



## Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de aminoácidos *in vitro* pelos microrganismos ruminais

Juliana Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Augusto César de Queiroz<sup>2</sup>, Rogério de Paula Lana<sup>2</sup>, Hilário Cuquetto Mantovani<sup>3</sup>, Rafaela Antônia Ramos Generoso<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pós-Graduação em Zootecnia, Mestrado –UFV. Bolsista do CNPq.

<sup>2</sup> Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, CEP 36571-000, Viçosa-MG. Bolsista do CNPq.

<sup>3</sup> Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa.

**RESUMO** - Foram estudados os efeitos *in vitro* dos inibidores monensina e própolis sobre a fermentação ruminal de aminoácidos. Utilizou-se líquido ruminal de um novilho em pastejo, acrescentado de solução de tripticase, em três tratamentos (controle, monensina e própolis). Na 1ª fase do experimento, foram feitas transferências diárias de inóculos para novos tubos com os mesmos tratamentos até o 10º dia e, no 11º dia, iniciou-se a 2ª fase, efetuando-se as combinações dos tratamentos da 1ª fase (C, M, P), no total de nove, com transferência diária e incubação por mais nove dias. Do 1º ao 10º dia de incubação (1ª fase), o ionóforo e a própolis não aumentaram significativamente a produção de amônia em comparação ao controle. A própolis foi mais eficiente em diminuir a produção de amônia que a monensina na 1ª fase e ainda reduziu a produção de amônia e a atividade específica de produção de amônia (AEPA) na 2ª fase, independentemente do tratamento aplicado na 1ª fase. Quando os inibidores estavam ausentes na 1ª fase, a monensina foi tão eficiente quanto a própolis na 2ª fase. Verificou-se que, ao remover os inibidores na 2ª fase no tratamento monensina, houve aumento significativo na produção de amônia, mas este efeito não foi detectado no tratamento com própolis, que manteve amônia em baixas concentrações.

Palavras-chave: amônia, bactéria, monensina, própolis, rúmen

## Effects of monensin and bee propolis on *in vitro* fermentation of amino acids by mixed ruminal bacteria

**ABSTRACT** - The objective of this trial was to study the *in vitro* effects of monensin and propolis on ruminal fermentation of amino acids. Ruminal fluid was collected from a steer grazing tropical pasture and after addition of casein hydrolysate was used in the incubations. Treatments consisted of: control-C; monensin-M; and propolis-P. In the first phase of the study, inocula were transferred daily into new tubes until day 10; on the 11<sup>th</sup> day of incubation, tubes from each of the treatments were used to inoculate three new tubes (C, M, P) yielding nine combinations that were also transferred daily and incubated for nine days (second phase). From day one to day 10 of incubation (first phase), addition of ionophore and propolis prevented increase in ammonia production compared to the control. Propolis was more efficient in decreasing ammonia production than monensin in the first phase and it was also able to decrease ammonia production and specific activity of ammonia production (SAAP) in the second phase regardless of the first phase treatments; monensin was as efficient as propolis, in the second phase, when the inhibitors were absent in the first phase. It was observed a significant increase in ammonia production with monensin by removing the inhibitors in the second phase

Key Words: ammonia, bacteria, monensin, propolis, rumen

### Introdução

O ionóforo monensina é um antibiótico que aumenta a eficiência de utilização de alimentos pelos ruminantes (Goodrich et al., 1984; Russell & Strobel, 1989), pois atua nas trocas de sódio e prótons, por meio do sistema antiporte em nível de membrana celular microbiana, além de catalisar trocas de prótons e potássio.

Em uma revisão de pesquisas com grande número de animais, Goodrich et al. (1984) verificaram que a monensina

melhora a eficiência alimentar de bovinos em confinamento em 7,5% e o ganho de peso de bovinos em pastagens em 13,5%, em decorrência do aumento da eficiência de utilização dos alimentos, provocado, em parte, pela diminuição na produção de amônia ruminal (Dinius et al., 1976; Van Nevel & Demeyer, 1977). Entretanto, há pouca informação sobre o efeito dos ionóforos no metabolismo ruminal de proteínas (Russell, 1991).

Russell et al. (1988) e Chen & Russell (1989) acreditam que a monensina reduz a produção ruminal de amônia pela

inibição da população de bactérias gram-positivas, fermentadoras obrigatórias de aminoácidos e com alta capacidade de produção de amônia, como, por exemplo, as espécies *Peptostreptococcus anaerobius* C, *Clostridium sticklandii* SR e *Clostridium aminophilum* F (Russell et al., 1988; Chen & Russell, 1989; Paster et al., 1993).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a própolis, resina proveniente de substâncias coletadas de plantas e misturadas com secreções de abelhas, também apresenta essa atividade antimicrobiana, pela inibição das bactérias gram-positivas (Ghisalberti, 1979; Vargas et al., 1994; Goulart, 1995; Park et al., 1998; Park et al., 2000). Constatou-se recentemente que o uso de própolis inibe o crescimento de bactérias gram-positivas, responsáveis pela incidência de mastite em bovinos leiteiros (Pinto, 2000).

No entanto, existem poucos trabalhos sobre sua utilização como aditivo nutricional para ruminantes e seus efeitos sobre a população microbiana ruminal. Se a própolis atua sobre as bactérias gram-positivas ruminais, espera-se que sua adição à ração e em cultivos de microrganismos *in vitro* reduza o crescimento de bactérias proteolíticas, assim como ocorre com os ionóforos (Hino & Russell, 1986) e, conseqüentemente, diminua a desaminação e a proteólise (Russell & Martin, 1984).

Este experimento foi conduzido com o objetivo de estudar os efeitos *in vitro* do ionóforo monensina e do extrato de própolis sobre a fermentação ruminal de aminoácidos. Considerando-se que o extrato de própolis é capaz de extinguir bactérias com alta capacidade de produção de amônia, a atividade de desaminação não retornará aos níveis normais, mesmo após a remoção do extrato do meio de cultura. Entretanto, se o extrato de própolis, como a monensina, causa apenas a inibição do transporte de aminoácidos à membrana, após sua remoção do meio de cultura, por meio de transferências diárias e sucessivas da cultura para meio estéril sem própolis, ocorrerá o aumento da produção de amônia.

## Material e Métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbicos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa - UFV, em Viçosa, Minas Gerais. Utilizou-se um novilho fistulado no rúmen (mantido em pastagem de capim-braquiária) como doador de líquido ruminal. O novilho foi alojado no Laboratório de Animais do Departamento de Zootecnia da UFV.

O líquido ruminal foi coletado antes do arraçoamento, para obtenção de meio de cultura com pH inicial elevado, e 2 a 3 horas após o arraçoamento, para obtenção de inóculo contendo população microbiana ativa. O líquido

foi coletado em diferentes locais no interior do rúmen, filtrado em quatro camadas de gaze, acondicionado em garrafa térmica com fechamento hermético e transportado imediatamente para o laboratório.

No preparo do meio de cultura, o líquido ruminal foi centrifugado a 500 x g, por 15 minutos, em temperatura abaixo de 5°C, para sedimentação de partículas dos alimentos e protozoários. O sobrenadante foi transferido para frascos Erlenmeyer de 500 mL, sendo autoclavado e resfriado para posterior utilização.

Para obtenção do inóculo, o líquido ruminal foi coletado no dia do início do experimento e mantido em banho-maria por 30 minutos. Após as partículas alimentares flutuarem pelo acúmulo de gases e os protozoários sedimentarem, foi obtido o líquido na fase mediana do frasco, por sucção.

Utilizaram-se nas incubações, como meio de cultura, 8,1 mL do líquido ruminal esterilizado e saturado com dióxido de carbono acrescentado de 0,7 mL de inóculo, 1,0 mL de tripticase (Trypticase; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD) 15% (p/v) e 0,2 mL de etanol, contendo ou não monensina ou extrato de própolis. A monensina foi adicionada ao líquido para atingir 5,0 mM como concentração final no meio de cultura, efetuando-se a incubação a 39°C. O extrato de própolis foi obtido utilizando-se 30 g de própolis moída, mantidos em 100 mL de solução alcoólica (70% de álcool e 30% de água) durante 10 dias. O extrato foi filtrado em papel-filtro e diluído com etanol na proporção de 1:1. Foram feitas transferências diárias, em anaerobiose, até o décimo oitavo dia, de 0,7 mL do líquido (inóculo) para novos tubos de incubação com o meio de cultura.

Na primeira fase, o experimento consistiu de três tratamentos (controle, monensina e própolis) e duas repetições até o 10º dia, totalizando seis tubos de incubação/dia. No 11º dia, iniciou-se a 2ª fase, na qual cada um dos três tratamentos serviu de inóculo para os mesmos tratamentos, em combinações diferentes. Como exemplo, o tratamento controle da primeira fase serviu de inóculo para um tratamento controle (CC), um monensina (CM), um própolis (CP), e assim sucessivamente, totalizando nove combinações diferentes (CC, CM, CP, MC, MM, MP, PC, PM, PP) e 18 tubos de incubação/dia, que foram incubados por mais nove dias.

Utilizaram-se seringas separadas para medição da solução de etanol e para coleta do meio de cultura em cada tratamento, evitando-se o efeito inibitório cruzado dos inibidores. Foram retiradas alíquotas do meio a 0 e 4 horas após o início da incubação, nos dias 0, 3, 6, 9, 11, 12, 15 e 18, para análises dos níveis de proteína microbiana e amônia.

As amostras coletadas foram centrifugadas em tubos *ependorfa* 5200 x g, por 10 minutos, e o sobrenadante foi congelado para análises de amônia. O *pellet* foi re-suspenso em solução salina (0,9% de NaCl), centrifugado, separado do sobrenadante por duas vezes, re-suspenso em água destilada e congelado para determinação de proteína microbiana. As análises dos níveis de amônia foram feitas pelo método colorimétrico, segundo Chaney & Marbach (1962), e as de proteína microbiana, conforme descrito por Lowry et al. (1951), em duplicatas.

A atividade específica de produção de amônia (AEPA) ou atividade de desaminação pela população microbiana foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$AEPA = (\text{DNH}_3 \times 1.000.000) / (\text{proteína microbiana} \times \text{tempo de incubação})$$

em que: AEPA = nmol NH<sub>3</sub>/mg proteína microbiana/minuto; DNH<sub>3</sub> = concentração final (4 horas) - inicial de amônia (0 hora), em mM; proteína microbiana = concentração inicial, em mg/L; tempo de incubação, em minutos (240 minutos).

As análises estatísticas na primeira fase foram realizadas utilizando-se o procedimento de regressão do Minitab (Ryan & Joiner, 1994), de acordo com o período experimen-

tal e, na segunda fase, pelo procedimento ANOVA (SAS, 1996), aplicando-se o teste de média no 18º dia de incubação. Uma vez que a incubação das amostras foi feita somente em duplicata (três tratamentos x duas repetições), optou-se pelo método de regressão na primeira fase, não sendo possível aplicar teste de média. A opção pelo teste de média na segunda fase, no entanto, foi para facilitar a interpretação dos resultados.

## Resultados e Discussão

Constam nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente, a produção de amônia, a concentração inicial de proteína microbiana e a atividade de desaminação em 4 horas de incubação por microrganismos ruminais em um meio contendo caseína hidrolisada (15 mg/L) sem (controle) ou com monensina ou própolis na primeira (1º ao 10º dia) e segunda fases experimentais (11º ao 20º dia).

Na primeira fase (1º ao 10º dia), houve efeito de tempo ( $P < 0,01$ ) e interação quadrática tempo x tratamento ( $P < 0,10$ ) sobre a produção de amônia, de modo que a própolis inibiu a produção e a monensina causou inibição inicial, mas não evitou o aumento da produção de amônia com o passar dos dias de incubação.

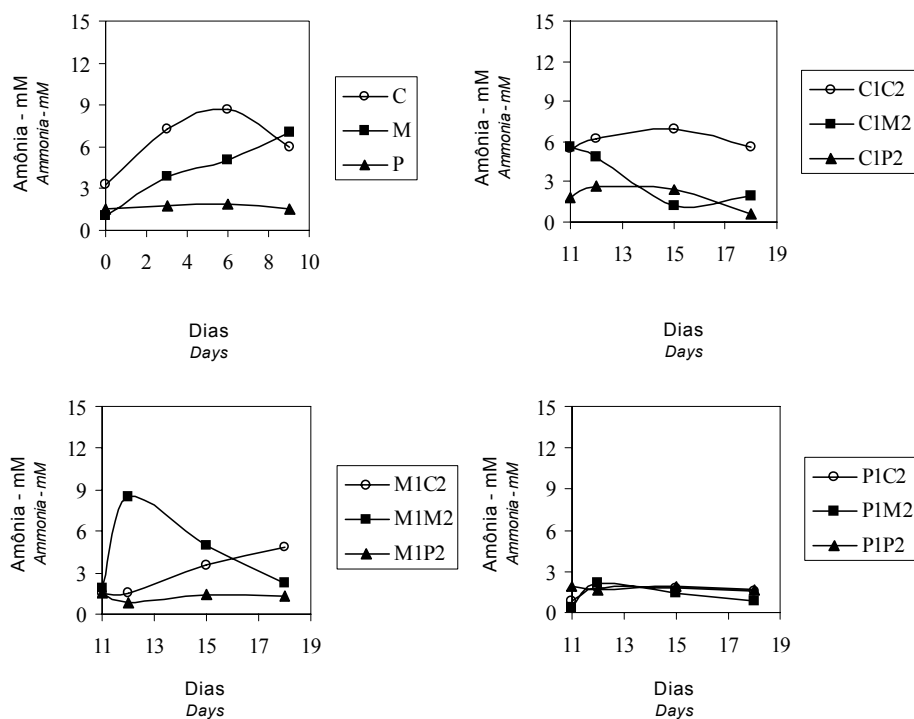


Figura 1 - Efeito dos tratamentos (controle, monensina e própolis) sobre a produção de amônia em um meio contendo caseína hidrolisada (15 mg/L), durante a primeira e segunda fases de incubação. As duplas de letras contidas nas legendas correspondem ao tratamento da primeira (1º ao 10º dia) e segunda fases experimentais (11º ao 18º dia), respectivamente.

Figure 1 - Effect of treatments (control, monensin, and propolis) on ammonia production in a medium containing casein hydrolyisate (15 mg/L) during the first and second phase of incubation. The pair of letters contained in the legend boxes corresponds to the treatment of the first (1<sup>st</sup> to 10<sup>th</sup> day) and second experimental phase (11<sup>st</sup> to 18<sup>th</sup> day), respectively.

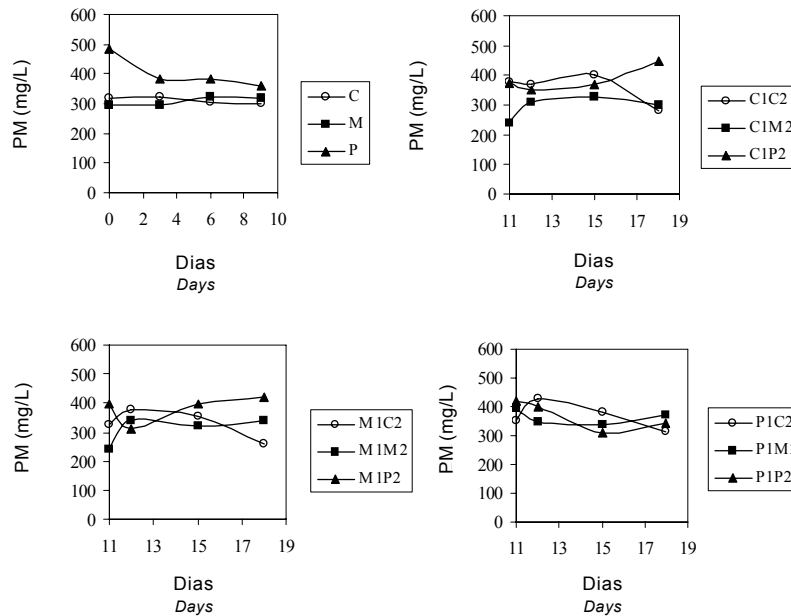


Figura 2 - Efeito dos tratamentos (controle, monensina e própolis) sobre concentração inicial de proteína microbiana em um meio contendo caseína hidrolisada (15 mg/L), durante a primeira e segunda fases de incubação. As duplas de letras contidas nas legendas correspondem ao tratamento da primeira (1<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> dia) e segunda fases experimentais (11<sup>o</sup> ao 18<sup>o</sup> dia), respectivamente.

Figure 2 - Effect of treatments (control, monensin, and propolis) on initial microbial protein concentration in a medium containing casein hydrolisate (15 mg/L), during the first and second phase of incubation. The pair of letters contained in the legend boxes corresponds to the treatment of the first (1<sup>st</sup> to 10<sup>th</sup> day) and second experimental phase (11<sup>st</sup> to 18<sup>h</sup> day), respectively.

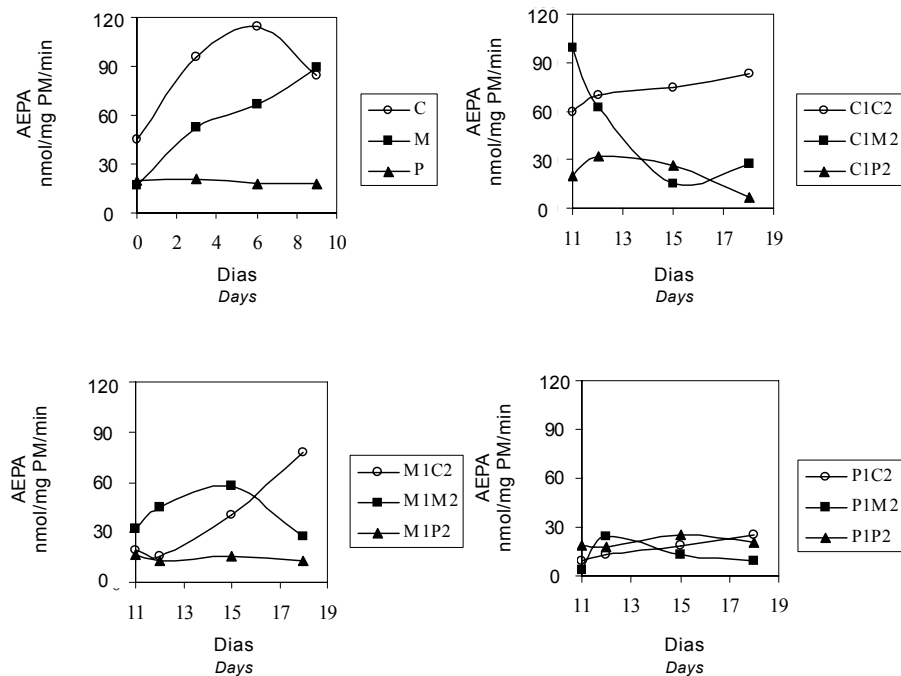


Figura 3 - Efeito dos tratamentos (controle, monensina e própolis) sobre a atividade de desaminação por microrganismos ruminais em um meio contendo caseína hidrolisada (15 mg/L), durante a primeira e segunda fases de incubação. As duplas de letras contidas nas legendas correspondem ao tratamento da primeira (1<sup>o</sup> ao 10<sup>o</sup> dia), respectivamente.

Figure 3 - Effect of treatments (control, monensin, and propolis) on deamination activity by ruminal microorganisms in a media containing casein hydrolisate (15 mg/L), during the first and second phase of incubation. The pair of letters contained in the legend boxes corresponds to the treatment of the first (1<sup>st</sup> to 10<sup>th</sup> day) and second experimental phase (11<sup>st</sup> to 18<sup>h</sup> day), respectively.

O efeito da monensina em reduzir a produção de amônia foi verificado anteriormente, *in vitro* (Russell et al., 1988; Chen & Russell, 1989; Cunha, 1999) e *in vivo* (Yang & Russell, 1993; Krause & Russell, 1996). A redução da produção de amônia pelos microrganismos ruminais com o uso de própolis confirma os primeiros resultados obtidos com uso de própolis *in vitro* e *in vivo* por Stradiotti Jr. et al. (2001). Estes resultados apresentam implicação prática, pois se há menor produção de amônia, ocorre maior acúmulo de peptídeos e aminoácidos no rúmen, favorecendo seu maior fluxo para o intestino delgado, com menores perdas ruminais das proteínas (Russell et al., 1988; Chen & Russell, 1989).

No tratamento monensina, embora inferior à do tratamento controle, a produção de amônia não foi mantida ao longo do tempo, indicando uma reação diferente dos microrganismos ruminais de clima tropical aos inóforos.

Não se observou efeito de tempo sobre a concentração inicial de proteína microbiana na primeira fase, mas houve efeito de tratamento ( $P < 0,01$ ), de modo que o tratamento com própolis proporcionou maior concentração de proteína microbiana. O ionóforo monensina não interferiu no crescimento microbiano quando comparado ao controle.

Houve efeito de tempo ( $P < 0,01$ ), tratamento ( $P < 0,10$ ) e interação quadrática de tratamento x tempo ( $P < 0,10$ ) na atividade de desaminação durante a primeira fase de incubação. Monensina e própolis inibiram a atividade específica de produção de amônia. Efeito da monensina também foi verificado por Cunha (2001), mas diferente do observado com própolis, o ionóforo não manteve a atividade específica de produção de amônia em baixos níveis.

Os resultados das análises estatísticas do 18º dia de incubação (2ª fase) são descritos na Tabela 1. Comparando-se os resultados com os gráficos de produção de amônia, verifica-se que a concentração inicial de proteína microbiana e atividade de desaminação, durante a segunda fase da incubação (11º ao 18º dia), considerando-se as populações de microrganismos ruminais mantidas na primeira fase (1º ao 10º dia) sob os tratamentos controle e monensina, foram maiores quando os microrganismos ruminais foram mantidos na ausência de inibidores na segunda fase. A própolis foi mais eficiente em decrescer a produção de amônia e AEPA na segunda fase, independentemente do tratamento na primeira fase. A monensina, por sua vez, foi tão eficiente quanto a própolis, na segunda fase, na ausência de inibidores na primeira fase.

Não houve efeito de tratamento na segunda fase sobre a concentração inicial de proteína microbiana. No entanto, os tratamentos que continham própolis na segunda fase apresentaram todos, no 18º dia, as maiores concentrações de proteína microbiana.

Aumento na produção de amônia com a remoção de monensina do meio de cultura foi descrito também por Lana et al. (2002). Os resultados deste estudo confirmam os obtidos por Newbold & Wallace (1989), que observaram que culturas de *Prevotella ruminicola* reduziram a atividade de transporte de peptídeos, quando submetidas ao inóforo tetronasina, em razão de os inóforos catalisarem o efluxo de potássio e o influxo de sódio e prótons para o interior da célula microbiana, ocorrendo gasto de ATP para evitar a acidificação intracelular (Russell, 1987). Como a difusão facilitada também atua no transporte de aminoácidos (Driessen et al., 1987; Chen & Russell, 1990) e não é afetada

Tabela 1 - Efeito da monensina e da própolis sobre a fermentação de caseína hidrolisada (15 mg/L) por microrganismos ruminais no 18º dia de incubação (2ª fase), após 17 dias de transferências diárias de inóculo em um meio contendo o tratamento controle, monensina ou própolis

Table 1 - Effect of monensin and propolis on fermentation of casein hydrolyzate (15 mg/L) by ruminal microorganisms in the 18<sup>th</sup> day of incubation (2<sup>nd</sup> phase) after 17 days of daily transfer of inoculum in a medium containing the control treatment (C), monensin (M) or propolis (P)

| 1ª fase<br>1 <sup>st</sup> phase | Controle<br>Control |        |        | Monensina<br>Monensin |        |         | Própolis<br>Propolis |        |        |                                    |
|----------------------------------|---------------------|--------|--------|-----------------------|--------|---------|----------------------|--------|--------|------------------------------------|
| 2ª fase<br>2 <sup>nd</sup> phase | C                   | M      | P      | C                     | M      | P       | C                    | M      | P      | EP <sup>a</sup><br>SE <sup>a</sup> |
| NH <sub>3</sub> ,<br>MM          | 11,11a              | 6,14ed | 5,54ef | 10,23b                | 7,15c  | 5,91edf | 5,84edf              | 5,35f  | 6,24d  | 0,18                               |
| Pmic <sup>b</sup>                | 288bc               | 298bc  | 449a   | 259c                  | 339bac | 423ba   | 313bc                | 349bac | 345bac | 34,31                              |
| AEPA <sup>c</sup>                | 82,9a               | 27,8b  | 6,2b   | 78,0a                 | 27,5b  | 12,8b   | 22,0b                | 9,8b   | 20,9b  | 9,02                               |

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem ( $P > 0,05$ ) pelo teste Tukey.

<sup>a</sup> Erro-padrão da média.

<sup>b</sup> Proteína microbiana, mg/L.

<sup>c</sup> Atividade específica de produção de amônia, em nmol NH<sub>3</sub>/mg proteína microbiana/minuto.

Means followed by the same letters within a row do not differ ( $P > 0,05$ ) by Tukey test.

<sup>a</sup> Standard error of mean.

<sup>b</sup> Microbial protein, mg/L.

<sup>c</sup> Specific activity of ammonia production, in nmol NH<sub>3</sub>/mg microbial protein/minute.

pelos inóforos, não há inibição total do transporte de aminoácidos ou da atividade de desaminação. Portanto, o restabelecimento do transporte em sua capacidade total ocorre assim que os inóforos são removidos do meio de cultura ou da alimentação animal.

Os tratamentos com própolis mantiveram, mesmo com sua remoção do meio, baixa produção de amônia e AEPA, o que justifica a realização de estudos sobre a forma de atuação desse inibidor, que pode ser diferente dos inóforos nos microrganismos ruminais, eliminando-os realmente, ou ter um espectro de ação maior que a monensina, atingindo a população de bactérias *Clostridium aminophilum* e outras, de alta capacidade de produção de amônia e mais resistentes à monensina.

### Conclusões

A própolis apresenta-se mais eficiente que a monensina em reduzir a produção de amônia de culturas de microrganismos ruminais em meio contendo caseína hidrolisada.

A produção de amônia normalizou assim que o inóforo monensina foi removido do meio de cultura, provavelmente em razão do restabelecimento da população de bactérias produtoras de amônia, comprovando que esse antibiótico apenas inibe estes microrganismos.

No tratamento com própolis, a produção de amônia manteve-se em níveis baixos mesmo quando removida do meio de cultura. São necessárias mais pesquisas para maior esclarecimento da forma de atuação da própolis e da monensina sobre os microrganismos ruminais de animais de clima tropical.

### Literatura Citada

- BLADEN, H.A.; BRYANT, M.P.; DOETSCH, R.N. A study of bacterial species from the rumen which produce ammonia from protein hydrolyzate. *Applied and Environmental Microbiology*, v.9, p.175-180, 1961.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*, v.8, p.130-132, 1962.
- CHEN, G.; RUSSELL, J.B. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, p.1052-1057, 1989.
- CHEN, G.; RUSSELL, J.B. Transport and deamination of amino acids by a gram-positive, monensin sensitive ruminal bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.2186-2192, 1990.
- CUNHA, L.T. **Efeito da acidez e de inóforos na degradação de proteínas por microrganismos ruminais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 68p. Dissertação (Mestrado Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- DINIUS, D.A.; SIMPSON, M.S.; MARSH, P.B. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. *Journal of Animal Science*, v.42, p.229-234, 1976.
- DRIESSEN, A.J.M.; JONG, S.D.; KONINGS, W.N. Transport of branched-chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. *Journal of Bacteriology*, v.169, p.5193-5200, 1987.
- GHISALBERT, E.L. Propolis: a review. *Bee World*, v.60, p.59-84, 1979.
- GOODRICH, R.D.; GARRETT, J.E.; GAST, D.R. et al. Influence of monensin on the performance of cattle. *Journal of Animal Science*, v.58, p.1484-1498, 1984.
- GOULART, T.C.S. **Estudos preliminares sobre atividade "in vitro" do extrato etanólico de própolis (EEP) no combate de bactérias isoladas de processos infecciosos de animais**. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 1995. 18p. Monografia (Graduação) - Universidade Federal da Bahia, 1995.
- HINO, T.; RUSSELL, J. B. Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein in vitro. *Journal of Animal Science*, v.64, p.261-270, 1986.
- KRAUSE, D.O.; RUSSELL, J.B. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.815-821, 1996.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.12, p.4499-4503, 1996.
- LANA, R.P.; OLIVEIRA, J.S.; BORGES, A.C. et al. Efeito da monensina e lasalocida sobre a atividade de fermentação de aminoácidos in vitro pelos microrganismos ruminais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, n.2, p.724-730, 2002.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.
- NEWBOLD, C.J.; WALLACE, R.J. Changes in the rumen bacterium, *Bacteroides rumenicola*, grown in the presence of the ionophore, tetronasin. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, v.2, p.452-453, 1989.
- PARK, Y.K.; KOO, H.; IKEGAKI, M. et al. Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces meslundii* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology*, v.29, p.143-148, 1998.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*, v.58, n.9, p.3-7, 2000.
- PASTER, B.J.; RUSSELL, J.B.; YANG, C.-M.J. et al. Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* and *Clostridium aminophilum*. sp. nov. *International Journal Systematica of Bacteriology*, v.43, p.107-110, 1993.
- PINTO, S.M. **Produção e composição química do leite de vacas holandesas no início da lactação alimentadas com diferentes fontes de lipídeos**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1997. 74p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, 1997.
- POOS, M.I.; HANSON, T.L.; KLOPFENSTEIN, T.J. Monensin effects on diet digestibility, ruminal protein bypass and microbial protein synthesis. *Journal of Animal Science*, v.48, p.1516-1524, 1979.
- PRESSMAN, B.C. Biological applications of ionophores. *Annual Review of Biochemistry*, v.45, p.501-530, 1976.
- RUSSELL, J.B.; WILSON, D.B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH. *Journal of Dairy Science*, v.79, p.1503-1509, 1996.
- RUSSELL, J.B. Fermentation of peptides by *Bacterioides rumenicola* B14. *Journal of Dairy Science*, v.76, p.826-830, 1983.
- RUSSELL, J.B.; MARTIN, S.A. Effects of various methane inhibitors on the fermentation of amino acids by mixed rumen microrganisms *in vitro*. *Journal of Animal Science*, v.59, p.1329-1338, 1984.

- RUSSELL, J.B. A proposed model of monensin action in inhibiting ruminal bacteria growth: effects on ion flux and proton motive force. **Journal of Animal Science**, v.64, p.1519-1525, 1987.
- RUSSELL, J.B. A re-examination of the amino acid sparing effect of ionophores. In: PROCEEDINGS OF THE GRAZING LIVESTOCK NUTRITION CONFERENCE, Cornell. **Proceedings...** Cornell University: USDA-ARS and Department of Microbiology, 1991. p.2-3.
- RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Minireview. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1-6, 1989.
- RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J.; CHEN, G. The enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.872-877, 1988.
- RYAN, B.F.; JOINER, B.L. **Minitab handbook**. 3.ed. Belmont: Duxbury Press, 1994. 448p.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **SAS/STAT User's Guide**. Release 6.12. Cary: 1996.
- STRADIOTTI JR., D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. et al. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gnosis, [2001]. CD-ROM. Nutrição de Ruminantes. TECHNOMEDIA.
- Van NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, p.251-257, 1977.
- VARGAS, A.C.; POCAI, E.A.; FONTANA, F.Z. et al. Dados parciais do teste *in vitro* da atividade anti-bacteriana da própolis. In: CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL, 1., CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 22., 1994, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SOVERGS, 1994. p.160.
- YANG, C.-M.J.; RUSSELL, J.B. Effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.3250-3254, 1993.

---

Recebido: 28/10/04  
Aprovado: 13/09/05