

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO FLUIDO RUMINAL E DO CONTEÚDO GASTROINTESTINAL DE BEZERROS HOLANDESES EM ALEITAMENTO ARTIFICIAL CONVENCIONAL OU FRACIONADO

[Physico-chemical and microbiological characterization of ruminal fluid from gastrointestinal contents of Holstein calves in artificial fed milk conventional or fractionated]

Gercino Ferreira Virgínio Júnior¹, Rafael Alves de Azevedo², Laís Trindade de Castro Ornelas¹, Neide Judith Faria de Oliveira¹, Luciana Castro Geraseev¹, Eduardo Robson Duarte^{1*}

¹ Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

² Departamento de Zootecnia, Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

RESUMO – O aleitamento artificial fracionado tem permitido fornecer quantidade adequada de leite aos bezerros nas primeiras semanas de vida e restringir na desmama, estimulando o melhor crescimento e adaptação a dietas com volumosos e concentrados. Objetivou-se avaliar as características ruminais e a microbiota gastrointestinal de bezerros leiteiros em diferentes sistemas de aleitamento. Foram utilizados 12 bezerros Holandeses, distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos. No aleitamento convencional, foram fornecidos quatro litros de leite diários; no fracionado, seis litros do 6° ao 25° dia, quatro litros do 26° ao 45° e dois litros por dia do 46° ao 60° dia. Ao final do período experimental, os animais foram eutanasiados e aproximadamente 15 mL dos conteúdos do rúmen, abomaso e intestino foram coletados para análises físicas, químicas e microbiológicas para detecção de Enterobacteriaceae, fungos e protozoários. Os sistemas de aleitamento não influenciaram nas características de cor, odor e viscosidade do líquido ruminal. O pH e a quantificação de protozoários, Enterobacteriaceae, fungos micelianos e leveduriformes não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, nos diferentes sítios avaliados. Os gêneros *Escherichia* e *Proteus* foram os mais frequentes entre as amostras dos conteúdos avaliados, para ambos os sistemas de aleitamento. Entretanto, *E. coli* foi significativamente mais frequente entre os isolados provenientes do fluido ruminal de bezerros em aleitamento convencional, o que poderia sugerir um desequilíbrio nesse ecossistema. Dessa forma constatou-se que os sistemas de aleitamentos influenciaram o perfil de gêneros de Enterobacteriaceae no rúmen e intestinos dos bezerros.

Palavras-Chaves: criação de bezerros; bovinocultura leiteira; microbiota gastrintestinal; microbiota ruminal.

ABSTRACT – The fractional artificial feeding has allowed provide an adequate amount of milk to calves in the first weeks of life and restrict at weaning, stimulating growth and favoring better adaptation to diets with forage and concentrates. The aim was to evaluate the ruminal characteristics and gastrointestinal microbiota of dairy calves in different feeding systems. Holstein calves were evaluated in randomly assigned to feed milk conventional that consisted of four liters of milk daily for 60 days or fractionated systems, six liters of 6° to 25°, four liters of 26° to 45° and two liters of 46° to 60° days old. At an end of the experimental period, the animals were euthanized, and approximately 15 mL of rumen, abomasum and intestine contents were collected for physicochemical and microbiological analysis to detection of fungi, protozoa and Enterobacteriaceae. Feeding systems did not influence characteristics of color, odor and viscosity of rumen fluid. The analysis of pH and quantification of Enterobacteriaceae, mycelial fungi and yeast showed no significant difference between treatments at the different sites. The *Escherichia* and *Proteus* genus were the most frequent for the gastrointestinal tract for both feed system. However, *E. coli* was significantly more frequent among isolates from the rumen fluid of calves in conventional feeding, which could suggest an imbalance in this ecosystem. Thus the artificial fed milk systems influenced the genus profile of Enterobacteriaceae in the rumen and small intestine of calves.

Keywords: calf raising; dairy cattle; intestinal microbiota; ruminal microbiota.

* Autor para correspondência. E-mail: duarvet@pq.cnpq.br

Recebido: 06 de março de 2016.

Aceito para publicação: 03 de julho de 2016.

INTRODUÇÃO

Os ruminantes, ao nascerem, apresentam o trato gastrointestinal estéril com pré-estômagos pequenos e não funcionais, sendo considerados não ruminantes. O rápido desenvolvimento desses compartimentos está associado ao tipo de manejo alimentar adotado na fase de cria (Khan et al., 2016), sendo que o estabelecimento da população microbiana está influenciado principalmente pela natureza e quantidade de alimentos sólidos consumidos (Anderson; Nagaraja; Morrill., 1987).

Bovinos jovens, recebendo alimento sólido até a nona semana de vida, podem apresentar colonização de microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos em elevadas concentrações no interior do rúmen. A interação entre microrganismos e alimentos, associada às condições ruminais, favorece o estabelecimento dessas populações, além de suprir as exigências do animal, pelo aporte de nutrientes necessários (Kamra, 2005). A dieta, a qualidade e a frequência da alimentação são fatores importantes para o estabelecimento e manutenção da estabilidade das diferentes populações microbianas no rúmen (Dehority; Odenyo, 2003, Rasmussen et al., 2006).

O aleitamento convencional, praticado em rebanhos leiteiros, é caracterizado pelo fornecimento da dieta líquida em quantidade constante, representando 10% do peso corporal do animal, dividido em duas refeições diárias (Azevedo et al., 2013). No sistema fracionado o leite é inicialmente fornecido em quantidade superior ao convencional, seguido de redução gradual até a desmama (Azevedo et al., 2013).

No sistema de aleitamento fracionado, as restrições gradativas do fornecimento de leite, com o desmame não abrupto, poderiam favorecer a melhor colonização microbiana do ambiente ruminal. No entanto, os efeitos dos sistemas de aleitamento sobre as características ruminais e da microbiota gastrointestinal de bezerros são ainda pouco conhecidos na literatura científica. Nesta pesquisa avaliou-se características físico-químicas e microbiológicas do trato gastrointestinal de bezerros Holandeses criados em sistemas de aleitamento fracionado ou convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização, Manejo Experimental e Tratamentos

O experimento foi conduzido no Setor de Bovinocultura da fazenda experimental do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brasil, sendo previamente aprovado pelo Comitê Local de Ética em Experimentação Animal (CETEA), sob o protocolo número 39/2009.

Foram utilizados 12 bezerros Holandeses, recém-nascidos. Após o nascimento os bezerros permaneceram com as matrizes por 24 horas e ingeriram colostro *ad libitum*, sendo posteriormente alojados em galpão experimental e identificados com brincos. No segundo dia foram alimentados com 4 L de colostro das respectivas mães, com fornecimento de dois litros, as 8 e 16 horas.

A partir do terceiro dia os bezerros foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais (n = 6 por grupo), os quais receberam aleitamento convencional (quatro litros de leite diários) ou fracionado (com seis, quatro e dois litros de leite diários do 6° ao 25°, do 26° ao 45° e do 46° ao 59° dias de vida, respectivamente), respeitando período de adaptação às dietas que ocorreu do terceiro ao quinto dia. Os tratamentos foram fornecidos duas vezes ao dia em quantidades equivalentes a 50% do total, utilizando mamadeiras com capacidade para dois litros.

Dietas

O leite integral utilizado foi proveniente de vacas Holandesas, em diferentes períodos de lactação, pertencentes à Fazenda Experimental do ICA/UFMG. Esse leite foi analisado no Laboratório de Análise de Leite da Escola de Veterinária da UFMG e apresentou média de 3% de proteína bruta, 4,7% de extrato etéreo e 12% de matéria seca. Concentrado peletizado e feno de *Cynodon* sp. (Tabela 1) foram fornecidos *ad libitum* em comedouros plásticos, ajustando-se as sobras em 10%, bem como o suplemento mineral *ad libitum*. A água ofertada aos animais foi renovada todos os dias pela manhã. Durante todo o decorrer do estudo, os bezerros foram alojados em baias individuais, com camas de areia, equipadas com baldes para água, concentrado, feno e mistura mineral.

Tabela 1. Composição bromatológica do concentrado peletizado e do feno de *Cynodon* spp. utilizados no arraçoamento de bezerros submetidos a diferentes sistemas de aleitamento até 59 dias de vida.

| Variável | Concentrado ^{®1} | Feno |
|-------------------------------------|---------------------------|-------|
| Matéria Seca (% da Matéria Natural) | 87,00 | 93,00 |
| Matéria Mineral (% da MS) | 06,95 | 05,35 |
| Proteína Bruta (% da MS) | 19,00 | 12,10 |
| Extrato Etéreo (% da MS) | 03,00 | 01,85 |

¹®Concentrado comercial peletizado, Tecnutri Bezerro Elite, empresa Tecnutri®, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

²Análises realizadas no laboratório de Bromatologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais.

Abate e Coleta de Amostras

Aos 60 dias de vida, os animais foram pesados após jejum de 15 horas e, posteriormente, eutanasiados. Para tal foi administrada medicação pré-anestésica (Xilazina, 1,0 mL/45Kg de peso corporal) e anestesia (Tiopental, 4 mg/Kg de peso corporal). Após confirmação da insensibilidade, o abate ocorreu por sangria, com corte da jugular e seguiu-se a evisceração e necropsia.

Amostras do conteúdo ruminal, do abomaso e intestino delgado foram coletadas, respectivamente, na porção do saco dorsal do rúmen, na região medial do abomaso e na parte inicial do duodeno. Os materiais foram coletados com auxílio de pipetas estéreis, armazenados em tubos de ensaio estéreis e transportados em caixas isotérmicas. Amostras do conteúdo ruminal e intestinal foram analisadas microbiologicamente. Também foram coletadas amostras de fezes de cada animal, diretamente da ampola retal, com auxílio de *swabs* estéreis.

Caracterização Físico-Química e Exames Diretos Microbiológicos

A análise macroscópica do líquido ruminal coletado foi realizada imediatamente após a coleta, em tubo contendo 5,0mL do fluido amostrado. Foram avaliados cor, odor, viscosidade e tempo de redução do azul de metileno na concentração 0,03%. O pH das amostras do líquido ruminal e das secreções do abomaso e intestino delgado foi aferido, utilizando-se potenciômetro digital (Dirksen, 1993).

As características micromorfológicas e tintoriais dos grupos bacterianos e das leveduras predominantes foram observadas após a confecção de esfregaços do fluido ruminal e coloração pelo método de Gram (Dirksen, 1993).

Para a detecção direta de fungos anaeróbios do rúmen, após a coleta, 2,0mL do conteúdo ruminal foram recolhidos e transferidos para tubos de ensaio, contendo 15mL de solução de KOH a 10% para clarificação conforme descrito por Chaudhry (2000).

Para a quantificação de protozoários ruminais, após a coleta, 1,0mL do conteúdo ruminal foi recolhido e transferido para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de formaldeído 10%. Dessa diluição, uma alíquota de 1,0mL foi transferida para um tubo contendo 9,0mL de solução salina 0,9%. As amostras foram homogêneas e uma alíquota de 1,0mL foi transferida para câmara de contagem de *Sedgewick Rafter*, para visualização em microscópio óptico, na objetiva de 10X para contagem de protozoários pequenos, médios e grandes (Dirksen, 1993).

Cultivo e Quantificação Microbiana

No cultivo microbiano, o material foi processado em câmara de fluxo laminar e diluições decimais seriadas do fluido ruminal e da secreção do duodeno foram preparadas em tubos contendo 9,0mL de solução salina estéril. Após cada diluição, os tubos foram homogêneos em vortex durante um minuto. Alíquotas de 100 µL foram inoculadas em placas de petri estéreis contendo o meio ágar *MacConkey*, seletivo para Enterobacteriaceae, o meio ágar *Sabouraud Dextrose*, para o cultivo de fungos micelianos e leveduriformes ou meio C contendo celulose, para o isolamento de microrganismos celulolíticos. Não foram realizados cultivos microbianos para as amostras coletadas do abomaso devido ao baixo pH e a ação de enzimas gástricas dificultarem o crescimento de microrganismo nesse ambiente.

Os inóculos foram espalhados com alças de *Drigalski* estéreis e as placas foram incubadas em estufa BOD a 39°C, monitoradas para o crescimento de colônias por 48 horas para Enterobacteriaceae e até sete dias para fungos. Após esse período, foi procedida contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Para identificação presuntiva de Enterobacteriaceae, foi realizado o cultivo em meio Rugai & Araújo (1968), modificado por Pessoa & Silva (1972), considerando a produção de indol e de H₂S, utilização de L-triptofano, sacarose, glicose, uréia e lisina e motilidade.

Análises dos Dados

A quantificação das colônias de fungos micelianos, leveduriformes, microrganismos celulolíticos aeróbios e de Enterobacteriaceae para os dois tratamentos no fluido ruminal e conteúdo intestinal foram analisados com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando-se o nível de significância de 5% (Sampaio, 1998). A distribuição dos gêneros de Enterobacteriaceae de fungos leveduriformes foram avaliados com o teste do Qui-quadrado (χ^2), considerando os valores de $p < 0,05$ (Sampaio, 1998).

As médias de pH para os tratamentos nos diferentes sítios avaliados e a frequência de diarreia foram comparadas pelo teste de Duncan com nível de significância de 5%. As análises deste estudo foram processadas no pacote do Sistema de Análises Estatísticas Genéticas – SAEG, 2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização Físico-química

A análise físico-química do conteúdo ruminal demonstrou que as características de odor (aromático) e viscosidade (aquoso) foram visivelmente semelhantes entre os tratamentos. A coloração predominante do conteúdo ruminal foi castanho claro representando 83,3% das amostras de ambos os tratamentos (Tabela 2). A redução do azul de metileno ocorreu em até três minutos em 100% das amostras nos dois sistemas, indicando a presença de microbiota ativa (Bouda et al., 2000).

A consistência normal do conteúdo ruminal de ruminante adulto é ligeiramente viscosa, com conteúdo aquoso sendo indício de bactérias e protozoários inativos (Dirksen, 1993). Na fase de aleitamento, a viscosidade aquosa apresentada pelos bezerros em ambos os sistemas (Tabela 3), pode estar relacionada ao baixo consumo de alimentos sólidos nessa fase. Em estudo preliminar com os mesmos animais, verificou-se que aleitamento fracionado favoreceu o desenvolvimento dos bezerros, pois a redução no fornecimento gradual de leite estimulou o aumento do consumo de alimentos sólidos (Azevedo et al., (2014).

O sistema de aleitamento não alterou a média do pH entre os tratamentos ($p > 0,05$), nos diferentes sítios avaliados (Tabela 3). O pH ruminal reflete diretamente as características da dieta, os produtos finais da fermentação e a taxa de crescimento microbiano, podendo ocorrer variações entre as populações dos microrganismos predominantes no rúmen (Dirksen, 1993).

É importante relatar que os animais deste estudo passaram por jejum pré-abate de 15 horas, sendo possível a ocorrência de alguma influência desse período sobre os valores de pH observados, pois pode ocorrer ação tamponante da saliva ou pela capacidade da mucosa do rúmen em absorver mais rapidamente os ácidos livres resultantes da fermentação (Dukes et al., 1996).

Segundo Khan et al. (2016), a avaliação pontual não leva em consideração a variação diurna ou o comprimento e a extensão das condições de das concentrações de ácidos ruminais, sendo mais indicada a avaliação contínua de pH ruminal em bezerros em desenvolvimento.

Exames Diretos de Detecção Microbiana

A análise direta pela coloração de Gram do conteúdo ruminal e intestinal indicou presença de leveduras, bactérias Gram negativas e Gram positivas, nos formatos de bastonetes, cocobastonetes e estreptococos nas amostras dos animais nos diferentes sistemas de aleitamento (Tabela 4). Verificou-se predomínio de cocobastonetes Gram negativos no conteúdo ruminal, em ambos os tratamentos e sítios avaliados, seguido por bastonetes e cocos em cadeia Gram positivos (Tabela 4).

A presença de leveduras foi detectada em todas as amostras, no entanto, em menor quantidade por campo avaliado quando comparadas às bactérias. (Tabela 4).

Tabela 2. Análises macroscópicas e do líquido ruminal de bezerros leiteiros alimentados em diferentes sistemas de aleitamento artificial até os 59 dias de vida.

| Variáveis | Convencional | Fracionado |
|----------------------|--------------|------------|
| | Nº | Nº |
| Cor: Castanho Claro | 5 | 5 |
| Castanho esverdeado | 1 | 1 |
| Odor: Aromático | 6 | 6 |
| Viscosidade: Aquoso | 6 | 6 |
| PRAM*: Até 3 minutos | 6 | 6 |

*PRAM: Potencial de Redução do Azul de Metileno

Tabela 3. Médias de pH do trato digestório de bezerros Holandeses alimentados em diferentes sistemas de aleitamento artificial até os 60 dias de vida.

| Tratamentos | Rúmen | Abomaso | Intestino Delgado |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Convencional | 6,77 ^a | 3,35 ^a | 5,87 ^a |
| Fracionado | 6,88 ^a | 3,82 ^a | 6,04 ^a |
| Desvio Padrão | 0,39 | 0,63 | 0,52 |

*Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Duncan a 5% de significância

Tabela 4. Microrganismos presentes no exame direto do conteúdo ruminal e intestinal de bezerros Holandeses criados em diferentes sistemas de aleitamento artificial até os 59 dias de vida.

| Microrganismos | Tratamentos | |
|--------------------------------|--------------|------------|
| | Convencional | Fracionado |
| Fluido ruminal | | |
| Cocobastonetes Gram negativos | (++++) | (++++) |
| Bastonetes Gram positivos | (+++) | (+++) |
| Cocos Gram positivos em cadeia | (+++) | (+++) |
| Leveduras | (++) | (++) |
| Intestino Delgado | | |
| Cocobastonetes Gram negativos | (++++) | (++++) |
| Leveduras | (+++) | (+++) |
| Diplococos Gram positivos | (++) | (++) |

No conteúdo intestinal houve predomínio de cocobastonetes Gram negativos em todas as amostras avaliadas, seguido por leveduras e diplococos Gram positivos, não sendo observada a presença de bastonetes Gram positivos.

No exame direto do conteúdo ruminal, não foram detectados protozoários e fungos anaeróbios em nenhuma das amostras dos diferentes sistemas de aleitamento. Diferentes fatores relacionados à alimentação e ao ambiente de criação podem influenciar a colonização desses microrganismos no rúmen de bezerros (Meale et al., 2016). Essa colonização é influenciada principalmente pelo contato com outros animais do rebanho e pelas fezes de animais adultos (Ewing; Cole, 1994, Oliveira Filho et al., 2007). Entretanto, os animais deste presente estudo foram manejados em gaiolas separadas, podendo justificar a falta desses eucaritos no conteúdo ruminal. A ausência de protozoários pode também ser justificada pela idade dos animais, pois segundo Nogueira Filho et al. (1984), a população de ciliados nesse sítio, começa a aparecer após o segundo mês de vida.

Cultivo e Quantificação de Fungos

Para ambos os tratamentos, observou-se taxas de positividade no meio Sabouraud semelhantes para fungos aeróbios no trato digestório. Apenas para o tratamento fracionado, essa taxa foi menor para fungos leveduriformes nas fezes e fungos micelianos no rúmen (Tabela 5).

As médias de UFC de fungos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os sistemas avaliados, independente do sítio de avaliação (Tabela 6). O gênero de fungos micelianos mais frequentemente identificado foi o *Aspergillus*, para ambos os tratamentos (Tabela 7, $p < 0,01$). A presença desse grupo microbiano pode estar mais relacionada à alimentação sólida fornecida aos animais. Fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* foram descritos como comumente encontrados em feno de *Cynodon* sp. (Taffarel et al., 2013; Neres et al., 2014; Mufatto et al., 2016), o que justificaria o aparecimento desses gêneros no ambiente ruminal dos animais avaliados.

Tabela 5. Positividade de fungos leveduriformes e micelianos para amostras provenientes do rúmen, intestino e fezes de bezerros Holandeses criados em diferentes sistemas de aleitamento até os 59 dias.

| Tratamentos | Fungos Leveduriformes | | | Fungos Micelianos | | |
|--------------|-----------------------|----|-------|-------------------|----|-------|
| | Rúmen | ID | Fezes | Rúmen | ID | Fezes |
| Convencional | 4 | 3 | 4 | 5 | 4 | 5 |
| Fracionado | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 |

Tabelas 6. Médias de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de fungos leveduriformes e micelianos para amostras provenientes do trato de digestório de bezerros Holandeses criados em diferentes sistemas de aleitamento até os 59 dias.

| Tratamento | Fungos Leveduriformes (UFC/mL) | | Fungos Micelianos (UFC/mL) | |
|--------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| | Rúmen | Intestino delgado | Rúmen | Intestino delgado |
| Convencional | 8,0 x 10 ^{7a} | 7,67 x 10 ^{7a} | 3,5 x 10 ^{8a} | 1,83 x 10 ^{7a} |
| Fracionado | 1,0 x 10 ^{7a} | 2,33 x 10 ^{7a} | 2,55 x 10 ^{6a} | 1,99 x 10 ^{6a} |

*Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis a 5% de significância.

Tabela 7. Distribuição de gêneros de fungos micelianos isolados do trato digestório de bezerros criados em dois sistemas de aleitamento

| Tratamentos/sítios | <i>Aspergillus</i> | <i>Paecilomyces</i> | <i>Penicillium</i> | <i>Trichophyton</i> | Total |
|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-------|
| Convencional | | | | | |
| Rúmen | 3 | 0 | 1 | 0 | 4 |
| Intestino delgado | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Fezes | 6 | 2 | 1 | 0 | 9 |
| Fracionado | | | | | |
| Rúmen | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Intestino delgado | 3 | 0 | 2 | 1 | 6 |
| Fezes | 7 | 1 | 0 | 0 | 8 |
| Total | 25* | 3 | 4 | 1 | |

*Gênero mais frequente com o teste do qui-quadrado considerando $p < 0,05$.

Em estudo com bezerras Holandesas entre sete a 13 meses de idade, verificou-se menor concentração de fungos micelianos e maior concentração de leveduras para bezerras alimentadas com cana de açúcar com uréia em comparação com aquelas alimentadas com silagem de sorgo. Os autores atribuíram as diferenças a maior concentração de carboidratos solúveis na dieta com cana de açúcar. Os fungos mais frequentes para as bezerras foi o *Aspergillus* spp. (Almeida et al., 2014), como observado nesta presente pesquisa.

Em bezerros Nelore desmamados, com seis a oito meses de idade, e criados exclusivamente a pasto, verificou-se no fluido ruminal a presença de fungos micelianos dos gêneros *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Onychocola*, *Trichophyton* e *Penicillium*, sendo os dois primeiros gêneros, os mais frequentes (Abrão et al., 2014).

Em um estudo, avaliou-se a atividade celulolítica de fungos provenientes do trato digestório de bovinos leiteiros e alimentados com forragens tropicais. Constatou-se que fungos do gênero *Aspergillus* e *Paecilomyces* apresentaram significativa capacidade para degradação da celulose microstalina, indicando o potencial desses fungos em estudos com aditivos microbianos (Almeida et al. 2014).

Futuros estudos são necessários para identificar espécies dessa microbiota e avaliar a relação com o desempenho e sanidade dos animais submetidos a esses sistemas de aleitamento, pois segundo Elad et al. (1998) algumas espécies da levedura *Candida* spp. podem estar associadas a graves quadros de diarreia em bezerros.

Cultivo e caracterização de Enterobacteriaceae

As médias de unidades formadoras de colônia (UFC) de Enterobacteriaceae também não apresentaram diferença entre os sistemas de aleitamento e sítios avaliados ($p > 0,05$). Entretanto, as amostras do sistema convencional apresentaram positividade de 100% para ambos os sítios avaliados. Para os bezerros criados com o sistema fracionado, 50% das amostras do intestino delgado foram negativas para essas bactérias (Tabela 8).

As concentrações de bastonetes Gram negativos e anaeróbios facultativos no fluido ruminal verificada para os dois grupos de bezerros em aleitamento pode ser considerada elevada (Tabela 8). Em estudo conduzido com bovinos leiteiros da raça Holandesa (Freitas et al., 2014), verificou-se que as bezerras de sete a treze meses de idade apresentaram maior população dessas bactérias no ambiente ruminal, comparando-se com vacas leiteiras adultas que recebiam a mesma fonte de volumoso (silagem de sorgo). Os autores atribuíram essas diferenças a menor estabilidade do ambiente ruminal dos animais jovens para controlar essas bactérias, o que poderia ser também constatado para os bezerros deste presente estudo.

Um total de 45 isolados bastonetes Gram negativos aeróbios e anaeróbios facultativos foi caracterizado para os dois sítios avaliados neste estudo. Os gêneros de maior ocorrência no conteúdo ruminal foram *Escherichia* e *Proteus* no sistema convencional e fracionado, respectivamente ($p < 0,05$, Tabela 9).

Tabela 8. Positividade e quantificação de Enterobacteriaceae provenientes dos conteúdos ruminal e do intestino delgado de bezerros Holandeses criados em diferentes sistemas de aleitamento artificial até os 60 dias de vida.

| Tratamento | Rúmen | | Intestino Delgado | |
|--------------|--------------|---------------------------|-------------------|--------------------------|
| | Positividade | UFC/mL | Positividade | UFC/mL |
| Convencional | 100% | 7,71 x 10 ¹¹ a | 100% | 5,2 x 10 ¹⁰ a |
| Fracionado | 83,3% | 1,6 x 10 ¹⁰ a | 50% | 1,6 x 10 ¹⁰ a |

*Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Kruskal-Wallis a 5 % de significância.

Tabela 9. Distribuição de gêneros de Enterobacteriaceae, provenientes do líquido ruminal e do intestino delgado de bezerros Holandeses criados em diferentes sistemas de aleitamento artificial até os 59 dias de vida.

| Gêneros | Convencional | | Fracionado | | Total |
|--------------------------|------------------|------|------------------|-------|-------|
| | Nº | % | Nº | % | |
| Rúmen | | | | | |
| <i>Alcaligenes</i> | 2 ^{Ba} | 11,8 | 1 ^{Ba} | 5,9 | 3 |
| <i>Enterobacter</i> | 0 | 0,0 | 1 ^B | 5,9 | 1 |
| <i>Escherichia</i> | 11 ^{Aa} | 64,7 | 5 ^{Bb} | 29,4 | 16 |
| <i>Proteus</i> | 4 ^{Bb} | 23,5 | 10 ^{Aa} | 58,8 | 14 |
| Total | 17 | 100 | 17 | 100 | 34 |
| Intestino Delgado | | | | | |
| <i>Alcaligenes</i> | 1 | 11,1 | 0 | 0,0 | 1 |
| <i>Escherichia</i> | 0 | 0,0 | 2 | 100,0 | 2 |
| <i>Proteus</i> | 8 | 88,9 | 0 | 0,0 | 8 |
| Total | 9 | 100 | 2 | 100,0 | 11 |

*Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas colunas e mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste do Qui-quadrado ($P \leq 0,05$).

Entretanto, no conteúdo do intestino delgado, o gênero *Proteus* apresentou ocorrência de 88,9% para o sistema convencional e foi ausente para o fracionado (Tabela 9).

Segundo Acres (1985), a presença de fezes no ambiente é uma das principais fontes para contaminação de *Escherichia coli*, que já são detectados no intestino entre oito a 10 horas após o nascimento. A baixa taxa de detecção desse microrganismo no intestino dos animais avaliados nesta presente pesquisa, pode ser justificada porque os bezerros foram criados separados dos demais animais do rebanho resultando em possivelmente em menor contaminação ambiental.

A menor ocorrência de *E. coli*, que é fermentadora de lactose, no fluido ruminal dos bezerros no tratamento fracionado (Tabela 9) pode estar relacionada com o menor consumo de leite no segundo mês de aleitamento e no período próximo à desmama (Azevedo et al., 2014).

No presente estudo, apesar de não detectado pela análise estatística, o tratamento convencional proporcionou maior concentração de Enterobacteriaceae no fluido ruminal dos bezerros e *E. coli* foi a bactéria predominante entre os isolados obtidos. Essa diferença poderia estar relacionada a um desequilíbrio nesse ecossistema, que poderia ter influenciado o menor desempenho dos animais do aleitamento convencional (Azevedo et al., 2014).

Em estudo com bezerros Nelore desmamados alimentados em pastagem de *Brachiaria* spp., *E. coli* representou somente 7% dos isolados de Enterobacteriaceae provenientes do fluido ruminal. Entretanto os autores constataram que essa espécie foi predominante no fluido ruminal dos novilhos alimentados sem volumoso e com acidose, indicando desequilíbrio populacional (Vieira et al., 2015).

Segundo Ávila et al. (2000), bactérias do gênero *Escherichia* são as mais comuns em diarreia de bezerros. Gomes et al. (1992) observaram 26%, de *Escherichia coli* nas fezes de bezerros leiteiros, com alta incidência de diarreia. Gyles (2007) reporta que os bovinos são portadores assintomáticos e considerados principais reservatórios de *E. coli*. No entanto, segundo Coura et al. (2014), diferentes cepas podem causar diarreias em bezerros, e apenas o isolamento e identificação da bactéria não significa que esse agente é o causador da patologia. Para tanto, é necessária a identificação das cepas de *E. coli* causadoras de diarreia (Nataro; Kaper 1998; Gyles; Fairbrother, 2010).

Em estudo preliminar, verificou-se que a incidência de dias com diarreia não foi influenciada pelo sistema de aleitamento fracionado nos diferentes períodos de avaliação e não foi demonstrada interação entre os sistemas e os períodos de avaliação para esse parâmetro. Apesar do aumento

da quantidade de leite fornecido no sistema fracionado acima do convencional provocar receio nos produtores, esse incremento não favoreceu diarreia nos animais (Azevedo et al., 2014).

No presente estudo não foi constatada a presença de *Klebsiella* sp. no ambiente ruminal ou intestinal dos bezerros avaliados. Em nosso estudo anterior, verificou-se que vacas leiteiras adultas, alimentadas com silagem de sorgo possuíam maior ocorrência *Klebsiella* sp. quando comparadas à bezerras alimentadas com a mesma dieta (Freitas et al., 2014). Dessa forma esse gênero poderia estar mais adaptado ao ambiente ruminal de animais adultos.

A presença de *Proteus* sp. foi significativamente maior entre os isolados do fluido ruminal dos bezerros em aleitamento fracionado (Tabela 9). Segundo Levinson & Jawetz (2005), o gênero *Proteus* sp. é ureolítico e dessa forma poderia contribuir com metabolismo da ureia no ambiente ruminal.

CONCLUSÃO

Os diferentes sistemas de aleitamentos não promoveram alterações significativas para as características físico-químicas para os fluidos do rúmen, abomaso e intestino. A população de protozoários, fungos também não foram influenciadas, entretanto o perfil de gêneros de Enterobacteriaceae variou entre os tratamentos e sítios avaliados, com maior ocorrência de *E. coli* no fluído ruminal de bezerros alimentados no sistema convencional. Futuros estudos devem considerar ainda a influência desses sistemas nos períodos pós desmame, considerando fatores econômicos, desempenho e saúde dos animais.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) e PRPq / UFMG

REFERÊNCIAS

ABRÃO, F. O. et al. Characterization of Fungi from Ruminal Fluid of Beef Cattle with Different Ages and Raised in Tropical Lignified Pastures. **Current Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1-13, 2014

ACRES, S. D. A review: enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 229-256.1985.

ANDERSON, K. L; NAGARAJA, T. G; MORRILL, J. L. Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.1000-1005, 1987.

ALMEIDA, P. N. M. et al. Atividade celulolítica de fungos aeróbios isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 202-207, 2014

AZEVEDO, R. A. et al. Desenvolvimento do trato digestivo de bezerros leiteiros criados em sistema de aleitamento fracionado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.33, n. 7, p.931-936, 2013.

AZEVEDO, R. A. et al. Desempenho de bezerros leiteiros em aleitamento artificial convencional ou fracionado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.15, p.237-247, 2014.

AVILA, F. A. et al. Avaliação da eficiência de um probiótico no controle de diarreia e no ganho de peso de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 41-46, 2000.

BOUDA, J. et al. Importância da coleta e análise de líquido ruminal e urina. In: GONZÁLEZ, F H.D.; BORGES, J.B.; CECIM, M. **Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos**. Porto Alegre, Brasil. 2000, 130p.

CHAUDHRY, A. S. Microscopic studies of structure and ruminal fungal colonization in sheep of wheat straw treated with different alkalis. **Anaerobe**, v. 6, p. 155-161, 2000.

COURA, F. M. et al. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 9, p. 811-818, 2014.

DEHORITY, B. A., ODENYO, A. A. Influence of diet on the rumen protozoal fauna of indigenous african wild ruminants. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.50, p. 220-223, 2003.

DIRKSEN, G. **Rosenberger exame clínico dos bovinos**.3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 1993. 419 p

DUKES, H.H. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 856 p. 1996

ELAD, D. et al. Feed contamination with *Candida krusei* as a probable source of mycotic mastitis in dairy cows. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 207, p.620-622, 1995.

EWING, W. N.; COLE, D.J.A. **The living gut – an introduction to micro-organisms in nutrition**, N. Ireland: Context, 1994.p. 220.

FREITAS, C. E. S. et al. Aerobe and anaerobe facultative Gram-negative bacteria rod-shaped in the ruminal fluid of dairy cattle fed with different diets containing tropical forages. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 6, p. 457-462, 2014.

GOMES, R. F. C., et al. Etiologia de algumas doenças de bezerros criados extensivamente na microrregião Paranaíba, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p.1635-1641, 1992.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER J.M.. *Escherichia coli*, p.231-265. In: Gyles C.A., Prescott J.F., Songer J.G. ;Thoen C.O. (Eds), **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Wiley-Blackwell, Iowa. 2010

GYLES, C. L. Shigatoxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, 45-62, 2007.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, p. :124-135, 2005.

KHAN, M. A. et al. Invited review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v.2, p.885-902, 2016

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 125p.

MEALE, S. J. et al. Development of ruminal and fecal microbiomes are affected by weaning but not weaning strategy in dairy calves. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 582, 2016.

MUFATTO, L. M. et al . Caracterização e quantificação da população de fungos em área de produção de feno de capim Tifton 85, adubado com biofertilizante suíno. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 486-491, 2016 .

NATARO J. P.; KAPER J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NERES, M. A. et al. Changes in Tifton 85 bermuda grass hay storage in the field underdried. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, n. 243, p. 555-558, 2014.

NOGUEIRA-FILHO, J. C. M. et al. Cronologia do aparecimento de protozoários ciliados no rúmen de bezerros do tipo "Mantiqueira" (*Bos taurus* L.), na região do Vale do Paraíba, SP. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 21, n. 2, p. 119-124, 1984.

OLIVEIRA FILHO, J. P. et al. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.419-424, 2007.

PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios de Rugai e lisinamotilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 32, p. 97-100,1972.

RASMUSSEN, M.A., et al. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **FEMS Microbial Letter**, v.114, p. 79-84, 2006.

RUGAI, E.; ARAUJO, A. Meio de cultura para identificação presuntiva de bacilos Gram-negativos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 28, p. 79-83, 1968.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 1998, 221 p.

TAFFAREL, L. E. et al . Dehydration curve, fungi and mycotoxins in Tifton 85 hay dehydrated in the field and in shed. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 6, p. 395-403, 2013.

VIEIRA, E. A., et al. Bastonetes Gram-negativos aeróbios e anaeróbios facultativos no fluido ruminal de bovinos de corte alimentados em pastagem lignificada e em novilhos com acidose ruminal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 811-816, 2015.