

## Efeitos da Monensina sobre a Fermentação e Sensibilidade de Bactérias Ruminais de Bovinos sob Dietas Ricas em Volumoso ou Concentrado

Rogério de Paula Lana<sup>1</sup>, James B. Russell<sup>2</sup>

**RESUMO** - Objetivou-se avaliar os efeitos da monensina sobre as mudanças nos padrões de fermentação e resistência à perda do potássio intracelular das bactérias ruminais provenientes de quatro bovinos recebendo dietas ricas em volumoso ou concentrado. As bactérias obtidas por centrifugação diferencial foram resuspenas em um meio pobre em potássio, no qual foi medida a perda do potássio intracelular, em 10 minutos de incubação, pelo uso de nível crescente de monensina. Os produtos de fermentação foram obtidos após 24 horas de incubação da cultura com feno de gramínea (100 mg/10 mL). As bactérias obtidas de animais recebendo dieta com 90% de concentrado produziram metade do metano e apresentaram metade da relação acetato propionato que as bactérias de animais recebendo forragem. Mais monensina foi requerida para diminuir a produção de metano e a relação acetato:propionato em bactérias de animais alimentados com 90% de concentrado que naquelas de animais recebendo forragem. A quantidade de monensina necessária para causar metade da perda máxima de potássio intracelular em bactérias de animais recebendo 90% de concentrado foi 12 vezes maior que aquela necessária em bactérias de animais recebendo forragem. Uma vez que as bactérias de animais recebendo forragem são mais sensíveis à monensina que aquelas de animais recebendo dietas ricas em concentrado, espera-se maior efeito deste ionóforo no desempenho de bovinos em dietas ricas em volumoso.

Palavras-chave: bactérias, fermentação, metano, monensina, potássio intracelular, rúmen

## Effects of Monensin on Fermentation and Sensitivity of Ruminal Bacteria from Bovines Fed High Concentrate or Forage Diets

**ABSTRACT** - The objective of this experiment was to evaluate the effects of monensin on changes of fermentation pattern and resistance to intracellular potassium losses from ruminal bacteria of four cattle receiving high forage or high concentrate diets. The bacteria obtained by differential centrifugation were resuspended in a low potassium media. The intracellular potassium losses were measured after 10 minutes of incubation at increasing levels of monensin. The fermentation products were obtained after 24 hours of culture incubation with grass hay (100 mg/10 mL). Bacteria taken from cattle fed with 90% concentrate diet produced half as much methane and had 2-fold lower acetate to propionate ratio than bacteria from cattle fed forage. More monensin was required to decrease the methane production and the acetate to propionate ratio of bacteria from cattle fed 90% concentrate than bacteria from cattle fed forage. The amount of monensin needed to cause half of the maximal potassium intracellular losses in bacteria from animals fed 90% concentrate was 12-fold greater than the amount needed for bacteria taken from forage-fed cattle. Once those bacteria from forage-fed cattle are inherently more sensitive to monensin than bacteria from concentrate-fed cattle diets, a greater benefit of monensin on animal performance in high forage diets is expected.

Key Words: bacteria, fermentation, intracellular potassium, methane, monensin, rumen

### Introdução

O ionóforo monensina tem sido utilizado na alimentação de bovinos de corte por mais de 20 anos para aumentar a eficiência alimentar (GOODRICH et al., 1984; RUSSELL e STROBEL, 1989). A monensina é mais eficiente contra bactérias gram-positivas – maiores produtoras de hidrogênio, precursor de metano – que contra gram-negativas (CHEN e WOLIN, 1979). Quando a produção de hidrogênio e metano diminui, os cofatores reduzidos durante a

fermentação dos carboidratos são oxidados na produção do propionato, aumentando a retenção de energia pelo animal (GOODRICH et al., 1984).

O efeito da monensina sobre a ecologia microbiana ruminal tem proporcionado resultados contraditórios, uma vez que as bactérias obtidas diretamente do rúmen apresentam coloração gram variável (HUNGATE, 1966) e a maioria ainda não é classificada pelo sequenciamento do RNA ribossômico (KRAUSE e RUSSELL, 1996). DAWSON e BOLING (1983) verificaram que bovinos tratados

<sup>1</sup> Professor do Departamento de Zootecnia - UFV - 36.571-000 - Viçosa, MG; E-mail: rlana@mail.ufv.br

<sup>2</sup> Professor de Microbiologia - Section of Microbiology - Cornell University - Ithaca, NY, USA - 14853

com monensina apresentaram uma população bacteriana ruminal mais tolerante à monensina *in vitro* que a população bacteriana de animais controle. Entretanto, esta diferença foi primariamente causada pelo declínio das bactérias resistentes à monensina nos animais controle, em vez do aumento da população resistente nos animais tratados com o ionóforo.

A molécula de monensina é um poliéter carboxílico que se liga a íons metálicos e os carrega através da membrana celular (PRESSMAN, 1976). A monensina tem um grupamento carboxílico exposto, devendo ser não-protonado para favorecer seu movimento livremente através da membrana celular. A ligação sequencial de íons metálicos e prótons permite a monensina agir como metal/próton antiporte. O grupamento carboxílico tem um pKa ligeiramente alcalino, sendo a monensina mais hábil em inibir bactérias (*Streptococcus bovis*, por exemplo), quando o pH é ácido (CHOW e RUSSELL, 1990).

A monensina cataliza a saída de potássio nas bactérias sensíveis (RUSSELL, 1987), e recente pesquisa (LANA e RUSSELL, 1996) indicou que a perda de potássio intracelular pode ser usada para monitorar o efeito de ionóforos na ecologia ruminal. Quando bovinos receberam 350 mg de monensina por dia, a concentração de monensina necessária para causar metade da perda máxima de potássio (Kd) aumentou oito vezes, e esta mudança ocorreu dois dias após o início da suplementação.

A monensina é tipicamente oferecida a animais em confinamento recebendo grandes quantidades de cereais, e os resultados de 228 ensaios (11274 animais) indicaram que o aumento na eficiência alimentar foi de 6,4% (GOODRICH et al., 1984). A monensina também tem sido utilizada em bovinos sob pastejo, mas existem poucos dados sobre a eficiência alimentar nestas condições. Animais em pastagens e suplementados com monensina ganharam 13,5% mais peso que animais controle (GOODRICH et al., 1984), sugerindo que as bactérias ruminais de animais recebendo forragem podem ser mais sensíveis ao ionóforo que aquelas de animais recebendo dieta contendo concentrado.

O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos da monensina sobre os produtos de fermentação e a resistência bacteriana à perda do potássio intracelular, com aumento gradativo do ionóforo *in vitro*, em microrganismos provenientes de animais recebendo forragem ou dieta rica em concentrado. Estas técnicas permitem acessar a sensibilidade das bactérias ruminais aos ionóforos, nos quais maior sensibilidade

em função da dieta é indicativo de maior potencial de mudança na população microbiana ruminal pelo uso de ionóforos, com maior benefício em melhorar o desempenho animal pelo uso dos mesmos na alimentação.

### Material e métodos

Quatro bovinos fistulados no rúmen foram alimentados com 100% de forragem ou 90% de concentrado e 10% de forragem, restritos a 95% do consumo *ad libitum*. Com isto, os animais consumiram todo o alimento fornecido, evitando a seleção da dieta. A forragem utilizada foi o feno de capim-Timóteo (*Phleum pratense*) (12% de PB; 61% de FDN; 42% de FDA; 0,76% de Ca; 0,34% de P; 0,23% de Mg; 2,18% de K; e 0,02% de Na). A dieta rica em concentrado (13% de PB; 20% de FDN; 10% de FDA; 0,11% de Ca; 0,36% de P; 0,15% de Mg; e 0,75% de K) continha 81% de milho quebrado, 9% de farelo de soja e 10% de feno de capim-Timóteo, balanceado de acordo com as recomendações do NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC (1996). Água e sal mineral foram fornecidos à vontade.

Foi coletada digesta de pelo menos cinco locais no rúmen, duas a três horas pós-alimentação, sendo a amostra coada por meio de quatro camadas de gaze e o pH medido imediatamente em peagômetro digital. O líquido ruminal (400 mL) foi transportado ao laboratório e centrifugado anaerobicamente a 500 x g (5 minutos, 5°C) para remover partículas alimentares e protozoários e, em seguida, a 10.000 x g (15 minutos, 5°C) para isolar as bactérias. O sobrenadante foi estocado a -15°C.

As bactérias mistas ruminais foram ressuspensas em 10 mL de um meio de cultura anaeróbico, apresentando-se altamente concentradas. O meio de cultura continha 292 mg de  $K_2HPO_4$ , 292 mg de  $KH_2PO_4$ , 480 mg de  $(NH_4)_2SO_4$ , 480 mg de NaCl, 100 mg de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 64 mg de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 4000 mg de  $Na_2CO_3$ , 125 mg de  $Na_2S \cdot 9H_2O$ , 1,08 mmol de ácido isobutírico, 0,91 mmol de ácido isovalérico, 0,92 mmol de ácido valérico, 0,88 mmol de ácido DL-2-metilbutírico, 1000 mg de Trypticase (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EUA), 500 mg de levedura e 600 mg de cisteína hidrolórica por litro. A suspensão concentrada de bactéria foi transferida anaerobicamente para o meio de cultura e a densidade ótica foi monitorada. Uma vez que a densidade ótica atingiu 6 unidades (600 nm, cubeta de 1 cm, espectrofotômetro Gilford 260), o meio resultante (10 mL) foi transferido anaerobicamente para tubos

contendo 0,10 g de feno misto de gramíneas (10% de PB; 65% de FDN; 43% de FDA; 0,45% de Ca; 0,29% de P; 0,15% de Mg; 2,39% de K; e 0,02% de Na) e 0 a 10  $\mu$ M de monensina como concentração final, em duplicatas. Os tubos foram vedados com rolhas de borracha, selados com capas de alumínio e incubados anaerobicamente a 39°C por 24 horas.

Amostras de gases foram obtidas sob pressão dos tubos de incubação por seringas com válvulas, evitando perda de gases, e injetadas diretamente no cromatógrafo a gás (Gow-Mac, modelo 550), para determinar metano e hidrogênio. O meio de cultura foi centrifugado para remover o alimento não-digerido e as bactérias (13000 x g, 5 minutos, 22°C). Os ácidos graxos voláteis no líquido sobrenadante foram determinados em cromatografia líquida de alto desempenho (Beckman, modelo 334). As células bacterianas foram tratadas com NaOH 0,2 N (100°C, 15 minutos), e a proteína foi analisada pelo método de LOWRY et al. (1951).

No experimento para determinação da resistência das bactérias à perda do potássio intracelular pelo uso de níveis crescentes de monensina, segundo LANA e RUSSELL (1996), as bactérias mistas ruminais foram inicialmente ressuspensas em um meio de cultura anaeróbico, faltando amônia, sulfeto, Trypticase, extrato de levedura e ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada. A concentração final de células foi de duas densidades óticas, equivalente a 600 mg de proteína microbiana por litro. Suspensões de células (3 mL) foram transferidas anaerobicamente para tubos contendo 0 a 6,4 mM de monensina e incubados a 39°C por 10 minutos. Amostras (1 mL) foram centrifugadas (13000 x g, 5 minutos) em tubos de microcentrífuga contendo 0,3 mL de óleo silicone (mistura 50:50 dos óleos Hysol 550 e 560 [Hysol Co., Olean, NY]). Os tubos de microcentrífuga foram congelados (-15°C) e o fundo dos mesmos foram cortados com um alicate, separando-se os pellets do óleo silicone. Os pellets foram então digeridos à temperatura ambiente por 24 horas em ácido nítrico 3 N, removendo-se o material indigerido por centrifugação. O potássio foi determinado em espectrofotômetro de chama (Cole-Parmer 2655-00).

A perda de potássio foi estimada pelo decréscimo do potássio intracelular. Foram obtidas equações de regressão linear da recíproca da perda de potássio com a recíproca da concentração de monensina, determinando-se então a quantidade de monensina necessária para causar a metade da perda máxima de potássio intracelular ( $K_d$ ) e a perda máxima de

potássio intracelular ( $K_{max}$ ). O intercepto da ordenada da equação de regressão correspondeu a  $-1/K_{max}$  e o intercepto da abscissa  $-1/K_d$ .

A análise estatística dos parâmetros de fermentação *in vitro* foram feitas usando o teste "t" (STEEL e TORRIE, 1960), no qual cada dieta foi fornecida a dois animais e as incubações foram feitas em duplicata. No caso da avaliação do efeito de níveis crescentes de monensina sobre os parâmetros de fermentação *in vitro*, foi utilizada a análise de regressão.

## Resultados e Discussão

Bovinos alimentados com dieta contendo 90% de concentrado apresentaram pH ruminal variando de 6,2, imediatamente antes da alimentação, a 5,5, duas a três horas pós-alimentação; neste caso, a concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) foi de 130 mM e a relação acetato:propionato de 1,5:1. Em dieta contendo somente volumoso, o pH ruminal foi mais constante (6,7), a concentração de AGV foi de 80 mM e a relação acetato: propionato de 4:1.

Quando as bactérias ruminais em bovinos alimentados com dieta rica em concentrado ou exclusivamente em forragem foram incubadas *in vitro* com feno de gramínea por 24 horas, a produção total de AGV foi de 64 e 72 mM, respectivamente (Figura 1a). As bactérias provenientes de dieta rica em concentrado produziram menos acetato, mais propionato e menos metano que bactérias provenientes de dieta de volumoso ( $P < 0,001$ ) e as taxas de acetato:propionato foram de 1,75:1 e 3,75:1, respectivamente (Figuras 1b e 1c). Não foi detectada produção de hidrogênio. O meio de cultura foi tamponado por carbonato de sódio, fazendo com que o pH não variasse ao longo da incubação, mantendo-se em 6,5.

Animais alimentados com 90% de concentrado apresentaram pH ruminal normalmente menor que 6,0. A inabilidade das bactérias de dietas ricas em concentrado em produzir grande quantidade de metano e aumentar a relação acetato:propionato é consistente com o efeito inibitório da acidez sobre a metanogênese. Trabalho publicado recentemente indicou que as bactérias mistas ruminais perdem a habilidade de produzir metano a partir de hidrogênio e dióxido de carbono em baixo pH e alta concentração de ácidos graxos voláteis (VAN KESSEL e RUSSELL, 1996).

O inóculo (seis unidades de densidade ótica) foi alto em relação à concentração de substrato (10 mg/mL) e o crescimento dos microrganismos metanogênicos foi restringido, uma vez que, dentro do

tempo necessário para que os mesmos aumentassem a população *in vitro*, todo o carboidrato disponível já havia sido utilizado. Com isto, a menor produção de metano das bactérias provenientes da dieta rica em concentrado foi um reflexo da menor população de microrganismos metanogênicos existentes *in vitro*, assim como *in vivo*, provavelmente devido à sua inibição pelo pH ruminal, conforme relatado por VAN KESSEL e RUSSELL (1996).

A monensina acarretou pequeno, mas significativa ( $P < 0,001$ ), decréscimo na produção de AGV (Figura 1a) e reduzida relação acetato:propionato ( $P < 0,001$ ; Figura 1b). As bactérias de animais que receberam forragem foram mais sensíveis à monensina que aquelas de dietas contendo 90% de concentrado. Quando a concentração de monensina foi aumentada em unidades logarítmicas de 0 para 10 mM, a relação acetato:propionato (Figura 1b) das bactérias de animais recebendo forragem declinou 1,4 unidades (de 3,8 para 2,4) e das bactérias de animais em dieta rica em concentrado, somente 0,5 unidades (de 1,75 para 1,25). Mesmo pequena concentração de monensina causou decréscimo na produção de metano das bactérias provenientes de animais alimentados com forragem e a resposta foi ainda maior em altos níveis de monensina (Figura 1c). Quando bactérias de animais recebendo 90% de concentrado foram tratadas com monensina, não houve decréscimo na produção de metano até a concentração de monensina ultrapassar 0,5  $\mu\text{M}$ . Altas concentrações de monensina diminuíram a produção de metano, mas essa produção já era baixa.

A monensina quase sempre causa decréscimo nas produções de metano e na relação acetato:propionato, sendo estas características utilizadas como rotina para avaliação de ionóforos e aditivos ruminais (CHALUPA, 1977; BERGEN e BATES, 1984; e RUSSELL e STROBEL, 1989). O relacionamento entre metano e acetato:propionato deve ser estequiométrico, mas há falta de informação sobre essa relação. WOLIN (1960) publicou um esquema matemático para prever a produção de metano ruminal por intermédio do balanço dos ácidos graxos voláteis. A comparação de valores preditos versus observados indicou que todo o decréscimo na produção de metano causado pela monensina pode ser explicado pela mudança nos AGVs e por decréscimo na relação acetato:propionato (Figura 2). O balanço de fermentação proposto por WOLIN (1960) tendeu a superestimar a produção de metano em 10%, particularmente quando as bactérias foram

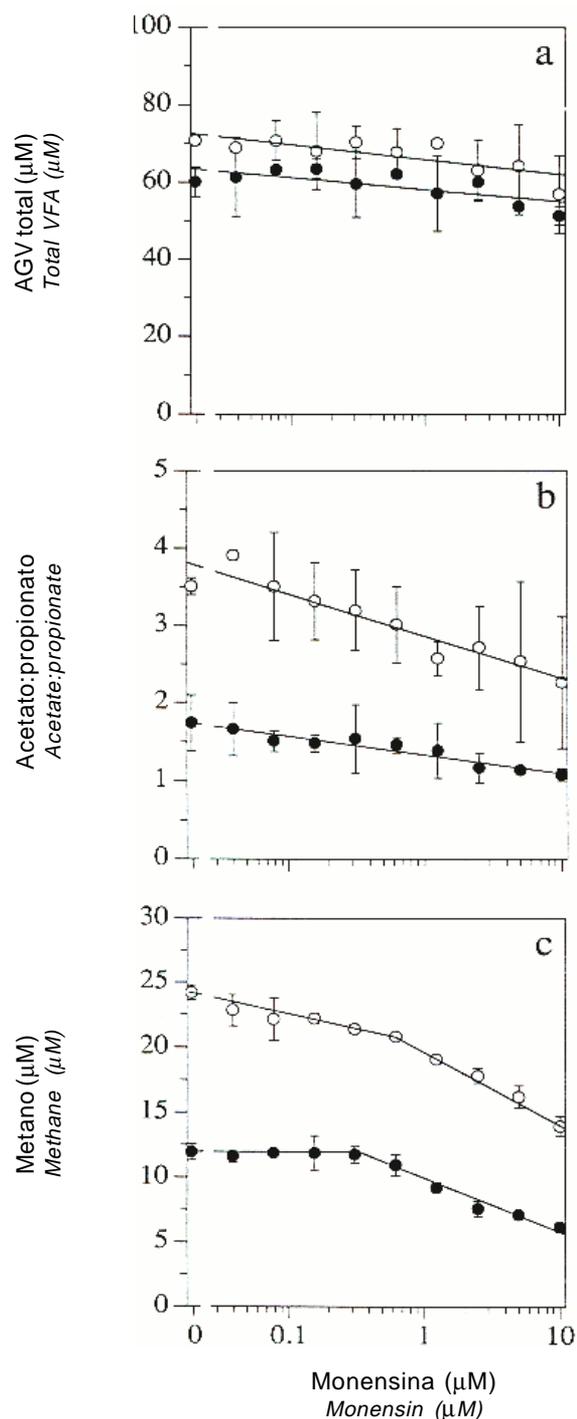


Figura 1 - Efeito da monensina na produção de ácidos graxos voláteis totais (a), relação acetato:propionato (b) e produção de metano (c) por bactérias mistas ruminais, incubadas com feno de gramínea moído por 24 horas. Os símbolos abertos representam bactérias de animais alimentados somente com forragem e os símbolos fechados, bactérias de animais em 90% de concentrado.

Figure 1 - Effect of monensin on the total volatile fatty acid production (a), acetate to propionate ratio (b) and methane production (c) of mixed ruminal bacteria that were incubated with ground hay for 24 hours. Open symbols are bacteria from cattle fed only forage and closed symbols are bacteria from cattle fed 90% concentrate.

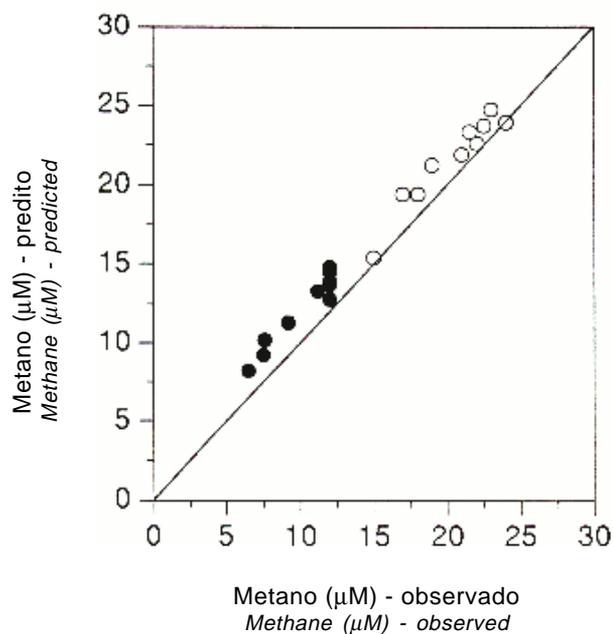


Figura 2 - Relação entre a produção de metano observada e a quantidade predita pelo balanço de fermentação de Wolin. Os símbolos abertos representam bactérias de animais alimentados somente com forragem e os símbolos fechados, bactérias de animais em 90% de concentrado.

Figure 2 - Relationship between observed methane production and the amount predicted by the Wolin fermentation balance. Open symbols are bacteria from cattle fed only forage and closed symbols are bacteria from cattle fed 90% concentrate.

obtidas de animais alimentados com dieta concentrada. O balanço de fermentação de Wolin não inclui células bacterianas como produto final de fermentação, tendendo assim a aumentar a estimativa de produção de metano (REICHL e BALDWIN, 1975).

A maioria das bactérias tem alta concentração de potássio intracelular, podendo apresentar elevado gradiente de potássio, especialmente se sua concentração extracelular for baixa (BAKKER e MANGERICH, 1981). O rúmen é um ambiente rico em sódio, sendo a concentração de sódio freqüentemente maior que 100 mM. A adesão não-específica de sódio à célula bacteriana tem confundido a estimativa de gradiente de sódio, mas parece que as bactérias ruminais mantêm baixa concentração de sódio dentro em relação ao meio externo (STROBEL e RUSSELL, 1989). A maioria das bactérias mantêm um gradiente de pH (alcalino no meio interno), quando o pH extracelular é ácido, mas a força motora do

meio externo para o meio interno proveniente dos gradientes de pH e de sódio são normalmente muito menores que aquela do meio interno para o externo proporcionado pelo gradiente de potássio (RUSSELL, 1987; RUSSELL e STROBEL, 1989).

Segundo COSTERTON et al. (1974), as bactérias ruminais também apresentam grande quantidade de glicogênio intracelular. LANA e RUSSELL (1996) observaram que as bactérias mistas ruminais foram hábeis em manter o gradiente de potássio por até sete horas, mesmo quando não havia fontes de energia extracelular. A monensina causou perda quase imediata do potássio intracelular pelas bactérias mistas ruminais, mas a perda foi dependente da concentração de monensina. Parece que as bactérias ruminais podem usar reservas intracelulares para contrapor a monensina em manter constância no fluxo de potássio através da membrana celular.

As bactérias gram-negativas têm membrana externa que impedem que a monensina atinja a membrana celular, sendo, portanto, mais resistentes à monensina que as bactérias gram-positivas (RUSSELL e STROBEL, 1989). Trabalho anterior indicou que mesmo altas concentrações de monensina não exauriram as bactérias ruminais de todo o potássio (LANA e RUSSELL, 1996). O presente trabalho também indicou que aproximadamente 50% do potássio intracelular era resistente ao efeito da monensina (Figura 3a). Os valores de  $K_{max}$  das bactérias mistas ruminais provenientes de dietas contendo 90% de concentrado ou exclusivamente forragem foram similares, mas o  $K_d$  das bactérias provenientes de dietas contendo 90% de concentrado foi 12 vezes maior que o  $K_d$  de bactérias provenientes de dietas à base de volumoso (2130 versus 180 nM) (Figura 3b). O último resultado indica que as bactérias de animais alimentados com forragem foram mais sensíveis à monensina que as bactérias de animais alimentados com dietas ricas em concentrado. As diferenças no  $K_d$  foram consistentes com o efeito da monensina sobre os produtos de fermentação *in vitro*. A monensina sempre diminuiu a produção de metano e a relação acetato:propionato, mas a resposta em função do aumento do nível de monensina foi maior nas bactérias de animais alimentados com forragem, conforme relatado anteriormente.

Uma vez que as bactérias de ambas as dietas foram obtidas por centrifugação e mantidas na mesma fonte de energia e pH; a sensibilidade à monensina foi provavelmente uma propriedade das bactérias. A dieta rica em concentrado induziu abaixamento do pH

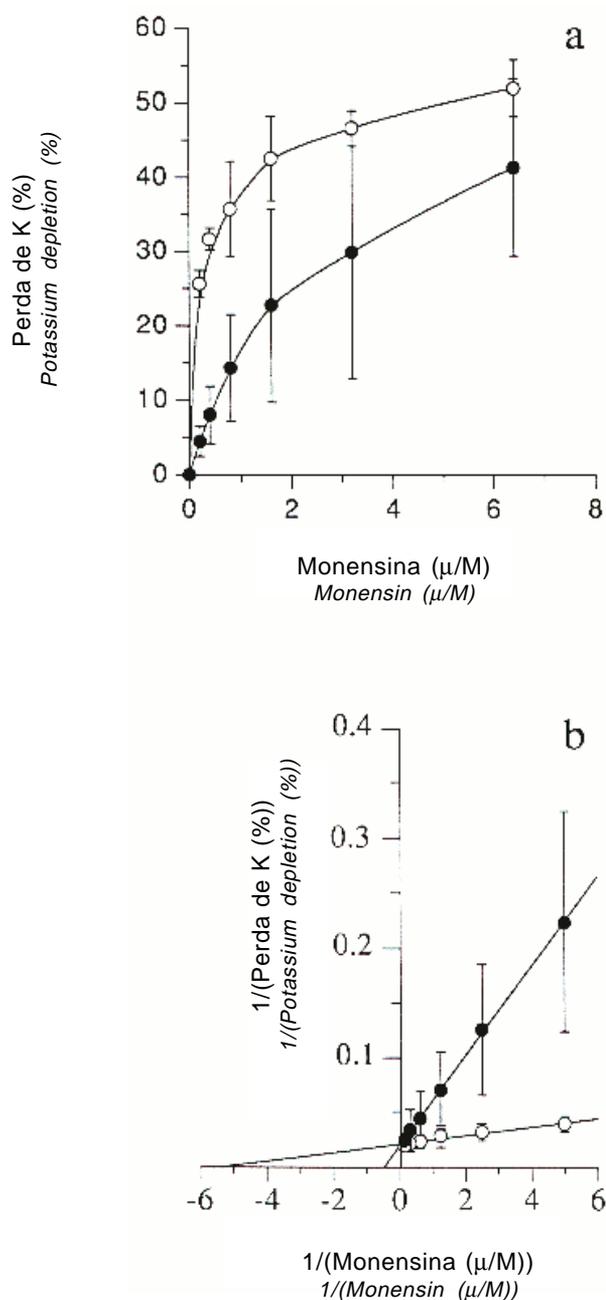


Figura 3 - Efeito da monensina na perda do potássio intracelular por bactérias mistas ruminais incubadas *in vitro* a 39°C por 10 minutos (a). O gráfico seguinte (b) mostra a dupla recíproca de 1/monensina versus 1/perda de potássio. Os símbolos abertos representam bactérias de animais alimentados somente com forragem e os símbolos fechados, bactérias de animais em 90% de concentrado.

Figure 3 - Effect of monensin on the potassium loss of mixed ruminal bacteria that were incubated *in vitro* at 39°C for 10 min (a). The next graph (b) shows a double-reciprocal plot of 1/monensin versus 1/potassium depletion. Open symbols are bacteria from cattle fed only forage and closed symbols are bacteria from cattle fed 90% concentrate.

*in vivo*, mas é pouco provável que o pH *per se* possa explicar o decréscimo na sensibilidade à monensina de bactérias provenientes de animais recebendo 90% de concentrado. As bactérias ruminais mais resistentes ao pH, *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* sp., são gram-positivas e sensíveis à monensina (RUSSELL e STROBEL, 1989). Pesquisa recente, entretanto, indicou que o uso de cereais promovendo modesto declínio no pH ruminal acarretou aumento em *Lactobacillus* produtores de bacteriocina (WELLS et al., 1997). Uma vez que bacteriocina tem modo de ação similar à monensina (CALLAWAY et al., 1997), é provável que os *Lactobacillus* produtores de bacteriocina selecionam bactérias resistentes à monensina.

### Conclusões

Bactérias ruminais provenientes de animais recebendo dieta exclusiva de forragem são mais sensíveis à monensina que aquelas de animais sob dietas ricas em concentrado, indicando que este ionóforo pode ter maior benefício no desempenho de bovinos em pastagens ou em dietas contendo elevado nível de volumoso em comparação àquelas ricas em concentrado.

### Referências Bibliográficas

- BAKKER, E.P., MANGERICH, W.E. 1981. Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. *J. Bacteriol.*, 146:820-826.
- BERGEN, W.G., BATES, D.B. 1984. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.*, 58:1465-1483.
- CALLAWAY, T.R., MELO, A.M.S.C., RUSSELL, J.B. 1997. The effect of nisin and monensin on ruminal fermentation *in vitro*. *Curr. Microbiol.*, 35:90-96.
- CHALUPA, W. 1977. Manipulating rumen fermentation. *J. Anim. Sci.*, 46:585-599.
- CHEN, M., WOLIN, M.J. 1979. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38:72-77.
- CHOW, J.M., RUSSELL, J.B. 1990. Effect of ionophores and pH on growth of *Streptococcus bovis* in bath and continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:1588-1593.
- COSTERTON, J.W., DAMGAARD, H.N., CHENG, J.K. 1974. Cell envelope morphology of rumen bacteria. *J. Bacteriol.*, 118:1132-1143.
- DAWSON, K.A., BOLING, J.A. 1983. Monensin-resistant bacteria in the rumens of calves on monensin-containing and unmedicated diets. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46:160-164.
- GOODRICH, R.D., GARRETT, J.E., GAST, D.R. et al. 1984. Influence of monensin on the performance of cattle. *J. Anim. Sci.*, 58:1484-1498.

- HUNGATE, R.E. 1966. *The rumen and its microbes*. New York: Academic Press. 465p.
- KRAUSE, D.O., RUSSELL, J.B. 1996. How many ruminal bacteria are there? *J. Dairy Sci.*, 79:1467-1475.
- LANA, R.P., RUSSELL, J.B. 1996. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:4499-4503.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et al. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. 1996. *Nutrient requirements of beef cattle*. 7 ed. Washington, DC: National Academy Press. 242p.
- PRESSMAN, B.C. 1976. Biological application of ionophores. *Annu. Rev. Biochem.*, 45:501-530.
- REICHL, J.R., BALDWIN, R.L. 1975. Rumen modeling: rumen input-output balance models. *J. Dairy Sci.*, 58:879-890.
- RUSSELL, J.B. 1987. A proposed model of monensin action in inhibiting rumen bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. *J. Anim. Sci.*, 64:1519-1525.
- RUSSELL, J.B., STROBEL, H.J. 1989. The effect of ionophores on rumen fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:1-6.
- STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H. 1960. *Principles and procedures of statistics*. New York: McGraw-Hill. 481p.
- STROBEL, H.J., RUSSELL, J.B. 1989. Non-proton-motive-force-dependent sodium efflux from the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: bound versus free pools. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 2664-2668.
- VAN KESSEL, J.A.S., RUSSELL, J.B. 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 20:205-210.
- WELLS, J.E., KRAUSE, D.O., CALLAWAY, T.R. et al. 1997. A bacteriocin-mediated antagonism by ruminal lactobacilli against *Streptococcus bovis*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 22:237-243.
- WOLIN, M.J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.*, 43:1452-1349.

**Recebido em:** 08/02/00

**Aceito em:** 21/09/00