

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

MARIANNE CRISTINA GONÇALVES HASSE

**QUANTIFICAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS CILIADOS EM
BORREGOS ALIMENTADOS COM NÍVEIS DE INCLUSÃO DE
TRIGUILHO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS
2017

MARIANNE CRISTINA GONÇALVES HASSE

**QUANTIFICAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS CILIADOS EM
BORREGOS ALIMENTADOS COM NÍVEIS DE INCLUSÃO DE
TRIGUILHO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Zootecnista.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Emilyn Midori Maeda

DOIS VIZINHOS

2017



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos
Gerência de Ensino e Pesquisa
Curso de Zootecnia



TERMO DE APROVAÇÃO

TCC II

QUANTIFICAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS CILIADOS EM BORREGOS ALIMENTADOS COM NÍVEIS DE INCLUSÃO DE TRIGUILHO

Autora: Marianne Cristina Gonçalves Hasse

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Emilyn Midori Maeda

TITULAÇÃO: Bacharel em Zootecnia

Aprovada em 21 de novembro de 2017.

Prof^º Dr. Vicente de Paulo Macedo

Dr^ª. Ana Carolina Fluck

Prof^ª Dr^ª. Emilyn Midori Maeda
(Orientadora)

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

*Aqueles que acreditam em mim, e dão força para continuar, o meu eterno muito obrigada, Mariliza Irene Hasse, Irene Hasse e Nolbert Hasse, aos quais **dedico** este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à Deus pelo dom da vida, pelas bênçãos, por reger-me, governar-me, iluminar-me e por conceder-me a fé para alcançar meus objetivos.

Agradeço a minha mãe Mariliza, pela educação que deu-me, pelas inúmeras vezes que motivou-me, incentivou-me, ajudou-me no que era do seu alcance, por sempre acreditar em mim, e por continuar confiante nos momentos difíceis.

Aos meus avós, Irene e Nolbert, que sempre confiaram em mim, e por sempre ter uma palavra de afeio e conselhos à serem dados.

A toda a minha família, que de uma forma e outra dão forças para lutar pelos meus sonhos.

À Professora Emilyn por aceitar ser minha orientadora, pela confiança, agradeço pela paciência, ensinamentos, e toda a ajuda prestada.

Ao Francisco Piran e a Diana Gilioli por toda a ajuda prestada, os quais não mediram esforços para que este trabalho fosse realizado da melhor forma possível.

As minhas amigas Fabiane, Jaqueline, Janine e Mariana, pelos conselhos, palavras de ânimo, e por mostrarem-me que com força de vontade nossos objetivos tornam-se realidade.

Agradeço ao Grupo PET Zootecnia, à todos os petianos(as), Tutor Douglas e Tutor Vicente pela oportunidade de fazer parte deste grupo e pela evolução pessoal adquirida neste período.

A Dr^a Ana Carolina Fluck pelo auxílio com os dados estatísticos.

Aos membros da banca avaliadora, por aceitarem fazer parte desta, e pelas contribuições feitas no trabalho.

Aos demais professores do curso, que contribuíram para o conhecimento adquirido nestes anos.

Aos demais que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para que este fosse realizado.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.
(Chico Xavier)

RESUMO

HASSE, Marianne C. G. Quantificação de protozoários ciliados em borregos alimentados com níveis de inclusão de trigoilho. 2017. 27 f. Trabalho (Conclusão de Curso) – Graduação em Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2017.

A inclusão de trigoilho em dietas de animais pode mostrar-se compensatória em relação aos menores custos que apresenta, entretanto devemos avaliar se este não altera a microbiota ruminal, por consequência o desempenho do animal. Salienta-se que os protozoários são de suma importância na degradação da fibra e amido, por isso necessita de avaliação quando usa-se alimentos alternativos. O objetivo deste trabalho foi quantificar os protozoários ciliados em borregos alimentados com níveis de inclusão de trigoilho. O experimento aconteceu na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, na UNEPE de metabolismo animal, no período de junho a agosto de 2017. Foram utilizados quatro ovinos machos, castrados e fistulados no rúmen com peso vivo médio de 40 kg. Estes animais eram mantidos em gaiolas metabólicas com bebedouros e comedouros individuais, alimentados com 40% de feno de Azevém e 60% de concentrado. As dietas fornecidas eram isoenergéticas e isoproteicas com 12,5% de Proteína Bruta e 68% de Nutrientes Digestíveis Totais. O delineamento experimental foi quadrado Latino (4x4), compostos por quatro níveis de inclusão: 0, 19, 38 e 57 % de trigoilho na matéria seca da ração total em substituição ao milho. O período experimental totalizou 80 dias, com 15 dias de adaptação, 5 dias de coleta dos alimentos e fezes e 1 dia de coleta do líquido ruminal. As amostras ficaram armazenadas em frascos plásticos com 20 ml de líquido ruminal não filtrado e fixadas em 20 ml de formalina 18,5%, posteriormente colocou-se 1mL de líquido ruminal e 9mL de glicerina à 30% e depois aplicadas solução de lugol (100 mL de água destilada, cinco gramas de iodo e dez gramas de iodeto de potássio). Foram consideradas as médias das contagens feitas em 100 campos independentes, realizadas em duplicata e analisadas em microscópio com aumento de 10x. O valor médio da contagem nos campos foi multiplicado pelo fator de correção de 1.600. Submeteu-se os dados à análise, por meio da metodologia de Modelos Lineares, generalizados, assumindo distribuição Poisson com função de ligação logarítmica, com nível de significância 1%, utilizou-se o procedimento GENMOD do pacote estatístico SAS. O uso de trigoilho em substituição ao milho nos diferentes níveis de inclusão, não influenciou a população de protozoários ciliados no rúmen.

Palavras-chave: Microbiologia ruminal. Subproduto. Microbiota.

ABSTRACT

HASSE, Marianne C. G. Quantification of protozoa ciliate in lambs fed with levels of inclusion of hawthorn. 2017. 27 f. Trabalho (Conclusão de Curso) – Graduação em Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2017.

The inclusion of wheatgrass in animal diets may be compensatory in relation to the lower costs that it presents, however we must evaluate if this does not alter the ruminal microbiota, consequently the performance of the animal. It should be noted that protozoa are of paramount importance in the degradation of fiber and starch, so it requires evaluation when using alternative feed. The aim was to quantify the ciliate protozoa in lambs fed levels of inclusion of hairspray. The assay was carried out at the Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, at the UNEPE of animal metabolism, from June to August 2017. Four male sheep were castrated and fistulated in the rumen with a mean live weight of 40 kg. These animals were kept in metabolic cages with individual drinking fountains and feeders, fed with 40% Azevém hay and 60% concentrate. The diets supplied were isoenergetic and isoprotein with 12.5% crude protein and 68% total digestible nutrients. The experimental design was a Latin square (4x4), composed of four inclusion levels: 0, 19, 38 and 57% of wheat in the dry matter of the total ration instead of maize. The experimental period has 80 days, with 15 days for adaptation, 5 days of feed and feces collection and 1 day of ruminal fluid collection. For the gothering was done samples the animals cannule bere opened and the removal will be done. The samples will be stored in plastic bottles with 20 ml of unfiltered rumen liquid and fixed in 20 ml of 18.5% formalin, then 1 ml of rumen liquid and 9 ml of 30% glycerine were added and then lugol solution (100 ml mL of distilled water, five grams of iodine and ten grams of potassium iodide). The counting averages were taken in 100 independent fields, performed in duplicate and analyzed under a 10x magnification microscope. The mean value of the count in the fields was multiplied by the correction factor of 1,600. Data were submitted to the analysis, using the Linear Models model, generalized, assuming Poisson distribution with logarithmic link function, with a significance level of 1%, using the procedure GENMOD of the statistical package SAS. The use of wheat in substitution of maize at different inclusion levels did not influence the population of ciliate protozoa in rumen.

Keywords: Ruminal Microbiology. By-product. Microbiota

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivo Específico	10
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 TRIGUILHO	11
3.2 MICRORGANISMOS RUMINAIS	12
3.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A POPULAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	20
6 CONCLUSÃO	23
7 REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

A utilização de subprodutos vem crescendo nos últimos anos, com intuito de ser uma alternativa para diminuir os custos de produção. Dentre eles pode-se citar o triguilho, utilizado como fonte energética nas dietas, substituindo o principal produto usado na alimentação animal que é o milho. Dentre as vantagens, pode ser uma alternativa sustentável na alimentação animal.

O triguilho é um subproduto do trigo, formado por grãos de qualidade inferior, contendo grãos mal granados e chochos, provindos do descarte da classificação do trigo (EMBRAPA, 1998). Possui bons valores de fibra bruta, proteína bruta, aminoácidos, cálcio e fósforo, possuindo valores inferiores quando comparado ao milho de energia metabolizável, extrato etéreo e teor de amido (ROSTANGO, 2011).

Entretanto, deve ser avaliado as alterações que cada subproduto pode causar na microbiota ruminal e se este não afetará o desempenho animal. A microbiota ruminal é composta por diversos microrganismos, dentre os quais pode-se citar os protozoários, que apresentam papel na fermentação ruminal, são responsáveis por grande parte da degradação dos alimentos e material fibroso, (KAMRA, 2005).

Atualmente, ainda tem-se poucos estudos sobre a microbiota ruminal, especialmente quando trata-se da utilização de subprodutos e a interferência que causa na quantidade e população de protozoários ciliados, desta forma há necessidades de serem realizados trabalhos nesta área.

Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da inclusão de triguilho na população de protozoários ciliados, quantificando-os nos diferentes horários após a alimentação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da inclusão de trigoilho em substituição ao milho, na população de protozoários ciliados em ovinos.

2.2 Objetivo Específico

Quantificar a população de protozoários ciliados nos diferentes horários após a alimentação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TRIGUILHO

O triguilho em designação técnica é formado por grãos de boa qualidade e bem formados, porém de tamanho menor que o trigo, que passam em peneira de crivo oblongo de 1,75 mm X 20,00 mm, espessura de chapa 0,72 mm. No entanto, é conhecido como subproduto do trigo, formado por grãos pequenos e mal granados chochos, com peso específico inferior a 70 Kg/hl, provenientes do descarte da classificação do trigo (EMBRAPA, 2005)

Para este ser considerado de boa qualidade para o uso em rações, deve possuir os seguintes valores: Proteína bruta maior que 13%, e extrato etéreo superior a 1%. Valores que não podem ultrapassar 4% de matéria mineral, 6% de fibra e 13% de umidade (EMBRAPA, 2005).

Comparando o triguilho com o milho pode-se observar que o milho possui valores superiores a extrato etéreo e a energia metabolizável, entretanto o triguilho destaca-se pelo seus valores de proteína e fibra bruta, aminoácidos cálcio e fósforo. Entretanto apresenta menor teor de amido, cerca de 63,34%, enquanto o milho apresenta valor de 71,62 (ROSTANGO, 2011).

O conhecimento do valor nutricional dos alimentos alternativos, possibilita rações que satisfaçam as exigências nutricionais, e com menores custos. Desta forma favorecendo a produção (AKSNES & OPSTVEDT, 1998).

Em trabalho desenvolvido por Signor et.al. (2007), foi observado que a inclusão de triguilho, em até 31,88% na ração de tilápias do Nilo, não alterou o desempenho produtivo das mesmas. Em pesquisa realizada pela Embrapa, 1993, constataram que o triguilho pode ser usado em até 30% em dietas para frangos de corte na fase inicial e final da criação, não havendo interferência no ganho e de peso, consumo e conversão alimentar. A mesma constatou que este subproduto pode ser usado pra suínos em crescimento e terminação, em até 30%, não sendo prejudicial alterando o consumo de ração diário médio, conversão alimentar e ganho de peso diário médio.

3.2 MICRORGANISMOS RUMINAIS

O rúmen é um ambiente anaeróbico, que possui temperatura de 39°C a 42°C e seu pH varia entre 6,0 e 7,0, havendo substratos e processos fermentativos. Estas características propiciam que bactérias, fungos, protozoários flagelados e ciliados, habitem e desenvolvam-se neste meio (KOZLOSKI, 2011). Segundo Stewart et al.(1997), uma espécie é considerada como parte da microbiota ruminal ao possuir metabolismo compatível as reações que ocorrem no meio em questão em condições normais.

A microbiologia do rúmen é composta por um grande número de microrganismos, sua quantidade e população varia de acordo com a dieta do ruminante (TEIXEIRA, 1991). Também dependem do tipo e frequência do alimento fornecido ao hospedeiro, da raça e estado fisiológico dos animais (HUNGATE, 1966). Outros fatores que influenciam, são o pH do conteúdo ruminal e as relações que estes microrganismos estabelecem entre si e com a população bacteriana (MOURA MARINHO, 1982). Possuem uma relação mutualística com seu hospedeiro, produzindo enzimas que degradam celulose das plantas, fornecendo assim energia ao animal (ARCURI et al., 2006).

A distribuição dos microrganismos no rúmen segundo Consternon et al. (1981) é dividida em: População do líquido ruminal, a qual compreende os microrganismos que povoam os alimentos recém ingeridos, com isso lhes é conferida grande atividade metabólica; a dos adeptos a fração sólida, relacionada com a degradação dos alimentos fibrosos (Consternon et al., 1995); e a aderida a parede do rúmen. De acordo com estudos da cinética, constata-se que 75% das bactérias ruminais estão aderidas a fração sólida e o restante aderida a fração líquida, auxiliando desta forma povoam o alimento que é prontamente ingerido (Dehority e Orpin, 1997). Desta forma pode-se citar os protozoários ciliados que também aderem-se as partículas sólidas, como forma de subsistência, devido ao período para a duplicação é maior que a taxa de passagem da fase líquida (WILLIAMS, 1997). Também auxiliam na redução das partículas contidas no rúmen, devido a nadarem entre as partículas de fibra e degradarem-as (NUSSIO; CAMPOS; LIMA, 2011).

Os protozoários foram os primeiros microrganismos descritos. Representam cerca de 2% do peso do conteúdo ruminal, 40% do nitrogênio total e 60% do nitrogênio proveniente da fermentação (KAMRA, 2005). Seu tamanho é de 20 a 200 micrómetros

(μm), aproximadamente dez à cem vezes superior ao tamanho das bactérias (DEHORITY, 1993).

A população no conteúdo ruminal varia em concentração, atingindo valores de 10^4 à 10^6 protozoários/mL (D' AGOSTO et al., 2001). Esta concentração corresponde a cerca de 40 a 60% da massa microbiana total do rúmen (DEHORITY et al., 1997). Sua presença no rúmen aumenta a digestão da celulose (FONDEVILA, 1998), amido e açúcares, os quais são absorvidos rapidamente e armazenados na forma de amido protozoário (WILLIAMS, 1986). São essenciais na fermentação do amido e evitam a diminuição brusca do pH, e também aumentam a relação acetato: propionato (LANA, 2007). Evidencia-se que os protozoários possuem maior sensibilidade que as bactérias, podendo desaparecer se o pH decair de 5, ou passar de 7,8 (WILLIAMS, 1986).

Tem papel fundamental na fermentação ruminal e são responsáveis por grande parte da degradação dos alimentos e material fibroso, podendo representar até 34% da digestão da fibra (KAMRA, 2005). Jouany e Senaud (1979), notaram que há uma maior digestibilidade da lignocelulose, que pode ser de 3 à 10%, quando há presença de ciliados no rúmen. Exercem função reguladora de pH, devido a armazenarem polissacarídeos, controlando os níveis de substratos presentes no ambiente ruminal, propiciando fermentação de maior homogeneidade (NUSSIO; CAMPOS; LIMA, 2011). Em seguida deste processo, ocorre a formação de ácidos graxos voláteis, ácido láctico, hidrogênio e dióxido de carbono, sendo que os ácidos graxos são de suma importância para o ruminante, pois é a partir dele que sintetizam carbono e energia (KITTELMANN; JANSSEN, 2011).

Uma característica específica dos protozoários é o quimiotactismo, ou seja, aptidão de locomoverem-se em gradientes onde há glicoproteínas e glicose (WILLIAMS et al., 1997). De acordo com Dehority (1989), constataram que os holotríquias praticam o quimiotactismo quando há a presença de alimento recém-ingirido, desta forma ocorrendo grande concentração de protozoários na fração líquida na parte mediana e dorsal do rúmen.

No momento que o alimento está no rúmen, os protozoários tem acesso à grandes quantidades de substratos rapidamente fermentáveis, dessa maneira realizam efeito tamponante (WILLIAMS, 1986), podendo evitar a ocorrência de acidose, em dietas ricas em açúcares e grãos (DEHORITY et al., 1997). Porém

possuem multiplicação lenta, demorando em torno de 15 a 24 horas para duplicarem-se e para seu crescimento preferem pH superior a 5,8 (SANTOS, 2011).

Atuam ainda na biohidrogenação de ácidos graxos insaturados e na fermentação do lactato resultante das bactérias. A proteína consumida pelos protozoários, após ser excretada retorna na forma de aminoácidos, peptídeos ou amônia (KOZLOSKI, 2011).

Grande parte destes que habitam o rúmen são ciliados, e dividem-se em duas classes: os holotriquias e os entodiniomorfos. Os entodiniomorfos apresentam cílios em sua cavidade oral e dorsal, de modo que estes auxiliam na sua locomoção (RUSSEL, 2002). São predominantes em ruminantes que alimentam-se com forragens, comumente consomem partículas insolúveis, que estão no fluido ruminal, possuindo capacidade de aderir-se as fibras e realizar função hemicelulolítica e fibrolítica (KOZLOSKI, 2011).

Já a classe dos holotriquias, apresentam cílios sobre todo o corpo (RUSSEL, 2002). Encontram-se prevaletentes quando a dieta é composta de grãos de cereais, possuindo grande capacidade de ingerir grânulos de amido e materiais solúveis (KOZLOSKI, 2009). Ademais são capazes de aderir-se à parede do retículo e deslocar-se ao rúmen, em seguida a alimentação, devido ao gradiente de açúcares solúveis (DEHORITY et al., 1989)

O requerimento nutricional dos protozoários ainda é pouco estudado, pois das muitas espécies conhecidas, apenas cerca de vinte já foram cultivadas *in vitro* com sucesso, porém sugere-se que as exigências nutricionais sejam semelhantes ao das bactérias (WILLIAMS et al., 1997).

Segundo Ivan et al. (2001), os protozoários conseguem usar a maior parte dos carboidratos solúveis, amido e carboidratos da parede celular para seu desenvolvimento, também estão associados à maior renovação de nitrogênio microbiano no rúmen e a diminuição no suprimento de aminoácidos ao intestino. Apresentam simbiose com arqueias metanogênicas, onde o hidrogênio produzido pelos ciliados é utilizado por estes microrganismos na formação de metano; e podem ser responsáveis por até 37% da metanogênese (WILLIAMS et al., 1997).

Os ciliados são eficientes na degradação e fermentação de substratos, armazenando grande quantidade de polissacarídeos e usam-no quando há falta de energia exógena (NUSSIO; CAMPOS; LIMA, 2011). Todos os protozoários ciliados para suprirem sua necessidade de aminoácidos e ácidos nucléicos ingerem bactérias,

bem como o engolfamento ocorre com maior intensidade em dietas ricas em grãos. Entretanto, em dietas compostas por forragens esta aderência é impossibilitada pelas bactérias, pois encontram-se aderidas, dificultando o processo (KOZLOSKI, 2011)

A digestão dos mesmos ocorre nos vacúolos, localizados no protoplasma, sendo possível o engolfamento de grânulos de amido e estes demoram mais para serem digeridos, em comparação da realizada pelas bactérias. Cita-se que são eficientes na fermentação de lactato, o que resulta em diminuição do efeito depressivo do pH ruminal (KOZLOSKI, 2011).

3.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A POPULAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS

O maior número de protozoários é relacionado com dietas mais digestíveis (VAN SOEST, 1994), apresentando função na modulação da taxa de fermentação ruminal, favorecendo o equilíbrio no ecossistema ruminal e evitando disfunções metabólicas (KOZLOSKI, 2011).

Estudos têm mostrado que há uma diminuição no número de protozoários quando se usa quantidades excessivas de concentrado na dieta (DAYANI et al., 2007). Porém alguns afirmam que há aumento na população quando a dieta é mais digestiva proporcionando desta forma o equilíbrio da microbiota (VAN SOEST, 1994). Belanche et al. (2012) constataram que dietas com grande quantidade de fibra detergente neutro (FDN), aumentaram a população de microrganismos celulolíticos, dentre os quais estão os protozoários, essa elevação deve-se ao fato de manter o pH alto, propiciando o seu desenvolvimento.

Em experimento realizado por Franzolin et al. (1996), notou que animais alimentados com dieta rica em concentrado, animais com a flora desprovida de protozoários (defaunados) tiveram pH ruminal menor do que os animais com a flora ruminal normal (faunados). Abou Akkada et al. (1964), isolaram cordeiros do nascimento até à quinta semana de idade, com o intuito de defauná-los, posteriormente, metade destes foi inoculada com conteúdo ruminal de animais faunados. Notaram com isso que os animais que possuíam protozoários ruminais tiveram um maior ganho de peso e comparação aos defaunados.

Borhani et al. (1967; *apud* Church, 1974), em experimento com bubalinos, observaram valores inferiores de nitrogênio amoniacal e ácidos graxos voláteis (AGV) em animais defaunados, possuindo redução na degradação de proteína dietética.

Em pesquisa desenvolvida por Rufino et al. (2011) a adição de torta de macaúba no nível de 5% da dieta não interferiu na concentração média de protozoários no líquido ruminal, quando comparado a 0% de inclusão. Sendo que as dietas com níveis de 10 e 15% de torta propiciaram aumento relevante da concentração média de protozoários. A média desta população ficou em $9,5 \times 10^5/\text{mL}$.

Vale ressaltar que alguns fatores como: nível, hábito e tempo de consumo, e características relacionadas a ruminação, salivação e tamponante do rúmen, possuem grande atuação sobre os protozoários ciliados. Reconhecendo desta forma que o tipo de dieta, período pós alimentação e o pH são elementos que afetam a quantificação dos protozoários (FRANZOLIN & DEHORITY, 1996).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da própria instituição, de acordo com o protocolo 2016-020.

O experimento foi realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, na Unidade de Ensino e Pesquisa (UNEPE) de Metabolismo Animal, no período de junho a agosto de 2017. Foram utilizados quatro ovinos machos, castrados e fistulados no rúmen com peso médio de 40 kg. Estes animais eram mantidos em gaiolas metabólicas com comedouros e bebedouros individuais, alimentados com 40% de feno de azevém e 60% de concentrado. As dietas eram isoenergéticas e isoproteicas com 12,5% de Proteína Bruta e 68% de Nutrientes Digestíveis Totais (Tabela 1) (NRC, 2007).

Tabela 1 – Composição da dieta

Ingrediente	Tratamentos (% da Matéria Seca)			
	0	19	38	57
Farelo de soja	10,87	7,38	3,90	0,420
Milho	48,38	32,87	17,35	1,83
Triguilho	0	19	38	57
Sal	0,75	0,75	0,75	0,75
Feno	40	40	40	40
	Nutrientes (% da Matéria Seca)			
Matéria seca	87,00	87,33	87,26	87,49
Proteína Bruta	12,5	12,5	12,5	12,5
Nutrientes digestíveis totais	69,54	68,99	68,44	67,88
Fibra em detergente neutro	37,00	37,87	38,73	39,59

Dos alimentos fornecidos aos animais foram retiradas amostras nos dias da coleta e feita a pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas para

posteriores análises bromatológica de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição bromatológica dos alimentos fornecidos

	MILHO	FARELO DE SOJA	TRIGUILHO	FENO
MS %	89,82	87,36	89,09	89,83
PB%	9,75	48,77	16,90	6,20
EE%	5,10	1,42	1,78	1,86
MM%	1,59	6,63	3,78	6,33
Ca %	0,040	0,310	0,130	0,530
P %	0,26	0,630	0,430	0,140
FDN%	16,20	16,51	20,798	68,43
FDA%	3,89	10,41	7,23	43,97
LIG %	-	-	2,07	6,48
CEL %	-	-	4,62	36,08
PIDA%	-	-	3,41	1,22
PIDN%	-	-	10,42	2,25

MS= Matéria seca; PB= Proteína Bruta; EE= Extrato Etéreo; MM= Matéria Mineral; Ca= Cálcio; P= Fósforo; FDN= Fibra em Detergente Neutro; FDA= Fibra em Detergente Ácido; LIG= Lignina; CEL= Celulose; PIDA= Proteína insolúvel em detergente ácido; PIDN= Proteína insolúvel em detergente neutro.

Os tratamentos foram compostos por 0, 19, 38 e 57 % de trigoilho na matéria seca da ração total em substituição ao milho. O período experimental totalizou 80 dias, com 10 dias de adaptação, 5 dias de coleta de alimento e fezes e 1 dia de coleta do líquido ruminal. Para a coleta das amostras, as cânulas dos animais foram abertas, sendo feita a retirada do líquido ruminal. As amostras ficaram armazenadas em frascos plásticos com 20 ml de líquido ruminal não filtrado e 20 ml de formalina.

Alimentou-se os animais duas vezes ao dia, às 9:00 e as 17:00 horas. Para avaliar o consumo alimentar dos animais pesou-se o alimento fornecido, e anteriormente a próxima alimentação realizou-se a pesagem das sobras, para desta forma determinar a quantidade exata que o animal consumiu.

A coleta para quantificação dos protozoários ocorreu nos tempos zero horas, quatro horas e oito horas após a alimentação. A contagem dos protozoários ciliados

aconteceu através da Câmara adaptada de Sedgewick-Rafter, fabricada em PTEG, em dimensões idênticas a original. As amostras de líquido e conteúdo ruminal coletadas foram fixadas em formalina 18,5%, posteriormente colocou-se 1mL de líquido ruminal e 9mL de glicerina à 30% e depois aplicadas solução de lugol (100 mL de água destilada, cinco gramas de iodo e dez gramas de iodeto de potássio) de acordo com metodologia modificada de D'Agosto e Carneiro (1999).

Considerou-se as médias das contagens feitas em 100 campos independentes, realizadas em duplicata e analisadas em microscópio com aumento de 10x. O valor médio da contagem nos campos foi multiplicado pelo fator de correção de 1.600. Submeteu-se os dados à análise, por meio da metodologia de Modelos Lineares, generalizados, assumindo distribuição Poisson com função de ligação logarítmica, com nível de significância 1%, utilizou-se o procedimento GENMOD do pacote estatístico SAS e regressão linear para avaliar o efeito da dieta.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Não foi observada diferença significativa na contagem de protozoários no rúmen dos borregos nos tratamentos (0, 19, 38, 57%) e nos horários (0, 4 e 8 horas) após a alimentação, de acordo com a Tabela 3. Isso pode ter ocorrido devido ao pH não ter divergido entre os tratamentos. Em trabalho realizado concomitantemente por Gilioli, (2017), os valores de pH variaram de 6,63 à 6,83, desta forma, não afetando o desenvolvimento dos microrganismos. Esses valores similares podem ser explicados devido ao poder tamponante da saliva, evitando o desequilíbrio no pH ruminal, decorrente dos processos fermentativos. De acordo com Van Soest (1994), o pH ideal para microrganismos celulolíticos deve ser de 6,2 à 6,7.

Tabela 3. População média de protozoários ciliados/mL de conteúdo ruminal. Números médios totais de protozoários ciliados/mL de conteúdo ruminal (10^4) de borregos fistulados, alimentados com níveis de inclusão de trigoilho (0, 19, 38, 57%), nas horas 0, 4, 8 horas após a alimentação.

Tempo	Tratamento				Média
	0%	19%	38%	57%	
0	19,48	16,76	19,84	19,2	18,82
4	17,08	17,68	17,8	19,12	17,92
8	16,96	19,96	22,7	21,2	20,2
Média	17,84	18,13	20,11	19,84	

Em trabalho realizado por Marinho (1983), onde avaliaram cordeiros em pastagem natural, observou-se uma variação na população total de protozoários, com valores entre $50-300 \times 10^4 \text{ g}^{-1}$ do conteúdo ruminal. Em carneiros na África nas diferentes estações do ano, Vanderwath e Myburgh (1941) encontraram valores de 100, 277, 455 e 278 $\times 10^3$ protozoários (mL^{-1}), respectivamente para o inverno, primavera, verão e outono. Em trabalho com renas, realizado por Westerling (1970), constatou concentrações entre 200 à 350 $\times 10^4$ protozoários (mL^{-1}).

Já em experimento realizado por Lima e colaboradores (2012), utilizando fêmeas ovinas provenientes do cruzamento das raças Corriedale e Texel, com dieta a base de 40% da MS de concentrado e 60% da MS de volumoso (composta de Feno de Alfafa e de Tifton 85), obtiveram valores superiores, quando comparado ao presente trabalho, sendo que o número total de protozoários ficou entre $1,1 \times 10^6$, que de acordo com os autores esse incremento ocorreu no decorrer do período experimental devido a adaptação da dieta fornecida aos animais.

De acordo com diversos estudos, percebe-se que há resultados variáveis de acordo com o nível de adição de concentrado e a população total de protozoários. Burger (2000), constatou uma diminuição linear para os níveis de 30, 45, 60, 75 e 90% de concentrado, observando valores de $33,6 \times 10^4$, $25,5 \times 10^4$, $17,5 \times 10^4$, $9,5 \times 10^4$ e $1,4 \times 10^4$ protozoários/mL em bezerros holandeses. Conquanto em trabalho com bovinos com dieta composta de capim-elefante e nível de inclusão de 20 e 40% de concentrado, não foi constatado diferença significativa na contagem de protozoários, os quais possuíram os valores de média no total por mililitros de conteúdo ruminal que foi: $48,75 \times 10^4$ na dieta composta apenas pela forrageira, $60,54 \times 10^4$ com forrageira e inclusão de 20% de concentrado e $54,30 \times 10^4$ contendo a inclusão de 40% de concentrado (Martinele et al., 2008). Os efeitos da adição de concentrado nas dietas depende basicamente da variação dos valores de pH ruminal (NAGARAJA, 1992), este é um fator que interfere claramente na população microbiana, e quando há queda drástica no pH, resulta em redução no número de protozoários (DAYANI et al., 2007). De acordo com Strobel (1986), valores de pH menores de 6,0 resultam em diminuição dos microrganismos fermentadores de celulose e em decorrência afetando a efetividade da síntese de proteína microbiana. Ressalta-se que em dietas com teor menor a 40% de fibra, afeta diretamente a produção de saliva dos animais e com isso o crescimento dos microrganismos (VALADARES FILHO; PINA, 2006).

Ao avaliar ruminantes africanos, Dehority & Odenyo (2003), constataram superioridade no número de protozoários em animais provindos do sistema a pasto, em relação a animais com dietas com adição de níveis de concentrado. A variação na concentração de protozoários, em trabalho realizado por Manella e Lourenço, 2004 foi devido as alterações nas características da forrageira, durante as diferentes épocas do ano, relatando que a suplementação proteica não modificou a população

de protozoários. Conforme as características da forrageira durante as diferentes épocas do ano.

De acordo com estudo desenvolvido por Wlodarski (2015), a inclusão de níveis (0, 2, 4 e 6%) de gordura protegida não resultou em diferenças no número total de protozoários ciliados, entretanto, encontrou-se valores superiores no tempo que antecede o fornecimento do alimento. O número médio de protozoários/mL ficou entre 0,32 a 0,49 x 10⁴, estes valores são menores de acordo com o trabalho realizado e de acordo com outros trabalhos da literatura, de acordo com o autor isso pode ser explicado devido a quantidade de abertura das cânulas dos animais, acarretando na alteração da temperatura ruminal maior entrada de oxigênio e subsequente morte dos microrganismos.

Através de diversos trabalhos realizados para a contagem de protozoários, percebe-se que há grande variação nesta concentração, sendo que a população média de protozoários observada neste trabalho, está dentro do intervalo proposto para ovinos. Esta é influenciada por diversos fatores, sendo que os principais são espécie animal, nível de inclusão de concentrado, taxa de passagem do alimento, pH do rúmen e sincronização de proteína e energia, pois os microrganismos utilizam a fonte de alimento energético e também precisam da fonte protéica, para o fornecimento de peptídeos, nitrogênio amoniacal e peptídeos. (PEREIRA, 2008).

Outro fator que explica os resultados é a grande capacidade dos ovinos produzirem saliva, com isso há a regulação do pH, favorecendo o ambiente ruminal ideal para os processos fermentativos ocorrerem com eficiência.

6 CONCLUSÃO

O uso de trigoilho em substituição ao milho nos diferentes níveis de inclusão e horários após a alimentação, não afetou a população de protozoários ciliados no rúmen de ovinos.

7 REFERÊNCIAS

- ABOU AKKADA, A. R.; EL-SHAZLY, K. Effect of absence of ciliate protozoa from the rumen on microbial activity and growth of lambs. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V.12, p.384-390, 1998.
- AKSNES, A.; OPSTVEDT, J. Content of digestible energy in fish feed ingredients determined by the ingredient-substitution method. **Aquaculture**, v.161, p.45-53, 1998.
- ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de. **Nutrição de Ruminantes**, Jaboticabal: Funep, p.111-116, 2006.
- BELANCHE, A. et al. Effect of diet and absence of protozoa on the rumen microbial community and on the representativeness of bacterial fractions used in the determination of microbial protein synthesis. **Journal of Animal Science**, v.90, p.3924-3936, 2012.
- BRUM, P. A. R.; ALBINO, L. F. T.; PIENIZ, L. C. Utilizaçãodo Triguilho em rações para frangos de corte. **Embrapa Suínos e Aves**, 1998.
- BRUM, P. A. R.; ZANOTTO, D. L.; AVILA, V. S. et al. Triguilho na alimentação de aves. **Embrapa Suínos e Aves**, 2005.
- BÜRGER P.J., PEREIRA J.C., VALADARES FILHO S.C. et al. Fermentação ruminal e eficiência microbiana em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 29(1): 215-224. 2000.
- CHURCH, D. C. **Fisiologia Digestiva y Nutrición de los Ruminantes**. Zaragoza: Acribia, p.184-224, 1974.
- CONSTERNON, J. W. et al. The bacterial glycocalix in nature and disease. Annual Review of Microbiology, 35: 299, 1981. In: BERCHIELLI, Telma, T.; PIRES, Alexandre, V; OLIVEIRA, Simone, G. **Nutrição de Ruminantes**. Ed Jaboticabal, Funep, 616p. 2011.
- CONSTERNON, J. W. et al. Microbial biofilms. Annual Review of Microbiology, 49: 711, 1995. In: BERCHIELLI, Telma, T.; PIRES, Alexandre, V; OLIVEIRA, Simone, G. **Nutrição de Ruminantes**. Ed Jaboticabal, Funep, 616p. 2011.
- D'AGOSTO, M. SIQUEIRA, I. C. V.; ESPÍRITO-SANTO, N. B. Comportamento e distribuição de protozoários ciliados (Protista, Ciliophora) no rúmen e no retículo de bovinos submetidos ao jejum. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, p.8-16, 2001.
- D'AGOSTO, Marta; CARNEIRO, Maria E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, p.725-729, 1999.

DAYANI O., GHORBANI G. R., ALIKHANI M. Effects of dietary whole cottonseed and crude protein level on rumen protozoal population and fermentation parameters. **Small Ruminant Research**. v.69, p.36-45, 2007.

DEHORITY, B. A.; ORPIN, C. G. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Eds.). The rumen microbial ecosystem. 2^oed. London: **Blackie Academic**, p.196-245, 1997.

DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P.A. Factors affecting the migration and sequestration of rumen protozoa in the family Isotrichidae. **Journal of General Microbiology**, p.153-539, 1989.

DEHORITY, B.A. Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. **Boca Raton, Fla: CRC Press**. 325 p. 1993.

DEHORITY, B.A.; ODENYO, A.A. 'Influence of diet on the rumen protozoal fauna of indigenous African wild ruminants, 50, 220–223, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Utilização do trigoilho em rações para frango de corte. **Boletim informativo**, 1998.

FONDEVILA, M. Proceso implicado en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. **Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)**, v.15, p.87-106, 1998.

FRAZOLIN, R.; DEHORITY, B. A. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. **Journal of Animal Science**, v.74, n.11, p.2803-2809, 1996.

GILIOLI, D. **pH ruminal e concentração de amônia em ovinos alimentados com trigoilho em substituição ao milho**. Trabalho de Conclusão de curso. 2017.

HUNGATE, R. E. The rumen and its microbes. New York: **Academic Press**, 533p. 1966.

IVAN, M.; MIR, P. S.; KOENIG, K.M. et al. Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. **Small Ruminant Research**, v.41, p.221-227, 2001.

JOUANY, J.P.; SENAUD, J. Role of rumen protozoa in the digestion of food cellulosic materials. **Annals of veterinary research**, v.10, n.2, p.261-263, 1979.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v.89, p.124-134, 2005.

KITTELMANN, S.; JANSSEN, P. H. Caracterização da composição de ciliados comunidade em carneiros domésticos, veados e gado, alimentando-se de dietas variadas, por meio de PCR-DGGE e bibliotecas de clones. **Microbiology Ecology, FEMS**, n.75, p.468-481, 2011.

KOZLOSKI, Gilberto. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2^oed. Santa Maria:UFSM, 216p., 2011.

LANA, R. P. **Nutrição e alimentação animal: mitos e realidades**. 2^o ed. Viçosa: UFV, v.1, 344p., 2007.

LIMA, M. E., VENDRAMIN, L., HOFFMANN, A. C. et al. Alterações na população de protozoários ruminais, quantificados a partir da adaptação da técnica de Dehority, de ovinos submetidos a uma dieta de confinamento. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, n.1, p.1019, 2012.

MARINHO, A. A. M. Ciliados do rúmen - Sua dinâmica e importância no metabolismo digestivo dos ruminantes. Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.77, n.464, p.241-259, 1982.

MARINHO, A. A. M. Protozoários ciliados no rúmen de ovinos em pastoreio. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.78, n. 467, 1983.

MARTINELE, I.; SIQUEIRA, I.V; D'AGOSTO, M. Protozoários ciliados no rúmen de bovinos alimentados com dietas de capim-elefante e com dois níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.1, p.74-81, 2008.

NAGARAJA T.G., TOWNE G. & BEHARKA A.A. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoal in cattle fed a high-grain diet. **Applied Environmental Microbiology**. (58): 2410-2414. 1992.

NRC, National Research Council. Nutrients requirements of sheep. Washington: **National Academies Press**, 362p, 2007.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; LIMA, M. L. Metabolismo de carboidratos estruturais. In: BERCHIELLI, Telma, T.; PIRES, Alexandre, V; OLIVEIRA, Simone, G. **Nutrição de Ruminantes**. Ed Jaboticabal, Funep, 616p., 2011.

PEREIRA, E.S. et al .Equações do NRC(2001) para predição do valor energético de coprodutos da agroindústria no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.9, n.2, p.258-269, abri/jun, 2008.

ROSTAGNO, Horacio S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3 ed. Editora UFV, Viçosa, 2011. 252p.

RUFINO, L.A.; BARRETO, S.P.; DUARTE, E.R.; GERASEEV, L.C.; SANTOS, A.R.; JARUCHE, Y.G.R. Efeitos da inclusão de torta de macaúba sobre a população de protozoários ruminais de caprinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.4, p.899-903, 2011.

RUSSEL, J. B. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca, NY: **Cornell University Press**, p.121, 2002.

SANTOS, J., Distúrbios metabólicos. In: BERCHIELLI, Telma, T; PIRES, Alexandre, V; OLIVEIRA, Simone, G. **Nutrição de Ruminantes**. Ed Jaboticabal, Funep, 2011, p.485. 616 p.

SIGNOR, A. A.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. et al. Triguilho na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.): digestibilidade e desempenho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p.1116-1121, 2007.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Análise de Alimentos (métodos químicos e biológicos). 3.ed., Viçosa: **Imprensa Universitária da UFV**, 235p., 2002.

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Eds.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. London: **Blackie Academic**, v.2, p.10-72, 1997.

STROBEL, H. J.; RUSSEL, J.B. Effects of pH and energy spilling on bacteria protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, 69:2941, 1986.

SULLIVAN, J. A.; REIGH, R.A. Apparent digestibility of selected feedstuff in diets for hybrid striped bass (*Morene saxatilis* x *Morena chrysops*). **Aquaculture**, v.138, p.313-322, 1995.

TEIXEIRA, J. C. **Nutrição dos Ruminante**, Lavras, MG: ESAL/ FAEPE, 1991.

VALADARES FILHO, Sebastião, C.; PINA, D. S. **Fermentação Ruminal**. In: *Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 583p. 2006.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 476p. 1994.

VANDERWATH, J. G.; MYBURGH, S. J. Studies on the alimentary tract of merino sheep in South Africa. VI. The role of infusoria in ruminal digestion with some remarks on ruminal. Onderstepoort **Journal Veterinary Science Animal**. Indust., Transvaal, v. 17, p. 61-88, 1941.

WESTERLING, B. Rumen ciliate fauna of semi-domestic reindeer (*Rangifer tarandus* L.) In finland: Composition, volume and some seasonal variations. *Acta Zool. Fenn.*, Helsinki, v. 127, p. 1-76, 1970.

WILLIAMS, A. G. Rumen holotrich ciliate protozoa. **Microbiological Review**, v.50, p.25, 1986.

WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. The rumen protozoa. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Eds.). *The rumen microbial ecosystem*. London: **Blackie Academic**, v.2, p.73-139, 1997.

WLODARSKI, L. **Protozoários ciliados em ovinos suplementados com gordura protegida**. Trabalho de Conclusão de curso. 2015.