

SAMY EMANUELLE ALMEIDA SOUSA CAVALCANTE

FONTE DE MICRORGANISMOS ALTERNATIVA AO INÓCULO RUMINAL NA
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ALIMENTOS PARA RUMINANTES

TERESINA
2017

SAMY EMANUELLE ALMEIDA SOUSA CAVALCANTE

FONTE DE MICRORGANISMOS ALTERNATIVA AO INÓCULO RUMINAL NA
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ALIMENTOS PARA RUMINANTES

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Universidade Federal do
Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal, área de
Concentração Produção Animal

Orientadora: Vânia Rodrigues Vasconcelos
Co-orientador: Adibe Luiz Abdalla

TERESINA
2017

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

C376f Cavalcante, Samy Emanuelle Almeida Sousa
Fonte de microrganismos alternativa ao inóculo ruminal na
avaliação *in vitro* de alimentos para ruminantes / Samy Ema-
nuelle Almeida Sousa - 2017.
67 f.: il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Fede-
ral do Piauí, Teresina, 2017.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Vânia Rodrigues Vasconcelos

1. Animais abatidos 2. Avaliação de alimentos 3. Inóculo alter-
nativo 4. Produção de gases 5. Ruminantes I. Título

CDD 636.0883

**FONTE DE MICRORGANISMOS ALTERNATIVA AO INÓCULO RUMINAL
NA AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ALIMENTOS PARA RUMINANTES**

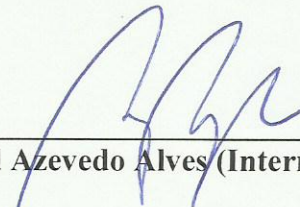
SAMY EMANUELLE ALMEIDA SOUSA CAVALCANTE

Tese aprovada em: 07/03/2017

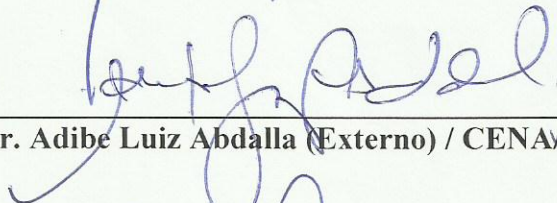
Banca Examinadora:



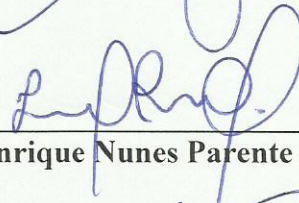
Prof. Dra. Vânia Rodrigues Vasconcelos (Presidente) / DZO/CCA/UFPI



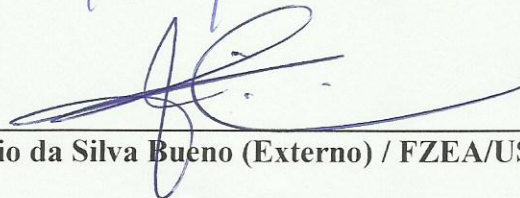
Prof. Dr. Arnaud Azevedo Alves (Interno) / DZO/CCA/UFPI



Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla (Externo) / CENA/USP



Prof. Dr. Henrique Nunes Parente (Externo) / CCAA/UFMA



Prof. Dr. Ives Claudio da Silva Bueno (Externo) / FZEA/USP-Pirassununga



Prof. Dr. Ronaldo Carlos Lucas (Externo) / Embrapa/Bolsista Pós-Doutorado

DEDICO,

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes e presentes na minha vida. À minha querida avó, **Maria das Dores Silva Almeida**; minha amada mãe, **Danielle Almeida Sousa**; minhas queridas irmãs, **Amália Sousa Cavalcante** e **Juliana Sousa Cavalcante**; minha sobrinha **Emelly Nathalie**, por todo o amor, carinho, preocupação e atenção que todas me propuseram!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **DEUS**, que sempre iluminou meu caminho e, por me dar forças para seguir adiante.

À **Universidade Federal do Piauí** e ao seu **corpo docente**, em especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em **Ciência Animal**.

À **Profa. Dra. Vania Rodrigues Vasconcelos**, pela orientação que me foi dada nesta longa jornada. Toda a paciência, apoio, críticas, sugestões e os conhecimentos transmitidos foram essenciais, sem os quais não poderia chegar até o final e serão sempre lembrados.

Ao grande **Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla**, pela orientação, pelo auxílio e suporte no decorrer do período experimental no CENA/USP, e pelo contato importante e crucial do Doutorado Sanduíche. Agradeço, também, pela paciência e compreensão, ao qual tenho uma admiração profissional inquestionável.

Ao **Prof. Arnaud Azevêdo Alves**, por sua amizade, pelos conhecimentos compartilhados, críticas e sugestões. Admiro seu profissionalismo, sua disponibilidade e dedicação à pesquisa.

À **Profa. Dra. María José Ranilla**. Faltam palavras para demonstrar os agradecimentos por toda a receptividade em León, pela oportunidade de trabalharmos juntas, pela preocupação comigo, por sua amizade e pela Ceia de Natal de 2015, longe da minha família. Agradeço de coração!

Ao meu amigo cubano, **Alexey Diaz**, pela amizade e todo apoio experimental do doutorado sanduíche; sua ajuda foi crucial.

Às amigas construídas e mantidas no Mestrado e Doutorado do **Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal** da UFPI e, também, a aqueles que puderam me auxiliar direta e indiretamente no decorrer do doutorado acadêmico. Muito obrigada pelo respeito, confiança, atenção e apoio.

Ao **Grupo de Estudos Forragicultura e Pastagens no Maranhão (FOPAMA)**, em especial à coordenadora, **Profa. Dra. Rosane Claudia Rodrigues (UFMA)**, por todo o apoio direto e indireto neste trabalho, desde o envio das amostras utilizadas e doadas pelo FOPAMA até sua contribuição no exame de qualificação. Uma pessoa que tenho grande

admiração por seu profissionalismo, dedicação e disciplina. Agradeço a confiança e a amizade.

Ao **Prof. Dr. Ives Claudio da Silva Bueno**, por sua disponibilidade e importante contribuição no exame de qualificação.

Aos professores da **Universidade Federal do Maranhão**, Campus de Chapadinha, que também me auxiliaram na realização desta conquista.

Ao **Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP)**, onde fui bem recebida e acolhida pelos estagiários, funcionários e pesquisadores. Agradeço pela disponibilidade de suas instalações, que foi fator primordial para adquirir novos conhecimentos que serão fundamentais na minha carreira profissional.

A todas as conquistas feitas na **Universidade de León (UNILEON)**, onde fui bem acolhida pelos estagiários, funcionários e pesquisadores. Agradeço pela disponibilidade de suas instalações.

Aos colegas e amigos **Adibe Filho, Alessandra Romero, Alline Schumann, Ana Cláudia Koki, Andressa Natel, Dinesh Kumar, Egon Hion, Gabriel Sakita, Gleison Sousa, Guilherme Moreira, Juliano Issakowicz, Letícia Faria, Linander Campos, Natasha Mantuan, Patrícia Pimentel, Paulo Tavares, Pierre Crouz, Ronaldo Carlos, Suzana Coimbra, Tairon Pannuzio e Thiago Bompadre** pelo convívio harmonioso, e pelas GRANDIOSAS contribuições nos experimentos.

A todos os meus **familiares** e demais **amigos** que aqui não foram citados, mas sempre estiveram torcendo por mim, almejando minha vitória.

A todos vocês, minha gratidão. Agradeço de coração!!!

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

George Bernard Shaw

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Ensaio <i>in vivo</i> na avaliação de alimentos.....	18
2.2 Técnica <i>in situ</i> na avaliação de alimentos.....	19
2.3 Técnicas <i>in vitro</i> na avaliação de alimentos.....	20
2.4 Diversidade e população microbiana ruminal.....	22
2.5 Inóculo fecal.....	23
3 CAPÍTULO I	25
4 CAPÍTULO II	38
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	54
7 ANEXOS	58

LISTA DE FIGURAS

Parte II – Capítulo 2	Página
1. Perfil da cinética de fermentação dos substratos incubados até o tempo de 144 horas, em inóculo ruminal e fecal de ovinos abatidos.....	52

LISTA DE TABELAS

Parte II - Capítulo 1	Página
1. Características bromatológica dos substratos.....	35
2. Produção de gases, digestibilidade e fator de partição do capim-Aruana, resíduo da cana-de-açúcar e feno de capim-Tifton 85 incubados em inóculos ruminal e fecal.....	36
3. Produção e concentração de metano do capim-Aruana, resíduo da cana-de-açúcar e feno de capim-Tifton 85 incubados em inóculos ruminal e fecal.....	37
Parte II - Capítulo 2	Página
1. Características bromatológica dos substratos.....	48
2. Parâmetros da cinética de produção de gases e degradação da matéria seca e matéria orgânica avaliados até o tempo de 144 horas de incubação.....	49
3. Características de fermentação dos substratos incubados em inóculo ruminal e fecal de ovinos no tempo de 24 horas.....	50
4. Degradação ruminal <i>in vitro</i> dos substratos incubados em inóculo ruminal e fecal de ovinos no tempo 24 horas.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A = potencial máximo de produção de gases.

AGCC = ácidos graxos de cadeia curta.

AND = capim-Andropógon.

CEL = celulose.

CENA = Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

CH₄ = metano.

CH₄MO = produção de metano com base na matéria orgânica.

CH₄MS = produção de metano com base na matéria seca.

CONCEA = Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

CO₂ = dióxido de carbono.

D100 = dieta com proporção igual a 100:0, volumoso:concentrado.

D50 = dieta com proporção igual a 50:50, volumoso:concentrado.

DFDN = degradação da fibra em detergente neutro.

DIVMO = degradabilidade verdadeira da matéria orgânica.

DMO = degradação da matéria orgânica.

DMS = degradação da matéria seca.

DVMO = degradação verdadeira da matéria orgânica.

epm = erro padrão da média.

FDA = fibra em detergente ácido.

FDN = fibra em detergente neutro.

FP = fator de partição.

H₂ = gás hidrogênio.

H₂SO₄ = ácido sulfúrico.

HCl = ácido clorídrico.

HEM = hemicelulose.

HUM = capim-Humidícola.

I*S = interação inóculo x substrato.

ID = identificação.

IF 23 = inóculo fecal produzido com 23 g fezes/100 mL tampão.

IF 38 = inóculo fecal produzido com 38 g fezes/100 mL tampão.

IR = inóculo ruminal.

L = tempo necessário para início da produção de gases.

LANA = Laboratório de Nutrição Animal.

LDA = lignina em detergente ácido.

MAS = capim-Massai.

MM = matéria mineral.

MO = matéria orgânica.

MOVD = matéria orgânica verdadeiramente degradada.

MS = matéria seca.

N = nitrogênio.

N-NH₃ = nitrogênio amoniacal.

p = pressão psi.

PB = proteína bruta.

PG = produção de gases.

PGMO = produção de gases com base na matéria orgânica.

PGMS = produção de gases com base na matéria seca.

pH = potencial hidrogeniônico.

S = substrato.

SBC = silagem de capim-Elefante com 5% de bagaço de cana-de-açúcar.

SCEBC = silagem de capim-Elefante com 5% de bagaço de cana-de-açúcar.

SCETB = silagem de capim-Elefante com 5% de torta de babaçu.

STB = silagem de capim-Elefante com 5% de torta de babaçu.

UNILEON = Universidad de León.

XAR = capim-Xaraés.

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a utilização de fontes microbianas alternativas ao inóculo ruminal na estimativa da degradação e da cinética de fermentação ruminal de alimentos em ruminantes, por meio de procedimentos *in vitro*. Estruturalmente este trabalho foi dividido em duas partes. A Parte I é constituída da Introdução e do Referencial Teórico, e a Parte II é referente a dois capítulos, ambos apresentados na forma de artigo científico, redigidos obedecendo às normas do Periódico *Animal Production Science*, ao qual serão submetidos a publicação. O capítulo I objetivou avaliar o efeito da concentração de fezes no inóculo fecal comparado ao inóculo ruminal, sobre a estimativa da degradabilidade e os parâmetros de fermentação ruminal pela técnica *in vitro* de produção de gases. Foram incubados os substratos capim-Aruana, feno de capim-Tifton 85 e resíduo da cana-de-açúcar. O comportamento do inóculo ruminal mostrou-se superior ($P < 0,05$) aos inóculos fecais para produção de gases com base na matéria seca, na matéria orgânica e na fibra em detergente neutro; e degradação verdadeira da matéria orgânica e da fibra em detergente neutro. O inóculo fecal nas concentrações avaliadas não foram eficazes para estimativa dos parâmetros de fermentação e de degradação ruminal do capim-Aruana, do resíduo da cana-de-açúcar e do feno de capim-Tifton-85, não podendo, dessa forma, substituir o inóculo ruminal. O capítulo II objetivou avaliar as fontes microbianas do conteúdo ruminal e das fezes de ovinos, provenientes de animais abatidos, em procedimentos *in vitro* de avaliação de alimentos para ruminantes. Foram incubadas quatro forragens tropicais, duas silagens com diferentes subprodutos como aditivos e duas dietas com duas proporções de volumoso:concentrado. Três ensaios *in vitro* foram conduzidos: 1 - cinética de fermentação ruminal até o tempo de 144 horas; 2 - características de fermentação no tempo 24 horas; e 3 - degradabilidade *in vitro* no tempo 24 horas. Os inóculos diferiram ($P < 0,05$) quanto ao potencial máximo de produção de gases, tempo necessário para atingir metade da assíntota, degradação da matéria seca e matéria orgânica. A degradabilidade da FDN mostrou-se superior ($P < 0,05$) quando avaliada em inóculo fecal comparado ao inóculo ruminal. A fonte microbiana da matéria fecal de ovinos abatidos pode ser utilizada para estimar os parâmetros de produção de gases até o tempo de 144 horas. O inóculo fecal de ovinos abatidos é eficiente na avaliação das características de degradação de nutrientes no tempo de incubação 24 horas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate alternative microbial sources to the ruminal inoculum of fistulated animals in the estimation of the degradation and kinetics of ruminal fermentation by *in vitro* procedures for the evaluation of feed for ruminant animals. Structurally this work was divided into two parts. Part I consists of the Introduction and Theoretical Referential, and Part II refers to two chapters, both presented in the form of papers, drafted according to the norms of the Journal Animal Production Science, to which they will be submitted. The Chapter I aimed to evaluate the effect faeces concentration in faecal inoculum versus ruminal inoculum on the estimation of degradability and ruminal fermentation parameters by the *in vitro* gas production technique. The substrates were grass-Aruana, Tifton 85 hay and sugarcane residue. The behavior of the ruminal inoculum showed to be upper ($P < 0.05$) to faecal inoculum for the gas production based on dry matter, organic matter and neutral detergent fiber; and true degradation of organic matter and neutral detergent fiber. The faecal inoculum at the concentrations evaluated were not effective for estimating ruminal fermentation and ruminal degradation parameters of Aruana grass, sugarcane residue and Tifton-85 hay, and could not therefore replace ruminal inoculum. The Chapter II aimed to evaluate microbial sources of the ruminal contents and faeces of sheep, from slaughtered animals, by *in vitro* tests for evaluation of feed for ruminants. Four tropical forages, two silages with different by-products as additives and two diets with two proportions of forage:concentrate were incubated. Three *in vitro* assays were conducted: 1 - ruminal fermentation kinetics up to 144 hours; 2 - characteristics of fermentation in the time 24 hours; 3 - *in vitro* degradability in 24 hours time. The inocula differed ($P < 0.05$) regarding the maximum potential of gas production, time required to reach half of the asymptote, degradation of dry matter and organic matter. The degradability of NDF was higher ($P < 0.05$) when evaluated in faecal inoculum compared to ruminal inoculum. The microbial source of faecal matter from slaughtered sheep can be used to estimate the parameters of gas production up to 144 hours. The faecal inoculum of slaughtered sheep is efficient in evaluating the characteristics of nutrient degradation in the incubation time 24 hours.

1 INTRODUÇÃO

Em produção sustentável de ruminantes, animais e pastagens adaptadas ao ambiente são os principais fatores para produzir proteína de alta qualidade, a partir de alimentos que não competem com a alimentação humana e produzidos em terras não agricultáveis (TILMAN e CLARK, 2014). As forragens são, frequentemente, o principal ingrediente na dieta de ruminantes nos trópicos (ARCHIMÈDE et al., 2011), e a identificação do valor nutritivo e da disponibilidade de nutrientes para os animais, está diretamente relacionada a sustentabilidade de produção animal. Os nutricionistas de animais ruminantes, geralmente, fazem uso de tabelas de composição de alimentos nas formulações de dietas. Entretanto, as grandes variações na composição das forragens tropicais, dificulta o atendimento às exigências nutricionais dos animais ou a formulação de dietas mais econômicas. A composição química possibilita quantificar o teor de nutrientes dos alimentos, podendo ser considerada a primeira etapa na avaliação de alimentos; essa composição, quando associada à digestibilidade, fornece o valor nutritivo dos alimentos.

Técnicas *in vitro* podem ser adotadas na estimativa do aproveitamento dos nutrientes no rúmen, por exemplo, pela avaliação de alguns parâmetros de fermentação ruminal (SILVA et al., 2003; MOREIRA et al., 2009), e na determinação do valor nutritivo de alimentos para animais ruminantes. Uma limitação ao uso dessas técnicas é a dependência do uso do conteúdo ruminal como fonte de microrganismos; muitos países restringem o desenvolvimento de pesquisas quando a coleta desse conteúdo se dá utilizando animais fistulados, por ser um procedimento invasivo (MOULD et al., 2005; POSADA et al., 2012). A Normativa nº17 (2014) do CONCEA estabeleceu o processo de reconhecimento de métodos alternativos no Brasil e determinou o prazo para substituição da utilização de animais por métodos alternativos reconhecidos (CONCEA, 2015). Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de protocolos alternativos que não dependam do uso de animais fistulados, ou até mesmo de inóculo ruminal, para estimar a cinética de fermentação, a degradação ruminal e a digestibilidade dos nutrientes dos alimentos.

A utilização das fezes como fonte de inóculo microbiano apresenta-se como uma alternativa ao uso do conteúdo ruminal, uma vez que a população microbiana presente nesse material tem a capacidade de degradar a fração fibrosa dos alimentos (HUGHES et al., 2012). Segundo LAUDADIO et al. (2009), as fezes de várias espécies animais podem ser manipuladas e utilizadas como inóculo microbiano para estimar a fermentação ruminal de

uma ampla variedade de forragens. Entretanto, não há, ainda, um protocolo estabelecido e amplamente aceito de preparo desse inóculo que resulte em boa correlação com os dados obtidos com o uso de inóculo ruminal.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a utilização de fontes microbianas alternativas ao inóculo ruminal na estimativa da degradação e cinética de fermentação ruminal de alimentos em ruminantes por meio de procedimentos *in vitro*.

Estruturalmente, este trabalho foi elaborado segundo as normas editoriais do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí e, se constitui de duas partes; a primeira, composta pelos itens Introdução e Referencial Teórico, e a segunda, por dois capítulos, redigidos na forma de artigos científicos, de acordo com as normas do periódico *Animal Production Science*, ao qual serão submetidos para publicação - intitulados “Uso de inóculo fecal na estimativa da fermentação ruminal *in vitro* de alimentos fibrosos” e “Fontes microbiana alternativas em ensaios *in vitro* de avaliação de alimentos para ruminantes”.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ensaio *in vivo* na avaliação de alimentos

As técnicas *in vivo* de avaliação de alimentos para animais ruminantes consistem na mensuração do consumo e da produção total de matéria fecal diretamente em gaiolas de metabolismo, ou através de marcadores internos ou externos (LANA, 2007). Esses marcadores podem estar presentes naturalmente na dieta ou podem ser adicionados, apresentando como principal característica a capacidade de não ser degradado, digerido ou absorvido. Logo, a quantidade de marcador excretada, diariamente, deve ser a mesma consumida, sendo possível determinar a concentração desses marcadores nas fezes, e estimar a produção de matéria fecal.

A determinação da digestibilidade tem sido o principal objetivo da experimentação *in vivo*, uma vez que indica a absorção dos nutrientes disponíveis no trato gastrintestinal dos animais. O estágio de maturidade, as diferenças entre as espécies, e a proporção de colmo e folha dos capins (HUGHES et al., 2012) podem representar a variabilidade na composição dos alimentos, e influenciar a disponibilidade de nutrientes para o animal. O conhecimento das características da forragem disponível é importante para auxiliar no manejo da produção de forragem e na produção animal (ZANINETTI et al., 2010).

Os ensaios *in vivo* que envolvem a produção animal e digestibilidade, de acordo com Berchielli, Pires e Oliveira (2006), são os métodos mais adequados para determinar o valor nutricional dos alimentos utilizados na nutrição dos ruminantes. Segundo Euclides et al. (2009), o consumo restrito de nutrientes é o principal fator que limita a produção animal, sendo este controlado pelo valor nutritivo da forragem apenas se a quantidade de forragem disponível não for limitante. Porém, outros fatores como a aceitação dos animais, também deverá ser levada em consideração, assim como o local onde os animais são mantidos, confinados ou a pasto.

A principal vantagem da avaliação *in vivo* é a condição real do ambiente ruminal, onde é possível obter dados mais precisos sobre o valor nutritivo de um determinado alimento ou dieta. Essa é a técnica que apresenta maior confiabilidade dos resultados, porém os ensaios com animais são caros, laboriosos, relativamente longos, e a logística operacional para avaliação de um grande número de animais, além da necessidade de elevada quantidade de matéria-prima para sua execução, controle rigoroso de consumo, maior disponibilidade de

mão de obra, dentre outros (ZICARELLI et al., 2011). Adicionalmente, a variação entre os animais se caracteriza como fator limitante na precisão desta técnica.

2.2 Técnica *in situ* na avaliação de alimentos

O procedimento para estimar os parâmetros de degradação ruminal *in situ*, técnica proposta por Mehrez e Ørskov (1977) apresenta como vantagens a facilidade e rápida execução, necessita uma pequena quantidade de amostra, e permite o contato íntimo entre o alimento e o ambiente ruminal. A técnica de sacos de náilon no rúmen é útil para se determinar a degradabilidade de diferentes frações do alimento, tais como matéria seca e proteína bruta (ALVES et al., 2007). Segundo Zaninetti et al. (2010), essa técnica é considerada um procedimento ideal, pois ocorre no próprio rúmen, respeitando-se um regime alimentar específico, mesmo o alimento não sofrendo efeitos da mastigação, ruminação e do escape ruminal.

O método *in situ* é amplamente utilizado em pesquisas para determinação de estimativas da degradabilidade dos alimentos no rúmen, sendo adotado em vários países. O procedimento básico consiste em introduzir sacolas de náilon no rúmen através de fístula ruminal, contendo o substrato a ser analisado, esse substrato pode ser um alimento volumoso, concentrado ou combinação de dietas. A remoção das sacolas é realizada ao longo do tempo de incubação. O modelo exponencial $Y=a+b(1-e^{-ct})$, proposto por Ørskov e McDonald (1979) descreve a cinética de degradação da matéria seca, ou qualquer outro componente do nutriente incubado, com base na quantidade de amostra que desaparece dos sacos em determinado período.

Os modelos matemáticos podem ser considerados uma ferramenta para auxiliar no trabalho dos nutricionistas de ruminantes. Eles podem ser utilizados para estimar as exigências dos animais e o valor nutritivo dos alimentos. Essa ferramenta tem um papel importante no fornecimento de informações que podem ser utilizadas no processo de tomada de decisão objetivando aperfeiçoar a eficiência técnica e econômica nos sistemas de produção animal (REZENDE et al., 2011). Alguns modelos matemáticos baseados na composição química (McDOWELL et al., 1974; WEISS, CONRAD e PIERRE, 1992) são utilizados para estimar o valor nutritivo dos alimentos.

Geralmente os ensaios *in situ* estão associados aos modelos matemáticos, e foi depois da introdução destas ferramentas, capazes de transformar os dados da taxa de

desaparecimento ruminal em valores denominados degradabilidade efetiva (ØRSKOV e McDONALD, 1979), que esse método passou a ter maior aceitação e tornou-se mais difundido.

2.3 Técnicas *in vitro* na avaliação de alimentos

Dentre as metodologias mais adotadas para determinar o valor nutritivo de alimentos para ruminantes, o método de dois estágios de Tilley e Terry (1963) é adotado com mais frequência (THEODOROU et al., 1994). Esse procedimento, se baseia na fermentação *in vitro* das forragens por 48 horas em líquido ruminal, seguido da digestão por mais 48 horas, em ácido fraco com adição de pepsina (TILLEY e TERRY, 1963).

A técnica de produção de gases (THEODOROU et al., 1994) é eficiente para se conhecer o valor nutritivo de alimentos, e tem sido amplamente utilizada nos laboratórios de nutrição de ruminantes, por ser simples e de baixo custo (MIZUBUTI et al., 2014). Segundo Moreira et al. (2009) essa técnica consiste basicamente em medir a produção total de gases liberada pela fermentação de uma amostra incubada em líquido ruminal tamponado ou a quantidade de AGCC produzidos dessa fermentação. O sistema *in vitro* de produção de gases fornece informações detalhadas sobre a cinética de fermentação ruminal de alimentos para ruminantes (THEODOROU et al., 1994). Esse sistema se fundamenta na manipulação dos microrganismos ruminais simulando seu ambiente natural, favorecendo seu crescimento e também a produção de seus metabólitos. De acordo com Abdalla et al. (2008) essa técnica é bastante adotada com a finalidade de avaliar o efeito de alimentos que possuem metabólitos secundários bioativos na fermentação ruminal e na degradabilidade da matéria orgânica, bem como, em estudos de emissão de metano.

As técnicas *in vitro* apresentam certas vantagens em relação aos procedimentos *in vivo*, tais como facilidade de realização, rapidez, permite um número maior de análises em curto intervalo de tempo, maior número de repetições e, maior precisão nos resultados. Vários autores relataram que a principal limitação dos procedimentos *in vitro* é a dependência do conteúdo ruminal como fonte microbiana para fermentação dos alimentos (HUGHES et al., 2012, POSADA et al., 2012, CAVALCANTE et al., 2015).

Uma das principais fontes de variação nas técnicas *in vitro* de avaliação de alimentos está relacionada ao inóculo. A espécie do animal doador também influencia a qualidade do mesmo (BUENO et al., 2005). O inóculo deve ter representatividade do ambiente ruminal

quando se trata da espécie microbiana e sua concentração (MOULD et al., 2005). Segundo Rymer et al. (2005), a variabilidade na população microbiana presente no inóculo ocorre devido a composição da dieta recebida pelos animais doadores, ao consumo, ao horário de coleta e ao método de obtenção do inóculo.

Os problemas associados à colheita e amostragem dos microrganismos ruminais podem conduzir a erros de estimativa do número de microrganismos e a importância relativa de suas atividades metabólicas (MOULD et al., 2005). A colheita de líquido ruminal com a finalidade de realizar ensaios de degradabilidade pode ser feita via sonda esofágica, fístula ruminal ou diretamente do rúmen do animal, quando este é abatido.

O método de colheita do líquido ruminal é de grande importância quando se objetiva avaliar os parâmetros de fermentação ruminal (OLIVEIRA et al., 1999). O uso de fístula ruminal facilita a coleta e a homogeneização do conteúdo ruminal, mas exige intervenção cirúrgica para implantação da cânula, o que acaba onerando os custos da experimentação, e limita o número de repetições (SALLES et al., 2003).

Salles et al. (2003) relataram diferenças entre os métodos de colheita, onde o líquido ruminal amostrado por fístula antes e depois da refeição, apresentou maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e menor pH que o colhido por sonda esofágica. Neste mesmo estudo, o líquido ruminal colhido depois da refeição, apresentou maior concentração de nitrogênio amoniacal. O método de colheita de líquido ruminal por fístula reflete valores reais de parâmetros de fermentação, enquanto a colheita por sonda esofágica seria indicada em trabalhos sobre o comportamento fermentativo de alimentos (LAVEZZO et al., 1988).

O efeito sobre a origem do líquido ruminal, via fístula no rúmen e via sonda esofágica, foi avaliada por Alcalde et al. (2001) nos ensaios de digestibilidade *in vitro* para o farelo de soja (98,78 e 99,15%) e feno de capim-Coast-cross (61,01 e 62,92%) respectivamente. Estes autores também avaliaram as fezes de bovinos em duas diluições nos ensaios de digestibilidade, e concluíram que os inóculos fecais não foram eficientes para os farelos de soja e canola e feno do capim-Coast-cross e feno do capim-Tifton 85, justificando que o meio microbiano oriundo das fezes gera fermentação, mas não com a mesma qualidade do líquido ruminal, e que as colônias de bactérias são diferentes daquelas encontradas no rúmen. Segundo Mould et al. (2005), a composição da dieta e a disponibilidade de nutrientes são os principais fatores que influenciam o crescimento microbiano no rúmen, o que terá um impacto importante sobre a atividade microbiana do inóculo.

Hughes et al. (2012), observaram que o inóculo fecal, quando preparado com 450g fezes bovinas por litro de solução tampão, pode substituir o líquido ruminal e prever a digestibilidade da matéria orgânica em forragens tropicais, para o período de 48 horas de fermentação. Rodriguez et al. (2012), concluíram que as fezes de ovinos podem ser utilizadas na avaliação *in vitro* de forragens para ruminantes. De acordo com Rodriguez et al. (2013), há correlação positiva da produção de gases *in vitro* com a utilização das fezes de ovinos.

Quando o inóculo ruminal apresenta alta atividade, a degradação da maioria das forragens poderá ser no período de 48 h, produzindo resultados semelhantes à digestibilidade aparente *in vivo* (OMED, LOVETT e AXFORD, 2000), no entanto, para as forragens tropicais, esse tempo de 48 horas, pode não ser suficiente. Segundo Laudadio et al. (2009) as variações são atribuídas a diversos fatores, tais como: processamento das amostras, diferença na composição química dos alimentos, preparo da solução tampão, manuseio dos equipamentos, e porosidade dos sacos filtro.

2.4 Diversidade e população microbiana ruminal

O rúmen é um ambiente de alta complexidade, sendo considerado um ecossistema microbiano anaeróbico e, sob condições normais, possui temperatura média 39°C e pH próximo à neutralidade. O ambiente ruminal é colonizado por populações microbianas complexas, incluindo bactérias, protozoários, fungos e arqueas (MARTINEZ et al., 2010). Os vírus também podem ser encontrados no ambiente ruminal (FERNANDO et al., 2010; ROSS et al., 2013). Os vírus bacteriófagos representam esse grupo de microrganismos, e são denominados de *virome* (ROSS et al., 2013). Esse mesmo autor discute sobre as características funcionais dos *viromes* que são mais semelhantes entre si, mesmo quando tomadas amostragem em ambientes distintos, tais como ambientes aquáticos e ambiente ruminal.

Apesar da colonização de microrganismos variada no ambiente ruminal, a única relação existente entre o ruminante e a população microbiana, é a simbiose. A população microbiana ruminal converte os alimentos em biomassa microbiana, e os produtos da fermentação podem ser utilizados pelos animais. Dentre os microrganismos do rúmen, as bactérias representam o grupo de maior destaque nas pesquisas, devido seu maior impacto sobre o desempenho animal (FERNANDO et al., 2010). No rúmen, as macromoléculas do complexo lignocelulose da parede celular são hidrolisadas sob condições anaeróbicas a

oligômeros e monômeros, e então fermentadas na forma de ácidos graxos de cadeia curta, AGCC (KONG, TEATHER e FORSTER, 2010). A diferença de velocidade de passagem dos mais variados tipos de alimentos pelo rúmen, favorece a ação dos microrganismos sobre os alimentos. As partículas dos alimentos que se encontram na fase líquida (tamanho reduzido), são rapidamente fermentadas no saco ventral, enquanto que as grandes partículas de material fibroso localizadas no saco dorsal, os microrganismos têm um tempo de geração maior e a atividade não tão intensa (FÁVARO et al., 2014).

O sinergismo e antagonismo entre os diferentes grupos de microrganismos e, mesmo entre diferentes gêneros do mesmo grupo, é tão diverso e complicado que é difícil de quantificar o papel desempenhado por qualquer grupo em particular de microrganismos presentes no rúmen (KAMRA, 2005). De acordo com KIM et al. (2014), o trato gastrointestinal fornece um ambiente favorável para populações diversas e dinâmicas de espécies bacterianas que podem influenciar o crescimento, a saúde e bem-estar do hospedeiro.

A diversidade do tipo, atividade e tamanho da população microbiana presente no inóculo são as principais razões encontradas para diferenciar as fezes como fonte microbiana do conteúdo ruminal. A população bacteriana do rúmen é mais diversa e menos especializada do que as bactérias das fezes e do ceco, sendo estas principalmente do tipo celulolíticas, tais como: *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Bacteroides fibrisolvens* (HUGHES et al., 2012).

2.5 Inóculo fecal

Ensaio *in vitro* envolvendo a utilização do inóculo fecal como substituto ao inóculo ruminal, vem sendo estudada desde 1990. O procedimento cirúrgico para implantação da cânula ruminal em animais utilizados em pesquisa, vem sendo limitado e cada vez mais, os grupos éticos visando o bem estar animal, estão pressionando e intervindo sobre a não utilização destes animais em pesquisa. A produção de gases *in vitro* com base na matéria fecal não tem nenhuma limitação, quando se trata da disponibilidade das fezes, sendo que estas, podem ser consideradas uma fonte de microrganismos alternativa ao conteúdo ruminal. Laudadio et al. (2009) avaliaram o uso de fezes de ovinos como fonte de inóculo microbiano alternativo ao inóculo ruminal e não encontraram diferenças nos parâmetros avaliados quando compararam o inóculo fecal ao ruminal.

As fezes podem ser coletadas de animais sem fistula e manipuladas em laboratório para ser a fonte microbiana alternativa em ensaios *in vitro* de avaliação de alimentos. O que se

observa na literatura, entretanto, é que há variações nos resultados obtidos, o que pode estar associado a diversos fatores, como a espécie animal, a concentração de fezes e ao protocolo de preparo do inóculo fecal. Em relação a concentração de fezes, Tufarelli et al. (2010) usaram 40 g fezes/360 mL de água destilada. Enquanto Zicarelli et al. (2011), trabalharam com 50 g de fezes/200 mL solução tampão; Fon e Nsahlai (2012) trabalharam com 150 g de fezes/150 mL de solução tampão. Algumas pesquisas foram realizadas com o objetivo de estimar a melhor concentração de fezes no inóculo fecal, como o estudo conduzido por Hughes et al. (2012), que testaram cinco concentrações de fezes bovinas no preparo do inóculo fecal - 250, 300, 350, 400 e 450 g fezes/ 1000 mL de solução McDougal. As pesquisas não estão restritas aos animais confinados, e estes podem ser estudados em suas condições de ambiente e comportamento natural (PASHAEI, RAZMAZAR e MIRSHEKAR, 2010).

As fezes de iaque (*Bos grunniens*) como fonte de inóculo microbiano alternativo foram utilizadas por Tufarelli et al. (2010). Estes autores avaliaram várias espécies de plantas forrageiras, dentre gramíneas e leguminosas, e observaram que o extrato fecal tem grande potencial na estimativa da digestibilidade *in vitro* adotando a incubadora Daisy II. A similaridade entre os resultados das diferentes repetições, podem ser utilizadas como referência na precisão dos resultados, tornando comparável os valores de digestibilidade encontrados com o inóculo fecal comparado ao método tradicional (inóculo ruminal) para muitos tipos de forragens (Tufarelli et al., 2010).

3 CAPÍTULO**I****1**

¹ Elaborado segundo as normas do periódico *Animal Production Science*

1 **Uso de inóculo fecal para estimativa da fermentação ruminal *in vitro* de alimentos** 2 **fibrosos**

3
4 S.E.A.S Cavalcante^{A, B}

5
6 ^AParte da tese da primeira autora

7 ^BUniversidade Federal do Piauí, Zootecnia, Campus da Socopo, 64049-550 Teresina, Brasil

8 ^CAutor para correspondência: samyzootecnia@gmail.com

9 10 **Resumo**

11 As técnicas *in vitro* de avaliação de alimentos para ruminantes permitem determinar a
12 fermentação e a degradação ruminal de uma ampla variedade de alimentos, no entanto,
13 apresenta como limitação a utilização de conteúdo ruminal como fonte de microrganismo.
14 Objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito das concentrações de fezes de ovinos no
15 inóculo fecal comparado ao inóculo ruminal, sobre a estimativa da degradabilidade e os
16 parâmetros de fermentação ruminal pela técnica *in vitro* de produção de gases. Foram
17 incubados os substratos capim-Aruana, feno de capim-Tifton 85 e resíduo da cana-de-açúcar.
18 Como doadores de inóculo ruminal e fecal foram utilizados quatro ovinos machos da raça
19 Santa Inês, adultos, castrados, com peso vivo médio 70 kg, providos de cânula ruminal,
20 mantidos em pastagem e suplementado com concentrado ao final do dia. Os dados foram
21 submetidos à análise de variância, adotando o procedimento para modelos lineares
22 generalizados (PROC GLM) do programa estatístico SAS. O delineamento foi inteiramente
23 casualizado, em esquema fatorial 3x3 (três inóculos e três substratos). O comportamento do
24 inóculo ruminal mostrou-se superior ($P<0,05$) aos inóculos fecais para produção de gases com
25 base na matéria seca, na matéria orgânica e na fibra em detergente neutro; e degradação
26 verdadeira da matéria orgânica e da fibra em detergente neutro. Independente da concentração
27 de fezes, 23 e 38 g/100 mL (fezes/solução tampão), utilizada no inóculo fecal, os valores de
28 produção de gases (com base na MS, MO e FDN) foram superiores ($P<0,05$) quando os
29 substratos foram incubados em inóculo ruminal, com exceção ao fator de partição. Todos os
30 parâmetros associados à produção de metano apresentaram melhores ($P<0,05$) resultados
31 quando os substratos foram incubados em inóculo ruminal. O inóculo fecal nas concentrações
32 avaliadas não foram eficazes para estimativa dos parâmetros de fermentação e de degradação
33 ruminal do capim-Aruana, do resíduo da cana-de-açúcar e do feno de capim-Tifton-85, não
34 podendo, dessa forma, substituir o inóculo ruminal.

35 **Palavras-chave:** avaliação de alimentos, concentração de fezes, fonte microbiana alternativa.

36 **Introdução**

37 Com a adoção da técnica *in vitro* de produção de gases se busca simular os processos naturais
38 de degradação e digestão de alimentos. O ensaio de produção de gases é um dos
39 procedimentos *in vitro* que permite estimar os parâmetros de degradação e a cinética de
40 fermentação ruminal de alimentos consumidos por ruminantes, porém é dependente de
41 conteúdo do rúmen, geralmente animais fistulados, resultando em limitação. A utilização de
42 animais para implantação de cânula, vem sendo cada vez mais restringida, assim como as
43 licenças necessárias para permitir tal procedimento cirúrgico. Cone, Van Gelder e Bachmann
44 (2002) relataram que há países em que a legislação concede o aval para utilização de animais
45 fistulados apenas para as universidades e instituições de pesquisa, e em número bastante
46 reduzido.

47 A produção de gases *in vitro* com base na matéria fecal não tem nenhuma limitação, quando
48 se trata da disponibilidade das fezes, sendo que estas, podem ser consideradas uma fonte de

49 microrganismos alternativa ao conteúdo ruminal. Laudadio et al. (2009) avaliaram o uso de
50 fezes de ovinos como fonte de inóculo microbiano alternativo ao inóculo ruminal e não
51 encontraram diferenças nos parâmetros avaliados quando compararam o inóculo fecal ao
52 ruminal. Entretanto, há variação nos resultados obtidos, o que pode estar associado a diversos
53 fatores, como a espécie animal, a concentração de fezes e protocolo de preparo do inóculo
54 fecal. Em relação à concentração de fezes, Tufarelli et al. (2010) utilizaram de 40 g fezes/360
55 mL de água destilada; Zicarelli et al. (2011) utilizaram 50 g de fezes/200 mL solução tampão;
56 e Fon e Nsahlai (2012) 150 g de fezes/150 mL de solução tampão. Com o objetivo de estimar
57 a melhor concentração de fezes no inóculo fecal, Hughes et al. (2012) testaram concentrações
58 de fezes bovinas no preparo do inóculo fecal de 250 a 450 g fezes/ 1000 mL de solução
59 McDougal. As avaliações não estão restritas a animais confinados, o que possibilita avaliação
60 em suas condições de ambiente e comportamento natural (Pashaei, Razmazar e Mirshekar,
61 2010).

62 É necessário o desenvolvimento de protocolos que não dependam do uso de animais
63 fistulados ou até mesmo de inóculo ruminal para estimar a digestibilidade, a cinética de
64 fermentação e a degradação ruminal dos nutrientes dos alimentos. Nesse contexto, avaliou-se
65 o efeito das concentrações de fezes de ovinos no inóculo fecal comparado ao inóculo ruminal,
66 sobre a estimativa da degradabilidade e os parâmetros de fermentação ruminal pela técnica *in*
67 *vitro* de produção de gases.

68 **Material e Métodos**

69 *Local e animais*

70 O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de
71 Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), localizado no
72 município de Piracicaba-SP. As metodologias adotadas nessa pesquisa, incluindo coleta de
73 líquido ruminal e de fezes, foram aprovadas pela Comissão Interna de Meio Ambiente e Ética
74 em Experimentação Animal do CENA/USP (Protocolo N. 2013-19).

75 Como doadores de inóculo ruminal e fecal foram utilizados quatro ovinos adultos da raça
76 Santa Inês, machos, com peso vivo 70 ± 5 kg, providos de cânula ruminal e foram mantidos a
77 pasto de capim-Aruana, recebendo uma suplementação com milho e farelo de soja (70:30) ao
78 final do dia (200g/d/a).

79 *Substratos e análises químicas*

80 Os substratos avaliados foram o capim-Aruana (*Panicum maximum* cv. Aruana), o feno de
81 capim-Tifton 85 (*Cynodon dactylon* (L.)) e o resíduo de cana-de-açúcar (*Saccharum*
82 *officinarum*). O capim-Aruana foi coletado em uma área de 1m², com altura de 15 cm do solo
83 e idade de pós-rebrota 21 dias. O feno de capim-Tifton 85 foi adquirido no comércio local e o
84 resíduo da cana-de-açúcar foi fornecido por uma empresa de processamento de caldo de cana-
85 de-açúcar.

86 Para a determinação da composição química, foram coletadas amostras dos substratos e,
87 posteriormente, foram trituradas em moinho de facas tipo *Willey*, dotado de peneira com
88 malha com furos com \varnothing 2 mm. Em seguida, foram acondicionadas em sacos plásticos.

89 Os substratos foram caracterizados quanto ao teor de matéria seca (MS - ID 930.15), matéria
90 orgânica (MO - ID 942.05) e proteína bruta (PB=6,25xN; - ID 988.05) pelos métodos
91 descritos na AOAC (1995). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram
92 determinados segundo Van Soest, Robertson e Lewis (1991), utilizando alfa-amilase termo
93 estável e sulfito de sódio. Os teores de fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados
94 de acordo com Goering e Van Soest (1970). A lignina em detergente ácido (LDA) foi
95 estimada de acordo com Van Soest (1973), pelo método do H₂SO₄ a 72%. Estas mensurações
96 das frações fibrosas foram estimadas sequencialmente, com auxílio do analisador de fibra da

97 ANKOM 220 (ANKOM Technology Corporation, Macedon, NY, EUA), utilizando a mesma
98 amostra em sacos filtro. As características bromatológica dos substratos está apresentada na
99 Tabela 1.

100 *Preparo do meio nutritivo*

101 O meio nutritivo foi composto por soluções de micro e macrominerais, tampão, redutora e
102 indicadora, de acordo com Theodorou et al. (1994), sendo continuamente saturado com CO₂ e
103 mantido a 39°C até a sua utilização.

104 *Obtenção e preparo do inóculo ruminal*

105 O conteúdo ruminal foi coletado antes da primeira refeição dos animais, via fístula ruminal. A
106 fração líquida foi obtida utilizando-se sonda acoplada a uma seringa e em seguida foi
107 armazenada em garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e saturadas com CO₂. A
108 fração sólida foi coletada com o auxílio de uma pinça, logo após a coleta da fração líquida e
109 depois, foi acondicionada em sacos plásticos. Todo o conteúdo coletado foi mantido em caixa
110 térmica. Para o preparo do inóculo ruminal, as frações sólida e líquida foram
111 homogeneizadas, em proporções iguais (50:50), durante 10 s, e filtradas em quatro camadas
112 de tecido de algodão (Bueno et al., 2005). O inóculo foi mantido a 39°C e saturado com CO₂
113 para manutenção da anaerobiose até a sua utilização (Mauricio et al., 1999).

114 *Obtenção e preparo dos inóculos fecais*

115 As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais. Em seguida, foram
116 acondicionadas em sacos plásticos previamente saturados com CO₂, e mantidas em caixa
117 térmica. Foram preparados dois inóculos fecais, com as proporções de fezes 23 e 38 g
118 fezes/100 mL de solução tampão. No preparo dos inóculos fecais, as fezes foram inicialmente
119 pesadas e, depois, homogeneizadas, utilizando-se metade do volume da solução tampão. Em
120 seguida, o material foi filtrado e reservado, dando origem à primeira filtragem. A fração
121 sólida retida no tecido de algodão após a primeira filtragem, foi novamente homogeneizada
122 com a restante solução tampão e filtrada. O conteúdo obtido foi misturado ao da primeira
123 filtragem (Cavalcante et al., 2015). O inóculo fecal foi mantido sob as mesmas condições de
124 temperatura e anaerobiose do inóculo ruminal (Mauricio et al., 1999).

125 *Produção de gases*

126 A degradação e os produtos da fermentação ruminal foram estimados pelo ensaio de produção
127 de gases descrito por Theodorou et al. (1994), que foi adaptado a técnica *in vitro* semi-
128 automática de produção de gases, segundo Bueno et al. (2005), utilizando um transdutor de
129 pressão e armazenador de dados (Pressure Press Data 800, LANA, CENA-USP, Piracicaba,
130 Brasil).

131 Em garrafas de vidro com capacidade para 160 mL foram inseridos saquinhos pré-pesados
132 (Ankom # F57; sacos 50 x 40 mm, porosidade 25±10 µm; ANKOM, Technology
133 Corporation, Fairport, EUA) contendo 500 mg dos substratos. Nas garrafas correspondentes
134 aos tratamentos com inóculo fecal foram adicionados 75 mL do inóculo fecal e nas garrafas
135 correspondentes aos tratamentos com inóculo ruminal foram adicionados 25 mL de inóculo
136 ruminal e 50 mL de solução tampão. Em seguida, as garrafas foram vedadas com rolhas de
137 borracha (Bello Glass Inc. Vineland, NJ, EUA), homogeneizadas manualmente e mantidas em
138 estufa (Marconi MA35) a 39°C por 24 horas. Cada garrafa, após adição dos inóculos,
139 apresentou um *head space* igual a 85 mL, para o acúmulo de gases resultantes da
140 fermentação. A pressão dos gases no *head space* foi medida às 4, 8, 12 e 24 horas após
141 incubação.

142 Após as leituras de pressão, o volume de gases foi obtido a partir da equação proposta por
143 Araújo et al. (2011): $V = 7,365 \times p$, sendo,

144 “V”, volume de gases produzido (mL) e “p”, pressão medida (psi).

145 Após 24 horas da incubação, as garrafas foram colocadas em bandejas com água e gelo para
146 cessar a atividade microbiana. Os saquinhos foram retirados, lavados em água corrente,
147 tratados com solução detergente neutro por uma hora e, depois, foram novamente lavados
148 com água destilada quente e acetona (Soltan et al., 2013). Posteriormente, foram colocados
149 em capela para evaporação da acetona. Em seguida, foram mantidos em estufa a 105°C por 16
150 h e, depois, pesados e incinerados em mufla a 550°C por quatro horas. A matéria orgânica
151 verdadeiramente degradável (MOVD) foi determinada pela diferença entre a matéria orgânica
152 incubada e o resíduo não degradado da matéria orgânica. O fator de partição (FP) foi
153 calculado pela relação entre a MOVD e o volume de gases (mL em 24 horas) (Blümmel et al.,
154 1997).

155 *Produção de metano*

156 Para a análise da produção de metano (CH₄), foram coletados 2,5mL de gases de cada garrafa
157 às 4, 8, 12 e 24 horas após o início da incubação. O metano foi determinado por cromatografia
158 (Soltan et al., 2013), utilizando-se um cromatógrafo de gases (Shimadzu GC2014, Tokyo,
159 Japan), equipado com coluna microempacotada Shincarbon ST 100/120 (1,5875 milímetros
160 OD, 1,0 mm ID, 1 m de comprimento; Ref 19.809; Restek, Bellefonte, PA, EUA). O metano
161 produzido durante a incubação foi calculado de acordo com Longo et al. (2006): CH₄ mL =
162 (gases total, mL + *head space*, 85 mL) x CH₄%

163 *Estatística*

164 Os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA), adotando o procedimento para
165 modelos lineares generalizados (PROC GLM) do programa estatístico SAS (2002). O
166 delineamento adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 3x3 (três
167 inóculos e três substratos), sendo as fontes de variação os substratos e o tipo de inóculo.
168 Também foi avaliada a interação entre o inóculo e o substrato. As diferenças significativas
169 entre as médias foram testadas pelo teste SNK, ao nível de 5% de probabilidade (SAS, 2002).

170 **Resultados**

171 Na Tabela 2 podem ser observados os parâmetros PGMS (produção de gases total na matéria
172 seca), PGMO (produção de gases com base na matéria orgânica verdadeiramente degradada),
173 DVMO (degradabilidade verdadeira da matéria orgânica) e DFDN (degradabilidade da fibra
174 em detergente neutro). A PGMS, PGMO e DVMO foram maiores (P<0,05) para os substratos
175 incubados em inóculo ruminal (IR) quando comparado aos inóculos fecais (IF23 e IF38).
176 Maiores produções de gases foram observadas no resíduo de cana-de-açúcar (P<0,05)
177 comparada aos demais substratos incubados em inóculo ruminal. O mesmo efeito foi
178 observado com os inóculos fecais com maior produção de gases observada para o resíduo de
179 cana-de-açúcar quando comparado aos demais substratos (Tabela 2). Os inóculos fecais, IF23
180 e IF38, não diferiram entre si para PGMS, PGMO e DVMO (Tabela 2). Em geral, a média de
181 produção de gases dos substratos incubados nos inóculos fecais foram metade dos valores
182 quando comparado à incubação em inóculo ruminal, inóculo referência. A DFDN apresentou
183 valores superiores (P<0,05), para os substratos incubados em inóculo ruminal, em relação aos
184 inóculos fecais. A maior DFDN foi obtida para o capim-Aruana incubado em inóculo
185 ruminal. Os inóculos fecais não diferiram (P>0,05) quanto à DFDN. Os valores de FP (fator
186 de partição) dos inóculos não diferiram (P>0,05) quando o substrato incubado foi o feno de
187 capim-Tifton-85. De modo geral, a fonte microbiana dos inóculos produzidos a partir da
188 matéria fecal, tendem a apresentar valores superiores de FP, quando comparados ao inóculo
189 ruminal.

190 Na Tabela 3 podem ser observados os dados de produção de metano na matéria seca
191 (CH₄MS), produção de metano com base na matéria orgânica verdadeiramente degradada
192 (CH₄MO) e concentração de metano (% CH₄). A produção e concentração de metano foram

193 maiores ($P < 0,05$) para os substratos incubados em inóculo ruminal (IR) quando comparados
194 aos inóculos fecais. O resíduo da cana-de-açúcar sempre foi superior ($P < 0,05$) ao comparar
195 aos demais substratos incubados em inóculo ruminal. Ao confrontar os substratos capim-
196 Aruana e feno de capim-Tifton-85 incubados nos inóculos fecais, IF23 e IF38, não foram
197 observadas diferenças ($P > 0,05$) para produção de metano. A concentração de metano para
198 todos os substratos incubados nos inóculos fecais não diferem ($P > 0,05$), com resultados
199 próximos à metade da concentração de metano observados no inóculo ruminal.

200 **Discussão**

201 A densidade microbiana no inóculo ruminal é maior que a encontrada no inóculo fecal, o que
202 pode justificar a melhor atividade de fermentação dos microrganismos do conteúdo ruminal.
203 Além disso, há diferença na natureza dos microrganismos presentes no conteúdo ruminal e
204 nas fezes, bem como no estado de sobrevivência das bactérias fecais, que apresentam baixa
205 atividade metabólica (Zicarelli et al., 2011).

206 Em geral, a produção de gases e a degradabilidade foram superiores com o inóculo ruminal
207 em relação aos inóculos fecais, independente do substrato utilizado. Resultados semelhantes
208 foram observados por Váradyová, Baran e Zeneňák (2005), em que a menor produção de
209 gases foi obtida com o inóculo fecal (158 mL/g MS) quando comparada ao inóculo ruminal
210 (165 mL/g MS). Zicarelli et al. (2011) para diferentes proporções volumoso:concentrado,
211 também observaram menor produção de gases *in vitro* com inóculo fecal em relação ao
212 inóculo ruminal. Posada et al. (2012) também observaram maior volume de gases com o uso
213 de inóculo ruminal que para inóculo fecal até 24 horas de incubação, entretanto, após 30 horas
214 de incubação, maiores valores de produção de gases foram observados quando se utilizou o
215 inóculo fecal.

216 Sallam et al. (2007), observaram valores superiores (39,46 mL/0,2 g MS) de produção de
217 gases total do bagaço de cana-de-açúcar incubado com inóculo ruminal, que os resultados
218 desta pesquisa. O bagaço de cana-de-açúcar utilizado por Sallam et al. (2007) apresentaram
219 teores de 770 g/kg de FDN e 111 g/kg de LDA, superior ao obtido nesta pesquisa. Estes
220 mesmos autores relataram que a produção de gases se correlaciona negativamente com o teor
221 de FDN, e que o elevado teor de lignina pode explicar uma parte da limitada degradação nos
222 ensaios *in vitro*. O resíduo da cana-de-açúcar utilizado nesta pesquisa não foi classificado
223 como bagaço, devido a sua composição química, que mostrou-se com teores de FDN inferior.
224 A comparação deste substrato com os resultados de Sallam et al. (2007) resulta da maior
225 proximidade em termos de subproduto do processamento da cana-de-açúcar, e da escassez de
226 informações relativas as fezes como fonte de inóculo microbiano para esse subproduto.

227 Pesquisa conduzida por Hughes et al. (2012), ao compararem o potencial das fezes frescas de
228 bovinos em concentrações de 25 a 45 g de fezes/100 mL de solução tampão com o inóculo
229 ruminal, quanto a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica, observaram semelhança do
230 inóculo ruminal com o inóculo fecal produzido com 45 g fezes/100 mL de solução tampão.
231 Esses mesmos autores relataram que o aumento da concentração de fezes de bovinos no
232 inóculo fecal aumenta a atividade microbiana, devido ao aumento de microrganismos no
233 inóculo. No entanto, não foi observado efeito da concentração de fezes no inóculo fecal de
234 ovinos. As fezes de bovinos podem apresentar um meio mais propício para o aumento da
235 atividade microbiana no inóculo fecal, diferentemente das fezes de ovinos. Segundo Mould et
236 al. (2005), o modo de preparo dos inóculos podem influenciar a atividade microbiana. Outra
237 possível justificativa é quanto à mudança da microbiota, em termos qualitativos e
238 quantitativos, em função da qualidade da ração ingerida.

239 As concentrações de 25 e 40 g fezes bovinas/100 mL tampão, avaliadas por Hughes et al.
240 (2012), foram semelhantes ao presente estudo (23 e 38 g fezes ovinas/100 mL tampão). Não

241 observaram diferenças entre essas concentrações de fezes no inóculo fecal para a DIVMO do
242 grão de sorgo, do capim-Estrela Africana e do capim-Braquiária; o material fecal de ovinos
243 apresenta-se na forma menos hidratada em relação ao de bovino, sugerindo que a umidade nas
244 fezes bovinas pode favorecer melhores condições físicas para uma melhor atividade
245 microbiana.

246 Não foram encontrados na literatura resultados de ensaios utilizando o inóculo fecal para
247 avaliar a DFDN de alimentos para ruminantes. Soltan et al. (2012), obtiveram para o feno de
248 capim-Tifton-85 em inóculo ruminal de ovinos, maior produção de gases (135 mL/g MS),
249 degradabilidade verdadeira da matéria orgânica (386 mg/g) e degradabilidade da FDN (255
250 mg/g) em relação aos resultados para inóculos ruminal e fecais avaliados. Estes resultados
251 podem estar associados à composição química do feno de capim-Tifton-85, que no trabalho
252 citado, apresentou-se com teores de PB superiores (PB = 74 g/kg) e conteúdo fibroso (FDN =
253 803 g/kg, FDA = 461 g/kg e LDA = 65 g/kg) em menor concentração, quando comparados a
254 composição química do feno de capim-Tifton-85 utilizado nesta pesquisa. Alguns fatores
255 como idade do feno, modo de coleta e preparo dos inóculos e amostragem, também podem
256 influenciar os resultados (Mould et al., 2005).

257 A pequena diferença na concentração de fezes (15 g de fezes) entre os inóculos fecais pode
258 justificar as semelhanças observadas entre estes inóculos para os parâmetros avaliados.
259 Zicarelli et al. (2011), obtiveram maior degradabilidade da matéria orgânica com inóculo
260 fecal (77%) de ovinos com concentração 25g de fezes/100 mL tampão, em relação ao inóculo
261 ruminal (75%). Akhter et al. (1999), mostraram diferenças significativas usando uma baixa
262 concentração de fezes (8,3 g de fezes/100 mL tampão) e uma elevada concentração de fezes
263 (33,3 g/100 mL tampão) no inóculo fecal para a degradabilidade da matéria orgânica, com
264 melhores resultados para o inóculo preparado com maior concentração de fezes.

265 O fator de partição reflete variações na produção de biomassa microbiana. Posada et al.
266 (2012) relataram que o elevado fator de partição do inóculo fecal (4,47 mg/mL) comparado ao
267 inóculo ruminal (2,18 mg/mL), após 24 horas de incubação pode estar associado à menor
268 competição, decorrente da baixa densidade de microrganismos presentes no inóculo fecal.
269 Fon e Nsahlai (2012) obtiveram maior fator de partição do inóculo fecal de bovinos cultivado
270 (5,9 mg/mL) aos demais inóculos avaliados, e que o sistema de cultivo dos inóculos
271 microbianos melhora a competência fibrolítica do inóculo cultivado, aumentando a
272 concentração da população microbiana para degradar os nutrientes. O fator de partição pode
273 ser considerado um parâmetro importante para representar a densidade microbiana dos
274 inóculos. Assim, pode-se afirmar que os inóculos fecais apresentaram menor densidade
275 microbiana comparada ao inóculo ruminal. A maior densidade e diversidade microbiana
276 presente no inóculo ruminal leva à rápida depleção dos substratos disponíveis para o
277 crescimento microbiano (Posada et al., 2012).

278 Fon e Nsahlai (2012) obtiveram maior produção de metano com o inóculo ruminal em relação
279 à obtida com inóculos fecais fresco e cultivado. Ramin et al. (2015) obtiveram produção de
280 metano com uso de inóculo fecal 48,9%, da obtida com inóculo ruminal. A produção de
281 metano decorre da ação de microrganismos do grupo das arqueas, bactérias metanogênicas
282 que habitam não apenas o rúmen, mas outras partes do trato digestório, como o intestino
283 grosso. Segundo Pandian et al. (2016), o cólon e o ceco são as partes do intestino grosso
284 capazes de sustentar uma população microbiana significativa, onde ocorre fermentação
285 microbiana e os produtos finais resultantes são ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), células
286 microbianas e gases. O principal tipo de bactéria presente no ceco e nas fezes é do tipo
287 celulolítico, enquanto que o rúmen apresenta uma diversidade microbiana muito maior
288 (Hughes et al., 2012). Parte dos carboidratos da dieta que escapam da fermentação no rúmen e

289 digestão e absorção no intestino delgado chegam ao ceco e cólon, onde são fermentados por
290 populações bacterianas presentes nesses compartimentos, justificando assim, a pequena
291 produção, mas evidente, de metano quando os substratos são incubados em fonte microbiana
292 oriunda das fezes. Há necessidade em aumentar a concentração de microrganismos no inóculo
293 produzido a partir da matéria fecal, visando aumento de sua atividade microbiana.
294 Concluímos que o inóculo fecal com as concentrações de 23 e 38 g de fezes/100 mL de
295 solução tampão não foram eficazes para estimativa dos parâmetros de fermentação e de
296 degradação ruminal do capim-Aruana, do resíduo da cana-de-açúcar e do feno de capim-
297 Tifton-85, não podendo, dessa forma, substituir o inóculo ruminal.

298 **Referências**

299 Akhter, S, Owen, E, Theodorou, MK, Butler, EA, Minson, DJ (1999) Bovine faeces as a
300 source of micro-organisms for the *in vitro* digestibility assay of forages. *Grass and Forage*
301 *Science* **54**, 219-226.

302 AOAC (1995) Association of Official Analytical Chemists: *Official methods of analysis* (18th
303 ed.). Gaithersburg, MD: AOAC.

304 Araujo, RC, Pires, AV, Mourão, GB, Abdalla, AL, Sallam, SMA (2011) Use of blanks to
305 determine *in vitro* net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers.
306 *Animal Feed Science and Technology* **166-167**, 155-162.

307 Blümmel, M, Makkar, HPS, Becker, K (1997) *In vitro* gas production: A technique revisited.
308 *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **77**, 24-34.

309 Bueno, ICS, Cabral Filho, SLS, Gobbo, SP, Louvandini, H, Vitti, DMSS, Abdalla, AL (2005)
310 Influence of inoculum source in a gas production method. *Animal Feed Science and*
311 *Technology*, **123-124**, 95-105.

312 Cavalcante, SE, Vasconcelos, VR, Abdalla, AL, Alves, AA, Natel, AS, Dhanasekaran, D,
313 Silva, LRF, Siqueira, JC (2015) Faecal inoculum as alternative microbial source for *in vitro*
314 rumen fermentation techniques. In: 'Proceedings of the Tropentag 2015' pp.260. (Berlin,
315 Germany)

316 Cone, JW, Van Gelder, AH, Bachmann, H. (2002) Influence of inoculum source on gas
317 production profiles. *Animal Feed Science and Technology* **99**, 221-231.

318 Fon, FN, Nsahlai, IV (2012) Laboratory cultured faecal inoculum as a substitute for fresh
319 rumen inoculum for *in vitro* feed evaluation. *African Journal Agricultural Research* **7**, 6595-
320 6604.

321 Goering MK, Van Soest PJ (1970) Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and
322 some applications). In 'Agricultural handbook, no. 379'. (Agricultural Research Services,
323 USDA: Washington DC)

324 Hughes, M, Mlambo, V, Lallo, CHO, Jennings, PGA (2012) Potency of microbial inocula
325 from bovine faeces and rumen fluid for *in vitro* digestion of different tropical forage
326 substrates. *Grass Forage Science* **67**, 263-273.

327 Laudadio, V, Lacalandra, GM, Monaco, D, Khorchani, T, Hammadi, M, Tufarelli, V (2009)
328 Faecal liquor as alternative microbial inoculum source for *in vitro* (DaisyII) technique to
329 estimate the digestibility of feeds for camels. *Journal of Camelid Science* **2**, 1-7.

330 Longo, C, Bueno, ICS, Nozella, EF, Goddoy, PB, Cabral Filho, SLS, Abdalla, AL (2006) The
331 influence of *head space* and inoculum dilution on *in vitro* ruminal methane measurements. In:

- 332 Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M., editors. Greenhouse gases and animal agriculture: an
333 update. Int. Congr. Series N. 1293. Amsterdam (The Netherlands): Elsevier. p. 62–65.
- 334 Mauricio, RM, Mould, FL, Dhanoa, MS, Owen, E, Channa, KS, Theodorou, MK (1999) A
335 semiautomated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal*
336 *Feed Science and Technology* **79**, 321-330.
- 337 Mould, FL, Kliem, KE, Morgan, R, Mauricio, RM (2005) *In vitro* microbial inoculum: A
338 review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology* **123-124**, 31-50.
- 339 Pandian, CS, Reddy, TJ, Sivaiah, K, Blümmel, M, Reddy, YR (2016) Faecal matter as
340 inoculum for *in vitro* gas production technique. *Animal Nutrition and Feed Technology* **16**,
341 271-281.
- 342 Pashaei, S, Razmazar, V, Mirshekar, R (2010) Gas production: A proposed *in vitro* method to
343 estimate the extent of digestion of a feedstuff in the rumen. *Journal of Biological Sciences* **10**,
344 573-580.
- 345 Posada, SL, Noguera, RR, Segura, JA (2012) Ruminant feces used as inoculum for the *in*
346 *vitro* gas production technique. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* **25**, 592-602.
- 347 Ramin, M, Lerose, D, Tagliapietra, F, Huhtanen, P (2015) Comparison of rumen fluid
348 inoculum vs. faecal inoculum on predicted methane production using a fully automated *in*
349 *vitro* gas production system. *Livestock Science* **181**, 65-71.
- 350 Sallam, SMA, Nasser, MEA, El-Waziry, AM, Bueno, ICS, Abdalla, AL (2007) Use of an *in*
351 *vitro* rumen gas production technique to evaluate some ruminant feedstuffs. *Journal of*
352 *Applied Sciences Research* **3**, 34-41.
- 353 SAS (2002). ‘SAS Software, Version 8.’ (SAS Institute Inc.: Cary, NC.)
- 354 Soltan, YA, Morsy, AS, Sallam, SMA, Louvandini, H, Abdalla, AL (2012) Comparative *in*
355 *vitro* evaluation of forage legumes (*Prosopis*, *Acacia*, *Atriplex*, and *Leucaena*) on ruminal
356 fermentation and methanogenesis. *Journal of Animal and Feed Sciences* **21**, 759-772.
- 357 Soltan, YA, Morsy, AS, Sallam, SMA, Lucas, RC, Louvandini, H, Kreuzer, M, Abdalla, AL
358 (2013) Contribution of condensed tannins and mimosine to the methane mitigation caused by
359 feeding *Leucaena leucocephala*. *Archives of Animal Nutrition* **67**, 169-184.
- 360 Theodorou, MK, Williams, BA, Dhanoa, MS, McAllan, AB, France, J (1994) A simple gas
361 production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of
362 ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* **48**, 185-197.
- 363 Tufarelli, V, Cazzato, E, Ficco, A, Laudadio, V (2010) Assessing nutritional value and *in*
364 *vitro* digestibility of Mediterranean pasture species using yak (*Bos grunniens*) faeces as
365 alternative microbial inoculum in a Daisy^{II} incubator. *Journal of Feed, Agriculture &*
366 *Environment* **2**, 477-481.
- 367 Van Soest, PJ, Robertson, JB, Lewis, BA (1991) Methods for dietary fibre, neutral detergent
368 fibre, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*
369 **74**, 3583–3597.
- 370 Van Soest, PJ (1973) Collaborative study of acid detergent fibre and lignin. *Journal of*
371 *Association of Official Analytical Chemists* **56**, 781–784.

- 372 Váradyová, Z, Baran, M, Zelenák, I (2005) Comparison of two *in vitro* fermentation gas
373 production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. *Animal Feed*
374 *Science and Technology* **123-124**, 81-94.
- 375 Zicarelli, F, Calabrò, S, Cutrignelli, M, I, Infascelli, F, Tudisco, R, Bovera, F, Piccolo, V
376 (2011) *In vitro* fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios:
377 comparison of rumen and faecal inocula. *Journal of the Science of Feed and Agriculture* **91**,
378 1213-1221.
- 379

380 **Tabela 1. Características bromatológica dos substratos**

381 MS (matéria seca), MO (matéria orgânica), MM (matéria mineral), PB (proteína bruta), FDN
 382 (fibra em detergente neutro), FDA (fibra em detergente ácido), LDA (lignina em detergente
 383 ácido), HEM (hemicelulose), CEL (celulose).

384

Substratos	MS (g/kg)	Componentes químicos (g/kg de MS)							
		MO	MM	PB	FDN	FDA	LDA	HEM	CEL
Capim-Aruana	293,7	890,4	109,6	112,4	676,2	364,3	65,9	311,9	298,4
Resíduo da cana-de-açúcar	480,4	992,7	7,3	22,7	589,0	402,9	76,5	186,1	326,4
Feno de capim-Tifton 85	927,7	952,0	48,0	56,5	808,3	432,7	94,7	375,6	338,0

385

386 **Tabela 2. Produção de gases, degradabilidade e fator de partição do capim-Aruana,**
 387 **resíduo da cana-de-açúcar e feno de capim-Tifton 85 incubados em inóculos ruminal e**
 388 **fecal**

389 Médias seguidas de letras iguais minúsculas (colunas) e maiúsculas (linhas) não diferem entre
 390 si pelo teste SNK ($P > 0,05$);

391 PGMS (produção de gases com base na matéria seca), PGMO (produção de gases com base
 392 na matéria orgânica verdadeiramente degradada), DVMO (degradabilidade verdadeira da
 393 matéria orgânica), FP (fator de partição), IR (inóculo ruminal), IF 23 (inóculo fecal com 23 g
 394 fezes/100 mL tampão), IF 38 (inóculo fecal com 38 g fezes/100 mL tampão), Aruana (capim-
 395 Aruana), Cana (resíduo da cana-de-açúcar), Feno (feno de capim-Tifton 85), TRT
 396 (tratamentos), epm (erro padrão da média), S (Substrato), I (Inóculo), S*I (Interação substrato
 397 x inóculo).

398

Item	Inóculo Substratos					Valor p			
	TRT	Aruana	Cana	Feno	Média	epm	I	S	S*I
PGMS (mL/g MS)	IR	131,12Ba	175,91Aa	92,51Ca	133,18a	6,79	<0.0001	<0.0001	0.0298
	IF 23	52,32Bb	121,17Ab	42,73Bb	75,55b				
	IF 38	56,83Bb	121,91Ab	47,90Bb	75,07b				
	média	92,85B	148,72A	68,91C					
PGMO (mL/g MOVD)	IR	147,39Ba	177,20Aa	97,18Ca	140,59a	6,88	<0.0001	<0.0001	0.0045
	IF 23	58,81Bb	122,06Ab	44,88Bb	75,25b				
	IF 38	63,88Bb	122,80Ab	50,31Bb	79,00b				
	média	104,37B	149,81A	72,39C					
DVMO (g/kg)	IR	515,57Aa	490,85Aa	299,63Ba	435,35a	19,11	<0.0001	<0.0001	0.0292
	IF 23	327,66Bb	436,98Ab	158,99Ca	307,87b				
	IF 38	308,52Bb	423,94Ab	183,05Ca	305,17b				
	média	416,83B	460,65A	235,32C					
FP (mg MOVD/mL gas)	IR	3,96Ab	2,81Bb	3,36ABa	3,37b	0,18	<0.0001	0.0004	0.1182
	IF 23	6,35Aa	3,64Ba	3,81Ba	4,60a				
	IF 38	5,51Aa	3,49Ba	3,96Ba	4,32a				
	média	4,94A	3,18B	3,62B					

399

400 **Tabela 3. Produção e concentração de metano do capim-Aruana, resíduo da cana-de-**
 401 **açúcar e feno de capim-Tifton 85 incubados em inóculos ruminal e fecal**

402 Médias seguidas de letras iguais minúsculas (colunas) e maiúsculas (linhas) não diferem entre
 403 si pelo teste SNK ($P > 0,05$); CH₄MS (produção de metano com base na matéria seca), CH₄
 404 (concentração de metano em função do volume total de gases), CH₄MO (produção de metano
 405 com base na matéria orgânica verdadeiramente degradada), IR (inóculo ruminal), IF 23
 406 (inóculo fecal com 23 g fezes/100 mL tampão), IF 38 (inóculo fecal com 38 g fezes/100 mL
 407 tampão), Aruana (capim-Aruana), Cana (resíduo da cana-de-açúcar), Feno (feno de capim-
 408 Tifton 85), TRT (tratamentos), epm (erro padrão da média), S (Substrato), I (Inóculo), S*I
 409 (Interação substrato x inóculo).

410

Item	Inóculo Substratos					epm	Valor p		
	TRT	Aruana	Cana	Feno	média		I	S	S*I
CH ₄ MS mL/g MS	IR	11,70Ba	16,51Aa	5,54Ca	11,25a	0,83	<0.0001	<0.0001	0.0003
	IF 23	2,22Bb	5,34Ab	1,15Bb	2,90b				
	IF 38	1,98Bb	4,98Ab	1,75Bb	2,90b				
	média	6,90B	10,84A	3,49C					
CH ₄ MO mL/ g MOVD	IR	13,16Ba	16,64Aa	5,82Ca	11,87a	0,86	<0.0001	<0.0001	0.0004
	IF 23	2,49Bb	5,38Ab	1,21Bb	3,02b				
	IF 38	2,23Bb	5,02Ab	1,84Bb	3,03b				
	média	7,76B	10,92A	3,67C					
CH ₄ %	IR	8,86Aa	9,35Aa	6,05Ba	8,09a	0,41	0.0002	<0.0001	0.1603
	IF 23	4,09Ab	4,40Ab	2,58Ab	3,69b				
	IF 38	3,34Ab	4,09Ab	3,47Ab	3,63b				
	média	6,29A	6,80A	4,53B					

4 CAPÍTULO

II

1

¹ Elaborado segundo as normas do periódico *Animal Production Science*

1 Fontes microbianas alternativas para ensaios *in vitro* de avaliação de alimentos para 2 ruminantes^A

3
4 S.E.A.S Cavalcante^{A, B}

5
6 ^AParte da tese do primeiro autor

7 ^BUniversidade Federal do Piauí, Zootecnia, Campus da Socopo, 64049-550 Teresina, Brasil

8 ^CAutor para correspondência: samyzootecnia@gmail.com

9 10 **Resumo**

11 Os procedimentos *in vivo* são considerados como um método trabalhoso e exige um grande
12 número de animais, além dos elevados custos e a necessidade de grandes quantidades de
13 substratos, quando comparados aos procedimentos *in vitro*. A dependência do conteúdo do
14 rúmen de animais fistulados nos ensaios *in vitro*, é considerado como um ponto negativo.
15 Nesse sentido, objetivou-se com esta pesquisa avaliar a fonte microbiana do conteúdo ruminal
16 e das fezes de ovinos abatidos em ensaios *in vitro* de avaliação de alimentos para animais
17 ruminantes. Foram incubadas quatro forragens tropicais, duas silagens com diferentes
18 subprodutos como aditivos e duas dietas com duas proporções de volumoso:concentrado. A
19 coleta do conteúdo ruminal e as fezes foram feitas após o abate de quatro ovelhas adultas da
20 raça Merina, que recebia uma dieta exclusiva de volumoso. Três ensaios *in vitro* foram
21 conduzidos: 1 - cinética de fermentação ruminal até o tempo de 144 horas; 2 - características
22 de fermentação no tempo 24 horas; e 3 - degradabilidade *in vitro* no tempo 24 horas. O
23 delineamento adotado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2x8 (dois inóculos e
24 oito substratos), com quatro repetições. As diferenças significativas entre as médias foram
25 testadas pelo teste SNK, ao nível de 5% de probabilidade. Os inóculos diferiram (P<0,05)
26 quanto ao potencial máximo de produção de gases, tempo necessário para atingir metade da
27 assíntota, degradação da matéria seca e matéria orgânica. O tempo de colonização não diferiu
28 (P>0,05) entre os inóculos ruminal e fecal avaliados. A degradabilidade da matéria seca e da
29 matéria orgânica foi maior (P<0,05) para todos os substratos incubados em inóculo ruminal
30 que em inóculo fecal. A degradabilidade da FDN mostrou-se superior (P<0,05) quando
31 avaliada em inóculo fecal comparado ao inóculo ruminal. Concluímos que a fonte microbiana
32 da matéria fecal de ovinos abatidos pode ser utilizada para estimar os parâmetros de produção
33 de gases até o tempo de 144 horas. O inóculo fecal de ovinos abatidos é eficiente na avaliação
34 das características de degradação de nutrientes no tempo de incubação 24 horas.

35 **Palavras-chave:** inoculo alternativo, animais abatidos, matéria fecal

36 **Introdução**

37 Os métodos *in vivo* de avaliação de alimentos estimam adequadamente a digestibilidade dos
38 alimentos e apresentam como vantagens o fato dos animais usados nas pesquisas não
39 sofrerem mudanças bruscas de ambiente nem de manejo. No entanto, os procedimentos *in*
40 *vivo* são considerados trabalhosos e requerem um grande número de animais (Zicarelli et al.,
41 2011), quando comparados aos procedimentos *in vitro*, além dos elevados custos e, a
42 necessidade de grande quantidade de substrato. Outra forma de predizer o valor nutricional de
43 forragens para ruminantes é o procedimento de degradação ruminal *in situ*, técnica proposta
44 por Mehrez e Ørskov (1977), que é também conhecida como a técnica de sacos de náilon.
45 Esse procedimento permite determinar a degradabilidade de diferentes frações do alimento,
46 tais como matéria seca e proteína bruta (Alves et al., 2007), e envolve a utilização de animais
47 fistulados.

48 Os procedimentos *in vitro* podem ser adotados para estimar o valor nutritivo de alimentos
49 para ruminantes. Um ponto negativo associado aos ensaios *in vitro* é a dependência de
50 conteúdo ruminal, geralmente proveniente de animais fistulados, visto que a coleta via
51 esôfago deve ser realizada com cautela, além da contaminação da amostra com saliva.

52 Pesquisa realizada por Mizubuti et al. (2014) com conteúdo ruminal proveniente de bovinos
53 abatidos em frigoríficos, possibilitou obter parâmetros de cinética de fermentação ruminal de
54 substratos pela técnica *in vitro* de produção de gases.

55 Entretanto, muitas vezes os frigoríficos não estão localizados próximos aos centros de
56 pesquisa, o que torna necessária a utilização de outra fonte microbiana alternativa. As fezes
57 podem ser coletadas de animais sem fistula e manipuladas em laboratório para ser a fonte
58 microbiana alternativa em ensaios *in vitro* de avaliação de alimentos. Quando os alimentos
59 são incubados *in vitro* em fluido ruminal tamponado, os carboidratos são fermentados a
60 AGCC, gases e células microbianas (Zicarelli et al., 2010). Assim, acredita-se que fontes
61 microbianas alternativas ao conteúdo do rúmen, possam ser viáveis para ensaios *in vitro*.
62 Dentro deste contexto, objetivou-se com esta pesquisa avaliar as fontes microbianas do
63 conteúdo ruminal e das fezes de ovinos, provenientes de animais abatidos, em procedimentos
64 *in vitro* de avaliação de alimentos para ruminantes.

65 **Material e Métodos**

66 *Local e Animais*

67 O estudo foi conduzido na *Universidad de León*, localizado na cidade de León, Espanha.
68 Foram utilizadas quatro ovelhas adultas da raça Merina, com peso 70,78 kg ($\pm 14,22$ kg),
69 recebendo dieta exclusiva de volumoso (mistura de forragens locais). Os animais foram
70 mantidos com essa dieta por um período de adaptação de 5 dias. Procedeu-se o abate dos
71 animais em quatro períodos (semanas) distintos, respeitando um jejum de 12 horas. Após o
72 abate, o conteúdo do rúmen e do reto foram retirados para serem utilizados como fonte
73 microbiana alternativa nos ensaios *in vitro*. Cada animal proporcionou duas fontes
74 microbianas distintas, dando origem a dois inóculos por animal, um ruminal e um fecal,
75 totalizando oito inóculos (quatro grupos de animais x duas fontes de microrganismos).

76 *Substratos*

77 Os substratos avaliados consistiram de quatro forragens tropicais: capim-Massai (*Panicum*
78 *maximum* cv. Massai), capim-Andropógon (*Andropogon gayanus*), capim-Braquiária
79 humidícola (*Brachiaria Humidicola* cv. Humidícola), capim-Xaraés (*Brachiaria brizantha* cv.
80 Xaraés); duas silagens com diferentes subprodutos como aditivos: silagem de capim-elefante
81 (*Pennisetum purpureum*) com 5% de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), e
82 silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) com 5% de torta de babaçu (*Orbignya*
83 *phalerata*); e duas dietas, uma composta por uma mistura forragens locais (dieta 100:0,
84 volumoso:concentrado) e outra composta por uma mistura de forragens locais e concentrado
85 (dieta 50:50, volumoso:concentrado). Os capins e as silagens foram provenientes do Setor de
86 Forragicultura da Universidade Federal do Maranhão, em Chapadinha-MA. As dietas
87 avaliadas foram amostradas da fazenda experimental pertencente a *Universidad de León*.

88 Os substratos foram caracterizados quanto ao teor de matéria mineral (MM - ID 942.05) e
89 proteína bruta (PB - ID 988.05) pelos métodos da AOAC (2005). Os teores de fibra em
90 detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados por
91 metodologia sequencial (ID 2002.04 e ID 973.18, respectivamente) de acordo com AOAC
92 (2005), e a lignina em detergente ácido (LDA) de acordo com Goering e Van Soest (1970),
93 pelo método do H₂SO₄ a 72%. A composição química dos substratos está apresentada na
94 Tabela 1.

95 *Coleta de material biológico (rúmen e fezes)*

96 O abate foi realizado com o objetivo de retirar o rúmen e o reto dos animais e obter o
97 conteúdo do rúmen e as fezes. Após o abate das ovelhas na sala de necropsias da *Facultad de*
98 *Veterinaria da Universidad de León*, coletou-se as fontes de inóculos microbianos. Após
99 coleta do conteúdo ruminal, este foi homogeneizado e filtrado em quatro camadas de tecido
100 de algodão e transferido para garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C. O fluido
101 ruminal, livre de partículas, foi misturado à solução tampão (Goering e Van Soest, 1970), na
102 proporção de 1:4 (vol/vol) a 39°C, sob injeção constante de CO₂.

103 As fezes foram coletadas da ampola retal de cada animal abatido, buscando-se extrair ao
104 máximo a matéria fecal, armazenadas em sacolas plásticas e acondicionadas em caixa térmica
105 até o momento da manipulação. No preparo dos inóculos fecais, as fezes foram inicialmente
106 pesadas e, depois, homogeneizadas, utilizando-se metade do volume da solução tampão. Em
107 seguida, o material foi filtrado e reservado, dando origem à primeira filtração. A fração
108 sólida retida no tecido de algodão após a primeira filtração, foi novamente homogeneizada
109 com a restante da solução tampão e filtrada. O conteúdo obtido foi misturado ao da primeira
110 filtração (Cavalcante et al., 2015). O inóculo fecal foi mantido sob as mesmas condições
111 físicas do inóculo ruminal (39°C e saturado com CO₂) (Mauricio et al., 1999), e produzido
112 respeitando-se uma proporção de 10g fezes/100 mL solução tampão.

113 *Produção de gases in vitro: cinética de fermentação*

114 Para estimativa dos parâmetros da cinética de fermentação ruminal e degradação da matéria
115 seca (DMS) e matéria orgânica (DMO), amostras de 300 mg de MS de cada substrato foram
116 inseridos em garrafas com capacidade 120 mL. As garrafas foram pré-aquecidas (39°C) antes
117 da adição de 30 mL dos inóculos previamente preparados, de acordo com o tratamento. Um
118 total de oito garrafas, uma garrafa por substrato e mais duas garrafas sem substrato (branco),
119 foram incubadas por 144 horas. A produção de gases foi mensurada nos tempos 3, 6, 9, 12,
120 16, 21, 26, 31, 36, 48, 60, 72, 96, 120 e 144 horas após a incubação, com auxílio de um
121 transdutor de pressão e uma seringa calibrada, sendo os gases produzidos liberados após cada
122 mensuração. Após 144 horas de incubação, a fermentação foi paralisada, mantendo-se as
123 garrafas em água com gelo. Em seguida, o conteúdo das garrafas foi transferido para cadinhos
124 filtrantes previamente pesados. Os cadinhos com o resíduo da incubação foram lavados com
125 água destilada quente (50°C), secos em estufa a 50°C por 48 horas e o desaparecimento
126 aparente do substrato foi calculado. O resíduo após incineração em mufla (500°C), foi
127 utilizado para calcular o desaparecimento aparente da matéria orgânica após 144 horas de
128 incubação.

129 *Produção de gases in vitro: características de fermentação em 24 horas*

130 As características de fermentação dos substratos foram avaliadas em 24 horas de incubação.
131 Um total de oito garrafas contendo 300 mg dos substratos, uma garrafa por substrato, e duas
132 garrafas sem substrato (branco), foram adicionados 30 mL de cada inóculo tamponado
133 (ruminal ou fecal) e foram incubadas a 39°C. Após 24 horas de incubação, as garrafas foram
134 abertas e o pH foi mensurado imediatamente com pHmetro. Para a determinação do N
135 amoniacal, 0,5 mL do conteúdo líquido foi coletado e adicionou-se 0,5 mL de HCl 0,5N
136 (Carro e Miller, 1999).

137 *Degradabilidade in vitro: incubadora Daisy II*

138 Para determinação da degradabilidade *in vitro* no tempo 24 horas, foram adicionados 200 mg
139 de cada substrato em saquinhos pré-pesados (Ankom # F57; dimensão 50 x 40 mm,
140 porosidade 25±10 µm; ANKOM, Technology Corporation, Fairport, EUA). Os saquinhos
141 foram colocados nas jarras do fermentador ruminal Daisy II, incubadora *in vitro* ANKON.
142 Em seguida, foram adicionados 600 mL do inóculo ruminal em duas jarras e 600 mL do
143 inóculo fecal em duas jarras. Foram utilizadas quatro jarras por semana, e cada jarra recebeu o

144 equivalente a 16 sacos (8 substratos com 2 repetições cada). Após 24 horas de incubação os
 145 sacos foram retirados e lavados em água corrente.

146 *Cálculos, procedimentos analíticos e análises estatísticas*

147 O volume de gases foi corrigido subtraindo-se o volume produzido nos frascos branco, e os
 148 valores de pressão foram ajustados no modelo proposto por France et al. (1993):

$$149 \quad y = A \{1 - \exp[-b(t - L) - c(\sqrt{t} - \sqrt{L})]\}$$

150 Sendo, y = produção cumulativa de gases (mL) no tempo t; A = potencial máximo de
 151 produção de gases (assíntota); L = tempo de colonização; t = tempo de incubação; b (h⁻¹) e c
 152 (h^{-0,5}) = taxas fracionais constantes. O tempo necessário para atingir a metade do potencial de
 153 produção de gases (T ½) foi obtido pelo modelo proposto por France et al. (1993):

$$154 \quad T \frac{1}{2} = \left[\frac{-c/2 \pm \sqrt{([c^2/4 + b(bL + c\sqrt{L + \ln 2})])}}{b} \right]^2$$

155 Os parâmetros estimados pelos modelos foram submetidos à análise da variância (ANOVA),
 156 adotando o procedimento para modelos lineares generalizados (PROC GLM) do programa
 157 estatístico SAS (2002). O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), em
 158 arranjo fatorial 2x8 (dois inóculos e oito substratos), com quatro repetições. Também foi
 159 avaliada a interação entre o inóculo e o substrato. As diferenças significativas entre as médias
 160 foram testadas pelo teste SNK, ao nível de 5% de probabilidade (SAS, 2002).

161 **Resultados**

162 Os parâmetros cinéticos de produção de gases e dados sobre a degradação da matéria seca e
 163 matéria orgânica avaliados até o tempo de 144 horas estão apresentados na Tabela 2. Os
 164 inóculos diferiram (P<0,05) quanto ao potencial máximo de produção de gases (A), tempo
 165 necessário para atingir metade da assíntota (T ½), degradação da matéria seca (DMS) e
 166 matéria orgânica (DMO). O tempo de colonização não diferiu (P>0,05) entre os inóculos
 167 ruminal e fecal avaliados. O inóculo fecal apresentou-se superior (P<0,05) ao inóculo ruminal
 168 sobre os parâmetros A e T ½.

169 As variáveis avaliadas apresentaram efeito do substrato (P<0,05) e não houve interação
 170 inóculo x substrato (P>0,05). O capim-Humidícola e capim-Xaraés apresentaram a maior
 171 (P<0,05) produção potencial de gases, e as silagens (SBC e STB) mostraram-se com os
 172 menores valores. O menor tempo de colonização observou-se para as dietas (D100 e D50), e o
 173 capim-Andropógon mostrou-se como o substrato que vai exigir um maior tempo para iniciar a
 174 fermentação. As forragens tropicais (MAS, AND, HUM e XAR), juntamente com as silagens
 175 (SBC e STB) avaliadas, apresentaram um tempo mais tardio para atingir metade da assíntota,
 176 comparada as dietas (D100 e D50).

177 A degradabilidade da matéria seca e da matéria orgânica foi maior (P<0,05) para todos os
 178 substratos incubados em inóculo ruminal que em inóculo fecal. Maiores degradações (P<0,05)
 179 da MS e MO foram observadas para a dieta 50:50, volumoso:concentrado.

180 As características de fermentação ruminal *in vitro* no tempo 24 horas estão apresentadas na
 181 Tabela 3. Foram observados efeito do inóculo (P<0,05) para pH, para produção de gases
 182 (mL/g) e para produção de metano (%). Para os teores de N amoniacal não foram observados
 183 (P>0,05) efeito do inóculo e do substrato, e também nenhuma interação inóculo x substrato. A
 184 produção de gases e de gás metano foi superior (P<0,05) quando os substratos foram
 185 incubados em inóculo ruminal. O pH mostrou-se com valores superiores (P<0,05) quando
 186 avaliado em inóculo fecal comparado ao inóculo ruminal.

187 Os dados da degradabilidade ruminal *in vitro* no tempo 24 horas estão apresentadas na Tabela
 188 4. Observou-se efeito do inóculo (P<0,05) apenas para degradabilidade da FDN (%). Não
 189 foram (P>0,05) observadas diferenças significativas para a DMS entre os inóculos ruminal e
 190 fecal. A DFDN mostrou-se superior (P<0,05) quando avaliada em inóculo fecal comparado ao
 191 inóculo ruminal.

192 A Figura 1 apresenta os perfis da cinética de fermentação *in vitro* dos substratos incubados até
193 o tempo de 144 horas. A curva para comportamento cinético das dietas, 100:0 e 50:50,
194 apresentaram-se semelhante para os inóculos ruminal e fecal avaliados.

195 **Discussão**

196 A variação na concentração dos nutrientes, podem justificar o efeito do substrato ($P < 0,05$)
197 para todos os parâmetros avaliados. A composição química dos substratos mostrou-se
198 bastante variada com teor de nutrientes entre 911,9 a 959,1 g/kg para matéria orgânica; 51,7 a
199 111,4 g/kg para proteína bruta; 349,2 a 834,2 g/kg para FDN; 175,0 a 494,9 g/kg para FDA;
200 24,8 a 87,9 g/kg para a lignina; 174,2 a 364,6 g/kg para hemicelulose; e 150,2 a 418,1 g/kg
201 para celulose.

202 A diferença de 8,5 (mL gases/g) para o potencial máximo de produção de gases entre os
203 inóculos, mostrou que os substratos geraram maiores fermentações quando incubados em
204 inóculo fecal. Fon e Nsahlai (2012), obtiveram produção de gases, nos tempos 24 e 72 horas,
205 iguais a 100 e 150 (mL/g) para o inóculo ruminal, respectivamente e, 82 e 136 (mL/g) para o
206 inóculo fecal, respectivamente. Pesquisa conduzida por Váradyová, Baran e Zenenák (2005)
207 pela técnica de produção de gases *in vitro*, utilizando inóculo ruminal e fecal de ovinos,
208 indicou menor taxa e extensão de produção de gases com o inóculo fecal em relação ao
209 inóculo ruminal, verificando-se maior diferença na taxa de produção de gases (mL/g MS h)
210 entre os inóculos na fase inicial (3 horas), 5,3 mL gases/g MS h, enquanto no tempo 30 horas,
211 essa diferença diminuiu para 1,9 mL gases/g MS.

212 Alguns autores, consideram que a fase inicial do inóculo fecal pode ser denominada ou
213 interpretada como a mais crítica (Váradyová, Baran e Zenenák, 2005). Este fato pode estar
214 relacionado ao atraso na fermentação do substrato. Dependendo da composição química,
215 podemos dizer que o inóculo fecal vai exigir um maior tempo de colonização. A taxa de
216 passagem no intestino grosso é relativamente elevada, e o tempo que a população microbiana
217 tem é muito limitada para extrair nutrientes para sobreviver no ecossistema deste
218 compartimento (Fon e Nsahlai, 2012).

219 Variações no inóculo, segundo Mizubuti et al. (2014), podem influenciar o tempo de
220 colonização e refletir no potencial fermentativo do inóculo, pode ser decorrente do animal
221 doador, do estado nutricional, fonte de alimento recebido e estado fisiológico. Os autores
222 ainda relatam que, lentas taxas de degradação podem estar relacionadas ao elevado teor de
223 lignina dos substratos. Outro fator que não está relacionado diretamente ao inóculo, é a
224 quantidade de amostra incubada. Segundo Cavalcante et al. (2015), a menor quantidade de
225 substrato incubado pode ser equivalente à quantidade de microrganismos no inóculo,
226 resultando em maior degradação do material incubado. Em outras palavras, o inóculo fecal
227 apresenta sempre menor densidade microbiana, e para melhorar a capacidade de fermentação
228 e degradação do inóculo fecal, pode ser feita através da diminuição da quantidade de substrato
229 incubado durante os ensaios *in vitro*, aumentando a área de contato do substrato com a
230 microbiota presente no inóculo produzido a partir das fezes. Também, pode ser feito através
231 do aumento da concentração das fezes no inóculo, aumentando assim, a população
232 microbiana.

233 Os substratos apresentaram comportamento bem semelhante comparando inóculo ruminal e
234 fecal (Figura 1). No terço final da curva observada em cada substrato, o comportamento dos
235 inóculos fecal e ruminal foram próximos. Estes resultados divergem dos relatados por Posada
236 et al. (2012), que observaram que o inóculo ruminal apresentou maior produção de gases até
237 24 horas de incubação, e que após 30 horas, os valores do inóculo fecal foram superiores
238 ($P < 0,05$). Diferentes frações de alimentos são fermentados em diferentes velocidades (Bueno
239 et al., 2010), e alguns estudos têm indicado que, no método *in vitro*, a degradabilidade da MS

240 ou da fibra, inicia-se na própria forragem, independente da fonte de inóculo ruminal
241 (Marinucci, Dehority e Loerch, 1992). Com base nisso, pode-se sugerir que a microbiota do
242 inóculo fecal pode ter se multiplicado e aumentado a população microbiana na fase final. Por
243 outro lado, Fon e Nsahlai (2012) sugerem que o cultivo da microbiota presente nas fezes, sob
244 condições anaeróbicas adequadas antes de sua utilização, poderia aumentar a população
245 microbiana inicial, e favorecer a especificidade dos microrganismos e taxa de fermentação.
246 A menor digestibilidade da matéria orgânica quando se utiliza inóculo fecal pode resultar de
247 variações na produção de biomassa microbiana, refletindo em baixa correlação com a
248 capacidade fermentativa para degradação (Posada et al., 2012). A degradação da MS e MO foi
249 maior ($p < 0,05$) para os substratos incubados em inóculo ruminal quando comparados ao
250 inóculo fecal. Zicarelli et al. (2011), observaram maior degradabilidade *in vitro* da matéria
251 orgânica com o inóculo fecal (75,49 e 78,61%) em comparação ao inóculo ruminal (71,64 e
252 71,87 %) de ovinos para dietas com proporção volumoso:concentrado 90:10 e 80:20,
253 respectivamente.

254 Os resultados deste estudo estão de acordo com os resultados de Ramin et al. (2015), que
255 observaram maiores degradações quando os substratos foram incubados em inóculo ruminal
256 que inóculo fecal de bovinos. Os autores ainda citaram uma tendência para a interação inóculo
257 x substrato, com maiores diferenças na digestibilidade verdadeira da matéria orgânica para
258 substratos de baixa qualidade (conteúdo do rúmen e retículo com FDN = 810 g/kg MS) em
259 relação ao substrato de melhor qualidade (dieta 50:50, silagem de gramínea:cevada, com FDN
260 = 239 g/kg de MS).

261 Posada et al. (2012) comparando a capacidade de degradar a MS, verificaram que os valores
262 médios foram diferentes ($P < 0,05$) no tempo 24 horas, mas não no final do processo de
263 fermentação. Os resultados desta pesquisa divergem dos relatados pelos autores acima
264 citados, onde a DMS no tempo 24 horas não apresentou diferença entre os inóculos ruminal e
265 fecal testados. A degradação da MS no tempo 144 horas de incubação, foi maior em 53,60%
266 para o inóculo ruminal e 57,44% para o inóculo fecal, em relação ao tempo de incubação 24
267 horas. De fato, um maior tempo de contato do substrato com a fonte microbiana do inóculo,
268 tende a aumentar a degradação dos nutrientes. Por outro lado, há relatos que em tempos de
269 avaliação *in vitro* superiores a 48 horas de incubação, a fermentação não é oriunda do
270 substrato, mas sim da degradação da população microbiana (Van Soest, 1994). Enquanto o
271 inóculo fecal não apresentar um protocolo definitivo, estudar sua extensão de fermentação por
272 tempos superiores a 48 horas, podem ajudar a justificar seu modo de ação sobre os substratos.
273 A degradação de substratos incubados em fontes microbianas oriundas pós-rúmen, podem
274 estar restritos, principalmente para o material fibroso, pois embora semelhante ao rúmen, o
275 ceco só representa 15% da fermentação total do trato gastrointestinal (Van Soest, 1994;
276 Mould et al., 2005). Assim, essa pode ser a explicação para os resultados superiores e
277 significativos da DFDN quando os substratos foram incubados em inóculo fecal por 24 horas.
278 Segundo Fon e Nsahlai (2012), os microrganismos presentes no intestino grosso, podem ser
279 muito eficazes na fermentação de alimentos ricos em fibra, a uma taxa mais elevada, porém
280 há limitação destes inóculos pelo número inicial de microrganismos durante a incubação *in*
281 *vitro*.

282 A atividade da microbiota ruminal é maximizada quando o pH está próximo a 6,5, para a
283 maioria da população microbiana (Domingues et al., 2010). O menor pH foi observado no
284 substrato representado pela dieta 50:50 (volumoso:concentrado), o que pode ter decorrido do
285 consumo do meio tampão, ocasionado pela presença do concentrado, em razão da menor
286 fração fibrosa do substrato. Dietas com baixa proporção de fibra, resultam em elevada taxa de
287 degradação, conseqüentemente em maior produção de AGCC, exigindo assim, maior

288 concentração do meio tampão no sistema ruminal, para permitir a concentração de íons H⁺,
289 evitando a depleção do pH (Slyter 1976).

290 Não foram encontrados relatos na literatura sobre resultados de nitrogênio amoniacal
291 utilizando inóculo fecal. Neste caso, podemos afirmar que o inóculo fecal não apresenta
292 variações sobre a concentração de nitrogênio amoniacal, como pode ser observado nos
293 resultados desta pesquisa. A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃, mg/dL) tem sido
294 adotada como um fator qualitativo, para facilitar o entendimento do ambiente ruminal, de
295 acordo com a atividade microbiana sobre os carboidratos fibrosos (Detmann et al., 2009;
296 Souza et al., 2013). A concentração de N-NH₃ pode aumentar ou diminuir dependendo da
297 quantidade de proteína degradável e da quantidade e tipo de carboidratos da dieta disponíveis
298 para a utilização pela microbiota ruminal (Sallam et al., 2010).

299 A menor produção de metano quando da utilização de inóculo fecal como fonte microbiana,
300 pode ser atribuída à menor quantidade de substrato fermentado, isto é, à menor produção de
301 gases. Ramin et al. (2015) observaram menor produção de metano (mL/ g MO) para os
302 substratos conteúdo do retículo e rúmen, matéria fecal, silagem de gramínea, feno de
303 gramínea e dieta 50:50 silagem de gramínea:cevada, incubados em inóculo fecal (6,9; 7,5;
304 18,7; 16,5 e 21,9, respectivamente) comparado ao inóculo ruminal (17; 18,7; 38,7; 29,7 e
305 41,0, respectivamente). Estes autores justificaram que este fato pode estar relacionado às vias
306 alternativas de H₂, provavelmente acetogênese, no intestino posterior, com produção reduzida
307 de metano.

308 As fezes, como fonte de inóculo microbiano para ensaios *in vitro* de avaliação de alimentos
309 para animais ruminantes, apresentam grande potencial para substituir o conteúdo ruminal de
310 animais fistulados. Concluímos que a fonte microbiana da matéria fecal de ovinos abatidos
311 pode ser utilizada para estimar os parâmetros de produção de gases (A, L e T ½) até o tempo
312 de 144 horas. O inóculo fecal de ovinos abatidos é eficiente na avaliação das características de
313 degradação de nutrientes no tempo de incubação 24 horas.

314 **Referências**

315 Alves, AA, Sales, RO, Neiva, JNM, Medeiros, AN, Braga, AP, Azevedo, AR (2007)
316 Degradabilidade ruminal *in situ* de vagens de faveira (*Parkia platycephala* Benth.) em
317 diferentes tamanhos de partículas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*
318 **59**, 1045-1051.

319 AOAC (2005) 'Official methods of analysis of AOAC International.' 18th ed. (AOAC
320 International: Arlington, VA)

321 Bueno, ICS, Cabral Filho, SLS, Godoy, PB, Abdalla, AL. (2010) Comparison of *in situ* and *in*
322 *vitro* dry matter rumen degradability of three distinct quality hays in sheep. *Tropical and*
323 *Subtropical Agroecosystems* **12**, 321-332.

324 Carro MD, Miller EL (1999) Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen
325 forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semicontinuous culture
326 system (Rusitec). *The British Journal of Nutrition* **82**, 149–157.

327 Cavalcante, SE, Vasconcelos, VR, Abdalla, AL, Alves, AA, Natel, AS, Dhanasekaran, D,
328 Silva, LRF, Siqueira, JC (2015) Faecal inoculum as alternative microbial source for *in vitro*
329 rumen fermentation techniques. In: 'Proceedings of the Tropentag 2015' pp.260. (Berlin,
330 Germany)

331 Detmann, E, Paulino, MF, Mantovani, HC et al. (2009) Parameterization of ruminal fibre
332 degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. *Livestock Science*
333 **126**, 136-146.

- 334 Domingues, AR, Silva, LDF, Ribeiro, ELA, Castro, VS, Barbosa, MAAF, Mori, RM, Vieira,
335 MTL, Silva, JAO (2010) Consumo, parâmetros ruminais e concentração de uréia plasmática
336 em novilhos alimentados com diferentes níveis de torta de girassol em substituição ao farelo
337 de algodão. *Semina: Ciências Agrárias* **31**, 1059-1070.
- 338 Fon, FN, Nsahlai, IV (2012) Laboratory cultured faecal inoculum as a substitute for fresh
339 rumen inoculum for *in vitro* feed evaluation. *African Journal Agricultural Research* **7**, 6595-
340 6604.
- 341 Goering MK, Van Soest PJ (1970) Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and
342 some applications). In 'Agricultural handbook, no. 379'. (Agricultural Research Services,
343 USDA: Washington DC)
- 344 Marinucci, MT, Dehority, BA, Loerch, SC (1992) *In vitro* and *in vivo* studies of factors
345 affecting digestion of feeds in synthetic fiber bags. *Journal of Animal Science* **70**, 296-307.
- 346 Mauricio, RM, Mould, FL, Dhanoa, MS, Owen, E, Channa, KS, Theodorou, MK (1999) A
347 semiautomated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal*
348 *Feed Science and Technology* **79**, 321-330.
- 349 Mehrez, AZ, Ørskov, ER (1977) The use of a Dacron bag technique to determine rate of
350 degradation of protein and energy in the rumen. *Journal of Agriculture Science* **88**, 645-650.
- 351 Mizubuti IY et al (2014) Cinética de degradação ruminal de alimentos proteicos pela técnica
352 *in vitro* de produção de gases. *Semina: Ciências Agrárias* **35**, 555-566.
- 353 Mould, FL, Kliem, KE, Morgan, R, Mauricio, RM (2005) *In vitro* microbial inoculum: A
354 review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology* **123-124**, 31-50.
- 355 Posada, SL, Noguera, RR, Segura, JA (2012) Ruminant feces used as inoculum for the *in*
356 *vitro* gas production technique. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* **25**, 592-602.
- 357 Ramin, M, Lerosé, D, Tagliapietra, F, Huhtanen, P (2015) Comparison of rumen fluid
358 inoculum vs. faecal inoculum on predicted methane production using a fully automated *in*
359 *vitro* gas production system. *Livestock Science* **181**, 65-71.
- 360 Sallam, SMA, Bueno, ICS, Nasser, MEA, Adballa, AL (2010) Effect of eucalyptus
361 (*Eucalyptus citriodora*) fresh or residue leaves on methane emission *in vitro*. *Italian Journal*
362 *of Animal Science* **9**, 299-303.
- 363 SAS (2002). 'SAS Software, Version 8.' (SAS Institute Inc.: Cary, NC.)
- 364 Schofield, P, Pitt, RE, Pell, AN (1994) Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas
365 production. *Journal of Animal Science* **72**, 2980-2991.
- 366 Slyter, LL (1976) Influence of acidosis on rumen function. *Journal Animal Science* **43**, 910-
367 929.
- 368 Souza, NKP, Detmann, E, Valadares Filho, SC, Costa, VAC, Pina, DS, Gomes, DI, Queiroz,
369 AC, Mantovani, HC (2013) Accuracy of the estimates of ammonia concentration in rumen
370 fluid using different analytical methods. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e*
371 *Zootecnia* **65**, 1752-1758.
- 372 Van Soest, PJ (1994) Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. New York: Cornell
373 University Press, 476p.

- 374 Váradyová, Z, Baran, M, Zelenák, I (2005) Comparison of two *in vitro* fermentation gas
375 production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. *Animal Feed*
376 *Science and Technology* **123-124**, 81-94.
- 377 Zicarelli, F, Calabrò, S, Cutrignelli, M, I, Infascelli, F, Tudisco, R, Bovera, F, Piccolo, V
378 (2011) *In vitro* fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios:
379 comparison of rumen and faecal inocula. *Journal of the Science of Feed and Agriculture* **91**,
380 1213-1221.
- 381

382 **Tabela 1. Características bromatológica dos substratos**

383 MO (matéria orgânica), PB (proteína bruta), FDN (fibra em detergente neutro), FDA (fibra
 384 em detergente ácido), LDA (lignina em detergente ácido), HEM (hemicelulose), CEL
 385 (celulose).

386 Massai (capim-Massai), Andropógon (capim-Andropógon), Humidícola (capim-Humidícola),
 387 Xaraés (capim-Xaraés), SCEBC (Silagem de capim-Elefante com 5% de Bagaço de cana-de-
 388 açúcar), SCETB (Silagem de capim-Elefante com 5% de torta de babaçu), Dieta 100
 389 (combinação de volumosos, dieta 100:0 volumoso:concentrado), Dieta 50 (Dieta 50:50
 390 volumoso:concentrado)

391

	MO	PB	FDN	FDA	LDA	HEM	CEL
	g/kg						
Massai	947,8	51,7	834,2	494,9	76,8	339,3	418,1
Andropógon	959,1	78,4	738,3	390,8	41,1	347,5	349,7
Humdicola	939,2	72,3	737,9	373,3	39,9	364,6	333,4
Xaraés	946,5	69,4	709,5	363,8	34,4	345,7	329,4
SCEBC	911,9	96,5	754,0	450,6	83,0	303,4	367,6
SCETB	923,2	104,1	685,6	419,0	87,9	266,6	331,2
Dieta 100	940,8	69,8	573,6	337,1	39,3	236,5	297,8
Dieta 50	934,1	111,4	349,2	175,0	24,8	174,2	150,2

392 **Tabela 2. Parâmetros da cinética de produção de gases e degradação da matéria seca e matéria orgânica avaliados até o tempo de 144**
 393 **horas de incubação**

394 Médias seguidas de letras iguais na linha (minúsculas) e na coluna (maiúsculas) não diferem entre si pelo teste SNK (P< 0.05);

395 A (potencial máximo de produção de gases), L (tempo de colonização), T ½ (tempo necessário para atingir metade da assíntota), DMS
 396 (degradação da matéria seca), DMO (degradação da matéria orgânica), R (ruminal), F (fecal), MAS (capim-Massai), AND (capim-Andropógon),
 397 HUM (capim-Humidícola), XAR (capim-Xaraés), SBC (silagem de capim-Elefante com 5% bagaço de cana-de-açúcar), STB (silagem de capim-
 398 Elefante com 5% de torta de babaçu), D100 (dieta 100), D50 (dieta 50), epm (erro padrão da média), S (Substrato), I (Inóculo), S*I (Interação
 399 substrato x inóculo).

Item	Inóculo	Substrato								Valor P				
		MAS	AND	HUM	XAR	SBC	STB	D100	D50	média	epm	I	S	SxI
A (mL/g)	R	83,05	80,30	94,53	89,30	61,45	55,35	78,23	81,38	77,95b	2,25	0,0011	<0,0001	0,2750
	F	92,90	93,95	100,40	108,55	59,28	57,88	79,53	97,70	86,27a				
	média	87,98AB	87,13AB	97,46A	98,93A	60,37C	56,61C	78,88B	89,54AB					
L (h)	R	7,64	10,67	5,73	3,31	7,79	5,83	1,87	1,54	5,55a	0,46	0,0579	<0,0001	0,9442
	F	8,02	10,46	8,03	5,93	8,46	7,56	2,49	3,71	6,83a				
	média	7,83AB	10,56A	6,89B	4,62BC	8,12AB	6,69B	2,18C	2,62C					
T ½ (h)	R	56,77	58,77	53,50	53,79	44,04	43,15	26,41	17,66	44,26b	2,47	<0,0001	<0,0001	0,3614
	F	78,98	68,05	69,21	74,40	57,04	65,82	31,00	26,15	58,83a				
	média	67,88A	63,41AB	61,37ABC	64,10AB	50,54C	54,49BC	28,70D	21,90D					
DMS (%)	R	65,20	67,43	73,76	76,15	55,96	62,25	69,72	83,23	69,21a	1,14	0,0024	<0,0001	0,8792
	F	61,00	66,03	69,86	70,63	49,69	60,58	68,97	78,00	65,59b				
	média	63,10A	66,73CD	71,81BC	73,39B	52,82E	61,41D	69,34BC	80,62A					
DMO (%)	R	64,49	67,37	73,28	75,61	55,66	60,63	71,28	83,31	68,95a	2,31	0,0141	<0,0001	0,9224
	F	60,94	66,84	70,41	71,91	51,10	59,33	71,23	80,10	66,48b				
	média	62,71D	67,10C	71,84B	73,76B	53,38E	59,98D	71,25B	81,71A					

400 **Tabela 3. Características de fermentação dos substratos incubados em inóculo ruminal e fecal de ovinos no tempo de 24 horas**

401 Médias seguidas de letras iguais na linha (minúsculas) e na coluna (maiúsculas) não diferem entre si pelo teste SNK ($P < 0.05$);

402 pH (potencial hidrogênico), PG (produção de gases), N-NH₃ (nitrogênio amoniacal), R (ruminal), F (fecal), MAS (capim-Massai), AND (capim-
403 Andropógon), HUM (capim-Humidícola), XAR (capim-Xaraés), SBC (silagem de capim-Elefante com 5% bagaço de cana-de-açúcar), STB
404 (silagem de capim-Elefante com 5% de torta de babaçu), D100 (dieta 100), D50 (dieta 50), epm (erro padrão da média), S (Substrato), I
405 (Inóculo), S*I (Interação substrato x inóculo).

406

Item	Inóculo	Substrato								Valor P				
		MAS	AND	HUM	XAR	SBC	STB	D100	D50	média	epm	I	S	SxI
pH	R	7,28	7,19	7,07	7,06	7,08	7,13	6,88	6,71	7,05b	0,02	0,0444	<0,0001	0,4238
	F	7,19	7,25	7,14	7,10	7,16	7,23	6,90	6,81	7,10a				
	média	7,23A	7,22AB	7,10BC	7,08C	7,12ABC	7,18ABC	6,89D	6,76E					
PG (mL/g)	R	30,85	28,78	38,74	39,19	31,01	32,11	56,55	70,29	40,94a	1,92	<0,0001	<0,0001	0,9267
	F	20,79	20,00	25,96	27,23	20,31	17,87	43,53	57,57	29,16b				
	média	25,82D	24,39D	32,35C	33,21C	25,66D	24,99D	50,04B	63,93A					
Metano (%)	R	3,25	2,72	4,15	3,87	4,68	3,70	5,30	5,93	4,20a	0,22	<0,0001	<0,0001	0,6603
	F	2,05	1,25	2,00	2,24	1,93	1,00	3,81	5,13	2,43b				
	média	2,64C	1,98C	3,08BC	3,05BC	3,31BC	2,35C	4,56AB	5,53A					
N-NH ₃ (mg/dL)	R	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,28a	0,002	0,9903	1,0000	1,0000
	F	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2	2,3	2,1	2,2	2,27a				
	média	2,2A	2,2A	2,2A	2,2A	2,2A	2,3A	2,2A	2,2A					

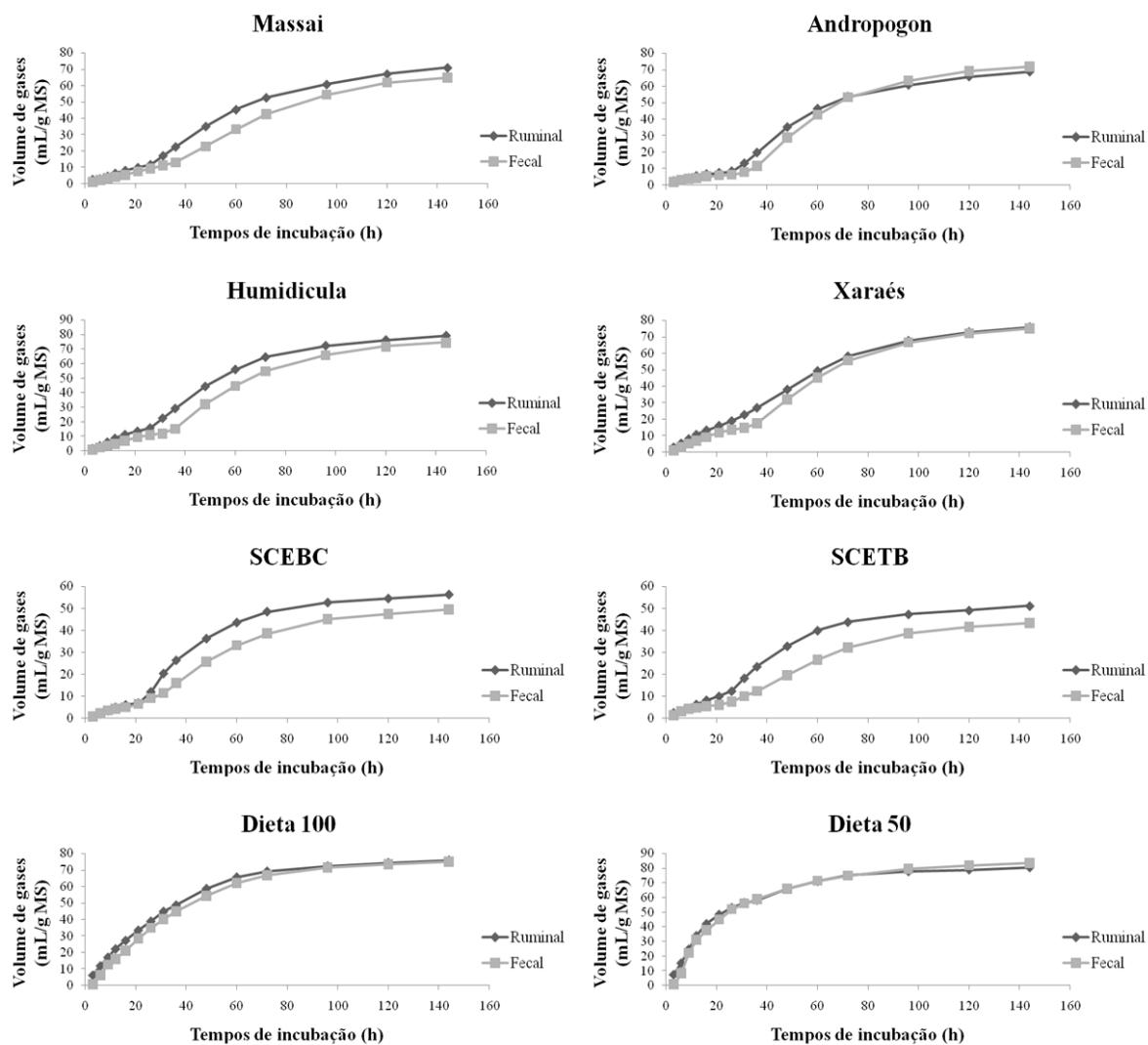
407 **Tabela 4 - Degradação ruminal *in vitro* dos substratos incubados em inóculo ruminal e fecal de ovinos no tempo de 24 horas**

408 Médias seguidas de letras iguais na linha (minúsculas) e na coluna (maiúsculas) não diferem entre si pelo teste SNK ($P < 0.05$);
 409 DMS (degradação da matéria seca), DFDN (degradação da fibra em detergente neutro), R (ruminal), F (fecal), MAS (capim-Massai), AND
 410 (capim-Andropógon), HUM (capim-Humidícola), XAR (capim-Xaraés), SBC (silagem de capim-Elefante com 5% bagaço de cana-de-açúcar),
 411 STB (silagem de capim-Elefante com 5% de torta de babaçu), D100 (dieta 100), D50 (dieta 50), epm (erro padrão da média), S (Substrato), I
 412 (Inóculo), S*I (Interação substrato x inóculo).
 413

Item	Inóculo	Substrato								Valor P				
		MAS	AND	HUM	XAR	SBC	STB	D100	D50	média	epm	I	S	SxI
DMS (%)	R	38,11	40,13	25,81	27,59	22,20	33,94	48,82	60,19	37,10a	2,02	0,8621	<0,0001	0,6965
	F	25,54	31,98	21,68	34,78	29,05	41,49	53,38	63,58	37,68a				
	média	31,82C	36,05BC	23,75C	31,18C	25,62C	37,71BC	51,10AB	61,88A					
DFDN (%)	R	45,43	48,27	32,77	36,18	31,09	42,18	55,77	67,20	44,86b	2,25	0,0002	0,0020	0,9507
	F	52,49	60,38	47,53	59,10	51,51	64,69	71,22	75,29	60,27a				
	média	48,96B	54,32AB	40,15B	47,64B	41,30B	53,42AB	63,49AB	71,24A					

414 **Figura 1. Perfil da cinética de fermentação dos substratos incubados em inóculo ruminal**
 415 **e fecal de ovinos**

416 Massai (capim-Massai), Andropógon (capim-Andropógon), Humidícola (capim-Humidícola),
 417 Xaraés (capim-Xaraés), SCEBC (Silagem de capim-Elefante com 5% de bagaço de cana-de-
 418 açúcar), SCETB (Silagem de capim-Elefante com 5% de torta de babaçu), Dieta 100 (dieta
 419 100:0 volumoso:concentrado), Dieta 50 (dieta 50:50 volumoso:concentrado).
 420



421

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estimativa dos parâmetros de fermentação e de degradação ruminal dos substratos avaliados até 24 horas de incubação com o uso de inóculo fecal, preparado com 23 e 38 g de fezes/mL de solução tampão, como fonte de microrganismos, difere em relação aos dados obtidos com o inóculo ruminal.

Após 144 horas de incubação, o estudo do comportamento cinético dos substratos avaliados com o inóculo fecal obtido de ovinos abatidos demonstra que ele pode ser utilizado para estimar, com eficiência.

Para ensaios de produção de gases *in vitro* adotando-se o tempo de 24 horas de incubação, é necessário aumentar a concentração de microrganismos presentes no inóculo fecal.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABDALLA, A.L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, Suplemento especial, p.260-268, 2008.

ALCALDE, C.R. et al. Digestibilidade *in vitro* de alimentos com inóculos de líquido de rúmen ou de fezes de bovinos. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.23, n.4, p.917-921, 2001.

ALVES, A.A. et al. Degradabilidade ruminal *in situ* de vagens de faveira (*Parkia platycephala* Benth.) em diferentes tamanhos de partículas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1045-1051, 2007.

ARCHIMÈDE, H. et al. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. **Animal Feed Science and Technology**, v.166-167, p.59-64, 2011.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583p.

BUENO, I.C.S. et al. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.123-124, p.95-105, 2005.

CAVALCANTE, S.E. et al. Faecal inoculum as alternative microbial source for *in vitro* rumen fermentation techniques. In: Tropentag 2015. Berlin, Germany. **Proceedings...**:Berlin: Humboldt-Universität zu Berlin, 2015. p.260

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (2015). Resolução Normativa nº23, de 23 de julho de 2015. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jul. 2015. Seção 1, p. 4. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/0237/237231.pdf>. Acesso em: 9 jul. 2016.

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; VALLE, C.B.; DIFANTE, G.S.; BARBOSA, R.A.; CACERE, E.R. Valor nutritivo da forragem e produção animal em pastagens de *Brachiaria brizantha*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.1, p.98-106, 2009.

FÁVARO, V.R. et al. A utilização de glicerina em dietas para bovinos altera a microbiota ruminal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.5, p.1504-1512, 2014.

FERNANDO, S.C. et al. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.7482-7490, 2010.

FON, F.N.; NS AHLAI, I.V. Laboratory cultured faecal inoculum as a substitute for fresh rumen inoculum for *in vitro* feed evaluation. **African Journal Agricultural Research**, v.7, p.6595-6604, 2012.

HUGHES, M. et al. Potency of microbial inocula from bovine faeces and rumen fluid for *in vitro* digestion of different tropical forage substrates. **Grass and Forage Science**, v.67, p.263-273, 2012.

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

- KIM, M. et al. Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. **Journal of Animal Science**, v.92, p.683-694, 2014.
- KONG, Y.; TEATHER, R.; FORSTER, R. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. **FEMS Microbiology Ecology**, v.74, p.612-622, 2010.
- LANA, R.P. **Nutrição e alimentação animal: mitos e realidades**. 2. ed. Viçosa: Suprema Gráfica, 2007.
- LAUDADIO, V. et al. Faecal liquor as alternative microbial inoculum source for *in vitro* (DaisyII) technique to estimate the digestibility of feeds for camels. **Journal of Camelid Science**, v.2, p.1-7, 2009.
- LAVEZZO, O. E. N. M. et al. Influência de métodos de coleta de fluido ruminal sobre os parâmetros de fermentação em bovinos alimentados com diferentes fontes de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.17, n.3, p.281-291, 1988.
- MARTINEZ, M.E. et al. Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and RUSITEC fermenters. II. Protozoa population and diversity of bacterial communities. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.3699-3712, 2010.
- McDOUGALL, E.I. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemistry Journal**, v.43, p.99-109, 1948.
- MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R. The use of a Dacron bag technique to determine rate of degradation of protein and energy in the rumen. **Journal Agriculture Science**, v.88, p.645-650, 1977.
- MIZUBUTI, I.Y. et al. Cinética de degradação ruminal de alimentos proteicos pela técnica *in vitro* de produção de gases. **Semina: Ciências Agrárias Londrina**, v.35, p.555-566, 2014.
- MOREIRA, P.C. et al. Produção de ácidos graxos voláteis, avaliada pela técnica semiautomática *in vitro*, na dieta de ruminantes com diferentes fontes de carboidratos na fração volumosa. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.10, n.2, p.413-424, 2009.
- MOULD, F.L. et al. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.123-124, p.31-50, 2005.
- OLIVEIRA, M. D. S. et al. Efeito de métodos de coleta de fluido ruminal em bovinos sobre alguns parâmetros ruminais e microbiológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.5, p.867-871, 1999.
- OMED, H.M.; LOVETT, D.K.; AXFORD, R.F.E. Faeces as a source of microbial enzymes for estimating digestibility. In: GIVENS, D.I. et al. (Eds.), **Forage Evaluation in Ruminant Nutrition**. Wallingford: CAB International, 2000. p.135-154.
- ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science Cambridge**, v.92, p.499-503, 1979
- PASHAEI, S.; RAZMAZAR, V.; MIRSHEKAR, R. Gas production: A proposed *in vitro* method to estimate the extent of digestion of a feedstuff in the rumen. **Journal of Biological Sciences**, v.10, p.573-580, 2010.

POSADA, S.L.; NOGUERA R.R.; SEGURA J.A. Ruminant feces used as inoculum for the *in vitro* gas production technique. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v.25, n.1, p.592-602, 2012.

REZENDE, P.L.P.; NETO, M.D.F.; RESTLE J.; FERNANDES, J.J.R.; PÁDUA, J.T.; QUEIROZ, G.A.B. Validação de modelos matemáticos para predição de consumo voluntário e ganho em peso de bovinos. **Archivos de Zootecnia**, v.60, p.921-930, 2011.

RODRIGUEZ, M.G., PUJAL, A.A.R., OLIVEIRA, R.M.P., SÁEZ, S.J.M. Heces ovinas depuestas como inóculo en la técnica de producción de gases para la valoración nutritiva de forrajes. **Revista de Producción Animal**, V.24, p.1-5, 2012.

RODRIGUEZ, M.G., PUJAL, A.A.R., OLIVEIRA, R.M.P., SÁEZ, S.J.M. Validación de heces ovinas con la técnica de gas *in vitro* para valorar alimentos destinados a rumiantes. **Revista de Producción Animal**, v.25, p.1-5, 2013.

ROSS, E. M. et al. Metagenomics of rumen bacteriophage from thirteen lactating dairy cattle. **BMC Microbiology**, v.13, n. 242, p.1-11, 2013.

RYMER, C. et al. *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.123-124, p.9-30, 2005.

SALLES, M.S.V. et al. Avaliação de colheita de líquido ruminal por fístula ou sonda esofágica em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.4, p.438-442, 2003.

SILVA, K.T. et al. Utilização de fezes (eqüina ou bovina) em substituição ao líquido ruminal como fonte de inóculo para determinação da digestibilidade *in vitro* de alimentos para ruminantes. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.25, n.2, p.355-361, 2003.

THEOROROU, M.K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.185-197, 1994.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of the British Grassland Society**, Oxford, v.18, n.2, p.104-111, 1963.

TILMAN, D.; CLARK, M. Global diets link environmental sustainability and human health, **Nature**, v.515, n.7528, p.518-522, 2014.

TUFARELLI, V. et al. Assessing nutritional value and *in vitro* digestibility of Mediterranean pasture species using yak (*Bos grunniens*) faeces as alternative microbial inoculum in a Daisy^{II} incubator. **Journal of Feed, Agriculture & Environment**, v.2, p.477-481, 2010.

WEISS, W.P.; CONRAD, H.R.; ST. PIERRE, N.R. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v.39, p.95-110, 1992.

ZANINETTI, R.A. et al. Degradação *in situ* da matéria seca e da fração fibrosa do capim Marandu obtido por diferentes métodos de amostragem, no período seco do ano. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, p.603-609, 2010.

ZICARELLI, F. et al. *In vitro* fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios: comparison of rumen and faecal inocula. **Journal of the Science of Feed and Agriculture**, Oxford, v.91, p.1213-1221, 2011.

7 ANEXOS

Author Instructions of Journal Animal Production Science

<http://www.publish.csiro.au/an/forauthors/authorinstructions>

All manuscripts should be submitted via ScholarOne Manuscripts.

Animal Production Science welcomes the submission of articles presenting original and significant research that are within the journal's scope.

- **Journal policy and scope**
- **Review papers**
- **Perspective**
- **Editorials**
- **Comment papers**
- **Licence to publish**
- **Open access**
- **Citing personal communications and statistical software**
- **Animal experimentation**
- **Preparing your manuscript**
- **Title**
- **Summary text for the Table of Contents**
- **Abstract**
- **References**
- **Units**
- **Mathematical formulae**
- **Tables**
- **Figures and computer graphics**
- **Photographs**
- **Statistical evaluation of results**
- **Nomenclature**

- **Submission of research manuscripts**
 - **Post acceptance of manuscript**
 - **Proofs and Reprints**
 - **Style guide for references**
-

Journal policy and scope

Research papers in **Animal Production Science** focus on improving livestock and food production, and on the social and economic issues that influence primary producers. The journal is predominantly concerned with domesticated animals (beef cattle, dairy cows, sheep, pigs, goats and poultry); however, contributions on horses and wild animals may be published where relevant. **Animal Production Science** publishes original research papers, critical review articles, and viewpoints; it does not publish technical and research notes, or short communications.

High quality original contributions are encouraged on:

- animal breeding and genetics
- animal nutrition and reproduction
- livestock farming systems, sustainability and natural resource management
- meat science and consumer acceptability
- behaviour, health and welfare
- feed quality and nutritional value
- bio-pharmaceuticals derived from animals

The subject scope extends from the molecular level through to the role of animals in farming systems. The target readership is animal scientists, and administrators and policy-makers who interface with this discipline.

[Return to Index](#)

Review papers

Prestigious, invited reviews are commissioned from authors who are world leaders in the animal sciences. Reviews should summarise a body of knowledge and, from it, formulate ideas and recommendations which would be useful to international research community. If you are interested in preparing a Review article, please discuss the subject matter with the [Editor-in-Chief](#) or the appropriate [Associate Editor](#).

[Return to Index](#)

Perspective

A perspective is a pithy (but balanced) opinion piece about current or future directions in animal science. A perspective can critically assess current scientific topics or report on

future issues that may arise from the discipline. The intent is to stimulate discussion and possible rethinking of current views in the animal sciences. Perspectives that address interdisciplinary research areas with relevance to a broader audience are of particular interest to the Editors. The Perspective should be accompanied by an abstract and generally range from 1000 to 4000 words; tables and figures can be included.

[Return to Index](#)

Editorials

Editorials are usually commissioned. Editorials are opinion pieces which reflect on papers previously or currently published in **Animal Production Science**, or on issues of general interest to the animal sciences community. They should be written in a crisp, lively style. They should have a maximum of 800 words, and not more than 5 references.

[Return to Index](#)

Comment papers

A brief comment or critique on a paper recently published in **Animal Production Science**. No abstract required. Authors of the original paper will be invited to submit a response.

[Return to Index](#)

Licence to publish

Submission of a paper is taken to mean that the results reported have not been published and are not being considered for publication elsewhere. A summary of the findings in the proceedings of a conference or in an extension article is not necessarily regarded as prior publication. However, if substantial parts of the data, such as those in Tables and Figures, have been published before, the inclusion of extra peripheral data does not alter the judgment that the paper is not new. The Editor assumes that all authors of a multi-authored paper have agreed to its submission. For details regarding copyright, please see [Copyright/Licence to Publish](#).

[Return to Index](#)

Open access

Authors may choose to publish their paper Open Access on payment of a publication fee. See [Open Access](#) for more details.

[Return to Index](#)

Citing personal communications and statistical software

Citation of submitted manuscripts, unpublished data and personal communications should be avoided but if essential, they should be cited parenthetically in the text thus (e.g. PA Smith, pers. comm.). In such cases, the authors **must obtain permission** from the data owner to quote his or her unpublished work. Likewise, any statistical software used to process your data should be cited in brackets in the text, providing the name and version of the package and the name, city, state and country of the company that produced it.

[Return to Index](#)

Animal experimentation

Experiments involving animals are expected to have been conducted in accordance with the guidelines set out in the joint publication of the National Health and Medical Research Council of Australia, CSIRO and the Australian Agricultural Council entitled 'Code of Practice for the Care and Use of Animals for Experimental Purposes' (National Health and Medical Research Council: Canberra, 1997). Editors will take account of animal welfare issues and reserve the right not to publish.

[Return to Index](#)

Preparing your manuscript

All authors should read at least one book on scientific writing. The titles of some suitable books are listed at the end of these notes. The work should be presented concisely and clearly in English. Introductory material, including a review of the literature, should not exceed that necessary to indicate the reason for the work and the essential background. However, a short statement explaining the broader relevance of the study can be helpful to readers. Sufficient experimental detail should be given to enable the work to be repeated, and the discussion should focus on the significance of the results. Poorly prepared or unnecessarily lengthy manuscripts have less prospect of being accepted. Authors should note the layout of headings, references, Tables and Figures in the latest issues of the Journal and follow the [Journal style](#). Strict observance of these and the following requirements will shorten the interval between submission and publication.

[Return to Index](#)

Title

The title should be concise and informative and contain all keywords necessary to facilitate retrieval by modern searching techniques. Additional keywords not already contained in the title or abstract may be listed beneath the abstract. A short title of less than 50 letter spaces, to be used as a running head at the top of the printed page, should be supplied. The title, author(s), address(es) and short title should comprise a separate title page.

[Return to Index](#)

Summary text for the Table of Contents

This is a three-sentence paragraph of 50 to 80 words written for interested non-experts, such as journalists, teachers, government workers, etc. The text should be free from scientific jargon, and written at the level of an article in a science magazine. Your first sentence should engage the reader, convincing them that this is an important area. The second sentence should introduce the problem addressed in the paper, and state your main discovery. The final sentence should describe how the results fit into the bigger picture (i.e. implications or impact of the discovery).

[Return to Index](#)

Abstract

The abstract (preferably less than 250 words) should state concisely the scope of the work and the principal findings and should not just recapitulate the results. It should be complete enough for direct use by abstracting services. Acronyms and references should be avoided.

Please suggest 3-6 keywords, noting that all words in the title and abstract are already considered to be keywords. Keyword should list alternative spellings, e.g. defense for defence, aluminum for aluminium etc.

[Return to Index](#)

References

References are cited by the author and date (Harvard system); they are not numbered. All references in the text must be listed at the end of the paper, with the names of authors arranged alphabetically; all entries in this list must correspond to references in the text. In the text, the names of 2 co-authors are linked by 'and'; for 3 or more, the first author's name is followed by 'et al.'. Where more than one reference is cited in the text, they should be listed chronologically. No editorial responsibility can be taken for the accuracy of the references. The titles of papers and the first and last page numbers must be included for all references. Papers that have not been accepted for publication cannot be included in the list of references and must be cited in the text as 'unpublished data' or 'personal communication'; the use of such citations is discouraged. Authors should refer to the latest issues of the Journal for the style used in citing references in books and other literature. Full titles of periodicals must be given.

Examples of common references can be found in the ['Style guide for references'](#).

Use of referencing software. To obtain the style file for this journal, please go to the following websites.

If using 'Reference Manager', visit <http://www.refman.com/support/rmoutputstyles.asp>.

If using 'ProCite', visit <http://www.procite.com/support/pcoutputstyles.asp>.

If using 'EndNote*' software, visit <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>.

*You will find the style file under the 'Agriculture' category, listed as Animal Production Science.

[Return to Index](#)

Units

The SI system of units should be used for exact measurements of physical quantities and, where appropriate, elsewhere. The double solidus must not be used in complex groupings of units (i.e. use mg/sheep.day, not mg/sheep/day or mg sheep⁻¹ day⁻¹). This Journal uses the abbreviation 'L' for litre; 'mL' for millilitre. When using non-standard abbreviations, define the abbreviation where it first occurs in the text.

Spell out numbers lower than 10 unless accompanied by a unit, e.g. 2 mm, 15 mm, two plants, 15 plants, but 2 out of 15 plants. Do not leave a space between a numeral and %, ‰ or °C.

[Return to Index](#)

Mathematical formulae

Formulae should be carefully typed with symbols correctly aligned and adequately spaced. If special symbols must be hand-written, they should be inserted with care and

identified by pencilled notes in the margin. Judicious use should be made of the solidus to avoid 2 mathematical expressions wherever possible and especially in the running text. Each long formula should be displayed on a separate line with at least 1 line of space above and below.

[Return to Index](#)

Tables

Tables must be numbered with Arabic numerals and each must be accompanied by a title. A headnote containing material relevant to the whole Table should start on a new line.

Tables should be arranged with regard to the dimensions of the Journal columns (8 by 21 cm), and the number of columns in the Table should be kept to a minimum. Excessive subdivision of column headings is undesirable and long headings should be avoided by the use of explanatory notes which should be incorporated into the headnote. The first letter, only, of headings should be capitalised.

The symbol of unit of measurement should be placed in parentheses beneath the column heading. The prefixes for units should be chosen to avoid an excessive number of digits in the body of the Table or a scaling factor should be added to the heading. Footnotes should be kept to a minimum and be reserved for specific items in the columns.

Horizontal rules should be inserted only above and below column headings and at the foot of the Table. Vertical rules should not be used. Each Table must be referred to in the text, and the preferred position of the Table in the text should be indicated by a note in the margin.

Short tables can frequently be incorporated into the text as a sentence or as a brief untitled tabulation. Only in exceptional circumstances will the presentation of essentially the same data in both a Table and a Figure be permitted: where adequate, the Figure should be used.

[Return to Index](#)

Figures and computer graphics

Lettering should be in sans-serif type (**Helvetica or Arial type 1 font**) with the first letter of the first word and proper names capitalised. The x-height after reduction should be 1.2-1.3 mm. Thus for the preferred reductions of graphs to 30, 40 or 50% of linear dimensions, the initial x-height of lettering should be 4, 3 or 2.5 mm respectively.

Symbols and grid marks should be the same respective sizes, and curves and axes should then be either 0.8, 0.7 or 0.6 mm thick respectively. Proportionally smaller sizes of type, symbols, grid marks and curve thicknesses should be used for lesser reductions. The following symbols are readily available and should be

used: ■ □ ◆ ◇ ● ○ ▲ △ ▼ ▽ ★ ☆ . The symbols + or × should be avoided.

Explanations of symbols should be given in the caption to the figure, and lettering of graphs should be kept to a minimum. If information is given in a caption instead of a legend describe the lines and symbols in words (e.g. solid lines, dashed lines, dot-and-dash lines, open circles, solid circles, striped bars, cross-hatched bars and so forth).

[Return to Index](#)

Photographs

Photographs must be of the highest quality, with a full range of tones and of good contrast. Before being mounted, photographs must be trimmed squarely to exclude features not relevant to the paper and be separated from neighbouring photographs by uniform spaces that will be 2 mm wide after reduction. Lettering should be in a transfer lettering sans-serif type (**Helvetica font**) and contrast with its background; thus, white lettering should be used on dark backgrounds. The size of lettering should be such that the x-height after reduction is 1.5-12 mm. A scale bar must be inserted on each photomicrograph and electron micrograph. Important features to which attention has been drawn in the text should be indicated (i.e. by coded upper case letters and/or arrows). Colour photographs will be accepted if they are essential, but the cost of production must be borne by the author.

[Return to Index](#)

Statistical evaluation of results

Manuscripts must contain a clear and concise description of the experimental design used; with sufficient detail such that, in the case where analysis of variance or regression models are to be used in the statistical evaluation, the reader is quite clear as to how the error term was estimated. The statistical tests should be briefly described and, if necessary, supported by references. Numbers of individuals, mean values and measures of variability should be stated. It should be made clear whether the standard deviation or the standard error has been given.

[Return to Index](#)

Nomenclature

The nomenclature of compounds such as amino acids, carbohydrates, lipids, steroids and vitamins should follow the recommendations of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Other biologically active compounds, such as metabolic inhibitors, plant growth regulators and buffers should be referred to once by their correct chemical name (which is in accordance with IUPAC Rules of Chemical Nomenclature) and then by their most widely accepted common name. For pesticides, the latest issue of 'Pesticides - Synonyms and Chemical Names' (Australian Government Publishing Service: Canberra) should be followed. Where there is no common name, trade names or letter abbreviations of the chemical may be used. The first letter of a trade name must be capitalised.

[Return to Index](#)

Submission of research manuscripts

To submit your paper, please use our online journal management system [ScholarOne Manuscripts](#), which can be reached directly through this link or from the link on the journal's homepage. If a first-time user, register via the 'Register here' link, or use your existing username and password to log in. Then click on the 'Author Centre' link and proceed.

A covering letter must accompany the submission and should include the name, address, fax and telephone numbers, and email address of the corresponding author. The letter should also contain a statement justifying why the work should be considered for publication in the journal, and that the manuscript has not been published or

simultaneously submitted for publication elsewhere. Suggestions of possible referees are welcome.

[Return to Index](#)

Post acceptance of manuscript

When asked to submit production files, please provide the Production Editor with the original figure files separately from the manuscript, and in highest resolution.

Ensure that figures are in their original file format (i.e. Photoshop, Adobe Illustrator, Excel, CorelDraw, SigmaPlot, etc.) rather than embedded in a Word document or converted to a derived format. However, if your figures are in a format that we do not accept, high-quality high-resolution PostScript or PDF files are acceptable. Sending files in more than one format is fine; we will use the format that will reproduce the best.

Scanned photographs must be saved as .tif files; all supplied .tif files must be compatible with Adobe Photoshop, which is the preferred program. If figures are prepared in a 'paint' program, line art should be saved at 600 dpi, and greyscale or colour images should be saved at 300 dpi. Electronic photographic work should be submitted at the intended print size (85 mm wide for one column and up to a page width of 175 mm) (on CD-ROM if necessary). These will be returned after use if requested at the time of submission.

Colour photographs will be accepted if they are essential but the cost of colour reproduction on the printed copy must be borne by the author. The Production Editor will provide an estimate of the cost with the page proofs. Colour figures must be supplied in CMYK, not RGB, format.

[Return to Index](#)

Proofs and Reprints

Approximately two weeks after the paper is accepted, the corresponding author will receive an edited MSWord document that has undergone formatting and copyediting. Questions from the Production Editor should be answered. Minor corrections can be made at this stage. The paper is then typeset, and page proofs sent to the corresponding author for checking prior to publication. At this stage only essential alterations and correction of typesetting errors may be undertaken. Excessive author alterations will be charged back to the author. Reprint order forms and prices are sent with the proofs and should be returned to the Production Editor with the proofs.

Upon publication, corresponding authors will be sent a free PDF of the paper. You may send copies of this PDF to individual colleagues for non-commercial purposes, print out and distribute copies to colleagues, or include the PDF in a course pack, subject to the usual copyright licensing agency arrangements.

We would also like to send your colleagues an alert to its publication + PDF. Our objectives for such action are to acknowledge authors, and stimulate the use and citations of the paper. This offer will be activated if you send a list of email addresses (i.e. up to 20 colleagues) to the Production Editor. This list will not be used for any other purpose other than to promote your research.

General enquiries, please contact:

Animal Production Science

CSIRO Publishing

Locked Bag 10

Clayton South, Vic. 3169

Australia

Telephone +61 3 9545 8468

Fax +61 3 9545 8578

Email publishing.an@csiro.au

[Return to Index](#)

Style guide for references

Journal article

Hubick KT, Farquhar GD, Shorter R (1986) Correlation between water-use efficiency and carbon isotope discrimination in diverse peanut (*Arachis*) germplasm. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**, 803-816.

Wagner TE (1985) The role of gene transfer in animal agriculture and biotechnology. *Canadian Journal of Animal Science* **65**, 539-552.

Lodge GM, Murphy SR, Harden S (2003a) Effects of grazing and management on herbage mass, persistence, animal production and soil water content of native pastures. 1. A redgrass-wallaby grass pasture, Barraba, North-West Slopes New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **43**, 875-890.

Lodge GM, Murphy SR, Harden S (2003b) Effects of grazing and management on herbage mass, persistence, animal production and soil water content of native pastures. 2. A mixed native pasture, Manilla, North-West Slopes New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **43**, 891-905.

Book chapter

Blackmore DJ (1996) Are rural land practices a threat to the environment? In 'Soil science - raising the profile'. (Ed. N Uren) pp. 22-30. (ASSSI and NZSSS: Melbourne)

Wolanski E, Mazda Y, Ridd P (1992) Mangrove hydrodynamics. In 'Tropical mangrove ecosystems'. (Eds AI Robertson, DM Alongi) pp. 43-62. (American Geophysical Union: Washington DC)

Book

Lucas GB (1963) 'Diseases of tobacco.' (University of North Carolina: Raleigh, NC)

Attiwill PM, Adams MA (Eds) (1996) 'Nutrition of eucalypts.' (CSIRO Publishing: Melbourne)

Hogan B, Beddington R, Constantine F, Lacy E (Eds) (1994) 'Manipulating the mouse embryo - a laboratory manual (2nd edn).' (Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY)

Thesis

Silver MW (1970) 'An experimental approach to the taxonomy of the genus *Enteromorpha* (L.) Link.' PhD thesis, University of Liverpool, UK.

Harrison AJ (1961) 'Annual reproductive cycles in the Tasmanian scallop *Notovola meridionalis*.' BSc (Hons) thesis, The University of Tasmania, Australia.

Report or Bulletin

Lea HW (1957) Report on a visit to the USA and Canada, April 1 to October 2, 1957.

NSW Department of Agriculture, Orange, NSW.

Chippendale GM, Wolf L (1981) The natural distribution of Eucalyptus in Australia. Australian National Parks and Wildlife Service, Special Publication No. 6, Canberra.

Australian Bureau of Statistics (2000) Australian Demographic Statistics, March Quarter 2000. Cat. No. 3101.0 (ABS: Canberra)

Commonwealth of Australia (1999) National Greenhouse Response Strategy. (AGPS: Canberra)

Conference Proceedings

Hayman PT, Collett IJ (1996) Estimating soil water: to kick, to stick, to core or computer? In 'Proceedings of the 8th Australian agronomy conference'. (Ed. M Asghar) p. 664. (The Australian Society of Agronomy Inc.: Toowoomba, Qld)

Kawasu T, Doi K, Ohta T, Shinohara Y, Ito K (1990) Transformation of eucalypts (*Eucalyptus saligna*) using electroporation. In 'Proceedings of the VIIth international congress on plant tissue and cell culture'. pp. 64-68. (Amsterdam IAPTC: Amsterdam)

Simpson RJ, Bond WJ, Cresswell HP, Paydar Z, Clark SG, Moore AD, Alcock DJ, Donnelly JR, Freer M, Keating BA, Huth NI, Snow VO (1998) A strategic assessment of sustainability of grazed pasture systems in terms of their water balance. In 'Proceedings of the 9th Australian agronomy conference'. (Eds DL Michalk, JE Pratley) pp. 239-242. (The Australian Agronomy Society Inc.: Melbourne)

Online sources

Give the author, year and title and then give further information as for a chapter or journal article, but adding the essential on-line address URL and the date the information was posted or accessed (or when the address was last verified).

De Vries FP, Jansen M, Metslaar K (1995) Newsletter of agro-ecosystems modelling [Online]. November edition. Available by e-mail Listserv (camase-1@hern.nic.surfnet.nl) or Web link to gopher archives (<http://www.bib.wau.nl/camase/cam-news.html>) (verified 1 November 1996)

Downing MD, Langseth R, Stoffel R, Kroll T (1996) Large-scale hybrid poplar production economics: 1995 Alexandria Minnesota, establishment cost and management [Online]. In: 'Bioenergy 1996'. Proceedings of the 7th national bioenergy conference in Nashville, TN. 15-20 September, 1996. Available at <http://www.esd.ornl.gov/bfdp/papers/bioen96/downing.html>. (posted 10 December 1996; verified 24 November 1998)

National Agricultural Statistics Service (1997) Crops country salinity data [Online]. Available at: <http://usda.mannlib.cornell.edu/data-sets/crops/9X100> (verified 30 November 1998)

University of California (1996) Tomato pest management guidelines. University of California Pest Management Guidelines, Publication 154. [Online] (Available on-line with updates at <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/selectnewpest.tomatoes.html>) (verified 30 November 1998)

[Return to Index](#)