

Glicerina associada à ureia na terminação de bovinos: parâmetros ruminais, digestibilidade e massa microbiana

[*Glycerin associated with urea in finishing cattle: ruminal fermentation, digestibility and microbial mass*]

A.P. D'Aurea, J.M.B. Ezequiel, E.M.O. D'Aurea, V.R. Fávaro, A.C. Homem Júnior, E.H.C.B. Van Cleef, J.R. Paschoaloto, M.T.C. Almeida

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – Unesp – Jaboticabal, SP

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi verificar a combinação de glicerina com ureia, quanto aos parâmetros ruminais, à digestibilidade e à qualidade da massa microbiana. O trabalho foi conduzido na Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos, pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Seis animais da raça Nelore providos de cânulas ruminais foram utilizados para verificar os parâmetros pH, nitrogênio amoniacal, a digestibilidade e a massa microbiana, distribuídos em quadrado latino 6x6. Seis dietas com energia metabolizável e proteína bruta semelhantes foram formuladas, utilizando-se a proporção volumoso:concentrado de 30:70. O volumoso utilizado foi silagem de milho. Os concentrados utilizados foram compostos por milho, casca de soja, farelo de girassol, glicerina e ureia. Os tratamentos foram: C = controle; U = 1% de ureia; G10 = 10% de glicerina; GU10 = 1% de ureia e 10% de glicerina, G20 = 20% de glicerina e GU20 = 20% de glicerina e 1% de ureia. Houve influência das dietas no crescimento dos microrganismos ruminais, no pH e no nitrogênio amoniacal. Dietas com 20% de glicerina na matéria seca da dieta diminuem a população de protozoários ruminais. A inclusão de glicerina diminui a digestibilidade de componentes fibrosos da dieta.

Palavras-chave: biodiesel, glicerol, microrganismo, rúmen

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the combination of glycerol with urea as the ruminal parameters, digestibility and quality of microbial mass. The work was conducted at the Animal Unit of Digestive and Metabolic Studies belonging to the Faculty of Agricultural Sciences and Veterinárias-FCAV/Unesp campus Jaboticabal. Six animals fitted with rumen cannulas Nelore were used to verify the parameters pH, ammonia nitrogen, digestibility, and microbial mass distributed in a 6x6 Latin square. Six diets with similar metabolizable energy and crude protein were formulated using the forage:concentrate ratio of 30:70. The roughage used was corn silage. The concentrates used were composed of corn, soybean hulls, sunflower meal, glycerin and urea. The treatments were: C = control, U = 1 % urea, G10 = 10 % glycerin, GU10 = 1 % urea and 10 % glycerol, G20 = 20 % glycerin and GU20 = 20 % glycerin and 1 % urea. Diets with glycerin had lower digestibility of NDF and hemicellulose. There was no influence of diets on the growth of rumen microorganisms, pH and ammonia nitrogen. Diets with 20 % glycerin in the diet dry matter decrease the population of rumen protozoa. The addition of glycerol decreases the digestibility of fibrous components of the diet.

Keywords: biodiesel, glycerol, microorganisms, rumen

Recebido em 25 de novembro de 2015

Aceito em 9 de agosto de 2016

E-mail: andredaurea@gmail.com

INTRODUÇÃO

Com o uso de confinamento para produção de bovinos, a cada dia novos tipos de subprodutos são utilizados com a finalidade de reduzir os custos de produção e proporcionar o mesmo desempenho ao animal sem prejudicar a qualidade da carne. Dessa forma, a pesquisa sempre deve estar à frente, investigando o uso de novos ingredientes para a nutrição de bovinos.

A glicerina vem surgindo como uma nova fonte de energia para ruminantes, podendo substituir ingredientes que concorrem com a alimentação humana, como o milho. Grande parte da energia disponível aos ruminantes é produzida no rúmen, podendo ser avaliados parâmetros ruminais, tais como pH e nitrogênio amoniacal, digestibilidade das dietas e qualidade dos microrganismos.

O pH do rúmen afeta diretamente a ação dos microrganismos ruminais, pois estes necessitam de uma faixa de pH ótimo para seu crescimento (Van Soest, 1994). Um dos efeitos negativos associados à alteração do pH é a diminuição da digestibilidade das dietas, devido à diminuição da ação dos microrganismos. A saliva é o tampão natural do rúmen, porém, em dietas com elevadas quantidades de concentrado, pode não ser suficiente para manter o pH estável (Church, 1979; Van Soest, 1994).

Além das condições de pH, os microrganismos necessitam de uma fonte de nitrogênio, assim utilizam o nitrogênio na forma de amônia, que está disponível no rúmen. A amônia ruminal é proveniente da degradação de proteínas, peptídeos, aminoácidos e de outras substâncias nitrogenadas, além da reciclagem via saliva ou difusão pela parede ruminal (Van Soest, 1994).

Segundo Leng (1990), em condições tropicais, as concentrações de nitrogênio amoniacal no rúmen devem ser superiores a 10mg/dL, para que a digestão ruminal da matéria seca seja maximizada, e superiores a 20mg/dL, para que ocorra consumo de matéria seca máximo. Valores próximos a 100mg/dL podem levar a quadros de intoxicação (Santos, 2006). Mehrez *et al.* (1977) consideram que a concentração de N-NH₃ de 23mg/dL é a mais eficiente para maximizar a produção microbiana.

A inclusão da glicerina em dietas de bovinos tem causado diminuição no aproveitamento da fração fibrosa pelos animais, sendo esse mecanismo ainda desconhecido (Donkin, 2008). Segundo Abo El-Nor *et al.* (2010), a glicerina pode alterar as populações de microrganismos ruminais pelo aumento da produção de propionato.

A glicerina, por ser um ingrediente exclusivamente energético e de rápida degradação ruminal, necessita de um ingrediente proteico que possa acompanhar sua curva de degradação ruminal para um melhor aproveitamento microbiano.

O objetivo deste trabalho foi avaliar possíveis alterações ruminais provocadas pela associação de glicerina e ureia em dietas de bovinos, em que foram avaliados o pH, o nitrogênio amoniacal, a digestibilidade total e a massa microbiana ruminal.

MATERIAL E MÉTODOS

Para as avaliações dos parâmetros ruminais, foram utilizadas as instalações e os equipamentos da Unidade Animal de Estudos Digestivos e Metabólicos, pertencente ao Departamento de Zootecnia da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, de acordo com os princípios éticos na experimentação animal (protocolo nº 027608/12) determinados pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal da referida instituição.

Foram utilizados seis machos da raça Nelore, distribuídos em quadrado latino 6x6. Os animais possuíam idade aproximada de três anos, com peso médio de 400kg, providos de cânulas permanentes no rúmen. Eles foram alojados em baias individuais, com 16m² e livre acesso a bebedouro e cochos. As dietas estão apresentadas na Tab. 5.

O período de adaptação dos animais às dietas experimentais foi de 14 dias, e sete dias para colheitas de conteúdo ruminal e fezes.

O concentrado, o volumoso e a glicerina foram pesados separadamente e misturados no momento do fornecimento, divididos em duas refeições diárias. As rações foram fornecidas para que as sobras não ultrapassassem 5% do oferecido.

Para a determinação do nitrogênio amoniacal e do pH, foram colhidas amostras do fluido ruminal (cerca de 100mL), via cânula ruminal, nos seguintes tempos: no momento da alimentação (zero), uma, duas, quatro, seis e oito horas após a alimentação.

O pH foi medido em potenciômetro digital de bancada, imediatamente após a colheita da

amostra. Em seguida, 2mL foram reservados em tubos de ensaio para a determinação do nitrogênio amoniacal e destilados em aparelho tipo micro-kjeldhal, utilizando-se 5,0mL de KOH 2N, regulado para destilar a um fluxo de 2,0mL/min. O destilado foi recebido em 10,0mL de solução de ácido bórico 2% até completar o volume de 50mL e, então, foi titulado com HCl 0,005 (Silva e Queiroz, 2002).

Tabela 1. Porcentagem dos ingredientes e determinação da composição bromatológica dos tratamentos experimentais (% MS)

Ingredientes	Tratamentos					
	C	U	G10	GU10	G20	GU20
Silagem de milho	30	30	30	30	30	30
Milho	27	40	20	34	10	14
Casca de soja	24	24	14	14	9	19
Farelo de girassol	18	4	25	10	30	15
Glicerina	-	-	10	10	20	20
Ureia	-	1	-	1	-	1
Suplemento mineral**	1	1	1	1	1	1

Nutrientes	Composição					
	C	U	G10	GU10	G20	GU20
PB (%)	12,80	12,93	12,96	12,91	12,83	12,95
EM (Mcal/kg)	2,75	2,83	2,73	2,82	2,71	2,76
FDN (%)	43,93	37,88	39,50	33,03	37,40	37,27
FDA (%)	29,20	24,56	25,72	20,75	24,33	24,86
HEM (%)	14,73	13,32	13,78	12,28	13,07	12,41
EE (%)	2,66	3,06	2,30	2,73	1,85	1,99

C = tratamento controle, G10 = tratamento com 10% de glicerina na MS, U = tratamento com 1% de ureia na MS, GU = tratamento com 10% de glicerina e 1% de ureia na MS, G20 = tratamento com 20% de glicerina na MS, GU20 = tratamento com 20% de glicerina e 1% de ureia na MS. % MS = % de matéria seca, PB = proteína bruta, EE = extrato etéreo, FDN = fibra em detergente neutro, FDA = fibra em detergente ácido, HEM = hemicelulose, EM = energia metabolizável. *Valores tabelados. **P=40g/kg; Ca = 80g/kg; Na = 195g/kg; Cl = 300g/kg; Mg = 5g/kg; S = 26g/kg; Zn = 2g/kg; Cu = 1g/kg; Mn = 0,5g/kg; Co = 0,1g/kg; I = 0,1g/kg; Se = 5mg/kg e F = 0,4g/kg.

O coeficiente de digestibilidade dos nutrientes foi determinado utilizando-se a fibra em detergente ácido indigestível (FDAi) como indicador interno, a qual foi determinada pela técnica de incubação *in situ* dos alimentos, das sobras e das fezes durante 288 horas, segundo a técnica descrita por Casali *et al.* (2008).

As amostras de sobras foram colhidas durante o período experimental. Os alimentos foram amostrados no início de cada período.

As amostras fecais (aproximadamente 100g) foram colhidas imediatamente após a defecação, duas, seis, 10, 14, 18 e 22 horas após a primeira alimentação, perfazendo um total de seis

amostragens/animal/período. A amostragem foi realizada na parte superior das fezes para evitar possível contaminação com o solo. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa de circulação forçada de ar, em temperatura de 55°C, por 72 horas. Após a secagem, as amostras foram devidamente identificadas e armazenadas individualmente em sacos plásticos, moídas em moinho do tipo faca a 1mm e, depois, misturadas, para formar amostras compostas de fezes e sobras.

A porcentagem de FDAi foi quantificada após 288 horas de incubação *in situ* (Casali *et al.*, 2008), utilizando-se sacos de náilon, 100% poliamida, medindo 14,0 x 7,0cm e com poros de

50µm, nos quais foram pesados aproximadamente 5,5g de matéria seca das amostras das rações, das sobras e das fezes.

Foram utilizadas, para incubação, as amostras moídas e pré-secas de alimentos, sobras e fezes para quantificar a FDAi. Após a incubação, os sacos foram imersos em água gelada por 30 minutos para interrupção da atividade microbiana e, em seguida, foram lavados em máquina tanquinho com renovação de água. Após essa etapa, os sacos contendo os resíduos da incubação foram mantidos em estufa de circulação e renovação de ar a temperatura de 55°C por 72 horas.

As amostras das rações e das fezes foram analisadas para a obtenção dos teores de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta (N x 6,25) e extrato etéreo, de acordo com AOAC (1995). As fibras em detergente neutro e em detergente ácido foram analisadas utilizando-se as soluções propostas por Van Soest e Wine (1967) e a digestão realizada em autoclave (0,5kgf/cm², 111°C por 50 minutos), segundo procedimento adaptado de Pell e Schofield (1992). O amido foi determinado de acordo com Hendrix (1993).

Foram colhidos manualmente aproximadamente 3kg de conteúdo ruminal para análise de massa microbiana, nos tempos zero, duas, cinco e oito horas após a alimentação. A colheita foi dividida em dois dias de cada período experimental, sendo no primeiro dia as colheitas realizadas nos tempos zero e cinco horas e, no segundo, nos tempos duas e oito horas após a alimentação, para evitar a retirada de grande quantidade de conteúdo ruminal em apenas um dia, o que poderia prejudicar o crescimento microbiano.

Para separar a fase líquida da fase sólida, o conteúdo ruminal foi filtrado em filtro de náilon com porosidade de 100µm e posteriormente avaliado de acordo com a técnica proposta por Martin *et al.* (1994). Foram pesados 200g da parte sólida do conteúdo, sendo 30g utilizados para a determinação da matéria seca da parte sólida e 170g para a extração das bactérias do sólido.

Para extração das bactérias da fase sólida, o conteúdo ruminal sólido foi misturado à solução salina (0,63% K₂HPO₄, 0,5% KH₂PO₄, 0,065% NaCl.6H₂O, 0,09% MgSO₄.7H₂O, 0,5%

cloridrato de cisteína), previamente aquecida a 39°C (1g de sólido:4mL de solução). Para a remoção das bactérias não aderidas ao sólido, procedeu-se à filtração dessa mistura (náilon 100µm) e o filtrado foi centrifugado (1000 x g por 10min). Os resíduos obtidos foram adicionados ao conteúdo retido no filtro. A estes, foi adicionada solução salina a 4°C (1g de sólido:4mL de solução) o qual foi homogeneizado (200 rpm por 5min) em aparelho homogeneizador Stomacher 400. O combinado sólido + solução rica em bactérias foi filtrado, e o sólido foi descartado. O material não bactéria foi descartado após centrifugação (1000 x g por 10min a 4°C), e o sobrenadante centrifugado novamente (27000 x g por 30min a 4°C). O sedimento resultante dessa última centrifugação correspondeu à população de bactérias sólido-aderidas (BSA).

O conteúdo de BSA foi transferido para potes, que foram identificados e levados à estufa de circulação forçada de ar a 55°C, onde foram pré-secos por 72 horas. Posteriormente, os potes foram pesados e reservados para posteriores análises de MS, MM e PB.

Quanto à fase líquida, os 700mL de líquido ruminal foram diluídos com quantidade igual de solução salina, pré-aquecida a 39°C, e a mistura foi incubada em banho-maria, sob a mesma temperatura, por cerca de 30 minutos. Após 25 minutos de incubação, foram adicionados 1g/L de glicose, para separar os protozoários do restante da mistura. Após essa etapa, realizou-se centrifugação (1000 x g por 10 minutos) de 400mL do fluido clarificado, quando foi separado o pélete de protozoários líquido-associados (PLA), que foi lavado com solução salina, a 39°C, e filtrado em tecido de náilon de 20 µm.

As bactérias líquido-associadas (BLA) foram obtidas pela centrifugação (15.000 x g por 20 minutos a 4°C) do fluido sobrenadante livre de protozoário.

Os péletes de PLA e BLA foram transferidos para potes plásticos e foram pré-secos por 72 horas, em estufa de circulação forçada de ar a 55°C. Após esse processo, foram analisados quanto aos teores de MS, MM e nitrogênio. O delineamento utilizado foi um quadrado latino 6x6, com seis animais, seis períodos e seis

tratamentos. A pressuposição de normalidade dos dados foi testada por meio do comando *proc mixed* do programa SAS (Statistical..., 2003). Foram utilizados o tratamento e o tempo como efeitos fixos, e os efeitos aleatórios foram animal e período. As médias ajustadas foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tab. 2, são apresentados os valores de pH e nitrogênio amoniacal ruminal (N-NH₃). O valor de pH não foi influenciado pelas dietas ($P > 0,05$). As dietas diferiram entre si ($P < 0,05$) quanto ao N-NH₃. Os valores de pH e N-NH₃ diferiram em função do tempo ($P < 0,05$).

Tabela 2. Efeito das dietas e do tempo sobre os valores de pH e NH₃ ruminais

	Efeito das dietas						Pr>F	EPM
	C	U	G10	GU10	G20	GU20		
pH	6,30	6,42	6,19	6,18	6,27	6,38	0,47	0,10
N-NH ₃ , mg/dL	23,1b	28,8a	27,5a	29,9a	19,9c	25,1ab	0,01	0,47
	Efeito de tempo						Pr>F	EPM
	0	1	2	4	6	8		
pH	6,67a	6,40b	6,18c	6,06cd	6,03d	6,10cd	0,001	0,04
N-NH ₃ , mg/dL	18,8cd	37,1a	35,5a	26,6b	19,9c	16,4d	0,001	0,30

As médias com diferentes letras nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 5\%$). C= tratamento controle, U = tratamento com ureia, G10 = tratamento com 10% de glicerina, GU10 = tratamento com 10% de glicerina e ureia, G20 = tratamento com 20% de glicerina, GU20 = tratamento com 20% de glicerina e ureia. EPM= erro-padrão da média.

Segundo Hoover (1986) e Van Soest (1994), o valor de pH mínimo, ideal para promover a fermentação da fibra, é de 6,2, pois esse valor não prejudica a ação dos microrganismos celulolíticos. Os tratamentos com G10 e GU10 apresentaram valores médios de pH inferiores a 6,2 e a digestibilidade da fibra foi diminuída nesses tratamentos, conforme apresentado na Tab. 3. Porém, os tratamentos com 20% de glicerina que possuíram valores de pH acima de 6,2 também apresentaram valores de digestibilidade da fibra diminuídos. Portanto, a glicerina promoveu alguma mudança no rúmen, que diminuiu a atividade de bactérias celulolíticas, independentemente do pH.

Na Tab. 3, são apresentados os coeficientes de digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes da dieta. Ocorreu diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos quanto à digestibilidade da fibra em detergente neutro e da hemicelulose. Os demais nutrientes não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$).

Este mesmo comportamento ocorreu com Abughazaleh *et al.* (2010), quando substituíram gradativamente o milho pelo glicerol, (0; 15; 30 e 45%) em experimento *in vitro*. Não observaram diferenças para o pH, porém, relataram que a concentração de DNA do *Butyrovibrio fibrisolvens* foi significativamente reduzida com

30 e 45% de glicerol em substituição ao milho, indicando que altos níveis de glicerol podem afetar essa bactéria, diminuindo a digestibilidade da fibra. Resultado semelhante também foi encontrado por Abo El-Nor *et al.* (2010), em experimento *in vitro*, com 0; 3,6; 7,2; e 10,8% de glicerol na dieta, ao observarem que não houve diferenças no pH e que a digestibilidade da FDN diminuiu linearmente à medida que aumentou o nível de glicerol nas dietas.

O N-NH₃ ruminal permite o conhecimento do balanceamento na degradação da proteína ou o equilíbrio entre produção, absorção e utilização pelos microrganismos.

Na Tab. 2, nota-se que a dieta G20 apresentou o menor valor de N-NH₃ ruminal, porém, quando incluído 1% de ureia (GU20), o valor de N-NH₃ ruminal aumentou, o que era esperado. Altas concentrações de N-NH₃ ruminal são necessárias para maximizar a taxa de digestão de alimentos rapidamente degradáveis. Altas concentrações de N-NH₃ ruminal podem ser resultado de excesso de proteína degradada no rúmen ou de baixas concentrações de carboidratos degradados no rúmen. A concentração de N-NH₃ ruminal acima de 5mg/dL é considerada como mínima para que ocorra uma adequada fermentação ruminal (Satter e Slyter, 1974). Porém, para otimizar a fermentação da fibra e a síntese microbiana, são

necessários entre 15 e 29mg/dL. As dietas diferiram quanto ao N-NH₃ ruminal, todavia estão todas dentro dos padrões esperados para proporcionar condições para fermentação de fibra e síntese microbiana. Assim, a fim de aumentar a eficiência de dietas de bovinos confinados, é importante a inclusão de nitrogênio não proteico para acompanhar a degradação dos carboidratos solúveis.

A absorção de N-NH₃ ocorre por difusão passiva, e a quantidade absorvida é dependente

do pH (Van Soest, 1994). A diminuição do pH em função do tempo está relacionada com o fornecimento do alimento que, ao ser digerido, produz ácidos graxos de cadeia curta e diminui o pH. O mesmo ocorre com a concentração de N-NH₃, que aumenta com a digestão do alimento nas duas primeiras horas após a alimentação e depois é absorvido gradativamente pelo epitélio ruminal, diminuindo novamente.

Tabela 3. Coeficientes de digestibilidade dos nutrientes das dietas

	Coeficientes de digestibilidade, %						Pr>F	EPM
	C	U	G10	GU10	G20	GU20		
MS	65,1	68,9	66,2	62,6	64,5	68,4	0,34	1,23
MO	68,9	70,3	69,3	64,1	66,0	71,7	0,15	1,45
Amido	86,9	86,8	87,6	87,0	88,9	86,7	0,23	0,98
EE	81,0	82,4	82,9	83,4	83,7	81,3	0,61	1,75
PB	69,7	71,1	69,5	70,6	68,2	70,2	0,13	1,43
FDN	52,9a	49,7a	40,9b	40,3b	37,5b	42,1b	0,001	1,34
HEM	65,8a	59,4a	44,6b	40,2b	42,1b	46,6b	0,001	1,56
FDA	44,1	40,5	38,1	40,4	37,8	39,2	0,11	0,87

As médias com diferentes letras na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P>5%). C = tratamento controle, U = tratamento com ureia, G10 = tratamento com 10% de glicerina, GU10 = tratamento com 10% de glicerina e ureia, G20 = tratamento com 20% de glicerina, GU20 = tratamento com 20% de glicerina e ureia. MS = matéria seca, MO = matéria orgânica, EE = extrato etéreo, PB = proteína bruta, FDN = fibra em detergente neutro, HEM = hemicelulose, FDA = fibra em detergente ácido. EPM = erro- padrão da média.

As dietas com glicerina prejudicaram a digestibilidade da fibra em detergente neutro e da hemicelulose, independentemente da ureia. A fibra em detergente neutro representa a parte da parede celular dos alimentos, constituída por hemicelulose, celulose e lignina. A hemicelulose e a celulose, quando não complexadas com a lignina, podem ser degradadas pelos microrganismos ruminais (bactéria celulolíticas) para obtenção de energia (Van Soest, 1994).

Resultados semelhantes foram obtidos por Schröder e Südekum (1999), sugerindo que concentrações de glicerina acima de 10% na dieta podem afetar a digestibilidade dos seus nutrientes. Da mesma forma, Parsons *et al.* (2009) concluíram que inclusões de glicerina bruta acima de 8% na dieta de novilhas podem resultar em efeitos negativos quanto ao aproveitamento da sua fração fibrosa. Parsons e Drouillard (2010), ao incluírem 0, 2 ou 4% de glicerina bruta em dietas de novilhas, também observaram efeito linear negativo sobre a

digestibilidade da fibra em detergente neutro. A diminuição da digestibilidade da fibra também foi encontrada em experimentos *in vitro*, conduzidos por Roger *et al.* (1992), quando foi observado que 0,5 e 5,0% de glicerol na matéria seca da dieta inibiram a degradação da celulose por fungos e bactérias celulolíticas.

A glicerina, associada à ureia ou não, causa redução na digestibilidade da fibra. Nota-se que ocorre algum tipo de inibição na degradação da hemicelulose, visto que as alterações ocorreram nesta e na fibra em detergente neutro, que a contém. Portanto, algum tipo de microrganismo ruminal que degrada a hemicelulose é prejudicado com a inclusão de glicerina na dieta. Em experimento *in vitro*, Abo El-Nor *et al.* (2010) adicionaram 3,6; 7,2; ou 10,8% de glicerina em dietas com 60% de feno de alfafa para vacas da raça Holandesa e observaram que, quando a glicerina foi adicionada em 7,2 ou 10,8%, houve diminuição (P<0,05) na digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente

neutro e diminuição nas populações das bactérias *B. fibrisolvens* e *S. ruminantium*.

A comparação de valores de qualidade de massa microbiana entre diferentes trabalhos é dificultosa. Existem grandes variações na composição química dos microrganismos ruminais, as quais podem ocorrer devido à diferença entre espécies relacionadas ao perfil da dieta ou a diferenças entre as técnicas utilizadas para isolar os microrganismos e/ou medir sua composição e a raça utilizada (Ezequiel, 2002).

Nas Tab. 4 e 5, são apresentados os valores de massa microbiana que apresentaram efeito de tratamento e tempo, respectivamente ($P < 0,05$). Não ocorreu interação entre tempo e tratamento com significância de 5%.

A glicerina altera as populações de microrganismos ruminais. O mecanismo de ação da glicerina sobre as populações de bactérias fibrolíticas ainda não está claro, podendo estar relacionado a três fatores principais: a formação de um ambiente pouco favorável à multiplicação dessas bactérias, como osmolaridade e pH, o encapsulamento das partículas fibrosas, evitando a aderência das bactérias, e a competição ou preferência por outro substrato, no caso a glicerina.

A redução das BSA, conseqüentemente, causa prejuízos à degradabilidade e à digestibilidade da

fibra. Neste experimento, a fração fibra teve sua digestibilidade diminuída com a inclusão de glicerina, e ocorreram alterações nas BSA tanto pelos tratamentos quanto pelos tempos estudados.

Quanto ao efeito de tratamentos, a dieta G20 apresentou o menor valor de mg de matéria orgânica de BSA/kg de conteúdo ruminal, assim como os tratamentos GU20 e U ($P > 0,05$). Cabe ressaltar que a dieta G20 possuía 20% de glicerina e não tinha ureia; a falta da ureia, fonte de NNP, pode ter reduzido a quantidade de BSA por falta de nitrogênio, pois o tratamento GU20 apresentou aumento na produção de BSA. O mesmo aconteceu no tratamento U, que possuía fonte de NNP, mas a falta de energia disponível pode ter reduzido a produção das BSA. Na Tab. 5, observa-se que as BSA, duas horas após a alimentação, tanto a matéria orgânica quanto o nitrogênio, apresentaram diminuição neste tempo. Segundo Donkin (2008), a glicerina, em seis horas, é totalmente aproveitada no rúmen, portanto o aproveitamento da glicerina, aliado à falta de NNP, pode ter influenciado na diminuição das BSA e, conseqüentemente, na redução da digestibilidade da fibra. Observa-se, na Tab. 2, que o tratamento G20 apresentou o menor valor para N-NH₃.

Tabela 4. Massa microbiana sob o efeito de tratamentos

	Tratamentos						Pr>F	EPM
	C	U	G10	GU10	G20	GU20		
mg MO								
BSA/kg CR	7385,7a	6955,6ab	7297,1a	7593,3a	5837,8b	6689,1ab	<0,005	275,96
mg MO								
BLA/L	1307,4bc	2010,9a	1445,9bc	1497,9b	1224,5bc	1070,2c	<0,001	67,81
mgN BLA/L	105,5b	169,4a	124,4b	119,0b	106,6b	92,5b	<0,001	6,70
mgN PLA/L	216,3b	269,0a	234,9ab	232,5ab	110,3c	136,6c	<0,001	9,05
%N BS/MO	7,98b	7,92b	8,40ab	7,99b	8,91a	8,88a	<0,001	0,14

As médias com diferentes letras nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 5\%$). C = tratamento controle, U = tratamento com ureia, G10 = tratamento com 10% de glicerina, GU10 = tratamento com 10% de glicerina e ureia, G20 = tratamento com 20% de glicerina, GU20 = tratamento com 20% de glicerina e ureia. MO = matéria orgânica, BSA = bactéria sólido-aderida, CR = conteúdo ruminal, BLA = bactéria líquido-associada, L = líquido ruminal, N = nitrogênio, BS = bactérias do sólido. EPM = erro-padrão da média.

As dietas com 20% de inclusão de glicerina também diminuíram significativamente os protozoários do líquido, conforme apresentado

na Tab. 5, redução que, em média, chegou a 51,8%. A glicerina é solúvel em líquido ruminal e inibiu, de alguma forma, o crescimento dos

protozoários do líquido, em relação às demais dietas.

Na Tab. 4, cabe ressaltar que a quantidade de nitrogênio das bactérias líquido-associadas foi maior no tratamento U. Porém, este valor pode

ser decorrente da solubilização da ureia em líquido, que fez com que aumentasse a quantidade de nitrogênio das bactérias líquido-associadas.

Tabela 5. Massa microbiana sob efeito dos tempos

	Tempos				Pr>F	EPM
	0	2	5	8		
mgMO BSA/kg CR	7764,54a	6011,82b	6749,70ab	7313,02a	<0,002	337,91
mgN BSA/ kg CR	621,81a	490,50b	601,56a	608,83a	0,01	28,77
mgN PLA/ L	162,33b	220,51a	208,19a	208,68a	<0,001	11,08
%N BL/MO	7,75b	8,47ab	8,71a	8,67a	0,007	0,14
%N BS/MO	8,11b	8,15b	8,72a	8,41ab	0,01	0,17

As médias com diferentes letras nas linhas diferem entre si i pelo teste de Tukey (P>5%). C = tratamento controle, U = tratamento com ureia, G10 = tratamento com 10% de glicerina, GU10 = tratamento com 10% de glicerina e ureia, G20 = tratamento com 20% de glicerina, GU20 = tratamento com 20% de glicerina e ureia. MO = matéria orgânica, BSA = bactéria sólido-aderida, CR = conteúdo ruminal, PLA = protozoário líquido-associado, L= líquido ruminal, N = nitrogênio, BS = bactérias do sólido, BL= bactérias do líquido. EPM = erro-padrão da média.

A maior parte do nitrogênio que o animal aproveita é proveniente do nitrogênio microbiano. A porcentagem de nitrogênio das bactérias do líquido e do sólido aumentou após a alimentação, indicando que as dietas favoreceram o crescimento das bactérias e, conseqüentemente, a produção de proteína microbiana.

CONCLUSÃO

A glicerina altera o ambiente ruminal e diminui a digestibilidade da fibra. A utilização da ureia em dietas com glicerina melhora as condições ruminais; 20% de glicerina diminuem a população de protozoários.

REFERÊNCIAS

ABO EL-NOR, S.A.; ABUGHAZALEHA, A.A.; POTUA, R.B. et al. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bactéria. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.162, p.99-105, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL – AOAC. Official Methods of Analysis. 16 ed. Arlington, 1995. v.2, 474p.

BALDWIN, R.L. Use of isolated ruminal epithelial cells in the study of rumen metabolis. *J. Nutr.*, v.128, p.293-296, 1998.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos *in situ*. *Rev. Bras. Zootec.*, v.37, p.335-342, 2008.

CECAVA, M.J.; MERCHEN N.R.; GAY C. et al. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.2480-2888, 1990.

CHURCH, D.C. *Digestive physiology and nutrition of ruminates: digestive physiology*. 3.ed. [s.l.]: O&B Books, 1979. v.3, p.277-303,

CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various glycolytic intermediates and other compounds by rumen microorganisms, with particular reference to methane production. *Br. J. Nutr.*, v.27, p.131-146, 1972.

DeFRAIN, J.M.; HIPPEN, A.R.; KALSCHUR, K. F. et al. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactational performance. *J. Dairy Sci.*, v. 87, 4195-4206, 2004.

DONKIN, S.S. Glicerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. *Rev. Bras. Zootec.*, v.37, Supl. p.280-286, 2008.

- EZEQUIEL, J.M.B.; MELÍCIO, S.P.L.; SANCANARI, J.B.D. et al. Quantificação das bactérias sólido-aderidas, bactérias e protozoários líquido-associados do rúmen de bovinos jovens alimentados com amireia. *Rev. Bras. Zootec.*, v.31, p.707-715, 2002.
- HENDRIX, D.L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. *Crop Sci.*, v. 33, p.1306-1311, 1993.
- HOOVER, W.H.; STOKES, S.R. Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.*, v.74, p.3360-3371, 1991.
- LENG, R.A. Factors affecting the utilization of "poor-quality" forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutr. Res. Rev.*, v.3, p.277-303, 1990.
- MARTIN, C.; WILLIAMS, A.G.; MICHALET-DOREAU, B. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *J. Anim Sci.*, v.72, p.2962-2968, 1994.
- MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br. J. Nutr.*, v.38. p.437-443
- MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel: síntese enzimática de monolaurina por esterificação. *Quím. Nova*, v.32, p.639, 2009.
- PARSONS, G.L.; SHELOR, M.K.; DROUILLARD, J.S. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. *J. Anim. Sci.*, v.87, p.653-657, 2009.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.1063-1073, 1992.
- ROGER, V.; FONTY, G.; ANDRE, C.; GOUET, P. Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. *Curr. Microbiol.*, v.25, p.197-201, 1992.
- SANTOS, F.A.P. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; ALEXANDRE, V.P.; OLIVEIRA, S.G. (Eds.). *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2006. p.255-284.
- SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.*, v. 2, p.199-205, 1974.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. *Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p.
- STATISTICAL analysis system. Version 9.1. Cary: SAS Institute, 2003.
- VALADARES FILHO, S.C.; MAGALHÃES, K.A.; ROCHA JÚNIOR, V.R. et al. *Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos*. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 329p.
- VAN SOEST, P.J. *Nutrition ecology of the ruminants*. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. IV. Determinations of plant cell-wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.50, p.50-55, 1967.