

Enterobacteriaceae no rúmen de borregas alimentadas com grãos de milho e de sorgo submetidos a diferentes processamentos

Douglas Dijkstra¹, Luis Henrique Curcino Batista², Ronaildo Fabiano Neto², Marcelo Marcondes de Godoy³, Flávia Oliveira Abrão Pessoa^{*3}

Resumo

Objetivou-se avaliar os efeitos da reidratação do milho e do sorgo sobre a população de enterobacteriaceae e características macroscópica e físico-químicas do líquido ruminal de ovinos. Em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) foram avaliados quatro tratamentos com sete repetições, sendo T1 - Milho Grão Seco (MGS), T2 - Milho Grão Reidratado (MGR), T3 - Sorgo Grão Seco (SGS) e T4 - Sorgo Grão Reidratado (SGR). Os animais foram confinados totalizando um período experimental de 65 dias. No último dia do experimento, foi realizada a coleta do fluido ruminal com auxílio de um cateter e de uma seringa estéril, para posterior execução das análises macroscópicas, físico-químicas e microbiológicas. Cada fluido foi processado (diluição seriada) e inoculado em placas contendo o meio ágar MacConkey. Após desenvolvimento microbiano realizou-se a quantificação de colônias e, treze isolados bacterianos foram repicados e identificados por meio de provas bioquímicas. As análises macroscópicas do líquido ruminal das borregas apresentaram cor verde oliva, odor aromático e consistência levemente viscosa para todos os tratamentos testados. O pH sofreu alterações ($P < 0,05$) sobre efeito dos tratamentos. Os diferentes tratamentos exercem efeito semelhante sobre a população de enterobactérias fermentadoras de lactose (Lac +), não fermentadoras de lactose (Lac -) e sobre o número total de bactérias enterozoonóticas ($P > 0,05$). A população de enterobactérias não sofre influências em função do processamento e do tipo de grãos. O tratamento Sorgo Grão Seco proporcionou maior diversidade de enterobactérias no rúmen.

Palavras-chave: Bactérias Zoonóticas. Microbiota ruminal. Ovinos.

Enterobacteriaceae in lambs fed rumen with corn and sorghum grains subjected to different processes

Abstract

This study aimed to evaluate the effects of corn and sorghum rehydration on the population of enterobacteriaceae and macroscopic physical and chemical characteristics of rumen fluid of sheep. In a completely randomized design (CRD) were evaluated four treatments with seven replicates: T1 - Corn Dry Grain (MGS), T2 - Corn Grain rehydrated (MGR), T3 - Sorghum Dry Grain (SGS) and T4 - Sorghum grain rehydrated (SGR). The animals were confined totaling in a trial period of 65 days. On the last day

¹Bacharel em Zootecnia pelo Instituto Federal Goiano – Campus Ceres – GO

²Graduando em Zootecnia - Instituto Federal Goiano – Campus Ceres – GO

³Docente do Instituto Federal Goiano – Campus Ceres – GO

*Autora para correspondência: flavia.abrao@ifgoiano.edu.br

Recebido para publicação em 01 de agosto de 2016

Aceito para publicação em 16 de agosto de 2016

of the experiment, the collection of rumen fluid with the aid of a catheter and a sterile syringe was held for further implementation of the macroscopic, physical-chemical and microbiological analysis. Each fluid was processed (serial dilution) and inoculated in plates containing the agar MacConkey. After microbial development took place quantification of colonies and thirteen bacterial isolates were picked and identified by biochemical tests. Macroscopic analysis of rumen fluid from lambs presented olive green color, aromatic odor and slightly viscous consistency for all treatments. The pH was altered ($P < 0.05$) of treatment effect. Different treatments have a similar effect on the population of enterobacteria fermenting lactose (Lac +), not fermenting lactose (Lac -) and on the total number of zoonotic bacteria ($P > 0.05$). The population of enterobacteria does not suffer influences due to the processing and the type of grain. The treatment Sorghum Grain Dry provided greater diversity of enterobacteria in the rumen.

Keywords: Zoonotic bacteria. Ruminal microflora. Sheep.

Introdução

O milho e o sorgo possuem características importantes na dieta de ruminantes por serem alimentos ricos em amido, esses constituem a principal fonte energética nos alimentos concentrados para alimentação animal. Como no Brasil a dieta de ruminantes é predominantemente composta de forragem volumosa, o milho e o sorgo surgem como opções de alimento durante o período de estiagem. Nesta situação, o fornecimento destes alimentos garante a energia digestível suficiente para melhores resultados de desempenho (LUCCI *et al.*, 2008).

A moagem dos grãos cereais é o processo em que reduz o tamanho de partícula dos grãos, por meio do moinho de martelo e peneira. O peneiramento, seguido da moagem, determina o grau de redução do tamanho de partícula, que pode influenciar na digestibilidade dos nutrientes (BELLAVIER; NONES, 2000). Esse processamento rompe parcialmente o pericarpo e aumenta a superfície de contato e torna o endosperma mais acessível aos microrganismos ruminais, porém tem pouco impacto sobre a matriz proteica presente no endosperma vítreo (BATALHA, 2015).

Outro processamento importante é a reidratação. Quando o grão de milho e de sorgo é devidamente reidratado e ensilado, há aumento na digestibilidade do amido do grão devido à fragilização e ao rompimento parcial da matriz proteica, proporcionada pela ação dos ácidos da fermentação (HOFFMAN; SHAVER, 2011). O amido pode também sofrer o processo de gelatinização, devido ao aquecimento proveniente do processo de fermentação da silagem, aumentando a sua susceptibilidade ao ataque enzimático (MOURA, 2013).

A família Enterobacteriaceae são bactérias anaeróbias facultativas, bastonetes Gram negativas, frequentemente encontradas no intestino de humanos e animais, amplamente distribuídas no ambiente e, encontradas com frequência no ecossistema ruminal. *Escherichia coli* e espécies do gênero *Salmonella* são importantes grupos de bactérias entéricas e agentes zoonóticos. Os ruminantes são reservatórios de cepas patogênicas desses microrganismos, e infecções nos seres humanos estão associadas com o contato indireto ou direto com fezes, líquido ruminal ou com as carcaças de animais contaminados (McEVOY *et al.*, 2003).

Estudos são realizados sobre a colonização do ambiente ruminal por esses microrganismos, quanto ao papel que desempenham no rúmen ou seu impacto sobre a saúde dos animais (CALLAWAY *et al.*, 2009). Esse grupo de bactérias pode desempenhar papel importante na manutenção do baixo nível de oxigênio disponível no ambiente ruminal (ARCURI *et al.*, 2011). Em contrapartida Khafipour *et al.* (2011) relatam que o ambiente ruminal com pH baixo proporcionado por dietas ricas em grãos favorece o crescimento de *E. coli* com gene de virulência que podem apresentar vantagem destas condições no rúmen para desencadear uma resposta inflamatória.

Com o intuito de reduzir a presença desses patógenos, vêm sendo realizadas pesquisas buscando avaliar o efeito de manejos na nutrição sobre a modulação microbiana no rúmen.

Poucos estudos relatam a influência da dieta sobre a prevalência destas bactérias no ambiente ruminal de pequenos ruminantes. Nesta pesquisa objetivou-se avaliar características físico-químicas e a população de entero-

bacteriacea no fluido ruminal de borregas confinadas, alimentadas com diferentes tipos de processamento do milho e do sorgo.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Ovinocultura do Instituto Federal Goiano - Campus Ceres, localizado no município de Ceres – Goiás, no período de Fevereiro a Maio de 2015.

Foram utilizadas 28 borregas da raça Santa Inês com idade média de nove meses, peso médio inicial de 36 kg, confinadas em baias coletivas, com comedouros e bebedouros e área de 15 m², distribuídas aleatoriamente em quatro lotes com sete animais, sendo cada animal uma repetição. As borregas receberam dietas isoenergéticas e isoprotéicas com relação volumoso:concentrado de 40:60 na matéria seca (MS), sendo os tratamentos: Milho Grão Seco (MGS), Milho Grão Reidratado (MGR), Sorgo Grão Seco (SGS) e Sorgo Grão Reidratado (SGR), balanceadas de acordo com o NRC (1985).

O milho e o sorgo foram moídos em moinho do tipo martelo com peneira de crivo 3 mm. O mesmo procedimento de moagem foi feito em outra fração da mesma partida dos grãos, e posteriormente reidratado, estimando para umidade de 35%, e ensilados em silo trincheira por 90 dias.

Para a avaliação da composição bromatológica dos tratamentos, foram efetuadas as determinações da matéria seca (MS) e proteína bruta (PB), conforme a metodologia descrita por Silva; Queiroz (2002).

O experimento teve duração de 60 dias, sendo os 15 primeiros dias destinados à adaptação dos animais a dietas e instalações e três períodos experimentais de 15 dias, totalizando 45 dias de ensaio. O concentrado foi composto pelos alimentos testados (MGS, MGR, SGS e SGR), além de farelo de soja, uréia, suplemento

mineral para ovinos, calcário calcítico e monensina sódica. O volumoso da dieta foi o feno de capim bermudas (*Cynodom dactylon*). O fornecimento do alimento foi realizado duas vezes ao dia, 07:00 e 16:00 horas, na forma de dieta total, com água sempre à disposição dos animais.

A composição das dietas utilizadas em cada tratamento está especificada na Tabela 1.

Amostragem do fluido ruminal, exames macroscópicos e físico-químicos

A coleta de fluido ruminal foi realizada no período de oito às 11 horas da manhã, no último dia do confinamento. Após prévio jejum entre oito a doze horas, foi realizado em uma área de aproximadamente cinco cm², localizada na parte ventral do abdomen esquerdo, abaixo da fossa paralombar e cranialmente à articulação do joelho, foram realizadas a tricotomia e a assepsia, com solução de Polivinilpirrolidona-Iodo (Iodo-PVP) (1%) (DIRKSEN, 1993). Foram puncionados aproximadamente 10 mL de fluido ruminal, com o auxílio de cateter humano (Solidor®, 14,2, BioMed healthCare Products, Har yana - Índia), acoplado a seringas estéreis.

Todas as amostras obtidas foram transportadas em caixas isotérmicas e armazenadas por no máximo uma hora em tubos de ensaio vedados e estéreis. As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de microbiologia do Instituto Federal Goiano (Campus Ceres).

A análise macroscópica do líquido coletado foi realizada imediatamente após a coleta, em um tubo de vidro contendo cinco mL do fluido amostrado, para avaliação da cor, odor e viscosidade (DIRKSEN, 1993).

Para avaliação da atividade microbiana no rúmen utilizou-se o teste de redução do azul de metileno na concentração 0,03% (potencial redox). O pH do líquido ruminal foi estimado, utilizando um potenciômetro digital (DIRKSEN, 1993).

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais, expressa na matéria seca (% MS)

Variável	Tratamentos			
	MGS	MGR	SGS	SGR
Ingredientes (%)				
Feno	40,00	40,00	40,00	40,00
Milho Grão Seco	43,39	-	-	-
Milho Grão Reidratado	-	42,76	-	-
Sorgo Grão Seco	-	-	45,29	-
Sorgo Grão Reidratado	-	-	-	44,79
Farelo de soja	14,85	15,48	12,95	13,45
Ureia	0,30	0,30	0,30	0,30
Calcário calcítico	0,20	0,20	0,20	0,20
Suplemento mineral ¹	1,20	1,20	1,20	1,20
Monensina sódica	0,06	0,06	0,06	0,06
Composição química (%)				
Matéria Seca (MS)	88,76	74,72	88,82	75,92
Nutrientes digestíveis totais (NDT)	77,12	76,76	76,88	75,98
Proteína bruta (PB)	15,92	16,16	15,26	15,68
Extrato etéreo (EE)	2,24	2,36	1,76	1,94
Fibra detergente neutro (FDN)	36,04	37,18	38,26	38,02
Fibra detergente ácido (FDA)	18,06	18,96	19,26	19,56
Matéria Mineral (MM)	3,16	3,28	2,58	3,10
Cálcio (Ca)	0,39	0,49	0,39	0,44
Fósforo (P)	0,30	0,34	0,29	0,32
pH	5,23	4,63	5,21	4,58

¹Composição por kg do produto: Vitamina A 50.000 UI, Vitamina E 312 UI, Ferro 1.000 mg, Manganês 3.000 mg, Zinco 5.000 mg, Iodo 60 mg, Cobalto 80 mg, Selênio 10 mg, Magnésio 10 g, Enxofre 12 g, Cálcio 140 g, Fósforo 65 g, Umidade 10 g, Sódio 130 g, Flúor 650 mg.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2016.

Cultivo, quantificação, isolamento e identificação de Enterobacteriaceae

Diluições decimais do líquido ruminal foram preparadas, em tubos contendo nove mL de solução salina estéril. Após cada diluição os tubos foram homogeneizados durante três minutos e alíquotas de 100 µL das diluições 10⁻² e 10⁻⁴ foram inoculadas em placas estéreis contendo meio ágar Mac Conkey. Os inóculos foram espalhados com alças de Drigalski estéreis nas placas, foram incubadas em estufa BOD a 39°C e monitoradas para o crescimento de colônias bacterianas por até 48 horas (VERMELHO *et al.*, 2006).

Para a identificação dos gêneros bacterianos mais prevalentes nas amostras de fluido ruminal, foi realizado o reisolamento e o cultivo em placas contendo meio ágar Mac Conkey em

estufa a 39°C por 24 horas. Após o crescimento exponencial, cada isolado foi inoculado em tubos contendo meio Rugai e Araújo, modificado por Pessoa e Silva. Os tubos foram incubados em estufa BOD a 39°C e posteriormente feito a leitura dos resultados após 24 horas, usando-se tabela ilustrativa para identificação presuntiva de Enterobacteriaceae, de acordo com Pessoa e Silva (1972).

Análise estatística

Para as variáveis estudadas foi adotado um delineamento inteiramente ao acaso. As quantificações de Enterobacteriaceae no rúmen de ovinos em função dos quatro tratamentos foram comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, a variável pH foi comparada pelo teste de Tukey (a 5% de significância), sendo os dados processados pelo pacote esta-

tístico ASSISTAT 7.7 Beta, considerando o nível de significância de 5%. A positividade dos principais gêneros foi comparada pelo teste de Qui-quadrado com correção de Yates ($\alpha=5\%$), pelo software R (R Development Core Team, 2013).

Resultados e discussão

Exames macroscópicos e físico-químicos do fluido ruminal

Para todas as borregas alimentadas com concentrado basal mais os tratamentos testados (milho grão seco, milho grão reidratado, sorgo grão seco ou sorgo grão reidratado) e com volumoso feno de tifton (40% da dieta na MS), observou-se coloração verde oliva, odor aromático, levemente viscoso para o fluido ruminal.

A cor do líquido ruminal encontrada em nosso estudo corrobora com os resultados encontrados por Borges *et al.* (2011) que estu-

daram o líquido ruminal de ovinos confinados submetidos a dieta básica de feno de *Brachiaria decumbens* e suplementadas com níveis crescente de mistura mineral-energético-proteico e encontraram coloração verde variando a tonalidade (amarelado, acastanhado e oliva). Dirksen (1993) relatou que a cor do suco ruminal pode variar de acordo com a alimentação ofertada aos animais.

A atividade da microbiota ruminal apresentou-se levemente inativa, sendo observado o potencial de redução do azul de metileno (PRAM) acima de três minutos para a maioria dos animais, porém foi observado em alguns animais microbiota ruminal mais ativa; com PRAM menor que três minutos para um animal do tratamento MGS, um do MGR e dois do SGS. O pH ruminal demonstrou-se mais ácido ($P<0,05$) para ovinos alimentados com MGR (6,24) e menos ácido para MGS e SGS (6,75 e 6,61, respectivamente) (TABELA 2).

Tabela 2 - Análise físico-química de borregas alimentadas com diferentes tipos de processamento de milho e de sorgo

Físico-química	Tratamentos				CV (%)
	MGS	MGR	SGS	SGR	
PRAM	> 3	> 3	> 3	> 3	-
pH	6,75 ^b	6,24 ^a	6,61 ^b	6,42 ^{ab}	3,6

Nota: Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV (%) – coeficiente de variação; PRAM – potencial de redução do azul de metileno. * MGS: milho grão seco, MGR: milho grão reidratado, SGS: sorgo grão seco, SGR: sorgo grão reidratado.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2016.

Segundo Van Soest (1994), o pH ruminal está relacionado com a alimentação ingerida, sendo controlada em maior parte pela saliva, que tem alto poder tamponante. As borregas alimentadas com dietas contendo os tratamentos MGR, apresentaram pH inferior aos constituídos por MGS e SGS. Observa-se uma tendência na redução do pH ruminal quando o grão passa pelo processo de reidratação e ensilagem. Acredita-se que o pH ruminal em todos os tratamentos poderia estar ainda mais baixo durante o manejo normal desses animais, uma vez que os animais estavam em jejum entre 8 e 12 horas. Segundo Vieira *et al.*, (2015), animais nesse período podem estar sob efeito tamponante da saliva.

Em contrapartida, no trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2015), o pH ruminal dos cordeiros alimentados com milho grão seco moído e silagem de grão úmido de milho, não sofreu

alterações entre os processamentos, apresentando médias de 6,62 e 6,63, respectivamente.

Cultivo e quantificação de Enterobacteriaceae

Após o cultivo, foi observado o desenvolvimento de Enterobacteriaceae em todos os tratamentos. Os diferentes tratamentos exerceram efeito semelhante sobre a população de enterobactérias fermentadoras de lactose (Lac +), não fermentadoras de lactose (Lac -) e sobre o número total de bactérias enterozoonóticas ($P>0,05$), conforme apresentado na Tabela 3.

Em razão da dieta apresentar a mesma relação volumoso:concentrado e serem isoenergéticas e isoproteicas, isso poderia ter contribuído para a similaridade sobre o número unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹) das bactérias entéricas.

Tabela 3 - Médias de unidades formadoras de colônias de enterobactérias isoladas do ambiente ruminal de borregas submetidas a diferentes dietas.

Enterobactérias	Tratamentos			
	MGS	MGR	SGS	SGR
Lac +	1,43 x 10 ²	1,14 x 10 ³	4,28 x 10 ²	1,44 x 10 ⁴
Lac -	8,57 x 10 ²	1,29 x 10 ⁵	1,73 x 10 ⁴	5,9 x 10 ⁴
Total	1,0 x 10 ³	1,3 x 10 ⁵	1,77 x 10 ⁴	7,34 x 10 ⁴

Nota: (Lac-) não fermentadoras de lactose e (Lac+) fermentadoras de lactose. Tratamentos semelhantes pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($\alpha = 5$). *MGS: milho grão seco, MGR: milho grão reidratado, SGS: sorgo grão seco, SGR: sorgo grão reidratado.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2016.

Identificação dos gêneros de bactérias

Para a dieta contendo MGS, foram reisoladas três colônias bacterianas, sendo 66,7% de *E. coli* e 33,3% de *E. coli* sacarose positiva. Dos isolados obtidos ($n = 2$) no tratamento MGR, 50% foram identificados como *Pseudomonas* sp. e 50% como *Klebsiella* sacarose ne-

gativa. No tratamento SGE, foram obtidos dois isolados, onde 50% *Pseudomonas* sp. e 50% *Alcaligenes* sp. Dos seis isolados obtidos no tratamento SGS, 16,7% foram identificados como *E. coli*, 16,7% como *Klebsiella* sacarose negativa, 16,7% como *Alcaligenes* sp. e 50% como *Enterobacter* sacarose negativa (TABELA 4).

Tabela 4 - Distribuição de gênero de enterobactérias no líquido ruminal de borregas alimentadas com diferentes tipos de processamento do milho e do sorgo

Gênero	Total		MGS		MGR		SGS		SGR	
	N		N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Pseudomonas</i> sp.	2		1	50,0	0	0,0	0	0,0	1	50,0
<i>Escherichia coli</i>	3		0	0,0	2	66,7	1	16,7	0	0,0
<i>E. coli</i> sacarose+	1		0	0,0	1	33,3	0	0,0	0	0,0
<i>Klebsiella</i> sacarose-	2		1	50,0	0	0,0	1	16,7	0	0,0
<i>Alcaligenes</i> sp.	2		0	0,0	0	0,0	1	16,7	1	50,0
<i>Enterobacter</i> sacarose-	3		0	0,0	0	0,0	3	50,0	0	0,0
Total	13		2	100	3	100	6	100	2	100

Nota: Não houve diferença entre os gêneros dentro de cada tratamento, pelo teste não paramétrico de Qui-quadrado ($P > 0,05$). * MGS: milho grão seco, MGR: milho grão reidratado, SGS: sorgo grão seco, SGR: sorgo grão reidratado.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2016.

O tratamento milho grão reidratado (MGR) proporcionou prevalência de *Escherichia coli* (100%) dentre os isolados. Sendo dos três isolados, um deles foi classificado como *E. coli* sacarose positiva. Provavelmente a maior frequência dessa espécie, ocorreu pela maior digestibilidade do grão. Esse resultado corrobora com os descritos por Vieira *et al.* (2015), que relatam que há predominância de *E. coli* no rúmen de novilhos alimentados com alta quantidade de grãos em relação aos bovinos mantidos a pasto.

Observou-se uma maior frequência do gênero *Enterobacter* em borregas alimentadas com grãos de sorgo seco. Com três isolados para esse gênero (50% de prevalência). Em contrapartida a esse estudo, Freitas *et al.* (2014) relataram que para bezerros alimentados com

silagem da planta inteira de sorgo houve maior frequência do gênero *Enterobacter* no fluido ruminal. Por outro lado, nesse mesmo estudo os autores encontraram prevalência do *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. para vacas leiteiras alimentadas com silagem de planta inteira de sorgo e pastagem, respectivamente.

A maior diversidade de enterobactérias encontradas para o tratamento SGS poderia ser justificada pelo perfil nutricional deste alimento, que durante o processo de ensilagem pode ter ocorrido perdas e/ou alterações na disponibilidade dos nutrientes. Futuros estudos devem ser realizados para elucidar o efeito do processamento do sorgo sobre o perfil dos nutrientes como o amido e fração proteica.

Conclusão

A quantidade de enterobactérias não sofre influência do processamento de reidratação e ensilagem do sorgo e do milho na dieta de ovinos. Há uma variação de gêneros de Enterobacteriaceae no ambiente ruminal de ovinos confinados, recebendo dietas formuladas com diferentes processamentos do milho e do sorgo.

Comitê de ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Federal Goiano (CEUA – IF Goiano), com número do Protocolo: 017/2014.

Agradecimentos

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Ceres, pelo apoio financeiro e pela disponibilidade dos animais. À Agrocria Nutrição Animal e Sementes pelo financiamento do sorgo. Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida.

Referências

- ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rumen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed). **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011.
- BATALHA, C. D. A. **Processamento de grãos de milho para vacas leiteiras em pastagem tropical**. 2015. 73 p. Dissertação (Ciência Animal e Pastagem), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba: ESALQ, 2015.
- BELLAVER, C.; NONES, K. A importância da granulometria, da mistura e da peletização da ração avícola. In: SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA, 4, 2000, Goiânia. **Anais...** Goiânia: UFG, 2000.
- BORGES, N. C. *et al.* Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do fluido ruminal de ovinos confinados submetidos a crescentes níveis de mistura mineral energético-protéica. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 392-399, 2011.
- CALLAWAY, T. R.; CARR, M. A.; EDRINGTON, T. S. Diet, *Escherichia coli* O157: H7, and cattle: a review after 10 years. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 11, p. 67-79, 2009.
- DIRKSEN, G. Sistema digestivo. In: DIRKSEN, G., *et al.* (Ed.). **Rosenberger**: exame clínico dos bovinos. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.167-169, 1993.
- 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 Veterinária**, v. 46, p. 457-462, 2014.
- HOFFMAN, P. C.; SHAVER, R. D. Grain quality: A dairy cow's perspective. In: WISCONSIN CROP MANAGEMENT CONFERENCE, 2011, Madison, Wisconsin. **Proceedings...** Madison, Wisconsin: University of Wisconsin Extension, 2011. p.51-73, 2011.
- KHAFIPOUR, E. *et al.* Population structure of rumen *Escherichia coli* associated with subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 1, p. 351-360, 2011.
- LUCCI, C. S. *et al.* Processamento de grãos de milho para ruminantes: digestibilidade aparente e “in situ”. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 45, n. 1, p. 35-40, 2008.
- McEVROY, J.M.; DOHERTY, A.M.; SHERIDAN, J. J. The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 4, p. 693-700, 2003.
- MOURA, A. M. **Milho diferindo no processamento para vacas leiteiras em pastejo**. 2013. 80 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.
- NRC -NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of sheep**. Washington, D.C.: NationalAcademy Press, 1985.
- OLIVEIRA, L. S. *et al.* Processamento do milho grão sobre desempenho e saúde ruminal de cordeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 7, p. 1292-1298, 2015.
- PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios de Rugai e lisinamotilidade combinados em um só tubo para a identificação presumtiva de enterobactérias. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 32, p. 97-100, 1972.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, 2013.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos (Métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994, 476p.
- VERMELHO, A. B. *et al.* **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- 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. 1-6, 2015.