

LÍLIA RAQUEL FÉ DA SILVA

MANUTENÇÃO DO INÓCULO RUMINAL DE OVINOS CULTIVADO *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS PELA TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES

TERESINA, PIAUÍ

2015

MANUTENÇÃO DO INÓCULO RUMINAL DE OVINOS CULTIVADO *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS PELA TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal, Área de Concentração: Produção Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Rodrigues Vasconcelos

Coorientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

TERESINA, PIAUÍ

2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

S586m Silva, Lília Raquel Fé

Manutenção do inóculo ruminal de ovinos cultivados *in vitro*
para avaliação de alimentos pela técnica de produção de gases
- 2016.
65f.: il.

Tese(Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal
do Piauí, Teresina, 2015
Orientação: Prof^a.Dr^a. Vânia Rodrigues Vasconcelos

1 .Ovinos - Eficiência microbiana 2. Fermentação ruminal 3.
Metano 4.Ração concentrada I.Título

CDD 636.3085

**MANUTENÇÃO DO INÓCULO RUMINAL- DE OVINOS
CULTIVADO IN VITRO PARA AVALIAÇÃO DE
ALIMENTOS PELA TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE
GASES**

LÍLIA RAQUEL FÉ DA SILVA

Aprovada em: 17 de Julho de 2015.

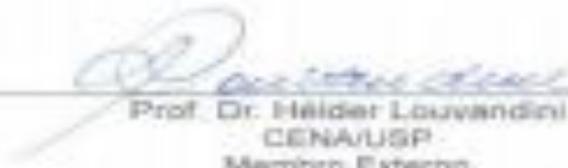
Banca Examinadora:



Prof. Dra. Vânia Rodrigues Vasconcelos
Presidente



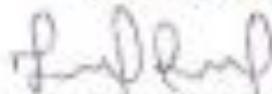
Prof. Dr. Arnaud Azevedo Alves
Membro Interno



Prof. Dr. Hélder Louvandini
CENA/USP
Membro Externo



Prof. Dra. Michelle de Oliveira Maia Parente
CCAAUFMA
Membro Externo



Prof. Dr. Henrique Nunes Parente
CCAM FMA
Membro Externo

A Deus, meu grande amigo, por todos os conselhos, incentivos e pelas nossas longas e agradáveis conversas!

À minha mãe, Alice Fé (“minha vida”) meu alicerce e minha maior inspiração de vida. Obrigada por me proporcionar educação e me ensinar a valorizar o respeito, a ética e os bons princípios não só como uma profissional, mas como ser humano. Graças ao seu amor e aos seus cuidados me fez acreditar e buscar a realização dos meus sonhos. Essa só é uma pequena forma de demonstrar o quanto que a amo!

DEDICO

*À minha avó, **Eva Fé** exemplo de vida e espiritualidade sempre mostrou torcedora fiel do meu sucesso.*

*Aos meus Pais, **José Augusto Camelo** e **Alice Fé** por todo o carinho e total ajuda e suporte para a minha conquista.*

*Aos meus irmãos, **Bruno Neto** e **Roniere Fé** que mesmo na distância passavam confiança e incentivo a minha jornada.*

*Aos meus sobrinhos **Kawã Augusto**, **Bruno Rafael** e **Heitor** meus preciosos tesouros e fonte de minha alegria.*

OFEREÇO

*Mas os que esperam no Senhor renovarão as forças, subirão com asas como águias;
correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão.*

Isaías 40:31

AGRADECIMENTOS

Ao meu *DEUS*, que através do seu imenso amor me fez acreditar em todos os momentos na minha vitória.

À minha família “*FÉ*” (todos os meus tios, tias, primos e primas) a qual tenho imenso orgulho de fazer parte.

Aos meus *tios Matilde Castro, Antônio Carlos Camelo* e minhas primas *Jéssicka e Bárbara Castro* por terem me acolhido de braços e coração abertos em sua casa transmitindo carinho e proteção familiar em todos os meus 11 anos vividos em Teresina.

À *Universidade Federal do Piauí* e ao *Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal* pela oportunidade de realizar o Mestrado e o Doutorado proporcionando-me crescimento profissional bem como a oportunidade de viver maravilhosos momentos durante todo esse período de estudos.

Ao *Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear da Agricultura (LANA/CENA/USP)* pela oportunidade de executar o experimento de tese e aprimorar meus conhecimentos, além me proporcionar à oportunidade de trabalhar com uma equipe qualificada e extremamente comprometida com os trabalhos de pesquisa. Sou grata por ter feito parte dessa família e por ter ampliado meu círculo de amigos.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, pela concessão da Bolsa de Doutorado, o que me fez dedicar mais tempo aos estudos e aos trabalhos do programa.

À minha orientadora, professora *Dra. Vânia Rodrigues Vasconcelos* pela orientação.

Ao professor *Dr. Adibe Luiz Abdalla* pela orientação na realização do trabalho de tese. Além de um orientador tornou-se um grande amigo que me fez acreditar ainda mais na minha capacidade e renovar a minha admiração pela pesquisa.

Ao professor *Dr. Arnaud Azevêdo Alves* pela amizade formada desde mestrado, e pelas orientações prestadas no doutorado e os constantes aprendizados. Foram oito anos de convivência e amizade que terei prazer em conserva-la.

Às professoras *Dra. Nasaré Bona* e *Dra. Maria Elizabete*, pelo carinho, amizade e pelos momentos inesquecíveis. Mais do que professoras, tornaram-se meu exemplo de profissionais e que tenho orgulho de ser amiga.

Aos professores *Dr. Nonato Pereira* e *Dr. João Batista Lopes* pela confiança, amizade e

companheirismo desde o mestrado.

Ao professor *Dr. José Lindenberg Sarmiento*, pelo aprendizado com as análises estatísticas, pelos seus valiosos comentários e discussões a respeito do trabalho e por sua total disponibilidade de ensinar e ajudar.

Aos funcionários do LANA/CENA: os técnicos *Maria Regina Peçanha, Lécio Castilho e Joaquim Everaldo*, pelo profissionalismo, amizade e auxílio na execução dos experimentos e nas análises laboratoriais e a secretária *Carla Adeodato* pelo carinho e pela disponibilidade em servir.

Aos meus amigos pós-graduandos do CENA/USP do grupo do LANA: *Ronaldo Carlos, Andressa Natel, Erika Canova, Alessandra Romero, Carina Nazato, Aline Campeche, Patrícia Pimentel, Fernanda Campos, Juliano Issakowicz, Ana Claudia Koki, Tiago Paim, Adibe Luiz Filho (Adibinho)* e os estagiários e bolsistas: *Fabiana Garcia, Laura Oliveira, Victor Guerrini, Jade Soares, Taís Carvalho, Ingride Mariano* pela valiosa ajuda na execução dos experimentos e principalmente pelos maravilhosos momentos vividos em Piracicaba e pela amizade reconhecida.

Aos amigos pós-graduandos de Piracicaba, *Natalia Arruda (Naty), Rafael Meghini (Poter) e Heverton Moreira (Ton)* por todos os momentos de apoio e amizade. Obrigada pelo carinho e a acolhida em Piracicaba!

Aos meus irmãos de “coração” *Dra. Yosra Ahmed Soltan e Dr. Amr Salah Morsy* pela ajuda na elaboração e execução do trabalho, pelo companheirismo, pelo aprendizado e principalmente pela amizade e carinho. Vocês tornaram-se um exemplo para mim de profissionais que tem amor pela pesquisa e pelo trabalho.

Às minhas amigas doutorandas em Ciência Animal/UFPI, *Jackeline Ost, Mabell Nery e Vânia Batista* pelo carinho, pelos momentos maravilhosos e pela amizade e respeito conquistados por todos esses anos de convívio. Mais que um grupo de amigas foi meu porto seguro e que serei sempre grata por tudo que fizeram por mim!

À minha amiga e fiel companheira do doutorado, *Eline Chaves* por ter me ensinado, muito mais do que imagina, a ser forte e nunca desistir dos meus objetivos. Pelo companheirismo nas viagens dos congressos e por nossa amizade e confiança.

Aos amigos *Gynna Azar, Maxwell Reis, Anali Linhares e Marinalva Soares* pela força, pelos incentivos e por sempre acreditarem no meu sucesso!

A minha amiga *Gardiana Rodrigues* que mesmo na distância soube acalmar meu coração e me devolver o ânimo e a Fé que precisava para continuar até o final.

À minha amiga e meu anjo da guarda, doutoranda *Marlúcia Lacerda* pelos seus preciosos serviços de revisão da tese e pelo seu carinho em me cuidar e me ensinar todos os dias a acreditar na nossa capacidade e no aprimorar da fé. Fui privilegiada de ter um anjo de verdade em meu caminho.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal: *Leidiana Moreira (Leda), Elvania Maria, Daniela Cristina, Rosiane Mendes, Pedro Bitencourt, Jandson Vieira, Wanderson Fiares, Raniel Lustosa, Suzana Coimbra, Bruno Spindola, Yânez André, Snaylla Natyelle* e os doutores *Miguel Arcanjo, Marcônio Martins e Maurílio Souza* pelo apoio, por todos os momentos vividos, pelo respeito, pela aprendizagem e por representarem muito mais do que meus companheiros de pós-graduação! Vocês tornaram-se minha segunda família que tive a honra de fazer parte.

Aos funcionários e servidores do Programa de Pós-Graduação Ciência Animal-UFPI *Luís Gomes da Silva, Fábio Moura e Danielle Arcoverde* pelo apoio em todos os momentos, pela total disponibilidade de ajuda e pela amizade firmada ao longo desses anos.

A todos os meus amigos que, direta ou indiretamente me ajudaram a conquistar mais um objetivo. Sou eternamente grata pelos amigos que tenho e pelo valor que cada um tem em minha vida. Sou orgulhosa por poder dizer que tenho amigos e que essa vitória só foi possível por ter a participação de todos vocês. Obrigada por existirem e fazerem parte de minha vida!

A gente não faz amigos, reconhece-os. (Garth Henrichs)

A amizade desenvolve a felicidade e reduz o sofrimento, duplicando a nossa alegria e dividindo a nossa dor. (Joseph Addison)

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | xi |
| LISTA DE TABELAS | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | xiii |
| RESUMO..... | 15 |
| ABSTRACT..... | 17 |
| INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 21 |
| 2.1. Fermentação e microbiota ruminal | 21 |
| 2.3. Sistemas <i>in vitro</i> para avaliação da fermentação ruminal | 23 |
| 2.3.1. Técnica <i>in vitro</i> de produção de gases | 24 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 26 |
| 4. CAPÍTULO I | 28 |
| Introdução..... | 29 |
| Material e Métodos | 30 |
| Resultados e Discussão..... | 34 |
| Conclusão | 38 |
| Referências | 38 |
| 5. CAPÍTULO II..... | 41 |
| Uso de inóculo ruminal cultivado <i>in vitro</i> na avaliação de alimentos pela técnica de produção de gases..... | 41 |
| Introdução..... | 42 |
| Material e Métodos | 43 |
| Resultados e Discussão..... | 51 |
| Conclusão | 56 |
| Referências | 57 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 61 |
| APÊNDICE..... | 62 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| | |
| CAPÍTULO I | |
| Figura 1: Variação do pH do inóculo cultivado com o tempo de incubação..... | 34 |
| Figura 2: Concentração de protozoários no inóculo cultivado <i>in vitro</i> em função do tempo de incubação..... | 35 |
| Figura 3: Concentração de bactérias no inóculo cultivado <i>in vitro</i> em função do tempo de incubação..... | 35 |
| | |
| CAPÍTULO II | |
| Figura 1 - Produção cumulativa de gases <i>in vitro</i> em função do inóculo e tempo de leitura, observadas e ajustadas à fórmula exponencial: $10^{(PG \text{ (mL/gMS)} / 1000)}$ | 51 |
| Figura 2 – Efeito de inóculo associado a substrato na concentração de ácidos graxos de cadeia curta (mM/mL)..... | 54 |

LISTA DE TABELAS

| Capítulo 1 | Páginas |
|--|----------------|
| Tabela 1. Composição química dos ingredientes | 32 |
| Tabela 2. Composição química do substrato incubado para cultivo do inóculo <i>in vitro</i> | 32 |
| Tabela 3. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC mM/mL) do inóculo cultivado <i>in vitro</i> até 72 h de incubação..... | 36 |
| Capítulo 2 | |
| Tabela 1. Composição química dos ingredientes das rações..... | 44 |
| Tabela 2. Composição química dos substratos incubados na produção de gases..... | 44 |
| Tabela 3. Efeito de inóculo associado a substrato na produção de gases (PG), produção de metano (CH ₄) e matéria orgânica verdadeiramente degradável (MOVD)..... | 50 |
| Tabela 4. Efeito de inóculo associado a substrato no pH, concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃ mg/100mL) e contagem de protozoários e bactérias..... | 52 |
| Tabela 5. Efeito de inóculo associado a substrato na degradabilidade da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO) e da fibra em detergente neutro (DFDN)..... | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- 1
- 2
- 3 AGCC = Ácidos graxos de cadeia curta.
- 4 C₂ = Ácido acético.
- 5 C₃ = Ácido propiônico.
- 6 C₂:C₃ = Relação acetato:propionato.
- 7 CH₄ = metano.
- 8 CNF = Carboidratos não-fibrosos.
- 9 DMO = Degradação ruminal da matéria orgânica.
- 10 EPM = Erro padrão da média.
- 11 FDA = Fibra em detergente ácido.
- 12 FDN = Fibra em detergente neutro.
- 13 FP = Fator de partição.
- 14 MOVD = Matéria orgânica verdadeiramente degradada.
- 15 MS = Matéria seca.
- 16 NDT = Nutrientes digestíveis totais
- 17 N-NH₃ = Nitrogênio amoniacal.
- 18 PB = Proteína bruta.
- 19 PG = Produção de gases
- 20 pH = Potencial hidrogeniônico
- 21 psi = Libra por polegada ao quadrado.
- 22 VF = Vagem de faveira
- 23
- 24
- 25
- 26

27 SILVA, L.R.F. **Manutenção do inóculo ruminal de ovinos cultivado *in vitro* para avaliação de**
28 **alimentos pela técnica de produção de gases.** 2015. 65p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) –
29 Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

30 RESUMO

31
32 Considerando a importância do inóculo nas técnicas *in vitro* e o seu efeito no processo de
33 fermentação, avaliou-se a manutenção do inóculo cultivado *in vitro* até 72 h e a influência da
34 proporção do inóculo cultivado sobre a fermentação ruminal através do sistema
35 semiautomático de produção de gases por 24 h. Foram utilizados quatro ovinos adultos Santa
36 Inês providos de cânulas ruminais como doadores de inóculo adaptados para uma dieta
37 constituída de 40% de feno de tifton e 60% de concentrado. Para a manutenção do inóculo
38 cultivado *in vitro* foi realizado em delineamento em blocos completos ao acaso considerando os
39 animais doadores de conteúdo ruminal como bloco e os tratamentos os tempos de fermentação
40 (0; 24; 48 e 72 horas). Os parâmetros de fermentação do inóculo cultivado *in vitro* foram
41 analisados utilizando-se o procedimento MIXED do SAS. O modelo incluiu efeitos fixos de
42 tempo (3 GL), e os efeitos aleatórios de animal (3 GL). Foram ajustadas 12 estruturas de
43 covariâncias dos erros para cada parâmetro de fermentação com seleção da melhor estrutura
44 segundo o menor valor, considerando-se o Critério de informação Bayesiano (BIC). O efeito do
45 inóculo cultivado na produção de gás foi avaliado utilizando como substrato ração concentrada
46 com níveis de vagem de faveira (*Parkia platycephala* Benth.) em substituição ao grão de milho
47 como fonte energética em delineamento de blocos completos ao acaso com os animais
48 considerados como bloco. Os substratos foram: Controle = milho e farelo de soja; VF_{25%} =
49 milho, farelo de soja e 25% vagem de faveira; VF_{50%} = milho, farelo de soja e 50% vagem de
50 faveira; VF_{75%} = milho, farelo de soja e 75% vagem de faveira e VF = somente vagem de faveira.
51 O inóculo cultivado *in vitro* foi preparado com 300 mL da fração ruminal dos ovinos fistulados +
52 600 mL de solução nutritiva com adição de CO₂ e colocado na incubadora *in vitro* a 39 °C por 72
53 h. Para os parâmetros de fermentação a análise de regressão indicou efeito linear decrescente
54 para pH e concentração de protozoários (P<0,05) e efeito quadrático para população de bactérias
55 em função do tempo de incubação (P<0,05) atingindo o valor mínimo de 0.49 x 10⁹/mL de
56 bactérias no tempo de 48 horas de incubação. O tempo de incubação teve efeito significativo
57 sobre as concentrações de todos os ácidos graxos (P<0,05), sendo que na concentração do ácido
58 isobutirato e a relação C2:C3 esse efeito foi quadrático (P<0,05) e nos demais ácidos
59 apresentaram efeito linear crescente. O cultivo *in vitro* do conteúdo ruminal por até 72 horas não

60 se mostrou eficiente para manutenção das características fermentativas, com redução na
61 população microbiana original, o que limita seu uso em ensaios *in vitro* para avaliação de
62 alimentos, como a técnica de produção de gases. As variáveis para produção de gases utilizando
63 inóculo cultivado não foi influenciada ($P>0,05$) pela interação inóculo x substrato. O inóculo
64 cultivado *in vitro* na proporção 25 mL mostrou-se equivalente ($P>0,05$) ao inóculo controle
65 quanto ao fator de partição (FP) e à matéria orgânica verdadeiramente degradada (MOVD),
66 verificando-se ainda menor ($P<0,05$) PG (mL/g MS) e concentração de CH_4 ao incubar os
67 substratos com o inóculo cultivado *in vitro* 75. Dentre os inóculos, o FP inferior ($P<0,05$) foi
68 verificado para o cultivado *in vitro* 75, decorrente da baixa PG total quando da incubação dos
69 substratos com este inóculo. Os resultados para degradabilidade da MS, MO e FDN foram
70 condizentes com os resultados para produção de gás, tendo o inóculo ruminal cultivado *in vitro*
71 na proporção 25 mL associado ao meio nutritivo se mostrado equivalente ($P<0,05$) ao inóculo
72 controle. A concentração de N-NH_3 , a população de bactérias e a concentração molar de AGCC
73 foram maiores ($P<0,05$) quando da incubação dos substratos em inóculo cultivado *in vitro* na
74 proporção de 75 mL sem meio nutritivo. O inóculo cultivado *in vitro* na proporção 25 mL
75 mostrou-se equivalente ao inóculo obtido diretamente do conteúdo ruminal de ovinos para
76 estimativa dos parâmetros de fermentação das rações concentradas, principalmente eficiência
77 microbiana, indicando viabilidade de sua utilização na técnica de produção de gases.

78

79 **Palavras-chave:** Eficiência microbiana; fermentação ruminal; fluido ruminal; metano; ração
80 concentrada.

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98
99 **SILVA, L.R.F. Maintenance of rumen fluid of sheep grown in vitro for evaluation of food by**
100 **gas production technique.** 2015. 60p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade
101 Federal do Piauí, Teresina, 2015.
102

103 ABSTRACT

104
105 Considering the importance of inoculum in vitro techniques and its effect on the
106 fermentation process, we evaluated the maintenance of the inoculum cultured in vitro for up to
107 72 hours and the influence of its proportion on rumen fermentation through the semi-automatic
108 system of gas production for 24 hours. We used four adult Santa Inês sheep fitted with rumen
109 cannulas as inoculum donors adapted for a diet consisting of 40% of Tifton hay and 60% of
110 concentrate. For the maintenance of in vitro grown inoculum was carried out in design in
111 randomized complete block considering the donor animal rumen content and block and
112 treatments the fermentation times (0, 24, 48 and 72 hours). The inoculum fermentation
113 parameters cultivated in vitro were analyzed using the MIXED procedure of SAS. The model
114 included fixed effects of time (3 GL), and the random animal effects (GL 3). They were adjusted
115 12 errors covariance structures for each fermentation parameter with the best structure selection
116 whichever is lower, considering the information criterion Bayesian (BIC). The effect of inoculum
117 cultured in gas production was evaluated using feed substrate with pods levels of faveira (*Parkia*
118 *platycephala* Benth.) as concentrated in replacement to corn grain as an energy source in a
119 randomized block design with animals serving as blocks. The substrates were: Control = corn
120 and soybean meal; FP25% = corn, soybean meal and 25% of faveira pods; FP50% = corn,
121 soybean meal and 50% of faveira pods; FP75% = corn, soybean meal and 75% of faveira pods
122 and FP = only of faveira pods. The in vitro cultured inoculum was prepared in 300ml of rumen
123 fraction from the fistulated sheep + of 600 ml of nutrient solution added of CO₂ and placed at in
124 vitro incubator at 39 °C for 72 hours. The regression analysis indicated linear effect for pH and
125 concentration of protozoans (P <0.05) and quadratic effect on bacterial population as a function
126 of incubation time (P <0.05), reaching the minimum value of 0.49 x 10⁹ / ml of bacteria in 48
127 hours of incubation. The incubation time had a significant effect on the concentrations of all fatty
128 acids (P <0.05), whereas the concentration of the isobutyrate acid and the ratio C2:C3, this effect
129 was quadratic (P <0.05) and in the other acids showed increasing linear effect. The in vitro
130 culture of rumen contents for up to 72 hours was not efficient for maintaining the fermentation
131 characteristics, reducing the original microbial population, which limits its use in in vitro assays

132 for foods evaluation, such as gas production technique. The variables for gas production using
133 cultured inoculum was not influenced ($P > 0.05$) by the interaction inoculum vs substrate. The in
134 vitro cultured inoculum at the proportion of 25 ml showed be equivalent ($P > 0.05$) to the control
135 inoculum in relation to partition factor (PF) and the truly degraded organic matter (MOVD),
136 verifying even lower ($P < 0.05$) PG (ml / g DM) and concentration of CH₄ by incubating the
137 substrates with the in vitro cultured inoculum 75. Among them, the worst ($P < 0.05$) FP was
138 found for cultivated in vitro 75, resulting from the low overall PG upon incubation of the
139 substrate with this inoculum. The results for degradation of DM, OM and NDF were consistent
140 with the results for gas production, with ruminal inoculum cultured in vitro in proportion of 25ml
141 associated with the nutrient medium has shown an equivalent ($p < 0.05$) to the control inoculum.
142 The concentration of NH₃-N, the bacteria population and the molar concentration of SCFA were
143 higher ($P < 0.05$) upon substrates incubation in in vitro cultured inoculum by the proportion of 75
144 ml with no nutrient medium. The in vitro cultivated inoculum in the proportion 25 mL proved to
145 be equivalent to the inoculum obtained directly from the rumen of sheep to estimate the
146 fermentation parameters of concentrated feed, especially microbial efficiency, indicating
147 feasibility of its use in gas production technique.

148

149 **Keywords:** Concentrated feed; methane; microbial efficiency; rumen fermentation; ruminal
150 fluid;

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172 INTRODUÇÃO

173 As técnicas de avaliação de alimentos *in vitro* adotadas para estimar a degradabilidade
174 de alimentos no rúmen representam modelos biológicos que simulam os processos de digestão
175 que acontecem *in vivo*. Essas técnicas permitem a manipulação dos parâmetros de fermentação,
176 além de permitir avaliação de maior número de amostras em menor tempo e com maior controle
177 das condições experimentais *in vitro*. A busca por controlar com maior precisão o ambiente *in*
178 *vitro* tem levado ao desenvolvimento de técnicas alternativas, aumentando substancialmente a
179 capacidade de pesquisa e o conhecimento da microbiologia do rúmen e dos processos
180 bioquímicos envolvidos na fermentação no ambiente ruminal.

181 A técnica *in vitro* de produção de gases fornece uma estimativa da degradabilidade da
182 matéria seca, da matéria orgânica e da fração fibrosa dos alimentos, além de ser um indicador
183 dos produtos finais da fermentação, como metano, ácidos graxos de cadeia curta e nitrogênio
184 amoniacal. Os sistemas de degradação *in vitro* utilizados na estimativa do valor nutritivo de
185 forragens têm sido muito difundidos, devido à capacidade analítica e ao baixo custo (ARAÚJO
186 et al., 2011; BUENO et al., 2005).

187 O inóculo ruminal é uma das principais fontes de variação das técnicas *in vitro*, pois a
188 microbiota presente - responsável pela fermentação do alimento ao longo do tempo - varia em
189 função da dieta fornecida ao animal, do período de coleta e também entre animais. Segundo
190 Bueno et al. (2005), a frequência, o tempo de coleta e a diluição final do inóculo são as
191 principais fontes de variação. Mould et al. (2005) e Pasada et al. (2012) citam como potenciais
192 fontes de variação da concentração da população microbiana no inóculo o efeito individual,
193 nutrição dos animais doadores e as preparações tanto das amostras a serem avaliadas *in vitro*
194 quanto do inóculo a ser utilizado.

195 Outro aspecto relacionado ao conteúdo ruminal é a espécie de animal doador utilizado,
196 pois este também tem uma influência sobre a qualidade do inóculo (BUENO et al., 2015). O uso
197 de pequenos ruminantes, especialmente ovinos, é amplamente aceito nos estudos de
198 digestibilidade e metabolismo ruminal, devido à facilidade de manuseio, ao baixo custo de
199 manutenção e alimentação de ruminantes menores em relação a ruminantes maiores, como
200 bovinos. Valores de digestibilidade obtidos em ovinos são aceitos como o padrão mundial para a
201 maioria dos sistemas de avaliação de alimentação para ruminantes (BUENO et al., 2005). Porém,
202 para reduzir as variações devido ao animal é necessário ter vários animais doadores de conteúdo
203 ruminal (WILLIAMS, 2000) o que torna a adição da técnica mais onerosa e propícia a variações
204 dos resultados quando não se tem a disponibilidade do número de animais adequado.

205 Considerando a importância do inóculo nas técnicas *in vitro* e o seu efeito na
206 fermentação, relacionada à quantidade de animais doadores e de coletas do conteúdo ruminal,
207 principalmente quando provenientes de pequenos ruminantes se tem estimulado procedimentos
208 que possam simular o ambiente ruminal artificial, conservando-se o inóculo por maior período
209 de tempo tal como o ambiente natural, evidenciado pela adoção de técnicas como o Rusitec
210 (*Rumen Simulation Technique*). O desenvolvimento dessas técnicas permite o estudo das
211 características dos inóculos quanto à capacidade fermentativa, o que envolve avaliação do pH,
212 N-NH₃, produção de ácidos graxos voláteis e população microbiana ao longo do tempo
213 (MARTÍNEZ et al., 2010).

214 Para ser uma ferramenta experimental adequada, um rúmen artificial deve imitar o
215 rúmen natural tanto no ambiente físico (temperatura, pH etc.) quanto na manutenção de
216 populações microbianas que devem ser representativas no rúmen artificial, em termos de
217 quantidade e de qualidade, daquelas encontradas no rúmen do animal hospedeiro (ZIEMER et
218 al., 2000) e assim manter as características fermentativas do inóculo *in vitro*. Assim, objetivou-se
219 com essa pesquisa avaliar a manutenção de inóculos cultivados *in vitro* a partir do conteúdo
220 ruminal de ovinos para uso em sistemas *in vitro* de avaliação de alimentos para ruminantes.

221 Esta Tese apresenta-se estruturada em Introdução e Referencial Teórico, redigidos segundo as
222 normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, e
223 em dois capítulos: Capítulo 1 - Cultivo *in vitro* de inóculo ruminal de ovinos para uso em
224 sistemas *in vitro* de avaliação de alimentos para ruminantes. Capítulo 2 - Uso de inóculo ruminal
225 cultivado *in vitro* na avaliação de alimentos pela técnica de produção de gases, elaborados como
226 artigos científicos, redigidos de acordo com as normas editoriais do periódico *Animal Feed*
227 *Science and Technology*, ao qual serão submetidos para publicação.

228

229

230

231

232

233

234

235

236 2 REFERENCIAL TEÓRICO

237 2.1. Fermentação e microbiota ruminal

238 Os ruminantes distinguem-se dos demais animais por possuírem características
239 anatômicas e simbióticas que lhes permitem digerir e aproveitar eficientemente a fração fibrosa
240 dos alimentos como fonte de energia (VALADARES FILHO e PINA, 2011). A maior parte da
241 digestão dos ruminantes é realizada por uma microbiota anaeróbica presente no rúmen. O
242 ambiente do rúmen atua como uma câmara de fermentação e devido suas características ideais de
243 temperatura em torno de 39 a 42 °C; anaerobiose (baixa concentração de oxigênio); pH tampão
244 entre 6,0 e 7,0; presença de bactérias, protozoários e fungos (atividade fermentativa); suplemento
245 de nutriente e contínua remoção de digesta e dos produtos da fermentação, favorece o
246 desenvolvimento contínuo da população microbiana (KOZLOSKI, 2011).

247 A fermentação do alimento no rúmen é um processo anaeróbico, conhecido como
248 processo fermentativo. O modo como esse processo fermentativo ocorre, assim como os
249 produtos finais gerados a partir do mesmo, são dependentes da dieta ingerida pelo animal
250 (RUSSELL, 1998). Os produtos finais resultantes do processo de fermentação ruminal são os
251 ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como os ácidos acético, propiônico e butírico, amônia
252 (NH₃), células microbianas e gases como H₂, CO₂ e metano (CH₄). A estequiometria da
253 conversão de um mol de glicose a AGCC e a proporção em que cada ácido é produzido,
254 dependem da espécie bacteriana, que pode ser especializada em produzir um tipo ou outro de
255 ácido e principalmente da concentração de H₂ dentro da célula (KOZLOSKI, 2011). O gás H₂ é
256 produzido principalmente pela oxidação do NADH, numa reação catalisada por uma
257 desidrogenase e mediada por uma ferredoxina: $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2$. De acordo com o
258 balanço estequiométrico da fermentação ruminal, os maiores produtores de H₂ e CH₄ são os
259 microrganismos que produzem acetato e butirato (HEGARTY e GERDES, 1998).

260 As bactérias e protozoários ciliados do rúmen são responsáveis pela degradação de 70 a
261 85% da matéria seca digestível da ração. Dentre os microrganismos presentes no rúmen, as
262 bactérias representam a maior população do ambiente ruminal, de 10¹⁰ a 10¹¹/mL, seguida da
263 população metanogênica, de 10⁸ a 10⁹/mL, e pelas populações de protozoários ciliados e fungos,
264 em cerca de 10⁶/mL cada uma (KUMAR et al., 2009).

265 As bactérias do ambiente ruminal variam muito em especificidade por substrato. A
266 maioria utiliza monômeros ou oligômeros liberados do tecido vegetal por hidrólise de polímeros,
267 incluindo amido, pectina, celulose, hemicelulose, lipídeos e proteínas. A hidrólise de polímeros

268 por bactérias fermentadoras de carboidratos ou outros compostos, inclui bactérias “especialistas”
269 como *Ruminobacter amylophilus*, que utiliza somente amido ou seus produtos de degradação
270 para seu crescimento, e *Fibrobacter succinogenes*, que utiliza principalmente a celulose ou seus
271 produtos finais (STEWART et al., 1997).

272 A população de protozoários do ambiente ruminal representa cerca da metade da
273 biomassa microbiana, são responsáveis por aproximadamente 25% da atividade celulolítica
274 microbiana ruminal e auxiliam na manutenção do balanço de H e no pH mais elevado por
275 engolfar grânulos de amido (DEHORITY, 2003).

276 Nenhuma das bactérias e protozoários que fermentam carboidratos produz metano, mas
277 muitos produzem formato, H₂ e CO₂ como produtos finais. Espécies de bactérias metanogênicas
278 podem transformar H₂ e CO₂ em metano. O formato é convertido em H₂ e CO₂ pelas bactérias
279 metanogênicas, sendo essa síntese um mecanismo gerador de energia para as bactérias
280 (VALADARES FILHO e PINA, 2011).

281 A dieta é o fator que mais influencia o número e proporções relativas das distintas
282 espécies de microrganismos que existem no rúmen. A mudança na dieta impõe ao animal um
283 período de transição na população microbiana do rúmen, com alterações nas proporções entre as
284 distintas espécies para dar um novo equilíbrio e promover uma melhor adaptação à nova dieta,
285 porém a transição das espécies microbianas pode favorecer organismos facultativos oportunistas
286 que podem dominar a fermentação, pela produção de ácidos e diminuição do pH ruminal,
287 conduzindo a distúrbios ruminais (VAN SOEST, 1994).

288 As alterações mais profundas na população de microrganismos do rúmen ocorrem
289 quando se compara dietas com maiores proporções de concentrados, em relação àquelas com
290 maior proporção de volumoso. Podem ocorrer também variações devido ao processamento dos
291 ingredientes, envolvendo principalmente a granulometria e peso, a frequência e a quantidade do
292 alimento fornecido (MOULD et al., 2005; ARCURI et al., 2011).

293 Mudanças na dieta promovem mudanças no pH ruminal. A maioria dos microrganismos
294 do rúmen tem sua atividade metabólica paralisada quando há grande diferença entre o pH do
295 meio e o seu pH citoplasmático. As bactérias fibrolíticas e protozoários necessitam de pH entre
296 6,2 e 6,8, para atuarem de forma adequada no processo fermentativo. Segundo Van Soest (1994),
297 pH abaixo de 6,2 aumenta o tempo de colonização da fibra e inibe sua degradação. No entanto,
298 as bactérias amilolíticas vão atuar em uma faixa de pH mais baixo (5,8), isso demonstra que o
299 pH do líquido ruminal influencia a degradação dos alimentos de forma diferenciada, sendo a
300 faixa de pH ideal entre 5,5 e 7,0 (FURLAN et al., 2011). A manutenção do pH em níveis

301 adequados (6,0 a 7,0) depende da capacidade de produção de agentes tamponantes, como sais à
302 base de carbonatos, e da remoção dos AGVs por meio da absorção no rúmen (VAN SOEST,
303 1994).

304 **2.3. Sistemas *in vitro* para avaliação da fermentação ruminal**

305 Diversos sistemas têm sido desenvolvidos com o objetivo de atingir condições próximas
306 às observadas no rúmen. As técnicas *in vitro* têm sido descritas para estimar a degradabilidade de
307 alimentos no rúmen, representando modelos biológicos que simulam os processos de digestão
308 que acontecem no animal vivo. Estas técnicas permitem a manipulação de parâmetros que
309 definem o estado do animal e, se devidamente avaliadas em relação a observações *in vivo*,
310 podem ser apropriadas para estudar a resposta do animal quando um fator é controlado sem a
311 interação de outros fatores relacionados, evidenciando seu principal efeito.

312 O uso dessas técnicas é importante pela minimização dos custos, possibilidade de
313 avaliação de maior número de amostras, menor tempo necessário e maior controle das condições
314 ambientais em relação aos experimentos *in vivo* (MAKKAR, 2005).

315 Uma das desvantagens das técnicas *in vitro* é a necessidade de ter, pelo menos, três
316 animais doadores de conteúdo ruminal para controlar variações devidas ao animal. Além disso, a
317 técnica se torna trabalhosa, por possibilitar analisar grande quantidade de amostras. Erro
318 substancial pode resultar em valores obtidos nas fases iniciais da degradação, devido à perda de
319 peso; e para volumosos de baixa qualidade, a aderência de microrganismos nos primeiros
320 estágios pode até levar a pesos mais elevados e, portanto, à distorção dos resultados, se a
321 modelagem cinética não incorporar a fase *lag* (McDONALD, 1981; DHANOA, 1988).

322 Variações nas técnicas *in vitro* decorrem, em parte, da atividade microbiana do inóculo,
323 que pode ser influenciada pela frequência, tempo de coleta e diluição final com tampão (BUENO
324 et al., 2005; RYMER et al., 2005). Podem ocorrer variações devido ao processamento das
325 amostras, envolvendo principalmente a granulometria e o peso. Também estão sujeitas a
326 diferenças atribuídas ao meio de cultura, quanto ao volume de líquido ruminal em relação à
327 solução nutritiva, ajuste adequado do pH e disponibilidade de substratos.

328 As variações nos procedimentos experimentais se referem ao tempo de incubação das
329 amostras, manutenção da anaerobiose no meio de cultura, bem como erros laboratoriais. O fluido
330 de rúmen representa a maior fonte de variação que não pode ser controlada nestas técnicas
331 (LÓPEZ, 2005). A atividade microbiana e a quantidade de microrganismos no líquido ruminal
332 podem apresentar diferenças marcantes com as diferentes espécies animais, raças, indivíduos, e

333 dentro do mesmo animal ao longo do tempo, bem como para a dieta dos animais doadores
334 (MOULD et al., 2005).

335 **2.3.1. Técnica *in vitro* de produção de gases**

336 A técnica *in vitro* de produção de gases é bastante utilizada, por apresentar grande
337 potencial em descrever a cinética de fermentação e de degradação ruminal, determinar a
338 produção de ácidos graxos de cadeia curta, nitrogênio amoniacal, metano, além de possibilitar a
339 verificação do efeito de fatores antinutricionais presentes nos alimentos (BUENO et al., 2005;
340 ABDALLA et al., 2008; SALLAM et al., 2009).

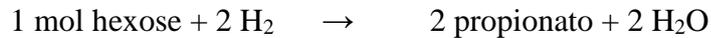
341 A técnica consiste na incubação dos substratos em frascos vedados com fluido de
342 inóculo tamponado, causando a acumulação de gases de fermentação no espaço interno do frasco
343 (*head space*). Um transdutor de pressão é usado para medir e liberar o gás acumulado para
344 restaurar a pressão atmosférica no interior da garrafa. A medição de pressão acumulada no *head*
345 *space* é utilizada para gerar estimativas de volume de gás a partir de uma função quadrática
346 derivada de medições simultâneas de pressão e volume. Ao contrário dos sistemas totalmente
347 automáticos, que combinam cada frasco com seu próprio transdutor de pressão, a técnica *in vitro*
348 semiautomática de produção de gás utiliza um único transdutor de pressão para todos os frascos
349 de fermentação. As principais vantagens dessa técnica são a alta capacidade, custo reduzido, fácil
350 manutenção, controle ambiental, maior segurança e redução nos erros de operação e medição
351 (THEODOROU et al., 1994).

352 Uma característica da técnica de produção de gases é que, ao se combinar a mensuração
353 do gás com a degradação do alimento, obtém-se uma variável capaz de relacionar a proporção de
354 substrato fermentado com a proporção de substrato incorporado na massa microbiana (RYMER
355 et al., 2005).

356 Uma vantagem de estimar a extensão e a cinética de degradação do alimento a partir do
357 volume de gás produzido com utilização da técnica de produção de gases é que o curso da
358 fermentação e o papel dos componentes solúveis do substrato podem ser quantificados (PELL et
359 al., 1994). O gás produzido pela técnica é resultado direto da degradação do substrato pelos
360 microrganismos do líquido ruminal (atividade microbiana), sendo também gerado indiretamente
361 pelo tamponamento do meio (TAGLIAPIETRA et al., 2010). O gás produzido como produto da
362 fermentação e o perfil acumulado deste gás podem dar informação sobre a degradabilidade do
363 alimento e cinética de sua fermentação (GETACHEW et al., 1998).

364 As estequiometrias da fermentação das hexoses na produção de gases através da

365 atividade microbiana foram descritas por Hungate (1966):



366 A produção de propionato é a única reação que não gera dióxido de carbono. A
 367 quantidade de gases diretos produzidos é variável em diferentes proporções molares de
 368 AGV (GETACHEW et al., 1998; RYMER et al., 2005). Maior produção de gases é verificada
 369 principalmente quando o substrato é fermentado a acetato e butirato (PASADA e NOGUERA,
 370 2005).

371 O inóculo pode promover variações nas produções de gases *in vitro*, por ser fornecedor
 372 dos microrganismos necessários para que o processo fermentativo ocorra no laboratório assim
 373 como ocorre no ambiente ruminal. Segundo Rymer et al. (2005), o inóculo é obviamente uma
 374 fonte crucial de variação, embora, quando fluido de rúmen é utilizado, o principal objetivo é
 375 assegurar que a atividade microbiana seja suficientemente elevada para revelar a taxa e a
 376 extensão da fermentação.

377 A atividade dos microrganismos no líquido ruminal, de acordo com Bueno et al. (2005)
 378 pode ser influenciada principalmente por fatores como a frequência, o tempo de coleta e a
 379 diluição final do inóculo com a solução nutritiva. Além dessas, Mould et al. (2005) e Pasada et
 380 al. (2012) também destacam outras potenciais fontes de variação no inóculo, como o efeito
 381 individual dos animais, o efeito da nutrição dos doadores, e as preparações tanto das amostras a
 382 serem avaliadas *in vitro* quanto do inóculo a ser utilizado.

383 Outro aspecto relacionado ao conteúdo ruminal é a espécie de animal doador utilizado,
 384 pois este também tem influência sobre a qualidade do inóculo. O uso de pequenos ruminantes,
 385 especialmente ovinos, é amplamente aceito nos estudos de digestibilidade e metabolismo
 386 ruminal, devido à facilidade de manuseio animal ao baixo custo de manutenção e alimentação de
 387 ruminantes menores em relação a ruminantes maiores, como bovinos. Valores de digestibilidade
 388 obtidos em ovinos são aceitos como o padrão mundial para a maioria dos sistemas de
 389 alimentação de ruminantes (BUENO et al., 2005). Porém, para reduzir as variações devidas ao
 390 animal é necessário ter, vários animais doadores de conteúdo ruminal (WILLIAMS, 2000), o que
 391 torna a adoção da técnica mais onerosa e propícia a variações dos resultados quando não se tem a
 392 disponibilidades do número de animais adequado para se obter o conteúdo ruminal.

393
394
395
396
397
398
399
400

401 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 402 ABDALLA, A.L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de
403 ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.260-268, 2008. (Suplemento).
- 404 ARAÚJO, R.C. et al. Use of blanks to determine *in vitro* net gas and methane production when
405 using rumen fermentation modifiers. **Animal Feed Science and Technology**, v.166-167, n.1,
406 p.155-162, 2011.
- 407 ARCURI, P.B.; LOPES, F.C.F.; CARNEIRO, J.C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI,
408 T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal, SP: FUNEP, 2011.
409 p.111-150.
- BUENO, I.C.S. et al. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed
Science and Technology**, v.123-124, p.95-105, 2005.
- BUENO et al., In vitro methane production and tolerance to condensed tannins in five ruminant
species. **Animal Feed Science and Technology**, v. 205, p. 1-9, 2015
- 410 DEHORITY, B. A. **Rumen Microbiology**. Nottingham University Press, Nottingham, UK, 2003,
411 p. 372.
- 412 DHANOA, M.S. On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. **Grass and
413 Forage Science**, v.43, p.441-444, 1988.
- 414 FURLAN, R.L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D.E. Anatomia e fisiologia do trato
415 gastrintestinal. In: BERCHIELLI T.T.; PIRES A.V.; OLIVEIRA S.G. (Eds). **Nutrição de
416 ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal, SP: FUNEP, 2011, p. 01-23.
- 417 GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. *In vitro* gas measuring
418 techniques for assessment of nutrition quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and
419 Technology**, v.72, p.261-281, 1998.
- 420 HEGARTY, R.S.; GERDES, R. Hydrogen production and transfer in the rumen. **Recent
421 Advances in Animal Nutrition**. v. 12, p. 37-44, 1998.
- 422 HUNGATE, R.E. **The rumen and its microbes**. London: Academic Press, 1966. 533 p.
- 423 KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2.ed. Santa Maria, RS: Editora UFSM, 2011.
424 140p.
- 425 KUMAR, S. et al. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies.
426 **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, n.9, p.1557-1566, 2009.

- 427 LÓPEZ, S. In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. In: DIJKSTRA, J.;
 428 FORBES, J.M.; FRANCE, J. (Ed.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and**
 429 **metabolism**. 2 ed. Cambridge: CABI Publishing, 2005. p. 87-121.
- 430 MARTINEZ, M. E. et al. Comparison of fermentation of diets of variable composition and
 431 microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. II. Protozoa population and
 432 diversity of bacterial communities. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 3684–3698, 2010.
- 433 MAKKAR, H. P. S. *In vitro* gas methods for the evaluation of feeds containing phytochemicals.
 434 **Animal Feed Science and Technology**. v. 123/124, n. 1, p.291-302, 2005.
- 435 McDONALD, I. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen.
 436 **Journal of Agricultural Science**. v. 96, p. 251252, 1981.
- 437 MOULD F. L.; KLIEM K. E.; MORGAN R.; MAURICIO R. M. *In vitro* microbial inoculum: A
 438 review of its function and properties. **Animal Feed Science and Technology**. v. 123; p.31-50,
 439 2005.
- 440 PASADA S.L.; NOGUERA, R.R. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para
 441 la evaluación de alimentos para rumiantes. **Livest Res Rural Development**. v. 17, n. 36. 2005.
- 442 PASADA, S.L. et al. Ruminant feces used as inoculum for the *in vitro* gas production technique.
 443 **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.25, n.1, p.592-602, 2012.
- 444 PELL, A.N.; SCHOFIELD, P.; STONE, W.C. Rates of digestion of feeds measured *in vitro* with
 445 computers. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE, 1997, Cornell University.
 446 **Proceedings...** Cornell University, 1994. p.74-81.
- 447 RYMER, C. et al. *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological
 448 considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**. v. 123, p. 9-30, 2005.
- 449 RUSSELL, J.B. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio
 450 and methane production in vitro. **Journal of Dairy Science**. v. 81, p. 3222–3230, 1998.
- 451 SALLAM, S. M. A. et al. Efficacy of eucalyptus oil on *in vitro* ruminal fermentation and
 452 methane production. **Options Méditerranéennes**, n.85, p.267-272, 2009.
- 453 TAGLIAPIETRA, F. et al. *In vitro* rumen fermentation: Effect of head space pressure on the gas
 454 production kinetics of corn meal and meadow hay. **Animal Feed Science and Technology**,
 455 n.158, p.197-201, 2010.
- 456 THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. A simple gas production method
 457 using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal**
 458 **Feed Science and Technology**, v.48, p.185-197, 1994.
- 459 VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. Fermentação Ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.;
 460 PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal, SP: FUNEP, 2011. p.151-
 461 182.
- 462 VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**, 3th ed. Cornell University Press,
 463 Ithaca, NY, USA, 1994.
- 464 STEWART, C.S.; FLINT, H.J.; BRYANT, M.P. The rumen bacteria. In: HOBSON, P.N. e
 465 STEWART, C.S. (eds.) **The rumen microbial ecosystem**. 2 ed. London: Blackie Academic e
 466 Professional, 1997. cap. 2, p.10-72.
- 467 WILLIAMS, B. A. Cumulative gas production techniques for forage evaluation. In: GIVENS,
 468 D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; OMED, H. M. (Eds.), **Forage Evaluation in Ruminant**

469 **Nutrition**. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 189–213, 2000.

470 ZIEMER, C.J.R. et al. Comparison of microbial populations in model and natural rumens using
471 16S ribosomal RNA-targeted probes. **Environmental Microbiology** l. v. 2, n. 6, p. 632–643.
472 2000.

473 4. CAPÍTULO I

474 Cultivo *in vitro* de inóculo ruminal de ovinos para uso em sistemas *in vitro* de avaliação de
475 alimentos para ruminantes.

476

477 Lília Raquel Fé da Silva ^{a*}; Vânia Rodrigues Vasconcelos ^a; Adibe Luiz Abdalla ^b, Arnaud Azevedo Alves^a

478 ^a Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Teresina, PI.

479 ^b Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

480 * Autor para correspondência. Telefone (+55) (86) 3215-5750. e-mail: liliaraquelfe@yahoo.com.br;

481

482 **Resumo:** Objetivou-se com esse estudo avaliar a manutenção do inóculo cultivado *in*

483 *vitro* até 72 horas, para ser usado em sistemas *in vitro* de avaliação de alimentos para ruminantes.

484 Utilizou-se como doadores de inóculo ruminal quatro ovinos adultos Santa Inês providos de

485 cânulas ruminais em um delineamento em blocos completos ao acaso com médias repetidas no

486 tempo. Os parâmetros de fermentação do inóculo adaptado foram analisados em 12 estruturas de

487 covariância, com escolha da melhor estrutura de acordo com o critério bayesiano (BIC). A

488 análise de regressão indicou efeito linear decrescente para pH e concentração de protozoários

489 (P<0,05) e efeito quadrático para população de bactérias em função do tempo de incubação

490 (P<0,05) atingindo o valor mínimo de $0,49 \times 10^9$ /mL de bactérias no tempo de 48 horas de

491 incubação. O tempo de incubação teve efeito significativo sobre as concentrações de todos os

492 ácidos graxos (P<0,05), sendo que na concentração do ácido isobutirato e a relação C2:C3 esse

493 efeito foi quadrático (P<0,05) e nos demais ácidos apresentaram efeito linear crescente. O cultivo

494 *in vitro* do conteúdo ruminal por até 72 horas não se mostrou eficiente para manutenção das

495 características fermentativas, com redução na população microbiana original, o que limita seu

496 uso em ensaios *in vitro* para avaliação de alimentos, como a técnica de produção de gases.

497 **Palavras-chave:** eficiência microbiana; fermentação ruminal; fluido ruminal.

498 **Introdução**

499 A descrição dos processos digestivos e metabólicos ocorridos no rúmen devem ser
500 fundamentados em dados biológicos. Nos ruminantes, a obtenção desses dados tem sido
501 facilitada pelo uso de técnicas *in vitro* capazes de representar o processo de fermentação e
502 possibilitar estimativas da taxa e grau de degradação dos nutrientes, equivalentes aos obtidos *in*
503 *vivo*.

504 A qualidade da fermentação de um alimento em um sistema *in vitro* pode ser
505 influenciada pelas características do próprio alimento incubado, do conteúdo do rúmen utilizado
506 como inóculo e das condições experimentais sob as quais a incubação é conduzida. Segundo
507 Mould et al. (2005), o conteúdo do rúmen representa a principal fonte de variação da técnica *in*
508 *vitro*. A atividade microbiana e a quantidade de microrganismos presentes no líquido ruminal
509 podem apresentar variações importantes em função das espécies animais, raças, indivíduos, e no
510 mesmo animal ao longo do tempo, bem como para a dieta dos animais doadores.

511 Para a avaliação de alimentos *in vitro*, é necessário coletar inóculo ao longo do tempo e
512 de animais diferentes, principalmente quando proveniente de pequenos ruminantes, o que
513 implica em repetições frequentes de processos invasivos. Para amenizar este problema são
514 estimulados o uso de procedimentos para conservar o inóculo por maior período de tempo,
515 evidenciado pela adoção de técnicas como o Rusitec (*Rumen Simulation Technique*) que tem
516 como característica importante a capacidade de manter um padrão de fermentação contínua,
517 semelhante ao padrão observado *in vivo* no rúmen dos animais doadores do conteúdo ruminal.

518 O desenvolvimento destas técnicas envolve o estudo das características dos inóculos
519 quanto à capacidade fermentativa, o que envolve avaliação do pH, N-NH₃, produção de ácidos
520 graxos voláteis e população microbiana (Martínez et al., 2010). Assim, essa pesquisa foi

521 realizada com o objetivo de avaliar a manutenção dos inóculos do conteúdo ruminal de ovinos
522 cultivados *in vitro* até 72 horas de fermentação.

523 **Material e Métodos**

524 **1. Local**

525 A coleta do conteúdo ruminal dos ovinos e a manutenção do inóculo cultivado *in vitro*
526 foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da
527 Universidade de São Paulo (LANA/CENA/USP), Piracicaba-SP, Brasil. Os tratamentos
528 avaliados e a técnica de manutenção do inóculo foram estabelecidas segundo exigências da
529 Comissão Interna de Meio Ambiente e Ética em Experimentação Animal do CENA/USP.

530 **1.1. Preparo do inóculo cultivado *in vitro* por 72h**

531 Foram utilizados como doadores de conteúdo ruminal quatro ovinos machos castrados
532 da raça Santa Inês ($60 \pm 2,5$ kg de PV) providos de cânula no rúmen e adaptados por sete dias a
533 uma dieta com 40% de feno de capim-Tifton 85 e 60% de concentrado (70% milho e 30% de
534 farelo de soja), disponibilizada duas vezes no dia, as 8:00 e 16:00 h com livre acesso à mistura
535 mineral e água, formulada segundo o NRC (2007) para manutenção.

536 Frações líquidas e sólidas do conteúdo ruminal foram recolhidas separadamente de cada
537 animal antes da refeição da manhã e mantidas em condições anaeróbias. A fase líquida foi
538 armazenada em garrafas térmicas pré-aquecidas a 39 °C e a fase sólida em sacos de plástico em
539 refrigeradores com sacos térmicos aquecidos a 39 °C. A fração líquida foi obtida por uma sonda
540 acoplada a uma seringa (capacidade para 100 mL) e a fração sólida por uma pinça de aço
541 inoxidável. Após a coleta, todo o material foi enviado imediatamente para o laboratório, onde
542 foram preparados os inóculos. Um inóculo foi preparado para cada animal. Por cada inóculo, 500
543 g do sólido e 500 mL do líquido do conteúdo ruminal foram homogeneizados durante 10 s,
544 filtrados em três camadas de tecido de algodão como descrito por Bueno et al. (2005). O material
545 filtrado foi então mantido em banho-maria (39 °C) sob a saturação de CO₂ até à sua utilização.

546 Os inóculos foram preparados e incubados em incubadora *in vitro* TECNAL (modelo
547 TE-150) a 39 °C, em quatro jarras com capacidade para 2 L. Em cada jarra colocou-se 300 mL
548 do conteúdo ruminal de um ovino e 600 mL de solução nutritiva e injeção de CO₂ por 10 s.
549 Como substrato para os microrganismos, em cada jarra adicionou-se um saco de náilon (8x12 cm
550 e 50 µm) contendo 12 g da dieta composta por 40% de feno de capim-Tifton e 60% de
551 concentrado (Tabela 2), o qual foi substituído por um outro igual após 24 horas da incubação,
552 permanecendo na jarra até as 72 h de fermentação (Czerkawski e Breckenridge ,1977 ; Carro et
553 al. 2009).

554 A solução nutritiva (pH = 7,0), foi obtida segundo Theodorou et al. (1994), a partir de
555 soluções de micro (CaCl₂.2H₂O; MnCl₂.2H₂O; CoCl₂.6H₂O e FeCl₃.6H₂O) e macrominerais
556 (Na₂HPO₄; KH₂PO₄ e MgSO₄.7H₂O), solução tampão (NH₄CO₃ e NaHCO₃), solução redutora
557 (Cysteíne HCl; NaOH 1M e Na₂S.9H₂O) e solução indicadora (Resazurim). Para manter o
558 tamponamento e, conseqüentemente, o pH do inóculo cultivado, retirava-se uma fração de 100
559 mL do mesmo e completava-se o volume com 100 mL de solução nutritiva a cada 24 horas de
560 fermentação.

561 As condições dos inóculos cultivados foram monitoradas durante todo o tempo de
562 incubação, com coletas de amostras a cada 24 h - momento em que era realizada a injeção de
563 CO₂ para manter o ambiente anaeróbico - para determinação do pH, da concentração de ácidos
564 graxos de cadeia curta e para a quantificação de bactérias e protozoários.

565 O pH foi determinado com potenciômetro digital portátil TECNAL, calibrado com
566 soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

567 A concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi determinada de acordo
568 com Palmquist e Conrad (1971). Cerca de 1,6 ml de fluido ruminal tamponado foi centrifugado a
569 15 min por 15000 x g a 4° C (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, EUA) com 0,4 mL de
570 solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% com ácido fórmico 98-100% + 0,2 mL de solução de

571 ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno, PM = 116,16; CAS 88-09-5; Sigma Chemie
572 Gmbh, Steinheim, Alemanha). Após a centrifugação, aproximadamente 1,2 mL foi transferido
573 para o *vial* cromatográfico. Injetou-se 01 µl de amostra em cromatógrafo gasoso (GC HP 7890A;
574 integrador HP 7683B, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) equipado com coluna capilar
575 HP-FFAP (19091F- 112; 25m; 0,320 mm; 0,50 µm; J&W Agilent Technologies Inc.; Palo Alto,
576 CA, EUA). Com hidrogênio (1,35 mL/min) como gás de arraste.

577 A curva de calibração externa foi feita com padrões cromatográficos (Chem Service,
578 West Chester, PA, EUA) de ácido acético (99,5%; CAS 64-19-97), propiônico (99%; CAS 79-
579 09-4), isobutírico (99%; CAS 79-31-2), butírico (98,7%; CAS 107-92-6), isovalérico (99%; CAS
580 503-74-2) e valérico (99%; CAS 109-52-4). A solução-padrão de maior concentração
581 (denominada “superalta”) continha 200 mM de ácido acético, 54 mM de ácido propiônico, 6 mM
582 de ácido isobutírico, 45 mM de ácido butírico, 9 mM de ácido isovalérico e 9 mM de ácido
583 valérico. As soluções-padrão subsequentes foram obtidas diluindo-se a solução “superalta” por ½
584 (alta), ¼ (média), 1/8 (baixa) e 1/16 (superbaixa). Para a preparação dos *vials* com soluções-
585 padrão foram adicionadas as mesmas quantidades de solução 3:1 ácido metafosfórico:ácido
586 fórmico + padrão interno usadas no preparo das amostras.

587 As contagens de protozoários e bactérias nos inóculos foram realizadas ao microscópio,
588 de acordo com Dehority et al. (1983) e Bryant e Robison (1961), respectivamente.

589 **1.2.Análises químicas**

590 A composição química dos ingredientes da ração dos animais doadores de conteúdo
591 ruminal (dieta com 40% de feno de Tifton e 60% de concentrado) e do substrato incubado para
592 cultivo do inóculo *in vitro* (Tabelas 1 e 2) foi obtida segundo a AOAC (1995), quanto à matéria
593 seca (MS) (ID 930,15), matéria mineral (MM) (ID 942,05), matéria orgânica (MO - 920.39),
594 proteína bruta (PB) (ID 954,01) e extrato etéreo (EE - ID 920,39). A fibra em detergente neutro
595 (FDN) (ID 973,18; Mertens, 2002) e fibra em detergente ácido (FDA) (ID 973,18; Mertens,

596 2002) foram analisadas sequencialmente na mesma amostra em sacos de filtro e corrigidas para
 597 cinza residual, utilizando-se um analisador de fibras ANKOM (ANKOM Technology
 598 Corporation, Macedon, New York, EUA). A FDN foi analisada usando α -amilase termoestável.
 599 O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) foi estimado pela fórmula $CNF=CHOT-FDN$,
 600 segundo Hall (2000), sendo CHOT o teor de carboidratos totais, obtido pela fórmula
 601 $CHOT=100-(PB\%+EE\%+MM\%)$, proposta por Sniffen et al. (1992).

602

Tabela 1. Composição química dos ingredientes

| Item | Ingredientes | | | |
|--------------------------------------|-------------------------|----------------|-------|------------------|
| | Feno de capim-Tifton 85 | Farelo de soja | Milho | Vagem de faveira |
| Matéria seca | 891,0 | 875,9 | 872,1 | 871,0 |
| <i>g/kgMS</i> | | | | |
| Proteína bruta | 60,0 | 495,6 | 117,4 | 106,1 |
| Extrato etéreo | 13,7 | 11,0 | 24,0 | 21,0 |
| Fibra em detergente neutro | 808,9 | 145,2 | 132,9 | 142,7 |
| Fibra em detergente ácido | 460,6 | 115,4 | 43,4 | 138,6 |
| Matéria mineral | 58,45 | 69,0 | 9,0 | 33,0 |
| Carboidratos não fibrosos | 59,0 | 279,2 | 716,7 | 697,2 |
| Nutrientes digestíveis totais (NDT)* | 485,4 | 679,9 | 720,4 | 666,8 |

603

*Valor estimado pelas equações propostas por Cappelle et al. (2001).

Tabela 2. Composição química do substrato incubado para cultivo do inóculo *in vitro*

| Ingredientes | Substratos |
|---------------------------------|------------|
| <i>Composição percentual</i> | |
| <i>g/kg MS</i> | |
| Feno de capim-Tifton 85 | 42,32 |
| Farelo de soja | 16,96 |
| Milho em grão triturado | 20,36 |
| Vagem de faveira triturada (VF) | 20,36 |
| Total | 100,0 |
| <i>Composição química</i> | |
| Matéria seca | 923,35 |
| <i>g/kg MS</i> | |
| Matéria orgânica | 957,35 |
| Proteína bruta | 157,81 |

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Fibra em detergente neutro | 550,00 |
| Fibra em detergente ácido | 288,05 |
| Carboidratos não fibrosos | 218,80 |
| Extrato etéreo | 30,86 |
| Nutrientes digestíveis totais (NDT)* | 582,6 |

604 *Valor estimado pelas equações propostas por Cappelle et al. (2001).

605 2. Análise Estatística

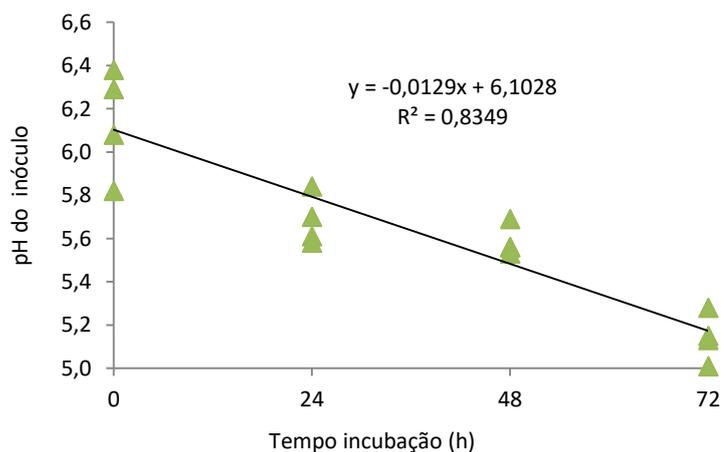
606 A manutenção do inóculo cultivado *in vitro* até 72 horas foi avaliada em delineamento
607 de blocos completos ao caso, considerando os animais doadores de conteúdo ruminal como
608 bloco e os tratamentos os tempos de fermentação (0; 24; 48 e 72 horas). Os parâmetros de
609 fermentação do inóculo cultivado *in vitro* foram analisados utilizando-se o procedimento
610 MIXED do SAS versão 9.2. O modelo incluiu efeitos fixos de tempo (3 GL), e os efeitos
611 aleatórios de animal (3 GL). Foram ajustadas 12 estruturas de covariâncias dos erros para cada
612 parâmetro de fermentação com seleção da melhor estrutura segundo o menor valor,
613 considerando-se o Critério de Informação Bayesiano (BIC). As estruturas que ajustaram para o
614 pH e valerato: Auto regressiva heterogênea de primeira ordem (ARMA (1,1)); Protozoários: Ante
615 dependente de primeira ordem (ANTE (1)); Bactérias e Acetato: Diagonal principal "Bartded"
616 (UN(1)); Propionato, Butirato, Isobutirato, Isovalerato, Total e a relação C2:C3: Auto-regressiva
617 de primeira ordem heterogênea (ARH(1)). O efeito de tempo foi decomposto em dois contrastes
618 polinomiais ortogonais: linear e quadrático, com significância de $P \leq 0,05$.

619 Resultados e Discussão

620 O tempo de incubação influenciou ($P < 0,05$) o pH do inóculo cultivado *in vitro*, com
621 alterações nas populações de protozoários e bactérias (Figuras 1, 2 e 3). Com base nos
622 coeficientes de determinação e na significância estatística ($P < 0,05$), a análise de regressão
623 indicou efeito linear decrescente para pH e para concentração de protozoários, e efeito
624 quadrático para concentrações de bactérias, em função do tempo de incubação.

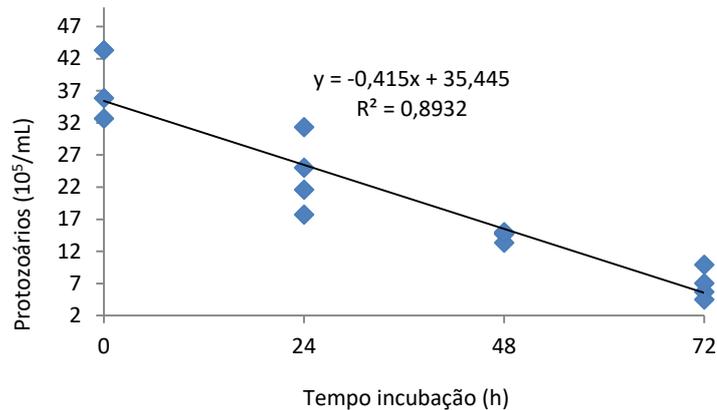
625 A solução nutritiva utilizada no preparo do inóculo cultivado *in vitro* tem a função de
 626 atuar como “saliva artificial”, proporcionando o tamponamento do meio para manter as
 627 condições favoráveis para fermentação microbiana. Porém, a adição da solução nutritiva a cada
 628 24 horas de incubação do inóculo cultivado *in vitro* não foi suficiente para manter o pH do
 629 inóculo cultivado. Além da solução nutritiva a rápida taxa de fermentação do substrato incubado
 630 (ração concentrada) contribuiu para diminuição do pH dos inóculos cultivados durante os tempos
 631 de incubação.

632 O decréscimo da população de protozoários está relacionado com a queda do pH,
 633 devido esses microrganismos serem sensíveis a pH muito baixo (Franzolin e Dehority, 1996).
 634 Valores de pH inferiores a $6,7 \pm 0,5$ limitam a atividade microbiana e a manutenção do processo
 635 de fermentação que ocorre normalmente no rúmen (Van Soest, 1994). A concentração total de
 636 protozoários variou de $37,3 \times 10^5$ protozoários/mL de fluido ruminal no início a $6,8 \times 10^5$
 637 protozoários/mL de fluido ruminal no tempo de 72 horas de incubação representando uma
 638 diminuição de mais de 60% da população total no inóculo cultivado *in vitro*.



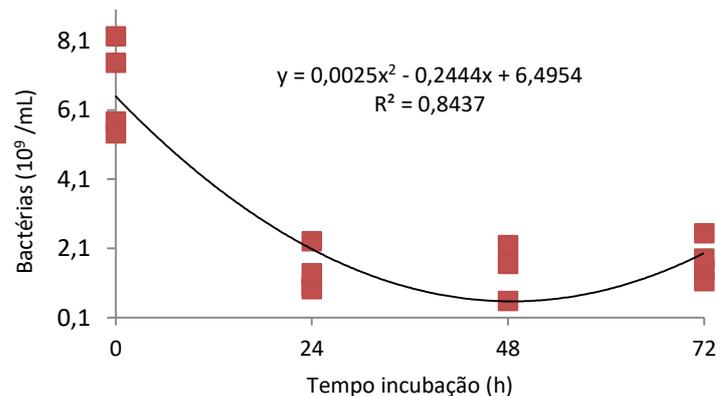
639
 640
 641
 642

Figura 1. Variação do pH do inóculo cultivado *in vitro* em função do tempo de incubação.



643
644
645
646
647

Figura 2. Concentração de protozoários no inóculo cultivado *in vitro* em função do tempo de incubação.



648
649
650
651
652

Figura 3. Concentração de bactérias no inóculo cultivado *in vitro* em função do tempo de incubação.

A população de bactérias apresentou uma queda acentuada no período de manutenção do inóculo, com a concentração variando de $6,7 \times 10^9$ bactérias/mL no início para $0,49 \times 10^9$ /mL às 48 horas de incubação. Essa redução está relacionada às diferenças observadas no ambiente *in vitro* - condições de pH, temperatura e anaerobiose – em relação ao verificado *in vivo*, que são ideais para o desenvolvimento da comunidade microbiana. O substrato incubado nas jarras como fonte de nutrientes para os microrganismos pode ter influenciado a diminuição do crescimento das bactérias no inóculo cultivado, pois o substrato foi disponibilizado apenas uma vez, o que favoreceu a rápida fermentação do substrato nas primeiras horas, principalmente dos carboidratos não fibrosos, com posterior indisponibilização de nutrientes para o crescimento

661 microbiano nos tempos finais de fermentação.

662 O tempo de incubação influenciou ($P < 0,05$) as concentrações dos ácidos graxos e a
 663 relação C2:C3, com efeito quadrático para concentração do ácido isobutirato e relação C2:C3 e
 664 efeito linear crescente para os demais ácidos graxos (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC mM/mL) no inóculo cultivado *in vitro* até 72 h de incubação

| Parâmetros | Tempo (h) | | | | Equação de regressão | P |
|--------------|-----------|--------|--------|--------|---------------------------------|--------|
| | 0 | 24 | 48 | 72 | | |
| AGCC (mM/mL) | | | | | | |
| Acetato | 60,29 | 69,05 | 70,34 | 93,33 | $Y=24,38+0,95x$ | 0,0077 |
| Propionato | 17,08 | 32,68 | 34,04 | 38,76 | $Y=24,60+0,19x$ | 0,0041 |
| Butirato | 13,13 | 27,27 | 27,08 | 35,21 | $Y=10,82+0,33x$ | 0,0349 |
| Valerato | 1,57 | 3,64 | 5,47 | 7,87 | $Y= 0,65+0,1003x$ | 0,0281 |
| Isobutirato | 1,01 | 0,69 | 1,08 | 1,07 | $Y= - 0,08 + 0,04x - 0,0003x^2$ | 0,0126 |
| Isovalerato | 2,93 | 2,34 | 3,62 | 3,29 | $Y= 3,05$ | 0,2124 |
| Total | 96,04 | 135,70 | 141,64 | 175,01 | $Y=74,91+1,39x$ | 0,0001 |
| C2:C3 | 3,68 | 2,12 | 2,08 | 2,49 | $Y=2,60-0,029+0,0003x^2$ | 0,0042 |

C2:C3 = relação acetato:propionato.

665

666 A produção e a proporção molar dos ácidos graxos são resultantes principalmente do
 667 substrato fermentado, da velocidade de fermentação e do pH ruminal (Souza et al., 2010). O
 668 comportamento da produção de AGCC no inóculo cultivado *in vitro* está de acordo com a queda
 669 do pH no meio e também com a característica do alimento (dieta com maior teor de concentrado)
 670 incubado como substrato para os microrganismos, o que resultou em maior atividade microbiana
 671 sobre os carboidratos não fibrosos.

672 As concentrações de propionato e butirato aumentaram em mais de 20% a partir do início
 673 da incubação (tempo 0), porém contribuíram para menor relação C2:C3 devido ao pH, pois
 674 segundo Zhen-hu et al. (2004) valores de pH inferiores a 6,8, além de outros fatores, favorecem a
 675 diminuição da relação acetato:propionato. As proporções molares de ácidos graxos de cadeia

676 curta produzidos durante a fermentação nos inóculos cultivados estão de acordo com os valores
677 normalmente produzidos no processo de fermentação ruminal *in vivo*, que variam de 45 a 75%,
678 15 a 45% e 11 a 13% para o acetato, propionato e butirato, respectivamente (Kozloski, 2011) e a
679 relação C2:C3 entre 0,9 a 4,0 (Johnson e Johnson, 1995).

680 **Conclusão**

681 O cultivo *in vitro* do inóculo a partir do conteúdo ruminal de ovinos por até 72 horas
682 não se mostrou eficiente para manutenção das características fermentativas, com redução na
683 população microbiana original, o que limita seu uso em ensaios *in vitro* para avaliação de
684 alimentos, como a técnica de produção de gases.

685 **Referências**

- 686 Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995. Official Methods of Analysis, 16th
687 ed. AOAC, Arlington, VA.
- 688 Bryant, M.P.; Robinson, I.M., 1961. An improved non-selective culture medium for ruminal
689 bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. Journal
690 of Dairy Science, v.44, n.1, p.1446.
- 691 Cappelle, ER. et al., 2001. Estimativas do valor energético a partir de características químicas e
692 bromatológicas dos alimentos. Revista Brasileira de Zootecnia, v.30, n.6, p.1837-1856.
- 693 Carro, MD. et al., 2009. Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in
694 Rusitec, single-flow continuous-culture fermenters and sheep rumen. Animal, v.3, n.4, p.527–
695 534.
- 696 Czerkawski JW; Breckenridge G., 1977. Design and development of a long-term rumen
697 simulation technique (Rusitec). British Journal of Nutrition. v.38, p.371–384.

- 698 Dehority, BA. et al., 1983. Occurrence of the rumen ciliate *Oligoisotricha bubali* in domestic
699 cattle (*Bos taurus*). Applied and Environmental Microbiology, v.45, n.4, p.1394-1397.
- 700 Hall, MB., 2000. Neutral detergent-soluble carbohydrates nutritional relevance and analysis: a
701 laboratory manual. Florida: University of Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences.
702 Bulletin n.339, p.76.
- 703 Johnson, KA.; Johnson, DE., 1995. Methane emissions from cattle. Journal of Animal Science.
704 v.73, p.2483-2492.
- 705 Kozloski, GV., 2011. Bioquímica dos ruminantes. Santa Maria, RS: Editora UFSM. 140p.
- 706 Martinez, ME. et al., 2010. Comparison of fermentation of diets of variable composition and
707 microbial populations in the rumen of sheep and RUSITEC fermenters. II. Protozoa population and
708 diversity of bacterial communities. Journal of Dairy Science, v.93, p.3684-3698.
- 709 Mertens, DR., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feed
710 with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. Journal of AOAC International, v.85,
711 n.6, p.1217-1240.
- 712 Mould, FL., 2005. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. Animal
713 Feed Science and Technology. v.123; p.31-50.
- 714 National Research Council. NRC. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Cervides
715 and Camelides. Washington, D.C.: National Academy Press, 362p.
- 716 Palmquist D., Conrad H., 1971. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or
717 high fat diets. Journal of Dairy Science, v.54, p.1025-1031.
- 718 Sniffen, CJ. et al., 1992 A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II.
719 Carbohydrate and protein availability. Journal of Animal Science, v.70, n.7, p.3562-3577.
- 720 Souza, EJO de; Guim, A; Torres, TR. 2010. Efeitos da fibra fisicamente efetiva sobre a produção

- 721 de ácidos no rúmen. Revista Eletrônica Nutritime, v.7, p.1269-1279.
- 722 Statistical Analysis Systems (SAS), 2002. Statistical Analysis Systems User's Guide: Statistics,
723 Version 8. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- 724 Theodorou, MK.; Williams, BA.; Dhanoa, MS. 1994. A simple gas production method using a
725 pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed
726 Science and Technology, v.48, p.185-197.
- 727 Van Soest, PJ. et al., 1991. Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications
728 in dairy cattle. Journal of Dairy Science, v.74, p.3583-3597.
- 729 Van Soest, PJ., 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. Cornell University Press. Ithaca.
- 730 Zhen-Hu, H.; Gang, W.; Han-Qing, Y. 2004. Anaerobic degradation of cellulose by rumen
731 microorganisms at various pH values. Biochemical Engineering Journal, v.21, n.1, p.59-62.
- 732
- 733
- 734
- 735
- 736
- 737
- 738
- 739
- 740
- 741

742

743

5. CAPITULO II

744

Uso de inóculo ruminal cultivado *in vitro* na avaliação de alimentos pela técnica de

745

produção de gases

746

Líli Raquel Fé da Silva ^{a*}; Vânia Rodrigues Vasconcelos ^a; Adibe Luiz Abdalla ^b, Arnaud Azevedo Alves^a

747

^a Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Teresina, PI.

748

^b Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

749

* Autor para correspondência. Telefone (+55) (86) 3215-5750. e-mail: liliaraquelfe@yahoo.com.br

750

751

Resumo: Objetivou-se com esse estudo avaliar a influência da proporção do inóculo

752

ruminal de ovinos cultivado *in vitro* sobre a microbiota e fermentação ruminal, a degradabilidade

753

dos nutrientes e a produção de metano (CH₄) de rações concentradas pela técnica de produção de

754

gases. Utilizou-se um sistema semiautomático de produção de gás (PG) por 24h em um

755

delineamento em blocos ao acaso utilizando modelos mistos com efeito fixo dos inóculos,

756

substratos e suas interações e como efeito aleatório os animais e o erro. Utilizou-se como

757

substrato ração concentrada com níveis crescente de vagem de faveira (*Parkia platycephala*

758

Benth.) em substituição ao grão de milho como fonte energética. Os substratos foram: Controle =

759

milho e farelo de soja; VF_{25%} = milho, farelo de soja e 25% vagem de faveira; VF_{50%} = milho,

760

farelo de soja e 50% vagem de faveira; VF_{75%} = milho, farelo de soja e 75% vagem de faveira e

761

VF = somente vagem de faveira. A produção de gases (PG) não foi influenciada (P>0,05) pela

762

interação inóculo x substrato. O inóculo cultivado *in vitro* na proporção 25 mL mostrou-se

763

equivalente (P>0,05) ao inóculo controle quanto ao fator de partição (FP) e à matéria orgânica

764

verdadeiramente degradada (MOVD), verificando-se ainda menor (P<0,05) PG (mL/g MS) e

765

concentração de CH₄ ao incubar os substratos com o inóculo *cultivado in vitro* 75. Dentre os

766

inóculos, o FP inferior (P<0,05) foi verificado para o cultivado *in vitro* 75, decorrente da baixa

767 PG total quando da incubação dos substratos com este inóculo. Os resultados para
768 degradabilidade da MS, MO e FDN foram condizentes com os resultados para produção de gás,
769 tendo o inóculo ruminal cultivado *in vitro* na proporção 25 mL associado ao meio nutritivo se
770 mostrado equivalente ($P < 0,05$) ao inóculo controle. A concentração de $N-NH_3$, a população de
771 bactérias e a concentração molar de AGCC foram maiores ($P < 0,05$) quando da incubação dos
772 substratos em inóculo cultivado *in vitro* na proporção de 75 mL sem meio nutritivo. O inóculo
773 cultivado *in vitro* na proporção 25 mL mostrou-se equivalente ao inóculo obtido diretamente do
774 conteúdo ruminal de ovinos para estimativa dos parâmetros de fermentação das rações
775 concentradas, principalmente eficiência microbiana, indicando viabilidade de sua utilização na
776 técnica de produção de gases.

777 **Palavras-chave:** atividade microbiana; fermentação ruminal; metano; ração concentrada.

778

779 **Introdução**

780 A técnica de produção de gases *in vitro* consiste em um sistema relativamente simples e
781 rápido para avaliação de alimentos para ruminantes, devido à capacidade analítica e ao baixo
782 custo. Nesta técnica, o inóculo tem a função de fornecer a microbiota adequada para fermentar
783 ou degradar um alimento ao longo do tempo, por isso é importante que esse apresente uma
784 atividade microbiana adequada. Variações nas estimativas do valor nutritivo dos alimentos por
785 essa técnica decorrem, em grande parte, dessa atividade microbiana do inóculo - que pode ser
786 influenciada pela frequência de alimentação do animal, pelo tempo de coleta e pela diluição final
787 do inóculo com solução nutritiva (Bueno et al., 2005; Rymer et al., 2005).

788 A composição da dieta dos animais doadores de inóculo e os nutrientes disponíveis à
789 microbiota ruminal são os principais fatores que determinam o crescimento e a atividade
790 microbiana do inóculo, impactando na fermentação dos nutrientes no rúmen e,

791 conseqüentemente, na concentração dos produtos finais da fermentação, o que pode levar a
792 diferenças nos dados obtidos com a técnica de produção de gases *in vitro* (Nagadi et al., 2000).

793 Alterações mais profundas na população dessa microbiota ocorrem com o uso de dietas
794 com maiores proporções de concentrados (Calsamiglia et al., 2008; Carro et al., 2009), devido à
795 redução do pH do fluido ruminal (Franzolin e Dehority, 1996). A maioria dos microrganismos do
796 rúmen tem sua atividade metabólica paralisada quando há grande diferença entre o pH do meio e
797 o seu pH citoplasmático. As bactérias fibrolíticas e os protozoários necessitam de pH entre 6,2 e
798 6,8, para atuarem de forma adequada no processo fermentativo. No entanto, as bactérias
799 amilolíticas vão atuar em uma faixa de pH mais baixo (5,8), indicando que o pH do líquido
800 ruminal influencia de forma diferenciada a população presente no rúmen e, dessa forma, a
801 fermentação do alimento, sendo a faixa de pH ideal entre 5,5 e 7,0 (Furlan et al., 2011).

802 Outro aspecto a ser considerado é a manutenção dos animais doadores com uma dieta
803 contendo ingredientes similares aos a se avaliar nos ensaios *in vitro* (Nagadi et al., 2000). Na
804 prática, isso seria difícil, devido à necessidade de utilização de um número maior de animais nos
805 experimentos e da necessidade de uma maior quantidade dos ingredientes a serem testados. Uma
806 alternativa ao uso de maior quantidade de doadores de conteúdo ruminal seria a utilização de
807 inóculos cultivados *in vitro*, a partir de uma fonte de micro-organismos presentes no rúmen dos
808 doadores.

809 Essa pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar a influência da proporção do
810 inóculo ruminal de ovinos cultivado *in vitro* sobre a microbiota e fermentação ruminal, a
811 degradabilidade dos nutrientes e a produção de metano (CH₄) de rações concentradas pela
812 técnica de produção de gases.

813 **Material e Métodos**

814 **1. Local**

815 Os ensaios *in vitro* e as análises químicas foram realizados no Laboratório de Nutrição
816 Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo
817 (LANA/CENA/USP), em Piracicaba, SP, Brasil. Os tratamentos avaliados e as técnicas adotadas
818 foram estabelecidas de acordo com a Comissão Interna de Meio Ambiente e Ética em
819 Experimentação Animal do CENA/USP.

820 **2. Delineamento experimental**

821 O efeito do inóculo cultivado *in vitro* na produção de gases foi avaliado utilizando-se
822 como substrato uma ração concentrada - contendo farelo de soja, milho e diferentes níveis de
823 vagem de faveira (*Parkia platycephala* Benth.) em substituição ao grão de milho como fonte
824 energética, em delineamento de blocos ao acaso, considerando os animais como blocos e os
825 inóculos cultivados *in vitro* como tratamento. No ensaio de produção de gases utilizou-se dois
826 frascos por tratamento em cada incubação (8 inóculos + 5 substratos + 2 frascos + 2 brancos),
827 sendo a média dos dois frascos a repetição. Os substratos foram: Controle = milho e farelo de
828 soja; VF_{25%} = milho, farelo de soja e 25% vagem de faveira; VF_{50%} = milho, farelo de soja e 50%
829 vagem de faveira; VF_{75%} = milho, farelo de soja e 75% vagem de faveira e VF = vagem de
830 faveira.

831 **2.1. Análises químicas**

832 A composição química das amostras (Tabelas 1 e 2) foi obtida segundo foi obtido
833 segundo a AOAC (1995), quanto à matéria seca (MS) (ID 930,15), matéria mineral (MM) (ID
834 942,05), matéria orgânica (MO - 920.39), proteína bruta (PB) (ID 954,01) e extrato etéreo (EE -
835 ID 920,39). A fibra em detergente neutro (FDN) (ID 973,18; Mertens, 2002) e fibra em
836 detergente ácido (FDA) (ID 973,18; Mertens, 2002) foram analisadas sequencialmente na mesma
837 amostra em sacos de filtro e corrigidas para cinza residual, utilizando-se um analisador de fibras
838 ANKOM (ANKOM Technology Corporation, Macedon, New York, EUA). A FDN foi analisada

839 usando α -amilase termoestável. O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) foi estimado pela
 840 fórmula $CNF=CHOT-FDN$, segundo Hall (2000), sendo CHOT o teor de carboidratos totais,
 841 obtido pela fórmula $CHOT=100-(PB\%+EE\%+MM\%)$, proposta por Sniffen et al. (1992).

Tabela 1. Composição química dos ingredientes das rações

| Item | Ingredientes | | |
|--------------------------------------|----------------|-------|------------------|
| | Farelo de soja | Milho | Vagem de faveira |
| Matéria seca | 875,9 | 872,1 | 871,0 |
| | <i>g/kgMS</i> | | |
| Proteína bruta | 495,6 | 117,4 | 106,1 |
| Extrato etéreo | 11,0 | 24,0 | 21,0 |
| Fibra em detergente neutro | 145,2 | 132,9 | 142,7 |
| Fibra em detergente ácido | 115,4 | 43,4 | 138,6 |
| Matéria mineral | 69,0 | 9,0 | 33,0 |
| Carboidratos não fibrosos | 279,2 | 716,7 | 697,2 |
| Nutrientes digestíveis totais (NDT)* | 679,9 | 720,4 | 666,8 |

*Valor estimado pelas equações propostas por Cappelle et al. (2001).

842

Tabela 2. Composição química dos substratos

| Ingredientes | Substratos | | | | |
|--------------------------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|
| | Controle | VF _{25%} | VF _{50%} | VF _{75%} | VF |
| | <i>Composição percentual</i> | | | | |
| | <i>g/kg MS</i> | | | | |
| Farelo de soja | 28,65 | 29,49 | 29,40 | 29,49 | 0,00 |
| Milho em grão triturado | 71,35 | 52,80 | 35,30 | 17,71 | 0,00 |
| Vagem de faveira triturada (VF) | 0,00 | 17,71 | 35,30 | 52,80 | 100,0 |
| Total | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| | <i>Composição química</i> | | | | |
| Matéria seca | 888,9 | 883,1 | 897,0 | 894,1 | 871,0 |
| | <i>g/kgMS</i> | | | | |
| Matéria orgânica | 970,4 | 963,8 | 967,0 | 964,1 | 967,0 |
| Proteína bruta | 227,9 | 263,2 | 228,8 | 233,1 | 106,1 |
| Fibra em detergente neutro | 404,2 | 429,9 | 439,3 | 436,9 | 142,7 |
| Fibra em detergente ácido | 61,0 | 86,6 | 122,9 | 123,7 | 138,6 |
| Carboidratos não fibrosos | 305,8 | 235,8 | 255,9 | 248,0 | 697,2 |
| Extrato etéreo | 32,3 | 35,0 | 43,8 | 47,7 | 21,0 |
| Nutrientes digestíveis totais (NDT)* | 708,2 | 698,3 | 688,8 | 679,4 | 666,8 |

*Valor estimado pelas equações propostas por Cappelle et al. (2001).

843

844 **2.2. Preparo do inóculo cultivado *in vitro* por 72h**

845 Foram utilizados como doadores de conteúdo ruminal quatro ovinos machos castrados
846 da raça Santa Inês ($60 \pm 2,5$ kg de PV) providos de cânula no rúmen e adaptados por sete dias a
847 uma dieta com 40% de feno de capim-Tifton 85 e 60% de concentrado (70% milho e 30% de
848 farelo de soja), disponibilizada duas vezes no dia, as 8:00 e 16:00 h com livre acesso à mistura
849 mineral e água, formulada segundo o NRC (2007) para manutenção.

850 Frações líquidas e sólidas do conteúdo ruminal foram recolhidas separadamente de cada
851 animal antes da refeição da manhã e mantidas em condições anaeróbias. A fase líquida foi
852 armazenada em garrafas térmicas pré-aquecidas a 39 °C e a fase sólida em sacos de plástico em
853 refrigeradores com sacos térmicos aquecidos a 39 °C. A fração líquida foi obtida por uma sonda
854 acoplada a uma seringa (capacidade para 100 mL) e a fração sólida por uma pinça de aço
855 inoxidável. Após a coleta, todo o material foi enviado imediatamente para o laboratório, onde
856 foram preparados os inóculos. Um inóculo foi preparado para cada animal. Por cada inóculo, 500
857 g do sólido e 500 mL do líquido do conteúdo ruminal foram homogeneizados durante 10 s,
858 filtrados em três camadas de tecido de algodão como descrito por Bueno et al. (2005). O material
859 filtrado foi então mantido em banho-maria (39 °C) sob a saturação de CO₂ até à sua utilização.

860 Os inóculos foram preparados e incubados em incubadora *in vitro* TECNAL (modelo
861 TE-150) a 39 °C, em quatro jarras com capacidade para 2 L. Em cada jarra colocou-se 300 mL
862 do conteúdo ruminal de um ovino e 600 mL de solução nutritiva e injeção de CO₂ por 10 s.
863 Como substrato para os microrganismos, em cada jarra adicionou-se um saco de náilon (8x12 cm
864 e 50 µm) contendo 12 g da dieta composta por 40% de feno de capim-Tifton e 60% de
865 concentrado (Tabela 2), o qual foi substituído por um outro igual após 24 horas da incubação,
866 permanecendo na jarra até as 72 h de fermentação (Czerkawski e Breckenridge, 1977 ; Carro et
867 al. 2009).

868 A solução nutritiva (pH = 7,0), foi obtida segundo Theodorou et al. (1994), a partir de
869 soluções de micro (CaCl₂.2H₂O; MnCl₂.2H₂O; CoCl₂.6H₂O e FeCl₃.6H₂O) e macrominerais

870 (Na₂HPO₄; KH₂PO₄ e MgSO₄.7H₂O), solução tampão (NH₄CO₃ e NaHCO₃), solução redutora
871 (Cysteíne HCl; NaOH 1M e Na₂S.9H₂O) e solução indicadora (Resazurim). Para manter o
872 tamponamento e, conseqüentemente, o pH do inóculo cultivado, retirava-se uma fração de 100
873 mL do mesmo e completava-se o volume com 100 mL de solução nutritiva a cada 24 horas de
874 fermentação.

875 As condições dos inóculos cultivados foram monitoradas durante todo o tempo de
876 incubação, com coletas de amostras a cada 24 h - momento em que era realizada a injeção de
877 CO₂ para manter o ambiente anaeróbico - para determinação do pH, da concentração de ácidos
878 graxos de cadeia curta e para a quantificação de bactérias e protozoários.

879 **2.3. Ensaio de produção de gases com inóculo cultivado *in vitro***

880 Os substratos foram avaliados pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de
881 gases (PG) (Bueno et al., 2005), utilizando-se um transdutor de pressão e um registrador de
882 dados (Pressure Press Data 800, LANA, CENA/USP, Piracicaba, Brasil).

883 Foram utilizados inóculos cultivados *in vitro* no laboratório por 72 horas e inóculos
884 provenientes diretamente do conteúdo ruminal dos ovinos doadores. A coletado a fração líquida
885 do conteúdo ruminal dos ovinos foi obtida por uma sonda acoplada a uma seringa (capacidade
886 100 mL) e a fração sólida por uma pinça de aço inoxidável. 500 g do sólido e 500 mL do líquido
887 do conteúdo ruminal foram misturados durante 10 s, filtrados em três camadas de tecido de
888 algodão e mantidos em banho-maria (39 °C), sob CO₂ até a inoculação.

889 A solução nutritiva (pH = 7,0), foi obtida segundo Theodorou et al. (1994), a partir de
890 soluções de micro (CaCl₂.2H₂O; MnCl₂.2H₂O; CoCl₂.6H₂O e FeCl₃.6H₂O) e macrominerais
891 (Na₂HPO₄; KH₂PO₄ e MgSO₄.7H₂O), solução tampão (NH₄CO₃ e NaHCO₃), solução redutora
892 (Cysteíne HCl; NaOH 1M e Na₂S.9H₂O) e solução indicadora (Resazurim), sendo
893 continuamente saturado com CO₂ e mantido a 39 °C até utilização.

894 Pesou-se 0,5 g de cada substrato (rações concentrada) em sacos de filtro Ankom #F57,
895 (50 mm x 40 mm, porosidade 10 µm). Realizou-se dois ensaios de produção de gases: No
896 primeiro, os substratos foram incubados em 96 frascos de 160 mL (*head space* de 85 mL) com
897 50 mL da solução nutritiva e 25 mL de inóculo provenientes diretamente do conteúdo ruminal
898 dos doadores. No segundo, adicionou-se 75 mL do inóculo cultivado *in vitro* (inóculo cultivado
899 75) sem a solução nutritiva.

900 Os frascos foram imediatamente fechados com rolha de borracha butílica de 20 mm
901 (Bélico Glass Inc., Vineland, Nova Iorque, EUA), agitados manualmente e incubados a 39 °C em
902 estufa de circulação forçada de ar por 24 h. A pressão do gás (*p*) no *head space* foi medida às 4,
903 8, 12 e 24 h. A produção de gás foi calculada utilizando-se a equação definida para as condições
904 laboratoriais e do ensaio (Soltan et al., 2012):

$$905 \quad V = 7,365 \times p \quad (n = 500; r^2 = 0,99)$$

906 Sendo: *V* = volume de gás (mL); *p* = pressão mensurada (psi). A produção total de gás foi
907 considerada como a soma das produções parciais de cada leitura.

908 Para determinação da produção de metano (CH₄), amostrou-se 2,5 mL de gás a cada
909 tempo de medição, com uma seringa de 10 mL, e armazenou-se em um tubo de vácuo de 10 mL.
910 A concentração de metano foi determinada por cromatografia de fase gasosa (Shimadzu 2014,
911 Tokyo, Japão) equipado com uma coluna microempacotada Shincarbon ST 100/120 (diâmetro
912 externo de 1,5875 mm, diâmetro interno de 1,0 mm, e comprimento de 1 m; n° 19809, Restek,
913 Bellefonte, PA, EUA). As temperaturas da coluna, do injetor e do detector de ionização de chama
914 foram 60, 200 e 240 °C, respectivamente. O Hélio, a 10 mL/min foi usado como gás de arraste. A
915 concentração de CH₄ foi determinada por calibração externa com curva analítica (0, 30, 60, 90 e
916 120 mL/L) preparado com CH₄ puro (White Martins Gases PRAXAIR industrial Inc., Osasco,
917 Brasil; 995 mL/L de pureza). A concentração de CH₄ foi determinada de acordo com Longo et
918 al. (2006), sendo:

919 CH_4 (mL) = (PG (mL) + *head space*, 85 mL) x concentração de CH_4 , mL/mL

920 A concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi determinada de acordo
921 com Palmquist e Conrad (1971). Cerca de 1,6 ml de fluido ruminal tamponado foi centrifugado a
922 15 min por 15000 x g a 4° C (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, EUA) com 0,4 mL de
923 solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% com ácido fórmico 98-100% + 0,2 mL de solução de
924 ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno, PM = 116,16; CAS 88-09-5; Sigma Chemie
925 Gmbh, Steinheim, Alemanha). Após a centrifugação, aproximadamente 1,2 mL foi transferido
926 para o vial cromatográfico. Injetou-se 01 µl de amostra em cromatógrafo gasoso (GC HP 7890A;
927 integrador HP 7683B, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) equipado com coluna capilar
928 HP-FFAP (19091F- 112; 25m; 0,320 mm; 0,50 µm; J&W Agilent Technologies Inc.; Palo Alto,
929 CA, EUA). Com hidrogênio (1,35 mL/min) como gás de arraste.

930 A curva de calibração externa foi feita com padrões cromatográficos (Chem Service,
931 West Chester, PA, EUA) de ácido acético (99,5%; CAS 64-19-97), propiônico (99%; CAS 79-
932 09-4), isobutírico (99%; CAS 79-31-2), butírico (98,7%; CAS 107-92-6), isovalérico (99%; CAS
933 503-74-2) e valérico (99%; CAS 109-52-4). A solução-padrão de maior concentração
934 (denominada “superalta”) continha 200 mM de ácido acético, 54 mM de ácido propiônico, 6 mM
935 de ácido isobutírico, 45 mM de ácido butírico, 9 mM de ácido isovalérico e 9 mM de ácido
936 valérico. As soluções-padrão subsequentes foram obtidas diluindo-se a solução “superalta” por ½
937 (alta), ¼ (média), 1/8 (baixa) e 1/16 (superbaixa). Para a preparação dos vials com soluções-
938 padrão foram adicionadas as mesmas quantidades de solução 3:1 ácido metafosfórico:ácido
939 fórmico + padrão interno usadas no preparo das amostras.

940 **2.4. Degradabilidade ruminal e características de fermentação**

941 Decorridas 24 h da incubação, os sacos contendo o resíduo não degradado foram
942 removidos e imersos em água com gelo para cessar o processo de fermentação microbiana. A
943 matéria orgânica verdadeiramente degradável (MOVD) foi determinada de acordo com Van

944 Soest et al. (1991). Os sacos foram tratados sequencialmente por 1 h a 90 °C com uma solução
945 detergente neutra, com α -amilase termoestável, em um analisador de fibra ANKOM220
946 (ANKOM Technology Corporation, Macedon, New York, EUA), lavados com água destilada
947 quente e acetona e mantidos em estufa a 105 °C por 24 h. Em seguida, foram incinerados em
948 forno mufla a 550 °C. A diferença entre as quantidades de MO incubada e MO não degradada foi
949 considerada MOVD (mg). A diferença entre a quantidade de fibra em detergente neutro (FDN)
950 incubada e o resíduo não degradado foi considerada FDN degradada. O fator de partição (FP),
951 um indicador da eficiência microbiana, foi calculado pela razão da MOVD (mg) pelo volume de
952 gás (mL), após 24 h de incubação (Blümmel et al., 1997).

953 A concentração de N-NH₃ foi medida de acordo com Preston (1995), pelo método
954 micro-Kjeldahl, com destilação a vapor com solução de tetraborato de sódio (5%), sendo o N-
955 NH₃ recolhido em solução de ácido bórico (20%) e determinado por titulação com solução de
956 H₂SO₄ (0,05 N). As contagens de protozoários e bactérias nos inóculos foram realizadas ao
957 microscópio de luz, de acordo com Dehority et al. (1983) e Bryant e Robison (1961),
958 respectivamente.

959 **2.5.Análise Estatística**

960 Os dados foram analisando em blocos ao acaso utilizando-se modelos mistos, com
961 efeito fixo dos inóculos (2 graus de liberdade, GL), substratos (4 graus de liberdade, GL) e suas
962 interações (8 grau de liberdade, GL) e os animais e o erro considerados efeito aleatório,
963 utilizando-se o procedimento MIXED do SAS (2002). As médias foram estimadas com auxílio
964 do comando LSMEANS. Quando significativas, as médias dos tratamentos foram comparadas
965 pela diferença mínima significativa de Fisher (Fisher's Protected Least-Significant Difference-
966 LSD), ao nível de probabilidade $P \leq 0,05$.

967 **Resultados e Discussão**

968 Não houve interação ($P>0,05$) inóculo x substrato para as variáveis da produção de
 969 gases. O inóculo cultivado na proporção 25 mL associado à solução nutritiva mostrou-se
 970 equivalente ($P>0,05$) ao inóculo controle quanto ao fator de partição (FP) e à matéria orgânica
 971 verdadeiramente degradada (MOVD). Menor valor de PG (mL/g MS) ($P<0,05$), menor
 972 concentração de CH₄ e maior valor de FP foram obtidos com o inóculo cultivado na proporção
 973 75 mL sem solução nutritiva (Tabela 3). Este resultado para FP indica que menor eficiência de
 974 produção de massa microbiana com o inóculo cultivado 75, com necessidade de maior
 975 quantidade de MO degradada dos substratos para gerar 1 mL de gases.

Tabela 3. Efeito de inóculo associado a substrato na produção de gases (PG), produção de metano (CH₄), matéria orgânica verdadeiramente degradável (MOVD) e Fator de partição (FP)

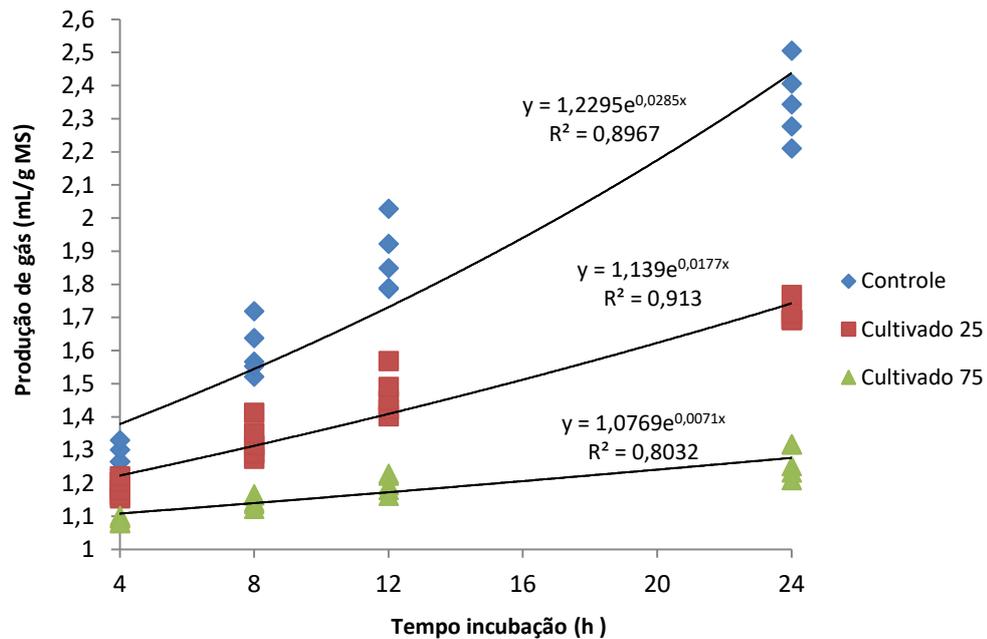
| Substratos | Inóculos | | | EPM ¹ |
|---------------------------------|----------|--------------|--------------|------------------|
| | Controle | Cultivado 25 | Cultivado 75 | |
| PG (mL/g MS) | | | | |
| Controle | 344a* | 228b | 102c | 19,87 |
| VF _{25%} | 346a | 228b | 102c | 19,87 |
| VF _{50%} | 311a | 228b | 91c | 19,87 |
| VF _{75%} | 366a | 233b | 123c | 19,87 |
| VF | 404a | 247b | 130c | 19,87 |
| CH₄ (mL/g MS) | | | | |
| Controle | 24,75a | 0,468b | 0,096b | 2,95 |
| VF _{25%} | 27,60a | 0,416b | 0,013b | 2,95 |
| VF _{50%} | 25,82a | 0,515b | 0,043b | 2,95 |
| VF _{75%} | 31,10a | 0,544b | 0,472b | 2,95 |
| VF | 36,74a | 0,691b | 0,260b | 2,95 |
| MOVD (g) | | | | |
| Controle | 0,322a | 0,331a | 0,292b | 0,011 |
| VF _{25%} | 0,315a | 0,330a | 0,332a | 0,011 |
| VF _{50%} | 0,341a | 0,335a | 0,301b | 0,011 |
| VF _{75%} | 0,332a | 0,344a | 0,313a | 0,011 |
| VF | 0,330a | 0,327a | 0,319a | 0,011 |
| FP (mg/mL) | | | | |
| Controle | 1,27b | 1,88b | 3,61a | 0,235 |
| VF _{25%} | 1,24b | 1,85b | 4,08a | 0,235 |
| VF _{50%} | 2,12b | 1,89b | 4,15a | 0,235 |
| VF _{75%} | 1,24b | 1,89b | 3,84a | 0,235 |
| VF | 1,08b | 1,67b | 3,40a | 0,235 |

VF=vagem de faveira; ¹EPM = Erro padrão da média; *Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si ($P<0,05$).

976

977 A produção cumulativa de gases foi maior quando da utilização do inóculo controle e

978 menor para o inóculo cultivado na proporção 75 mL (Figura 1). A avaliação da produção
 979 cumulativa de gases se verificou na fase exponencial do modelo de produção de gases,
 980 correspondente ao intervalo de tempo 6 a 30 horas, segundo Fortaleza et al. (2013). Decorridas
 981 24 horas de incubação, foi verificada menor produção cumulativa para os inóculos cultivados.



982
 983 **Figura 1.** Produção cumulativa de gases *in vitro* em função do inóculo e tempo de
 984 incubação, observadas e ajustadas à fórmula exponencial: $10^{(PG \text{ (mL/gMS) / 1000})}$

985
 986 A produção acumulativa de gases está associada ao crescimento rápido dos
 987 microrganismos, consistindo a fermentação do resultado das interações dos microrganismos com
 988 a maneira como degradam os substratos (Maurício et al., 2001). A diferença na produção
 989 acumulativa de gases observada na figura 1 entre os inóculos pode ser explicada pela maior
 990 atividade de fermentação dos microrganismos do inóculo controle em relação aos cultivados *in*
 991 *vitro*.

992 A composição dos substratos incubados influenciou ($P < 0,05$) o pH do ambiente de
 993 fermentação *in vitro*, promovendo alterações na microbiota dos inóculos e nas concentrações de
 994 N-NH₃ e AGCC (Tabela 4 e Figura 2). Elevadas concentrações de nutrientes digestíveis totais
 995 (NDT) de dietas e ingredientes influenciam a fermentação ruminal, com redução no pH e nas

996 concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (Calsamiglia et
 997 al., 2008). Essas alterações impactam diretamente a atividade dos microrganismos ruminais
 998 (Palmonari et al., 2010), principalmente os protozoários, sensíveis a baixo pH, os quais
 999 necessitam de pH>6,0 para atuarem adequadamente no processo fermentativo (Franzolin e
 1000 Dehority, 1996). No entanto, as bactérias amilolíticas atuam em uma faixa de pH mais baixo
 1001 (5,8) (Furlan et al., 2011).

Tabela 4. Efeito de inóculo associado a substrato no pH, concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃ mg/100mL) e contagem de protozoários e bactérias

| Substratos | Inóculos | | | EPM |
|---|----------|--------------|--------------|-------|
| | Controle | Cultivado 25 | Cultivado 75 | |
| pH | | | | |
| Controle | 6,6a* | 6,5b | 5,1c | 0,042 |
| VF _{25%} | 6,5a | 6,4b | 5,1c | 0,042 |
| VF _{50%} | 6,5a | 6,4a | 5,1b | 0,042 |
| VF _{75%} | 6,5a | 6,4a | 5,1b | 0,042 |
| VF | 6,4a | 6,4a | 5,0b | 0,042 |
| N-NH₃ (mg/100mL) | | | | |
| Controle | 37,18b | 19,42c | 44,45a | 6,35 |
| VF _{25%} | 37,62a | 20,12b | 42,87a | 6,35 |
| VF _{50%} | 33,86b | 20,56c | 43,13a | 6,35 |
| VF _{75%} | 36,83a | 22,22b | 40,63a | 6,35 |
| VF | 35,35a | 18,72b | 40,83a | 6,35 |
| Protozoários (10⁵/mL) | | | | |
| Controle | 9,31a | 1,53b | 2,94b | 1,20 |
| VF _{25%} | 9,16a | 1,59b | 2,36b | 1,20 |
| VF _{50%} | 8,98a | 1,29b | 2,79b | 1,20 |
| VF _{75%} | 10,57a | 1,40b | 2,83b | 1,20 |
| VF | 9,56a | 1,18b | 2,44b | 1,20 |
| Bactérias (10⁹ /mL) | | | | |
| Controle | 1,32b | 0,657c | 2,13a | 0,158 |
| VF _{25%} | 1,28b | 0,652c | 2,27a | 0,158 |
| VF _{50%} | 1,42b | 0,647c | 2,06a | 0,158 |
| VF _{75%} | 1,79b | 0,651c | 2,17a | 0,158 |
| VF | 1,35b | 0,628c | 2,51a | 0,158 |

VF=vagagem de faveira; ¹EPM = Erro padrão da média; Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si (P<0,05).

1002

1003 A composição de microrganismos num sistema *in vitro*, deve ser representativa, em
 1004 termos de quantidade e qualidade, daquela encontrada no rúmen do animal hospedeiro. A
 1005 população de protozoários nos inóculos do estudo mostrou-se mais representativa no inóculo
 1006 controle, provido diretamente do conteúdo ruminal dos ovinos doadores, devido ao fato do pH

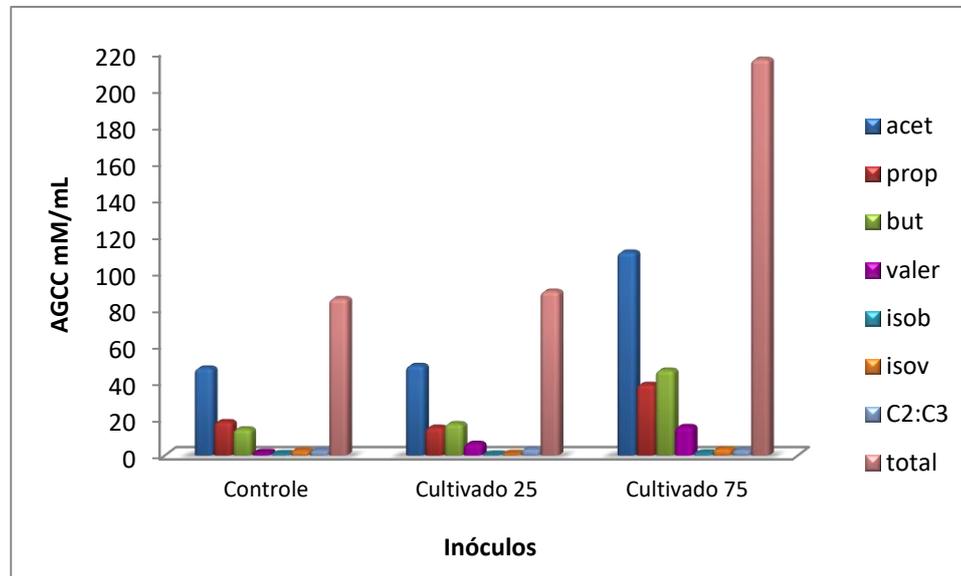
1007 ruminal nesse inóculo manter-se acima de 6,0. A população de bactérias mostrou-se mais
1008 representativa no inóculo cultivado na proporção 75 mL, o que está relacionado com o tipo de
1009 substrato incubado (ração concentrada) e o menor pH desse inóculo o que propiciou o maior
1010 crescimento da população de bactérias no inóculo cultivado 75. Lopes et al. (2015) analisaram o
1011 inóculo de ovinos doadores do conteúdo ruminal para o preparo do inóculo cultivado *in vitro*
1012 (alimentados com dietas ricas em concentrado) e constataram a predominância de bactérias do
1013 gênero *Prevotella*, responsáveis pela degradação de amido, o que comprova o perfil da
1014 população de bactérias presente nos inóculos.

1015 A estrutura e abundância das comunidades *Archaea* e bacteriana verificadas por
1016 Romagnoli et al. (2012) por qPCR no inóculo controle e cultivado *in vitro* na proporção 25 mL e
1017 constataram a predominância de bactérias e a redução de *Archaea* no inóculo cultivado. A menor
1018 presença das Archaeas no inóculo cultivado está relacionada ao perfil do substrato incubado
1019 (ração concentrada ou vagem de faveira) sem presença de volumoso (fibra) o que favoreceu a
1020 queda do pH e propiciou um ambiente mais hostil à sobrevivência das bactérias metanogênicas,
1021 devido à baixa produção de H₂ resultante dessa fermentação.

1022 As concentrações de N-NH₃ foram suficientes para promover o crescimento microbiano
1023 nos inóculos avaliados, pois superaram o mínimo estabelecido por Preston (1986), 5 mg/100 mL.
1024 Esses resultados corroboram os verificados por Calsamiglia et al. (2012), em que o aumento da
1025 disponibilidade de carboidratos de elevada capacidade de fermentação determina a taxa de
1026 crescimento microbiano e conseqüentemente melhora a eficiência de utilização do N-NH₃ no
1027 ambiente ruminal.

1028 A concentração dos AGCC foi maior (P<0,05) ao se utilizar o inóculo cultivado 75,
1029 resultando em menor pH nesse inóculo (Figura 2). A produção e a proporção molar dos AGCC
1030 são determinadas principalmente pelo substrato fermentado, velocidade de fermentação e pH

1031 ruminal (Souza et al., 2010). Com a redução do pH há aumento na concentração de ácidos graxos
 1032 voláteis.



1033 **Figura 2.** Efeito de inóculo associado a substrato na concentração de ácidos
 1034 graxos de cadeia curta (mM/mL).
 1035

1036
 1037 A diminuição na proporção de acetato em dietas com elevado teor de carboidratos de
 1038 rápida fermentação ocorre por conta da morte das bactérias fibrolíticas e dos protozoários
 1039 (principais produtores de acetato), ocasionada pela diminuição do pH ruminal (Mota et al.,
 1040 2010), fato observado nesta pesquisa quando da incubação de rações concentradas. Pela
 1041 estequiometria da fermentação ruminal, quando há produção de ácido propiônico reduzem as
 1042 perdas de energia na forma de CO₂ e CH₄, pois este AGCC possui capacidade de inibir a
 1043 produção de metano no rúmen, por ser utilizado o hidrogênio do ambiente ruminal na sua
 1044 formação (Ungerfeld et al., 2005). Na fermentação *in vitro*, a produção de CH₄ foi menor com o
 1045 inóculo cultivado 25 (em média 0,177 mL/g MS) o que está relacionado à maior produção de
 1046 ácido propiônico (em média 38,59 mM/mL) com esse inóculo.

1047 Dietas com concentrados, ricas em amido, propiciam o desenvolvimento de bactérias
 1048 produtoras de propionato e estão associadas ao aumento na proporção de propionato em
 1049 detrimento do acetato, embora acetato seja sempre o mais abundante dos ácidos graxos.

1050 A relação acetato:propionato pode interferir no volume total de gases, uma vez que a
 1051 maior produção de acetato favorece a produção de gases (Beuvink e Spoelstra, 1992). Há
 1052 interação entre os ácidos graxos voláteis e o meio nutritivo (tampão). Com o decréscimo no pH
 1053 há favorecimento à produção de propionato e, conseqüentemente, redução na produção de gases.

1054 Os resultados para degradabilidade da MS, MO e FDN foram condizentes com os
 1055 resultados obtidos para produção de gases, sendo os valores obtidos com o inóculo cultivado 25
 1056 equivalente ($P < 0,05$) ao inóculo controle (Tabela 5). Esses resultados indicam que o inóculo
 1057 cultivado 25 tem o mesmo potencial para estimar a degradabilidade de dietas com elevadas
 1058 proporções de concentrados que o inóculo obtido pelo método convencional.

Tabela 5. Efeito de inóculo associado a substrato na degradabilidade da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO) e fibra em detergente neutro (DFDN)

| Substratos | Inóculos | | | ¹ EPM |
|--------------------|----------|--------------|--------------|------------------|
| | Controle | Cultivado 25 | Cultivado 75 | |
| DMS (g/kg) | | | | |
| Controle | 749a* | 770a | 679b | 25,31 |
| VF _{25%} | 741a | 780a | 720a | 25,31 |
| VF _{50%} | 733a | 775a | 698b | 25,31 |
| VF _{75%} | 773a | 799a | 730a | 25,31 |
| VF | 780a | 771a | 754a | 25,31 |
| DMO (g/kg) | | | | |
| Controle | 746a | 768a | 677b | 26,26 |
| VF _{25%} | 740a | 774a | 780a | 26,26 |
| VF _{50%} | 786a | 771a | 695b | 26,26 |
| VF _{75%} | 771a | 797a | 725a | 26,26 |
| VF | 780a | 772a | 753a | 26,26 |
| DFDN (g/kg) | | | | |
| Controle | 552a | 591a | 432b | 39,58 |
| VF _{25%} | 496b | 563a | 450b | 39,58 |
| VF _{50%} | 615a | 588a | 450b | 39,58 |
| VF _{75%} | 479ab | 539a | 376b | 39,58 |
| VF | 403a | 381a | 329a | 39,58 |

1059 VF=vagem de faveira; ¹EPM = Erro padrão da média; *Médias seguidas de letras
 1060 diferentes na linha diferem entre si ($P < 0,05$).

1061 Conclusão

1062 O inóculo cultivado *in vitro* na proporção 25 mL mostrou-se equivalente ao inóculo
 1063 obtido diretamente do conteúdo ruminal de ovinos para estimativa dos parâmetros de
 1064 fermentação das rações concentradas, principalmente eficiência microbiana, indicando

1065 viabilidade de sua utilização na técnica de produção de gases.

1066 **Referências**

1067 Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1995. Official Methods of Analysis, 16th
1068 ed. AOAC, Arlington, VA.

1069 Beuvink, JMW.; Spoelstra, SF. 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products,
1070 buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed
1071 rumen microorganisms *in vitro*. Applied Microbiology and Biotechnology, v.37, p.505-509.

1072 Blümmel M., Makkar H.P.S., Becker K., 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited.
1073 Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. v. 77, p. 24-34

1074 Bryant, MP.; Robinson, I.M., 1961. An improved non-selective culture medium for ruminal
1075 bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen. Journal
1076 of Dairy Science, v.44, p.1446.

1077 Bueno, ICS. et al., 2005. Influence of inoculum source in a gas production method. Animal Feed
1078 Science and Technology, v.123-124, p.95-105.

1079 Capelle, ER. et al., 2001. Estimativas do valor energético a partir de características químicas e
1080 bromatológicas dos alimentos. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v.30, p.1837-1856, 2001.

1081 Calsamiglia, S. et al., 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined
1082 effect of type of diet and pH. Journal Animal Science. v.86, p.702–711.

1083 Calsamiglia, S. et al., 2012. Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools
1084 for its control. Animal Feed Science and Technology, v.172, p.42–50.

1085 Carro, MD. et al. 2009. Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in
1086 Rusitec, single-flow continuous-culture fermenters and sheep rumen. Animal, v.3, p.527–534.

- 1087 Dehority, BA. et al., 1983. Occurrence of the rumen ciliate *Oligoisotricha bubali* in domestic
1088 cattle (*Bos taurus*). Applied and Environmental Microbiology, v.45,p.1394-1397.
- 1089 Fortaleza, APS. et al., 2013. Efeito da torta de nabo forrageiro sobre a cinética de fermentação e
1090 degradação ruminal *in vitro*. Archivos de Zootecnia. v.62, p.131-142.
- 1091 Franzolin, R.; Dehority, BA. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal
1092 protozoa concentrations. Journal of Animal Science, v.74, p.2803- 2809.
- 1093 Furlan, RL.; Macari, M.; Faria Filho, DE. 2011. Anatomia e fisiologia do trato gastrintestinal. In:
1094 BERCHIELLI T.T.; PIRES A.V.; OLIVEIRA S.G. (Eds). **Nutrição de ruminantes**. 2 ed.
1095 Jaboticabal, SP: FUNEP, 2011, p. 01-23.
- 1096 Hall, MB., 2000. Neutral detergent-soluble carbohydrates nutritional relevance and analysis: a
1097 laboratory manual. Florida: University of Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences.
1098 Bulletin n.339, p.76.
- 1099 Longo, C. et al., 2006. The influence of head-space and inoculum dilution on *in vitro* ruminal
1100 methane measurements. International Congress Series, v.1293, p.62-65.
- 1101 Lopes, LD. et al., 2015. Exploring the sheep rumen microbiome for carbohydrate-active
1102 enzymes. Antonie van Leeuwenhoek. v.107, p.1-16.
- 1103 Maurício, RM. et al., 2001. Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum
1104 for an *in vitro* gas production technique for evaluating forages. Animal Feed Science and
1105 Technology, v.89, p.33-48.
- 1106 Mertens, DR., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feed
1107 with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. Journal of AOAC International, v.85,
1108 n.6, p.1217-1240.
- 1109 Mota, MF. et al., 2010. Parâmetros ruminais de vacas leiteiras mantidas em pastagem tropical.

- 1110 Archivos de Zootecnia, v.59, p.217-224.
- 1111 Nagadi, S. et al., 2000. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial
1112 concentration of ruminal fluid and *in vitro* gas production degradability parameters. Animal Feed
1113 Science and Technology, v.87, p.231-239.
- 1114 National Research Council. NRC. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Cervides
1115 and Camelides. Washington, D.C.: National Academy Press, 362p.
- 1116 Palmonari, A. et al., 2010. pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of
1117 lactating dairy cows. Journal of Dairy Science, v.93, n.1, p.279 - 287.
- 1118 Palmquist D., Conrad H.,1971. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high grain or
1119 high fat diets. Journal of Dairy Science. v.54, p.1025-1033.
- 1120 Preston, TR., 1986. Analytical methods for characterizing In: Feed resources for ruminants.
1121 Better utilization of crop residues and by products in animal feeding: research guidelines. 2. A
1122 practical manual for research workers. Rome: FAO, p.106
- 1123 Preston TR., 1995. Biological and chemical analytical methods. In: T.R. Preston (Editor).
1124 Tropical Animal Feeding: a Manual for Research Workers. FAO, Rome.
- 1125 Romagnoli, EM. et al., 2012. Quantification of *Archaea* and bacteria domains in the sheep rumen
1126 incubated under two diet conditions. In: 14th International Symposium on Microbial Ecology,
1127 ISME14, Copenhagen. International Society for Microbial Ecology, v.1. p.1 – 1.
- 1128 Rymer, C. et al., 2005. *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological
1129 considerations and challenges. Animal Feed Science and Technology. v.123, p.9-30.
- 1130 Sniffen, CJ. et al. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II.
1131 Carbohydrate and protein availability. Journal of Animal Science, v.70, n.7, p.3562-3577.
- 1132 Soltan YA. et al., 2012. Comparative *in vitro* evaluation of forage legumes (*prosopis*, *acacia*,

- 1133 *atriplex*, and *leucaena*) on ruminal fermentation and methanogenesis. Journal Animal and Feed
1134 Sciences, v.21, p.759 –772.
- 1135 Souza, EJO de; Guim, A; Torres, TR. 2010. Efeitos da fibra fisicamente efetiva sobre a produção
1136 de ácidos no rúmen. Revista Eletrônica Nutritime, v.7, p.1269-1279.
- 1137 Statistical Analysis Systems (SAS), 2002. Statistical Analysis Systems User's Guide: Statistics,
1138 Version 8. SAS Institute.
- 1139 Theodorou, MK.; Williams, BA.; Dhanoa, MS. 1994. A simple gas production method using a
1140 pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed
1141 Science and Technology, v.48, p.185-197.
- 1142 Ungerfeld, EM. et al., 2005. Effects of two lipids on *in vitro* ruminal methane production.
1143 Animal Feed Science and Technology, v.119, p.179-185.
- 1144 Van Soest, PJ. et al., 1991. Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications
1145 in dairy caltle. Journal of Dairy Science, v.74, p.3583-3597.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Para manter as características no inóculo cultivado *in vitro* deve-se considerar a manutenção do pH e da população microbiana (atividade microbiana), bem como a disponibilidade de substrato para crescimento microbiano.
- A população de microrganismos no inóculo cultivado *in vitro* deve ser representativa e equivalente à do conteúdo ruminal dos animais doadores.
- Considerando o cultivo do inóculo *in vitro* para rações concentradas deve-se levar em consideração o tempo de incubação para manter as características fermentativas às do inóculo.
- A dieta para manutenção do inóculo cultivado *in vitro* também é importante fonte de variação no líquido ruminal, sendo necessárias respostas com dietas com maior proporção de volumoso.

APÊNDICE

FOTOS DO PREPARADO INÓCULO CULTIVADO *IN VITRO*





Figura 4. Saco de nylon para o substrato e jarra para incubação do inóculo amplificado (A); Preparo do inóculo cultivado nas jarras com 300 mL do conteúdo ruminal e 600 mL de solução nutritiva (B) sob adição de CO₂; Inóculo cultivado *in vitro* ate 72 horas.

FOTOS PRODUÇÃO DE GASES



Figura 1. Preparo da solução nutritiva sob adição de CO₂.



Figura 2. Ovinos doadores de conteúdo ruminal (A); Coleta do conteúdo ruminal líquido (B); Coleta do conteúdo ruminal sólido.



Figura 3. Homogeneização das frações sólida e líquida do conteúdo ruminal (A); Filtragem do material após homogeneização das frações sólida e líquida (B); líquido ruminal mantido a 39° C sob CO₂.

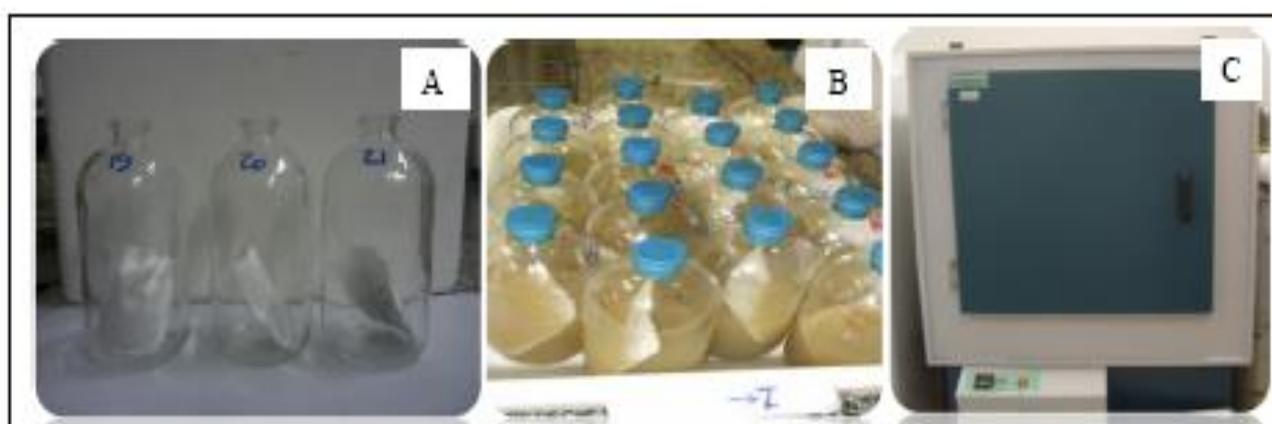


Figura 4. Substratos nas garrafinhas (A); Substrato com inóculo e solução nutritiva (B); Incubação das amostras em estufa com circulação forçada de ar a 39°C (C).



Figura 5. Leitura da pressão (A); Material para MOVD (B); Coleta de amostra para determinar AGCC, N-NH₃, contagens de bactérias e protozoários (C).