTON, J. D., 1971. The microbial flora of the rumen of cows fed hay and high cereal rations and its relationship to the rumen fermentation. J. Appl. Bact., 34, 425.
- LATHAM, M. J.; SHARPE, M. E., 1971. The isolation of anaerobic organisms from the bovine rumen. In Isolation of Anaerobes, SHAPTON, D. A. and BOARD, R. G., pg. 133. Academic Press, New York.
- LATHAM, M. J.; SUTTON, J. D.; SHARPE, M. E., 1974. Fermentation and microorganisms in the rumen and the content of fat in the milk of cows given low roughage rations. J. Dairy Sci., 57, 803.
- LEATHERWOOD, J. M., 1973. Cellulose degradation by Ruminococcus. Fed. Proc., 32, 1814.
- LEE, G. J.; McMANUS, W. R.; ROBINSON, V. N. E., 1982. Changes in rumen fluid composition and in the rumen epithelium when wheat is introduced to the diet of sheep: The influence of Wheat and hay consumption. Aust. J. Res., 33, 321.
- LEHNINGER, A. L., 1978. Biochemistry, Editorial Worth Publishers, Inc., New York.
- LEWIS, J. A.; STARKEY, R. L., 1968. Vegetable tannins, their decomposition of some organic compounds. Soil Science, 106, 241.
- LEWIS, J. A.; STARKEY, R. L., 1969. Decomposition of plant tannins on soil microorganisms. Soil Science, 107, 235.
- LEWIS, T. R.; EMERY, R. S., 1962. Intermediate products in the catabolism of amino acids by rumen organisms. J. Dairy Sci., 45, 1363.
- LLOYD, L. E.; PECKMAN, H. E.; CRAMPTON, E. W., 1956. The effect of change of ration on the required length of preliminary feeding period in digestion trials with sheep. J. Anim. Sci., 15, 846.
- LOHAN, O.; LALL, P. D.; MAKAR, H. P. S.; NEGI, S. S., 1981. Inhibition of rumen urease activity by tannins in oak leaves. Indian J. Anim. Sci., 51, 279.
- LOMIS, W. D., 1969. Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes. In Methods in Enzymology, vol. 13, pg. 555. LOWENSTEIN, J. M. (ed), Academic Press, New York.
- LOWE, S. E.; THEODOROU, M. K.; TRINCI, A. P. J., 1987.

- Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development. Appl. Environ. Microbiol., 53, 1210.
- LOWE, S. E.; THEODOROU, M. K.; TRINCI, A. P. J.; HESPELL, R. B., 1985. Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semi-defined media lacking rumen fluid. J. Gen. Microbiol., 131, 2225.
- LUBINSKY, G., 1957. Studies on the evolution of the Ophryoscolecidae (Ciliata: Oligotricha). I. A new species of Entodinium with «caudatum», «lobosopinosum», and «dubardi» forms, and some evolutionary trends in the genus Entodinium. Can. J. Zool., 35, 111.
- LUBINSKY, G., 1958. "Ophryoscolecidae (Ciliata: Entodiniomorpha) of the reindeer (Rangifer tarandus L.) from the Canadian Arctic. Can. J. Zool., 36, 937.
- LUCAS, E., 1986. Influência da suplementação azotada de dietas contendo 70% de bolota, na digestibilidade do azoto, da matéria seca e da matéria orgânica. Trabalho de fim de curso. Universidade de Évora.
- LUND, A., 1974. Yeasts and moulds in the bovine rumen. J. Gen. Microbiol., 81, 453.
- MA, Y.; BLISS, F. A., 1978. Tannin content and inheritance in common bean. Crop Science, 18, 201.
- MACKIE, R. I.; HEATH, S., 1979. Enumeration and isolation of lactate-utilizing bacteria from the rumen of sheep. Appl. Environ. Microbiol., 38, 416.
- MACKIE, R. I.; GILCHRIST, M. C.; ROBBERTS, A. M.; SCHWARTZ, P. E. H.; SCHWARTZ, H. M., 1978. Microbial and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. J. Agric. Sci., Camb. 90, 241.
- MACZULAK, A. E.; DEHORITY, B. A.; PALMQUIST, D. L., 1981. Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 42, 856.
- MAH, R. A., 1962. Experiments on the culture and physiology of Ophryoscolex purkynei. Ph.D. Thesis, University of California, Davis, California.
- MAH, R. A., 1964. Factors influencing the in vitro culture of the rumen ciliate Ophryoscolex purkynei stein. J. Protozool., 11, 546.
- MAHADEVAN, A.; MUTHUKUMAR, G., 1980. Aquatic microbiology with reference to tannin degradation. Hidrobiologia, 72, 73.
- MAKI, L. R.; FOSTER, E. M., 1957. Effect of roughage in the bovine ration on types of bacteria in the rumen. J. Dairy Sci., 50, 905.
- MAN, J. C., 1975. The probability of most probable numbers. European J. Appl. Microbiol., 1, 67.
- MANN, S. O., 1963. Some observations on the airborne dissemination of rumen bacteria. J. Gen. Microbiol., 33, IX.
- MANN, S. O., 1970. Some effects on the rumen microorganisms of overfeeding a high barley ration. J. Appl. Bacteriol., 33, 403.

- MANN, S. O., 1970. Some effects on the rumen microorganisms of overfeeding a high barley ration. J. Appl. Bact., 33, 403.
- MARINHO, A. A. M., 1983. Protozoários ciliados no rumen de ovinos em pastoreio. Rev. Port. Ciênc. Veter., 78, 157.
- MARINHO, A. A. M., 1984. Influência dos taninos no comportamento dos microorganismos e suas implicações nas transformações microbianas no trato gastrintestinal dos ruminantes. Rev. Port. Ciênc. Veter., vol.LXXIX, 5.
- MARINHO, A.A.M., 1983. Protozoários ciliados no rumen de ovinos ingerindo feno suplementado com bolota. II Congresso Nacional de Medicina Veterinária.
- MAROUNEK, M.; BARTOS, S., 1987. Interactions between rumen amylolytic and lactate-utilizing bacteria in growth on starch. J. Appl. Bacteriol., 63, 233.
- MARSHALL, D. R.; BROU, P.; MUNDAY, J., 1979. Tannins in pasture legumes. Australian J. Experimental Agriculture and Animal Husbandry, 19, 192.
- MARTIN, A. K., 1982. The origin of urinary aromatic compounds excreted by ruminants. 2. The metabolism of phenolic cinnamic acids to benzoic acid. Br. J. Nutr., 47, 155.
- MARTIN, A. K., 1982. The origin of urinary aromatic compounds excreted by ruminants. 3. The metabolism of phenolic compounds to simple phenols. Br. J. Nutr., 48, 497.
- MARTIN, A. K.; MILNE, J. A.; MOBERLY, P., 1983. The origin of urinary aromatic compounds excreted by ruminants. 4. The potential use of urine aromatic acid and phenol outputs as a measure of voluntary intake. Br. J. Nutr., 49, 87.
- MATTEUZI, D.; SOZZI, T., 1971. Bifidobacterium bacteriophage from calf rumen. Z. Allg. Mikrobiol., 11, 57.
- MAURICE, T. J.; SLADE, L.; PAGE, C. M., 1985. Polysaccharide-water interactions: Thermal behaviour of rice starch". In: SIMATOS, D. and MULTON, J. L. (Ed). Properties of Water in Foods. pa. 211. Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands.
- MAXCY, R. B.; DILL, C. W., 1967. Adsorption of free fatty acids on cells of certain microorganisms. J. Dairy Sci., 50, 472.
- MEAD, L. J.; JONES, G. A., 1981. Isolation and presumptive identification of adherent epithelial bacterial (Epimural bacteria) from the ovine rumen wall. Appl. Environ. Microbiol., 41, 1020.
- MENKE, H. H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHENEIDER, W., 1979. "The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from gas production when they are incubated with rumen liquor "in vitro". J. Agric. Sci., Camb., 93, 217.
- MICHALOWSKI, T., 1975. The effect of certain feedingstuffs on rumen ciliate protozoa in vitro. J. Agric. Sci., Camb., 85, 145.

- MILIC, B. L., 1972. Lucerne tannins: I. Content and composition during growth. J. Sci. Food Agric., 23, 1151.
- MILIC, B. L.; STOJANOVIC, S.; VUCUREVIC, N., 1972. Lucerne tannins: II. Isolation of tannins from lucerne, their nature and influence on the digestive enzymes in vitro. J. Sci. Food Agric., 23, 1157.
- MINATO, H.; SUTO, T., 1978. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. II. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to cellulose powder in vitro and elution of bacteria therefrom. J. Gen Appl. Microbiol., 24, 1.
- MOIR, R. J.; MASSON, M. J., 1952. An illustrated scheme for the microscopic identification of the rumen microorganisms of sheep. J. Path. Bacteriol., 64, 343.
- MOWRY, H. A.; BECKER, E. R., 1930. Experiments on the biology of infusoria inhabiting the rumen of goats. Iowa, State College J. Sci., 5, 35.
- McALLAN, A. B.; SMITH, R. H., 1977. Some effects of variation in carbohydrate and nitrogen intakes on the chemical composition of mixed rumen bacteria from young steers. Br. J. Nutr., 37, 55.
- MCCOWAN, R. P.; CHENG, K. J.; BAILEY, C. B. M.; COSTERTON, J. W., 1978. Adhesion of bacteria to epithelial cell surfaces within the reticulo-rumen of cattle. Appl. Environ. Microbiol., 35, 149.
- McGINTY, D. D., 1968. Factors affecting the digestibility of varieties of sorghum grain by cattle. Ph. D. Thesis. Texas A & M. University, College Station, Texas.
- McQUILLEN, K., 1960. Bacterial protoplasts. In The bacteria, vol. I. GUNSALUS, I. C. and STANIER, R. Y. (ed). Academic Press, New York.
- NAKAMURA, K.; KANEGASAKI, S., 1969. Densities of ruminal protozoa of sheep established under different dietary conditions. J. Dairy Sci., 52, 250.
- NEWBOLD, C. J.; CHAMBERLAIN, D. G.; WILLIAMS, A. G., 1982. DL-Lactate utilization by rumen microbes. Soc. Gen. Microbiol. Q., 9, M10 (Abstr.).
- NICHOLSON, J. W. G.; HAYNES, E. H.; WARNER, R. G.; LOOSLI, J. K., 1956. Digestibility of various rations by steers as influenced by the length of preliminary feeding trial. J. Anim. Sci., 15, 1172.
- NIKOLIC, J. A.; JOVANOVIC, M.; FILIPOVIC, R., 1975. Microbial protein synthesis by bovine rumen content in relation to concentration. In Tracer Studies on non-protein nitrogen for ruminants, 43, IAEA, Vienna, Austria.
- NOIROT THIMOTHEE, C., 1960. Etude d'une famille de ciliés, les Ophryoscolecidae: structure et ultrastructure. Ann. Sci. Nat., 12ème série. Tome II, 615.
- OGIMOTO, K.; GIESECKE, D., 1974. Untersuchungen zur genese und biochemie der pansenacidose. 2. Mikroorganismen und umsetzung von milchsaure. Isomerin. Zentralblatt fur

- Veterinarmedizin, Reihe A, 21, 532.
- OGIMOTO, K.; IMAI, S., 1981. Atlas of rumen microbiology. Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo.
- OH, H. I., 1978., Physiochemical and nutritional aspects of tannin-protein interactions. Ph.D. Thesis, Purdue University, USA.
- ORPIN, C. G., 1975. Studies on the rumen flagellate Neocallimastix frontalis. J. Gen. Microbiol., 91, 249.
- ORPIN, C. G., 1976. The characterization of the rumen bacterium Eadie's Oval, Magnoovum gen. nov. eadie sp. nov.. Arch. Microbiol., 111, 155.
- ORPIN, C. G., 1977. Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate Neocallimastix frontalis. J. Gen. Microbiol., 98, 423.
- ORPIN, C. G., 1977a. The occurrence of chitin in the cell wall of the rumen organisms Neocallimastix frontalis, Piromonas communis and Sphaeromonas communis. J. Gen. Microbiol., 99, 215.
- ORPIN, C. G., 1977b. On the induction of zoosporogenesis in the rumen Phycomycetes Neocallimastix frontalis, Piromonas communis and Sphaeromonas communis. J. Gen. Microbiol., 101, 181.
- ORPIN, C. G., 1983/1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. Anim. Feed Sci. Techn., 10, 121.
- ORPIN, C. G.; LETCHER, A. J., 1984. Effect of absence of ciliate protozoa on rumen fluid volume, flow rate and bacterial populations in sheep. Anim. Feed Sci. Techn., 10, 145.
- ORPIN, G. C.; HALL, J. H., 1977. Attachment of the rumen holotrich protozoon Isotricha intestinallis to grass particles. Proc. Soc. Gen. Microbiol., 14, 82.
- ORPIN, G. C.; LETCHER, A. J., 1978. Some factors controlling the attachment of the rumen holotrich protozoa Isotricha intestinallis and Isotricha prostoma to plant particles in vitro. J. Gen. Microbiol., 106, 33.
- ORPIN, G. C.; MUNN, E. A., 1974. The occurrence of bacteriophages in the rumen and their influence on rumen bacterial populations. Experientia, 30, 1018.
- ORSKOV, E. R., 1986. Starch digestion and utilization in ruminants. J. Anim. Sci., 63, 1624.
- ORSKOV, O. R., 1982. Rumen microorganisms. In Protein Nutrition in Ruminants. ORSKOV, O. R. (ed). Academic Press, London.
- OXFORD, A. E., 1958. Bloat in cattle. IX. Some observations on the culture of the rumen cattle ciliate Epidinium ecaudatum crawley, occurring in quantity in cows fed on red clover (Trifolium pratense L.). N. Z. J. Agric. Res., 1, 809.
- PAL, R. N.; PACHAURI, V. C.; NEGI, S. S., 1972. "Comparative nutritive value of maize and oak kernels vis-a-vis maize for cattle". Indian J. Anim. Sci., 42, 341-345."
- PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C., 1980. Fat in lactation rations: Review. J. Dairy Sci., 63, 1.

- PALD, R. T., 1988. Phenols as defensive compounds in birch (Betula spp.). Implications for digestion and metabolism in browsing mammals. Nutr. Abstr. Rev., (Series B), 58, 142.
- PATTERSON, H.; IRVIN, R.; COSTERTON, J. W.; CHENG, K. J., 1975. Ultrastructure and adhesion properties of Ruminococcus albus. J. Bacteriol., 122, 278.
- PETTIPHER, G. L.; LATHAM, M. J., 1979. Production of enzymes degrading plant cell walls and fermentation of cellobiose by Ruminococcus flavefaciens in batch and continuous culture. J. Gen. Microbiol., 110, 29.
- PIERPOINT, W. S., 1983. Reactions of phenolic compounds with proteins, and their relevance to the production of leaf protein. In Leaf Proteins Concentrates. TELEK, L., GRAHAM, H. D. (ed).
- PIERPOINT, W. S., 1985. Phenolics in food and feedstuffs: the pleasures and perils of vegetarianism. In The Biochemistry of Plant Phenolics. Annual Proceedings of The Phytochemical Society of Europe. VAN SUMERE, C. F., LEA, P. J. (ed)
- PITTMAN, K. A.; LAKSHMANAN, S.; BRYANT, M. P., 1967. Oligopeptide uptake by Bacteroides ruminicola. J. Bacteriol., 93, 1499.
- PORTUGAL, A. V., 1963. Some aspects of protein and amino acid metabolism in the rumen of the sheep. Ph.D. Thesis, University of Aberdeen.
- POTTER, E. L.; DEHORITY, B. A., 1973. Effects of changes in feed level, starvation, and level of feed after starvation upon the concentration of rumen protozoa in the ovine. Appl. Microbiol., 26, 692.
- PRESTON, T. R.; LENG, R. A., 1987. Matching livestock production systems to available resources. International Livestock Centre for Africa, Addis Ababa. Ethiopia.
- PRICE, M. L.; BUTLER, L. G., 1980. Tannins and nutrition. Agricultural Experiment Station, Purdue University, Station Bulletin n° 272.
- PRINS, R. A., 1977. Biochemical activities of gut microorganisms. In Microbiological Ecology of the gut, CLARKE, R. T. J. and BAUCHOP, T. (ed).
- PRINS, R. A.; CLARKE, R. T. J., 1980. Microbial ecology of the rumen. In Digestive Physiology of Ruminants, RUCKEBUSCH and THIVEND (ed)."
- PRINS, R. A.; PRAST, E. R., 1973. Oxidation of NADH in a coupled oxidase-peroxidase reaction and its significance for fermentation in rumen protozoa of the genus Isotricha. J. Protozool., 20, 471.
- PURSER, D. B., 1961. A diurnal cycle for Holotrich protozoa of the rumen. Nature, 190, 831.
- PURSER, D. B., 1961. Factors affecting the concentration of the ciliate protozoal population of the rumen. Ph.D. Thesis, University of W. Australia.
- PURSER, D. B.; MOIR, R. J., 1959. Ruminal flora studies in the sheep. IX. The effect of pH on the ciliate population of the rumen in vivo. Austr. J. Agric.

- Res., 10, 555.
- PURSER, D. B.; MOIR, R. J., 1966. Dietary effects upon concentrations of protozoa in the rumen. J. Anim. Sci., 25, 668.
- QUINN, L. Y.; BURROUGHS, W.; CHRISTIANSEN, W. C., 1962. Continuous culture of ruminal microorganisms in chemically defined medium. II. Culture medium studies. Appl. Microbiol., 10, 583.
- RAMACHANDRA, G.; VIRUPAKSHA, T. K.; SHADAKSHARASWAMY, M., 1977. Relationship between tannin levels and in vitro protein digestibility in finger millet (Eleusine coracana Gaertn.). J. Agric. Food Chem., 25, 1101.
- RAYUDU, G. V. N.; KADIRVEL, R.; VOHRA, P.; KRATZER, F. H., 1970a. Toxicity of tannic acid and its metabolites for chickens. Poultry Science, 49, 957.
- REDDY, G. V. N.; REDDY, M. R., 1987. Tree leaves as ruminant feed. Livestock Adviser, 12, 16.
- REED, J. D.; TEDLA, A.; KEBEDE, Y., 1987. Phenolics, fibre and fibre digestibility in the crop residue from bird resistant and non-bird resistant sorghum varieties. J. Sci. Food Agric., 39, 113.
- REID, C. S. W.; ULYATT, M. J.; WILSON, J. M., 1974. Plant tannins, bloat and nutritive value. Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod., 34, 82.
- RICE, E. L.; PANCHOLY, S. K., 1973. Inhibition of nitrification by climax ecosystems. II. Additional evidence and possible role of tannins. Amer. J. Bot., 60, 691.
- RITCHIE, A. E.; ROBINSON, I. M.; ALLISON, M. J., 1970. Rumen bacteriophage: survey of morphological types. 7ème Congr. Int. Microscop. Electron., Grenoble, 333.
- ROBBINS, C. T.; HANLEY, T. A.; HAGERMAN, A. E.; HJELJORD, O.; BAKER, D. L.; SCHWARTZ, C. C.; MAUTZ, W. W., 1987. Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability. Ecology, 68, 98.
- ROBBINS, C. T.; MOLE, S.; HAGERMAN, A. E.; HANLEY, T. A., 1987. Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in dry matter digestion?. Ecology, 68, 1606.
- ROBINSON, I. M., 1979. Special features of anaeroplastas. In The Mycoplasmas, vol. 1. Academic Press.
- ROBINSON, I. M.; ALLISON, M. J., 1975. Transfer of Acholeplasma bactoclasticum Robinson and Hungate to the genus Anaeroplasta (Anaeroplasta bactoclasticum - Robinson and Hungate - comb. nov.): Emended description of the species. Int. J. System. Bacteriol., 25, 182.
- ROBINSON, I. M.; ALLISON, M. J.; HARTMAN, P. A., 1975. Anaeroplasta abactoclasticum gen. nov., sp. nov.: an obligately anaerobic mycoplasma from the rumen. Int. J. System. Bacteriol., 25, 173.
- ROBINSON, J. P.; HUNGATE, R. E., 1973. Acholeplasma bactoclasticum sp. n., an anaerobic mycoplasma from the bovine rumen. Int. J. Syst. Bacteriol., 23, 171.
- RODRIGUEZ, C., 1923. Pastos arbóreos. Livraria clássica, Lisboa

- ROMERO, J.; RYAN, D. S., 1978. Susceptibility of the major storage proteins of the bean, Phaseolus vulgaris L., to in vitro enzymatic hydrolysis. J. Agric. Food Chemistry, 26, 784.
- ROONEY, L. W.; PFLUGFELDER, R. L., 1986. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. J. Anim. Sci., 63, 1607.
- RUSSELL, J. B.; HESPELL, R. B., 1981. Microbial rumen fermentation. J. Dairy Sci., 64, 1153.
- SABA, W. J.; HALE, W. H.; THEURER, B., 1972. In vitro rumen fermentation studies with a bird resistant sorghum grain. J. Anim. Sci., 35, 1076.
- SADANANDAN, K. P.; ARORA, S. P., 1976. Influence of added tannic acid on growth and in vitro 32P-phosphate utilization by rumen microbes. Indian J. Anim. Sci., 46, 593.
- SADANANDAN, K. P.; ARORA, S. P., 1979. Influence of tannins on microbial rumen fermentation pattern. J. Nucl. Agric. Biol., 8, 1.
- SALSBURY, R. L.; HOEFER, J. A.; LUECKE, R. W., 1960. Effect of feeding certain defined nutrients on cellulose digestion and volatile fatty acid concentration of rumen. J. Dairy Sci., 43, 870.
- SATTER, L. D.; SLYTER, L. L., 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. Br. J. Nutr., 32, 199.
- SCHAFFERT, R. E.; LECHTENBERG, V. L.; OSWALT, D. L.; AXTELL, J. D.; PICKETT, R. C.; RHYKERD, C. L., 1974. Effect of tannin in vitro dry matter and protein disappearance in sorghum grain. Crop Sci., 14, 640.
- SCHAFFERT, R. S.; OSWALT, D. L.; AXTELL, J. A., 1974. Effect of supplemental protein on the nutritive value of high and low tannin sorghum bicolor moench grain for the growing rat. J. Anim. Sci., 39, 500.
- SENAUD, J.; JOUANY, J. P.; GRAIN, J.; PUYTORAC, P., 1977. Influence de la fréquence des repas sur le comportement alimentaire du mouton et sur les variations de densité des populations de ciliés au cours du nyctamère. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 17,
- SENEZ, J. C., 1976. Microbiologia General, Editorial Alhambra.
- SETTINERI, D.; PACE, V.; DI CARLO, D.; VERNA, M.; MALOSSINI, F., 1987. Effects des tannins sur l'activité digestive de la liqueur ruminale de moutons. FEZ, Lisboa.
- SHARMA, C. P.; KANSHAL, G. P.; SAREEN, V. K.; SINGH, S.; BAHATIA, I. S., 1981. "In vitro metabolism of flavonoids by whole rumen contents and its fractions. Zentralbl Veterinaermed Reihe a, 28, 27.
- SHERROD, L. B.; ALBIN, R. C., 1973. Digestibility of various sorghum grain types. Res. Rep. #23. Texas Tech. Univ., PanTex, TX.
- SHORT, H. L.; SEGELQUIST, C. A.; GOODRUM, P.D.; BOYD, C. E., 1969. Rumino-reticular characteristics of deer on food of two types. J. Wildl. Manage., 33, 380.

- SIMPSON, F. J.; JONES, G. A.; WOLIN, E. A., 1969. Anaerobic degradation of some bioflavonoids by microflora of the rumen. Can J. Microbiol., 15, 972.
- SINGH, M., 1977. Effect of pipal leaves tannin and tannic acid on volatile fatty acids (VFA) production in goat's rumen. Indian Vet. J., 54, 553.
- SINGH, M., 1978. Effect of salseed tannin and tannic acid on volatile fatty acids production in goat's rumen. Indian Vet. J., 55, 45.
- SINGLETON, V. L.; KRATZER, F. H., 1969. Toxicity and related physiological activity of phenolic substances of plant origin. J. Agric. Food Chem., 17, 497.
- SINGLETON, V. L.; KRATZER, F. H., 1973. Plant phenolics. In Toxicants occurring naturally in foods. 2nd ed., National Academy of Science, Washington, D.C.
- SLYTER, L. L.; OLTJEN, R. R.; KERN, D. L.; WEAVER, J. M., 1968. Microbial species including ureolytic bacteria from the rumen of cattle fed purified diets. J. Nutr., 94, 185.
- SMITH, D. G., 1974. Inhibition of swarming in Proteus spp. by tannic acid. J. Appl. Bact., 38, 29.
- SMITH, R. H., 1979. Synthesis of microbial nitrogen compounds in the rumen and their subsequent digestion. J. Anim. Sci., 49, 1604.
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G., 1967. Statistical Methods, 6th ed.. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- SOETANO, H.; GORDON, G. L. R.; HUME, I. D.; LENG, R. A., 1985. The role of protozoa and fungi in fibre digestion in the rumen of sheep. Proceedings of the 3rd A.A.A.P. Animal Science Congress, vol. 2, 805. Seoul.
- STANIER, R. Y.; ADELBERG, E. A.; INGRAHAM, J. L., 1977. General Microbiology, 4th ed. The McMillan Press Ltd, London.
- STEEL, R. G. D; TORRIE, J. H., 1982. Principles and Procedures of Statistics. A biometric Approach, 2nd ed.. McGraw Hill."
- STEINGASS, H., 1983. "Bestimmung des energetischen futterwertes von wirtschaf-tseigenen futtermitteln aus der gasbildung bei der pansen-fermentation in vitro" Dissertation, zur erlangung des grades eines doktors der agrarwissenschaften vorgelegt der fakultat IV-Agrarwissenschaften II der Universitat Hohenheim.
- STERN, M. D.; HOOVER, W. H., 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: a review. J. Anim. Science, 49, 1590.
- STEWART, C. S., 1977. Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. Appl. Environ. Microbiol., 33, 497.
- STORM, E.; ORSKOV, E. R., 1983. The nutritive value of rumen microorganisms in ruminants. 1. Large scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms. Br. J. Nutr., 50, 463.
- STRELKOW, A.; POLJANSKY, G.; ISSAJOWA-KEO, M., 1933. Mode of introduction of the infusoria of rumen and reticulum

- in ruminants. Arch. Tierernähr Tierzucht, 9, 679.
- TAGARI, H.; HENNIS, Y. TAMIR, M.; VOLCANI, R., 1965. Effect of carob pod extracts on cellulolysis, proteolysis, deamination and protein biosynthesis in an artificial rumen. Appl. Microbiol., 13, 437.
- TALJAARD, T. L., 1972. Representative rumen sampling. J. S. Afr. Vet. Ass., 43, 65.
- TAMIR, M.; ALUMOT, E., 1970. Carob tannins-growth depression and levels of insoluble nitrogen in the digestive tract of rats. J. Nutr., 100, 573.
- TAMIR, M.; ALUMOT, E., 1970. Growth depression and levels of insoluble nitrogen in the digestive tract of rats. J. Nutr., 100, 573.
- TAMMINGA, S., 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. J. Anim. Sci., 49, 1615.
- TAMMINGA, S., 1983. Recent advances in our knowledge on protein digestion and absorption in ruminants. In Métabolism et Nutrition Azotés, vol. 1, 263. 4ème Sympos. Intern. European assoc. Anim. Prod.. INRA, Institut National de la Recherche Agronomique, 149, rue Grenelle, Paris.
- TAYLOR, B. F.; CAMPBELL, W. L.; CHINDY, I., 1970. Anaerobic degradation of the benzene nucleus by a facultatively anaerobic microorganism. J. Bacteriol., 102, 430.
- TEATHER, R. M.; MAHADEVAN, S.; ERFLE, J. D.; SAUER, F. D., 1984. Negative correlation between protozoal and bacterial levels in rumen samples and its relation to the determination of dietary effects on the rumen microbial population. Appl. Environ. Microbiol., 45,
- TELLE, P. P.; PRESTON, R. L., 1971. Ovine lactic acidosis: intraruminal and systemic. J. Anim. Sci., 33, 698.
- THEODOROU, M. K.; GASCOYNE, D. E.; AKIN, D. E.; HARTLEY, R. D., 1987. Effect of phenolics from plant cell walls on rumenlike fermentation in consecutive batch culture. Appl. Environ. Microbiol., 53, 1046.
- THIVEND, P.; FONTY, G.; JOUANY, J. P.; DURAND, M.; GOUET, Ph., 1985. Le fermenteur rumen. Reprod. Nutr. Dévelop., 25, 729.
- THORLEY, C. M.; SHARPE, E. M.; BRYANT, M. P., 1968. Modification of the rumen bacterial flora by feeding cattle ground and pelleted roughage as determined with culture media with and without rumen fluid. J. Dairy Sci., 51, 1811.
- TORRENT, J. A.; VARELLA, G.; BOZA, J., 1961. Digestibilidad y valor nutritivo de la bellota en cerdos y estudio de la capacidad de asentamiento en encinares. Bolet. Servicio Plagas Florestales, 4, 5.
- TRIPATHI, A. K., 1975. Effect of sal seed tannin and tannic acid on protein degradation in goat's rumen. Indian Vet. J., 52, 195.
- TSAI, C. -G.; JONES, G. A., 1975. Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic phloroglucinol degradation. Can. J. Microbiol., 21, 794.
- USHIDA, K.; JOUANY, J. P., 1985. Effect of protozoa on rumen

- protein degradation in sheep. Reprod. Nutr. Dévelop., 25, 1075.
- VAN GYLSWYK, N. O.; SCHWARTZ, H. M., 1984. Microbial ecology of the rumen of animals fed high-fibre diets. In Herbivore Nutrition in the Subtropics and Tropics, pg. 359. GILCHRIST, F. M. C. and MACKIE, R. I. (ed). Craighall, S. Africa: The Science Press.
- VAN HOVEN, W., 1984. Tannins and digestibility in greater kudu. Can. J. Anim. Science, 64 (Suppl.), 177.
- VAN SOEST, P. J., 1963. Use of detergent in analysis of fiber and lignin. J. Ass. off. analyt. Chem., 46, 829.
- VAN SOEST, P. J., 1982. Nutritional Ecology of the Ruminant. O & B Books, Corvallis, Oregon.
- VARELA, G.; FONOLLA, J.; RUANO, J., 1965. Influencia del maiz sobre el valor nutritivo y la digestibilidad de la bellota en cerdos. Avances en Alimentación Animal, 6, 221.
- VEIRA, D. M., 1986. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. J. Anim. Sci., 63, 1547.
- VEIRA, D. M.; IVAN, M., 1983. Rumen ciliate protozoa: Effects on digestion in the stomach of sheep. J. Dairy Sci., 66, 1015.
- VIDAL, C. et G. VARELA, 1967. Posibilidad de complementación con harina de pescado de algunos alimentos españoles que se utilizan en alimentación ganadera. Experiencias con harina de bellota. Alimentación y Mejora Animal, Vol.VIII.
- VIDAL, C. et G. VARELA, 1968. Sobre el aminograma del higo chumbo y de la bellota y posibilidades de mejora de la calidad de sus proteínas. Revista de Nutrition Animal, Vol. VI, No1.
- VOGELLS, G. D.; HOPPE, W. F.; STUMM, C. K., 1980. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. Appl. Environ. Microbiol., 40, 608.
- WAGHORN, G. C.; ULYATT, M. J.; JOHN, A.; FISHER, M. T., 1987. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed Lotus corniculatus L.. Br. J. Nutr., 57, 115.
- WALLACE, R. J.; BRODERICK, G. A.; BRAMMALL, M. L., 1987. Microbial protein and peptide metabolism in rumen fluid from faunated and ciliate-free sheep. Br. J. Nutr., 58, 87.
- WALLACE, R. J.; CHENG, K. J.; DINSDALE, D.; ORSKOV, E. R., 1979. An independent microflora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen. Nature, 279, 424.
- WARNER, A. C. I., 1962. Some factors influencing the rumen microbial population. J. Gen. Microbiol., 28, 129.
- WARNER, A. C. I., 1964. "Production of volatile fatty acids in the rumen. Methods of measurement". N.A.R., 34, 339
- WARNER, A. C. I., 1966. Diurnal changes in the concentrations of microorganisms in the rumen of sheep fed limited diet once daily. J. Gen. Microbiol., 45, 213.
- WARNER, A. C. I., 1966. Diurnal changes in the

- concentrations of microorganisms in the rumen of sheep fed to appetite in pens or at pasture. J. Gen. Microbiol., 45, 243.
- WATERMAN, P. G.; MBI, C. N.; McKEY, D. B.; STEPHEN, J., 1980. African rain-forest vegetation and rumen microbes: phenolic compounds and nutrients as correlates of digestibility. Oecologia (Ber.), 47, 22.
- WILLIAMS, A. G., 1982. The metabolism and significance of ciliate protozoa in the rumen ecosystem. Rep. Hannah Res. Inst., 93.
- WILLIAMS, A. G.; HARFOOT, C. G., 1976. Factors affecting the uptake and metabolism of soluble carbohydrates by the rumen ciliate Dasytricha ruminantium isolated from ovine rumen contents by filtration. J. Gen. Microbiol., 96, 125.
- WILLIAMS, P. P.; DAVIS, R. E.; DOETSCH, R. N.; GUTIEREZ, J., 1961. Physiological studies of the rumen protozoa Ophryoscolex caudatus Eberlein. J. Appl. Microbiol., 9, 405.
- WILLIAMS, P. P.; DINUSSON, W. E., 1973. Ruminal volatile fatty acid concentration and weight gains of calves reared with and without ruminal ciliated protozoa. J. Anim. Sci., 36, 588.
- WOLIN, M. J., 1975. Interactions between the bacterial species of the rumen, pg. 134. In Digestion and Metabolism in the Ruminants, McDONALD and WARNER, A. C. I. (ed). Univ. New England Publ. Unit, Armidale.
- YOKOYAMA, M. T.; JOHNSON, K. A., 1985. "Effect of pentachlorophenol (PCP) on rumen bacterial species". Report on XVIII Conference on Rumen Function, Chicago.
- ZEHNDER, A. J. B.; WUHRMANN, K., 1976. Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. Science, 194, 1165.



ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Deve-se ler
9	12	se eleva o nível	se eleva o nível
10	8	muito boas razões	muito boas razões
	20	Estas reacções	Estas reacções
11		impedientes alimentares	impedientes alimentares (PIENPOINT, 1985).
12	2	preferidas	preferidas
17	11	dicotiledónias	dicotiledóneas
	12	monocotiledónias	monocotiledóneas
19	5	sua decomposição	sua decomposição
20	21	o metabolismo de aeróbio	o metabolismo aeróbio
	24	constatado por vários.	constatado por vários autores.
22	7	em alimentados	em animais alimentados
23	19	galotânico	galhotânico
25	5	para o animal	pelo animal
	21	Fig. 1.3.	Fig. 1.2.
29	5	galotaninos	galhotaninos
	6	gálico	gálhico
	9	galotaninos	galhotaninos
40	28	em que espécies como	espécies como
	23	de CO ₂ e CH ₄	de CO ₂ a CH ₄
43	28	solúveis embora, os	solúveis, embora os
48	13	química, da dieta pode	química, pode
50	19	parece estar influenciada	parecem estar influenciadas
58	26	(WILLIAMS, 1982).	é arrastado (WILLIAMS, 1982).
59	6	ingerem 10 a 20 vezes	metabolizam 10 a 20 vezes
64	17	retículo-rumen que, dirige	retículo-rumen, que dirige
	20	interrelacionadas	interrelacionados
65		glicocálix	glicocálice
76	17	A disponibilidade	- a disponibilidade
80	6	excessiva	excessiva
97	2	para impedir a fibrólise	para aumentar a fibrólise
106	17	MARINHO (1983), é feita	MARINHO (1983). É feita
110	9	com o auxílio	com o auxílio
121	4	PROGRESSIVA DE INGESTÃO	PROGRESSIVA À INGESTÃO
125	11	inibidores químicos	inibidores químicos
131	27	carneiro #1, que o valor	carneiro #1, com o valor
133		Quadro 2.5.	Quadro 2.6.
	10	Quadro 2.4.	Quadro 2.2.
	16	Quadro 2.5.	Quadro 2.3.
137	16	Quadro 2.6.	Quadro 2.4.
138		Quadro 2.6.	Quadro 2.4.
156	10	não se casos	não se conhecem casos
	11	estes acesso	estes têm acesso
161	21	substractos purificados e a	substractos purificados e avaliar a
162	3	estabelecemos utilizámos	estabelecemos e utilizámos
169	1	prteica	proteica
	28	de PEG em função	de PEG e em função
172	21	As taxas	A taxa
174	5	proteica pelo PEG	proteica e pelo PEG
176	21	nas nossas (5 - 6,5%) amostras	nas nossas amostras (5 - 6,5%)
177	13	tendência para um aumento dos vlores	a tendência foi para um aumento dos valores
179	2	cadeia ramificada (SHAZLY, 1952)	cadeia ramificada.
	3	"in vitro" quer o substracto	"in vitro" quer sobre o substracto
	4	animais, quer os substractos	animais, quer sobre os substractos

Página	Linha	Onde se lê	Deve-se ler
204	14	(Fig. 4.1.)	(Fig. 4.2.)
206	5	géneros reimplantar	géneros a reimplantar
207	7	mesmos grupos. evolução	mesmos grupos. A evolução
	8	não parecem	não parece
	23	o desenvolvimentos	o desenvolvimento
209		Fi4. 3.5.	Fig. 3.5.
212	25	possível <u>Dasytricha</u>	possível reimplantar <u>Dasytricha</u>
222	28	purificado e extractos taninicos	purificado.
226	25	(Quadro 5.4.)	(Quadro 5.5.)
228	0		et al., 1983). Os resultados aqui expressos
234	19	permitem a diminuição	permite a diminuição
235	6	a fermentação de pelo menos	a fermentação é de pelo menos
248	2	glucidoca	glucidica
250	12	médias sido feita	médias foi feita
	13	tratamento por	Os tratamentos por
	14	nível e significância	nível de correlação
260	2	NAS BACTÉRIAS	NAS BACTÉRIAS
	15	da tanino	de tanino
	16	sede de tocas	sede de todas
269	7	uma manancial	um manancial
271	19	significativamente (P<0,05)	significativamente pelo PEG (P<0,05)
274	21	forneceram dos	forneceram os
	23	A as produções	As produções
296	11	foi influenciada... e 48h	<u>linha em branco</u>
	12	(P<0,05) de incubação... foi	<u>linha em branco</u>
	13	muito significativa	foi muito significativa
	15	tratamentos	tratamentos
	20	foram significativas	foram significativas
301	4	palha inteira (Vide Anexos)	palha inteira.
304	20	ciliados, estão	ciliados, está
305	25	celulos com elevado	celulose com elevado
306	3	provavelmente não a	provavelmente devido não a
318		Mistura AGCL - 0, 1, 2, 3,	Mistura AGCL - 1, 2, 3, 4,
322	25	existe nas regiões	existindo nas regiões
325	6	3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	4.2. MATERIAIS E MÉTODOS
343	27	conferem-lhe de facto	por outro lado conferem-lhes
	27	estatuto	estatuto
344	9	factores que bloquearam	factores bloqueando
	16	participam de uma forma	participa de uma forma
346	10	AGVs, mas provocando	AGVs, provoca
347	3	(1987)	(1987 - inf. pessoal)
	8	microflora em 4%	microflora 4%
	9	toleram níveis	tolerando níveis