



Vol. 13, Nº 03, maio/jun de 2016

ISSN: 1983-9006

www.nutritime.com.br

A Nutritime Revista Eletrônica é uma publicação bimestral da Nutritime Ltda. Com o objetivo de divulgar revisões de literatura, artigos técnicos e científicos bem como resultados de pesquisa nas áreas de Ciência Animal, através do endereço eletrônico: <http://www.nutritime.com.br>. Todo o conteúdo expresso neste artigo é de inteira responsabilidade dos seus autores.

Efeito de diferentes fontes de enxofre na síntese de proteína microbiana ruminal “in vitro”

Crescimento microbiano “in vitro”, fontes de enxofre, proteína.

Cássio José da Silva¹

José Mauro da Silva Diogo²

Tadeu Silva de Oliveira³

Gilberto Gonçalves Leite²

Sérgio Lúcio Salomon Cabral Filho²

¹ Doutorado, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – FAV/UnB. E-mail: silvajcassio@hotmail.com

² Doutorado, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – FAV/UnB

³ Doutorado, Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

RESUMO

Objetivou-se avaliar a produção de proteína microbiana ruminal “in vitro” em função de diferentes relações de massa entre duas fontes de enxofre: sulfato de cálcio e enxofre elementar, em líquido ruminal proveniente de um novilho em crescimento sob regime de pastejo e de uma vaca em lactação alimentada com silagem de milho e concentrado. As incubações foram feitas por 24 horas com relações variando de 100% de sulfato de cálcio até 100% do enxofre proveniente do enxofre elementar 70 (74% de enxofre), com níveis de inclusão de 10% além de um tratamento testemunha sem inclusão de uma fonte de enxofre. O experimento foi montado em esquema fatorial 2x12 e as análises de proteína microbiana realizadas por colorimetria. Não foram verificadas diferenças significativas nos teores de proteína microbiana “in vitro” para as relações avaliadas ($P>0,05$) indicando que as duas fontes podem ser utilizadas em conjunto sem danos as taxas crescimento microbiano .

Palavras-chave: crescimento microbiano “in vitro”, fontes de enxofre, proteína.

EFFECT OF DIFFERENT SOURCES OF SULFUR IN THE RUMEN MICROBIAL PROTEIN SYNTHESIS "IN VITRO "

ABSTRACT

The objective was to evaluate the ruminal microbial protein production “in vitro” in function of different mass ratios enters two sulfur sources: sulfate of calcium and elemental sulfur, in ruminal liquid proceeding from a steer in growth under scheme of grazing and from a cow in lactation fed with ensilage of maize and concentrated. The incubations had been made by 24 h with relations varying of 100% of calcium sulfate up to 100% of sulfur proceeding from elementary sulfur 70 (74% of sulfur), with levels of inclusion of 10% beyond a treatment testify without inclusion of a sulfur source. The experiment was mounted in factorial scheme 2x12 and the microbial protein analyses carried through by colorimetry. “In vitro” for the evaluated relations ($P>0.05$) had not been verified significant differences in microbial protein tests “in”; indicating that the two sources can be used in set without damages the rates microbial growth .

Keyword: microbial growth in vitro, sources of sulfur, protein.

INTRODUÇÃO

A necessidade de enxofre para ruminantes, primeiramente, se deve para o suprimento de substratos necessários para a máxima eficiência e síntese microbiana, objetivando assegurar uma adequada digestibilidade da fibra e aporte de nutrientes para a absorção. O suprimento de enxofre pode ser realizado a partir de diversas fontes: aminoácidos sintéticos, sais de sulfato como: sulfato de sódio, sulfato de amônio, sulfato de cálcio e enxofre elementar, chamado “flor de enxofre” ou “enxofre ventilado”. Entretanto, a maior parte do enxofre absorvido está na composição de aminoácidos sulfurados, após incorporação do elemento na massa microbiana. Todavia, uma pequena fração pode ser absorvida na forma de sulfeto de hidrogênio (H_2S) e juntamente com o enxofre proveniente da oxidação de metionina e cisteína que formam ânions sulfatos, participam do equilíbrio ácido base do organismo animal.

O enxofre mineral pode ser utilizado pelos mamíferos e pelas aves, em graus variáveis, apresentando principalmente efeito de promotor de crescimento. Os microrganismos do rúmen podem incorporar enxofre inorgânico em compostos orgânicos, como os aminoácidos sulfurados (BURK e HILL, 1994). Dietas com proteína de alta qualidade podem ter seus valores reduzidos pelos microrganismos do rúmen, entretanto, proteínas de baixa qualidade provenientes de gramíneas ou de fontes de nitrogênio não proteico como a uréia, suplementada com adequada quantidade de enxofre, podem ter seu valor aumentado através dos microrganismos do rúmen (ANDERSON et al., 1975). Embora animais ruminantes requeiram aminoácidos para o adequado crescimento microbiano e metabolismo, formulações baseadas na composição em aminoácidos de dietas são limitadas, em decorrência da necessidade de informações adicionais como o conteúdo de aminoácidos da proteína que chega ao duodeno em relação ao conteúdo de aminoácidos do alimento e as diferenças na absorção e na utilização metabólica de cada aminoácido (MAIGA et al., 1996).

A proteína microbiana sintetizada no rúmen fornece, em dietas para bovinos, 50% ou mais dos aminoácidos disponíveis para absorção, portanto, é considerada fonte de alta qualidade e com perfil de aminoácidos relativamente constante. Logo, torna-se

difícil a modificação na composição de aminoácidos na digesta duodenal (STERN et al., 1994; SCHWAB, 1996). Contudo, em casos de deficiência de alguns minerais como o enxofre, podem ocorrer casos de redução na síntese microbiana e consequentemente a disponibilidade da fonte de enxofre pode influenciar nesse parâmetro, assim estudos completos de disponibilidade de diferentes fontes minerais e influências destes no crescimento microbiano, digestibilidade, degradabilidade ruminal, composição de aminoácidos no abomaso e de eficiência de absorção e utilização são limitados.

Muitas bactérias do rúmen necessitam de enxofre, esse elemento pode ser obtido por diversas formas, algumas são capazes de degradar fontes inorgânicas de enxofre para sulfito e incorporá-lo em aminoácidos, enquanto outras utilizam somente enxofre orgânico (KANDYLIS, 1984a; DURAND e KOMISARCUK, 1988).

Aproximadamente 50% do enxofre bacteriano orgânico foi derivado de sulfato em ovelhas recebendo pasto ou feno de leucena (KENNEDY e MILLIGAN, 1978). Suprimentos de enxofre nas dietas são complementados através de enxofre reciclado na saliva, em uma mistura do elemento nas formas inorgânica e orgânica (KENNEDY e SIEBERT, 1972b; BIRD, 1974).

A proporção de fluxo de enxofre total no rúmen que é incorporada a proteína microbiana ruminal varia amplamente e é determinada por fatores como a fonte de enxofre (metionina que é menos degradada que outros aminoácidos sulfurados (BIRD, 1972a) e pela co-disponibilidade de outros substratos, como nitrogênio principalmente (MOIR, 1970; BEEVER, 1996). O nível ótimo de síntese microbiana e captura de enxofre acontece quando a energia de fermentação, fonte de enxofre, nitrogênio e fósforo estão disponíveis em taxas iguais à capacidade cinética do rúmen e da biomassa microbiana. O excesso de enxofre é rapidamente absorvido no rúmen como sulfato, que tem pequeno valor nutricional, mas é potencialmente tóxico.

Os protozoários do rúmen engolfam bactérias ruminais, reduzindo a incorporação de enxofre na proteína bacteriana e consequentemente aumentando disponibilidade de sulfato no rúmen (KANDYLIS, 1984a).

Experimentalmente a eficiência ruminal na síntese de proteína microbiana pode ser aumentada através de defaunação ruminal, ou seja, removendo os protozoários, um processo que deveria diminuir as concentrações de sulfato ruminal (HEGARTY et al., 1994). Fins semelhantes podem ser alcançados transferindo genes de bactérias que codificam enzimas para fixarem sulfato em rotas metabólicas de espécies comuns de bactérias que habitam o rúmen.

Fungos anaeróbios podem fazer um papel importante na degradação estrutural de fibra no rúmen. Essa atividade é dependente do enxofre dietético e contribui significativamente para a síntese de aminoácidos sulfitados (WESTON et al., 1988).

Com relação à obtenção do enxofre para utilização na nutrição animal, sabe-se que este é também matéria-prima básica de extrema necessidade, utilizando largamente na agricultura, que consome cerca de 53,0% da produção total. O consumo está diretamente relacionado à produção de ácido sulfúrico, que por sua vez, é destinado em cerca de 70 a 80% para produção de ácido fosfórico e de fertilizantes. Como subprodutos da produção de fosfato bicálcico podem ser gerados duas fontes de enxofre com real potencial de uso na nutrição de ruminantes, o sulfato de cálcio e o enxofre elementar 70 (74% de enxofre), sendo este o enxofre que não sofreu reação para produção de fertilizante.

Devido à deficiência de fósforo nos solos brasileiros torna-se evidente então a necessidade da produção em grande escala de fontes de fósforo, gerando para cada tonelada de fosfato bicálcico produzido aproximadamente quatro toneladas de sulfato de cálcio, ou seja, tanto para produção de fertilizantes como para suplementos minerais, ocorre um acúmulo de grandes quantidades de fontes de enxofre, como o sulfato de cálcio (gesso hidratado) e o enxofre elementar 70, tais coprodutos apresentam o inconveniente de necessitarem de grandes áreas para estocagem, sendo estes estocados na maioria das vezes a céu aberto, podendo levar a contaminações do meio ambiente. Como apresentam real possibilidade de uso na nutrição animal, faz-se necessário então o estudo mais detalhado da contribuição verdadeira de cada uma dessas fontes.

Assim objetivou-se com esse estudo avaliar a produção de proteína microbiana, "in vitro", em função de diferentes relações de massa de enxofre na forma de sulfato de cálcio e enxofre elementar, para fundamentação de bases para utilização destas duas fontes em conjunto na suplementação mineral de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia e as análises realizadas no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia ambos da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG. Avaliou-se a produção de proteína microbiana "in vitro" sob diferentes relações de massa entre as fontes de enxofre sulfato de cálcio (gesso hidratado) e enxofre elementar 70.

Os tratamentos foram obtidos por meio da inclusão de enxofre numa proporção de 40 µg/mL de líquido ruminal segundo recomendações de Kalhon et al. 1975, na forma sulfato de cálcio ou enxofre elementar e por relações entre essas duas fontes no líquido ruminal de um novilho fistulado no rúmen, alimentado exclusivamente a pasto. Realizou-se também a incubação com líquido de rúmen de uma vaca alimentada com silagem de milho e concentrado numa relação volumoso: concentrado de 60: 40, e podem ser observados a seguir: 100% do enxofre proveniente do enxofre elementar 70; 10% sulfato de cálcio e 90% enxofre (70); 20% sulfato de cálcio e 80% enxofre (70); 30% sulfato de cálcio e 70 enxofre (70); 40% sulfato de cálcio e 60% enxofre (70); 50% sulfato de cálcio e 50% enxofre (70); 60% sulfato de cálcio e 40% enxofre (70); 70 sulfato de cálcio e 30% enxofre (70); 80% sulfato de cálcio e 20% enxofre (70); 90% sulfato de cálcio e 10% enxofre (70); 100% do enxofre proveniente do sulfato de cálcio e testemunha sem enxofre inorgânico no suplemento.

O líquido de rúmen foi coletado (700 mL com pH em torno da neutralidade) nas primeiras horas da manhã, no caso do animal em regime em pastejo e duas horas após o arraçoamento no caso do animal confinado, este foi filtrado em quatro camadas de gaze em garrafas térmicas com capacidade para 1 litro, previamente aquecidas com água a 40°C e transportado

anaerobicamente para o laboratório, para preparação e montagem do sistema de incubação. O líquido foi transferido para um erlenmayer e mantido a 39°C, sob anaerobiose, para a separação da fase líquida intermediária (inóculo contendo bactérias), dos protozoários e das partículas dos alimentos (fase mais densa e sobrenadante), respectivamente.

O material foi acondicionado em frascos de vidro de 80 mL, em duplicita, saturados com CO₂, tampados com rolhas de borracha e lacres de alumínio, mantidos em uma sala climatizada, com temperatura constante de 39°C, em mesa de agitação orbital a 44 rpm.

Os frascos continham 40 mL de líquido ruminal isento de partículas alimentares, 2,41 mL de solução de ureia (concentração final de 0,28 g/L), 5,78 mL de solução de sacarose (concentração final de 27,7 g/L) e 40 µg/mL de enxofre, proveniente das diferentes relações sulfato de cálcio: enxofre (70).

Ao final de 24 horas, a atividade microbiana foi cessada artificialmente por meio de redução rápida da temperatura, sendo retirado 1,5 mL de solução, esta foi centrifugada (10000 rpm por 10 minutos) descartando-se o sobrenadante, do precipitado formado, determinou-se a concentração de proteína por colorimetria pelo método de Bradford (1976).

O método de Bradford 11 é uma técnica para a determinação de proteínas totais baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. (ZAIA, et. al. 1998). No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em comprimento de onda de 595 nm. (ZAIA, et. al. 1998)

Os dados foram analisados estatisticamente por meio recurso MIXED do programa estatístico SAS (SAS, 2007), em esquema fatorial 2x12 onde os animais consistiam nos níveis e as relações entre as fontes de enxofre nos fatores. Os parâmetros foram estimados segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \beta_j + (T\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

onde: = T_i = efeito fixo do animal; β_j = efeito aleatório da fonte de enxofre; (Tβ)_{ij} é o efeito da interação entre T_i e β_j e e_{ijk} = erro experimental.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os resultados para os teores de proteína microbiana “in vitro”, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos avaliados. A utilização do enxofre elementar foi necessária para satisfazer os requerimentos dos microrganismos, apesar de sua provável menor disponibilidade em relação às fontes orgânicas.

Os valores de proteína microbiana variaram de 868,64 a 1376,06 mg/L para as incubações em líquido ruminal do animal alimentado com silagem de milho e concentrado e de 1007,42 a 1425,85 mg/mL para o animal alimentado exclusivamente a pasto. O valor de suplementos minerais como fontes de enxofre para ruminantes depende completamente da codisponibilidade de outros nutrientes necessários para síntese de proteína microbiana, como o nitrogênio principalmente, o que pode ser visualizado através dos resultados apresentados, sendo que provavelmente a ausência de efeitos significativos se deve ao fato da alimentação dos animais utilizados já conterem um aporte adequado de enxofre para suprir adequadas taxas de crescimento microbiano ruminal, pois em condições de suprimento adequado

TABELA 1. Produção de proteína microbiana “in vitro” sob diferentes relações de sulfato de cálcio e enxofre elementar

Relações	(mg/L)	CV(%)
0%S.Ca ¹ : 100% EE 70 ²	1150,16	8,57
10%S.Ca: 90% EE 70	1250,79	
20%S.Ca: 80% EE 70	1296,61	
30%S.Ca: 70% EE 70	1210,54	
40%S.Ca: 60% EE 70	1172,67	
50%S.Ca: 50 % EE 70	1219,54	
60%S.Ca: 40% EE 70	1287,34	
70SS.Ca : 30% EE 70	1206,83	
80%S.Ca: 20% EE 70	1224,58	
90%S.Ca: 10% EE 70	1205,77	
100% S.Ca: 0% EE 70	1199,15	
Testemunha sem fonte de enxofre	1187,5	

¹ S.Ca = Sulfato de Cálcio; ² EE 70 = Enxofre elementar 70.

de energia e proteína não foram verificadas diferenças significativas ($P>0,05$).

Muitas são as avaliações comparativas sobre diferentes fontes de enxofre (ANDERSON et al. 1975; BIRD et al. 1972b; BIRD et al. 1974; BULL et al. 1973; EMERY et al. 1957; HUME et al. 1988; HARMS et al. 1987; JOHNSON et al. 1971; KAHLON et al. 197a; SPEARS et al. 1978.), baseando em equilíbrio de enxofre, com pequena ou nenhuma indicação da habilidade de uma determinada fonte, para promover síntese microbiana ruminal. Técnicas baseadas em culturas "in vitro" de microrganismos ruminais retificaram valor nutricional que simulou eventos ruminais "in vivo", mas os resultados obtidos apresentaram-se incompatíveis (HENRY e AMMERMAN, 1995). Avaliações baseadas em respostas animais em suplementação geralmente são mais consistentes. Por exemplo, o enxofre é tido como um mineral que possui baixo valor nutritivo de 0 a 36% para métodos "in vitro", 28 a 69% e 73 a 100% através de testes com crescimento de ovinos, quando comparados com Na_2SO_4 ou metionina (HENRY e AMMERMAN, 1995).

CONCLUSÃO

A variação nas relações entre sulfato de cálcio e enxofre elementar não alteram a produção de proteína microbiana ruminal "in vitro", indicando que as duas fontes em conjunto podem ser utilizadas como fontes de enxofre para ruminantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.O.; WARNICK, R.E.; DALAIC, R.K. Replacing dietary methionine and cystine in sheep diet with sulfate or other sulfur compounds. **New Zealand Journal Science**, Wellington, v.54, p.1122-1131, 1975.
- BEEVER, D.E. Meeting the protein requirements of ruminant livestock. **South African Journal of Animal Science**, v. 26, p.20-26.1996.
- BIRD, P.R. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. V. Ruminal desulphurization of methionine and cysteine. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.25, p.185-193,1972a.
- BIRD, P.R. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. X. Sulphide toxicity in sheep. **Australian Journal of Biological Sciences** n.25, p.1087-1098, 1972b.
- BIRD, P.R. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants. XIII. Intake and utilisation of wheat straw by sheep and cattle. **Australian Journal of Agricultural Sciences**., v. 25, 631–642.1974.
- BULL, L.S.; VANDERSALL, J.H. Sulfur sores "in vitro" cellulose digestion and in vivo ration utilization, nitrogen metabolism, and sulfur balance. **Journal of Dairy Science**., Champaign, v.56, p.106-112, 1973.
- BURK, R.F.; HILL, K.E. Selenoprotein P.A selenium-rich extracellular glycoprotein. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.124, p.1891-1897, 1994.
- BURK, R.F.; HILL, K.E. Selenoprotein P.A selenium-rich extracellular glycoprotein. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.124, p.1891-1897, 1994.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248, 1976.
- DURAND, M.; KOMISARCZUK, K. (1988) Influence of major minerals on rúmen microbiota. **Journal of Nutrition**, v.118, p.249-260,1988.
- EMERY, R.S.; SMITH, C.K; AND HUFFMAN, C.F. Utilization of inorganic sulfate by rúmen microorganisms. I. Incorporation of inorganic sulfate into amino acids. **App. Microbiol.** v.5, p.360-363, 1957.
- HARMS, R.H.; BURESH, R.E. A comparison of diets with and witout supplemented inorganic sulfate and collie for use in comparing relative potencies of various methionine supplements. **Nutr. Report International Los Altos**, v.35, p.909-920, 1987.
- HEGARTY, R.S., NOLAN, J.V.; LENG, R.A. The effects of protozoa and of supplementation nitrogen and sulphur on digestion and microbial metabolism in the rúmen of sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**., v.45, p.1215-1227,1994.
- HUME, I.D.; BIRD, P.R. Synthesis of microbial protein in the rúmen, the influence of the level and form of dietary sulphur. **Australian journal of Agricultural Science**, Chanpaing, v.66, p.1948-1501, 1988.
- HENRY, P. R.; AMMERMAN, C. B. Selenium bioavailability. In: C. B. Ammerman, D. H. Baker and A. J. Lewis (Eds.) **Bioavailability of nutrients for animal: amino acids, minerals, and vitamins**. Academic Press, San Diego. 1995.
- JOHNSON, W.H., GOODRICH, R.D.; MEISKE, J.C. Metabolism of radioactive sulfur from elemental sulfur, sodium sulfate and methionine by lambs.

- Journal of Animal Science.** Champaign, v.32, p.778-785, 1971.
- KANDYLIS, K. The role of sulphur in ruminant nutrition: a review. **Livestock production science**, v.11, p.611-624, 1984a.
- KAHLON, T.S.; MEISKE, J.C.; GOODRICH, R.D. Sulphur metabolism in Ruminants. I. “in vitro” availability of various chemical forms of sulfur. **Journal of Animal Science**. v.41; p.1147-1153, 1975.
- KENNEDY, P.M.; MILLIGAN, L.P. Quantitative aspects of the transformations of sulphur in sheep. **British Journal of Nutrition**., 39, 65–84, 1978.
- KENNEDY, P.M.; SIEBERT, B.D. The utilisation of spear grass (*Heteropogon contortus*). II. The influence of sulphur on energy intake and rumen and blood parameters in sheep and cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.23, p.45–46, 1972a.
- LICHTIG, J., ZAIA, C. T. B. V., LICHTIG, J. Determinação de Proteínas Totais via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes. **Química Nova na Escola**, Volume 21, 1998.
- MAIGA, H.A.; SCHINGOETHE, D.J.; HENSON, J.E. Ruminal degradation, amino acid composition and intestinal digestibility of the residual components of five protein supplements. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.9, p.1647-53, 1996.
- MOIR, R.J. Implications of the N:S ratio and differential recycling. In: Muth, O.H. and Oldfield, J.E. (eds) **Sulphur in nutrition – Symposium Proceedings**. AVI Publishing Company, Westport, Connecticut, p.165-170.1970.
- SCHWAB, C.G. Rumen-protected amino acids for dairy cattle: progress towards determining lysine and methionine requirements. **Animal Feed Science and Technology**, v.59, n.1, p.87-101, 1996.
- SPEARS, J. W., D. G. ELY AND L. P. BUSH. Influence of supplemental sulfur on “in vitro” and in vivo microbial fermentation of Kentucky 31 tall fescue. **Journal of Animal Science**. v.47. p.552, 1978.
- STERN, M.D.; CALSAMIGLIA, S.; ENDRES, M.I. Dynamics of ruminal nitrogen metabolism and their impact on intestinal protein supply. In: **Cornell Nutrition Conference For Feed Manufacturers**. Ithaca. Ithaca: Cornell University, 1994, p.105-116.
- WESTON, R.H., LINDSAY, J.R., PURSER, D.B., et al. Feed intake and digestion responses in sheep to the addition of inorganic sulfur to a herbage diet of low sulfur content. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.39, p.1107-1119, 1988.