VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE SIMULAÇÃO RUMINAL (RUSITEC) E SEU USO
PARA ESTUDO DE MANIPULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO

HUMBERTO MACIEL FRANÇA MADEIRA

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando Machado

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Ciência Animal e
Pastagens

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Agosto - 1992

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Madeira, Humberto Maciel França

M181v Validação da técnica de simulação ruminal (RUSITEC) e
seu uso para estudo de manipulação da fermentação. Pira-
cicaba, 1992.
105p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Dieta para ruminante - Fermentação - Efeito do lase-
locida 2. Rumen - Fermentação - Manipulação 3. Simulação
ruminal - Técnica (RUSITEC) I. Escola Superior de Agricul-
tura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 636.2085

VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE SIMULAÇÃO RUMINAL (RUSITEC) E SEU USO
PARA ESTUDO DE MANIPULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO

HUMBERTO MACIEL FRANÇA MADEIRA

Aprovada em 28.09.92

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Henrique Vianna de Amorim ESALQ/USP

Prof. Dr. Wilson Roberto Soares Mattos ESALQ/USP

Prof. Dr. Paulo Fernando Machado ESALQ/USP

Prof. Dr. Paulo Fernando Machado
Orientador

"...para que sejam reconfortados os seus corações e estreitamente unidos no amor. Que eles sejam enriquecidos com uma convicção plena da inteligência e conheçam o mistério de Deus, Cristo, em quem estão escondidos todos os tesouros da sabedoria e da ciência" **Colossenses 2, 2-3.**

Aos meus pais, Rosalvo e Maria de Lourdes,
e aos seus 15 filhos, frutos de seu amor,

D E D I C O

A Maria Luisa, pelo carinho e incentivo,

O F E R E Ç O

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Fernando Machado pela assistência permanente durante minha iniciação científica e pela orientação inestimável durante o curso de mestrado.

Aos professores Raul Dantas D'Arce e Raul Machado Neto pelo incentivo, colaboração e amizade.

Ao Engº Agrº Fernando Basile de Castro, grande responsável pelo despertar de minha vocação científica.

As estagiárias Laura Maria Vieira da Silva e Jane Marin Alonso Perez pela colaboração na condução do experimento.

Aos professores Maria Cristina Stolf Nogueira e Irineu Umberto Packer pelo auxílio na análise estatística.

Ao Departamento de Zoologia da ESALQ/USP, pelo oferecimento de condições laboratoriais para condução do experimento.

A FINEP e à International Foundation for Science pelo financiamento do projeto RUSITEC.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudo.

A FAPESP pela concessão de bolsa de estudo complementar.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO	ix
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Sistema de Fermentação Contínua <i>in vitro</i>	3
2.1.1. Histórico	3
2.1.2. Técnica de Simulação Ruminal (RUSITEC)	15
2.2. Ionóforos	23
2.2.1. Modos de Ação	23
2.2.2. Estudos com ionóforos <i>in vitro</i>	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Local	30
3.2. Material	30
3.2.1. Aparelho de Fermentação Contínua	30
3.2.2. Animais Doadores	33
3.2.3. Dieta dos Fermentadores e Sacos de Incubação.	33
3.2.4. Saliva Artificial	35
3.3. Métodos Experimentais	37

3.3.1. Tratamentos	37
3.3.2. Delineamento Experimento	37
3.3.3. Estabelecimento das Culturas nos Fermentadores e Trocas Diárias	38
3.3.4. Coleta de Efluente	39
3.4. Métodos Analíticos	40
3.4.1. Análises Químico-bromatológicas.....	40
3.4.2. Determinação de pH	41
3.4.3. Volume do Efluente	41
3.4.4. Determinação de N-NH ₃	41
3.4.5. Determinação de AGV	42
3.4.6. Determinação de Degradabilidade <i>in situ</i>	43
3.4.7. Contagem de protozoários	43
3.5. Análise Estatística	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Composição Bromatológica da Dieta Base	45
4.2. Validação do RUSITEC	46
4.3. Resultados das Variáveis Ruminais - Efeito dos Tratamentos	56
4.3.1. Resultados de pH	56
4.3.2. Resultados de Nitrogênio Amoniacal (NH ₃).....	63
4.3.3. Resultados de Degradação <i>in situ</i> da fração insolúvel da matéria seca (DISI).....	67
4.3.4. Resultados de Produção de AGV	71

4.3.5 Resultados de Contagem de Protozoários	85
5. CONCLUSÕES	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1:	As partes principais do aparelho de fermentação contínua.....	7
Figura 2:	Esquema de um fermentador do RUSITEC.....	17
Figura 3:	Representação esquemática do RUSITEC e um diagrama de fluxo para ilustrar o modelo de três compartimentos do sistema.....	18
Figura 4:	Vista geral do RUSITEC e acessórios.....	31
Figura 5:	Vista de um fermentador e suas partes.....	32
Figura 6:	pH dos frascos controle (T1 a T4).....	56
Figura 7:	Produção de nitrogênio amoniacal dos frascos controle (T1 a T4).....	57
Figura 8:	Degradabilidade <i>in situ</i> dos frascos controle (T1 a T4).....	58
Figura 9:	Relação C ₂ /C ₃ dos frascos controle (T1 a T4)...	59
Figura 10:	pH medio dos frascos nas duas fases.....	60
Figura 11:	Concentração média (mg/dia) de nitrogênio amoniacal dos frascos nas duas fases.....	64
Figura 12:	Degradabilidade <i>in situ</i> média dos frascos nas duas fases.....	68
Figura 13:	Produção média (nM/dia) de ácido acético dos frascos nas duas fases.....	71
Figura 14:	Produção (mM/dia) de ácido butírico dos frascos nas duas fases.....	75
Figura 15:	Produção média (mM/dia) de ácido propiônico dos frascos nas duas fases.....	77
Figura 16:	Produção total (mM/dia) de ácidos graxos voláteis dos frascos nas duas fases.....	80
Figura 17:	Relação acético/propiônico média dos frascos nas duas fases.....	82
Figura 18:	Contagem de protozoários (un./ml) dos frascos nas duas fases.....	86

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1:	Uso da Técnica de Simulação Ruminal para diferentes fins e em diferentes locais.....	19
Tabela 2:	Dieta dos fermentadores (g de MS/dia).....	35
Tabela 3:	Composição química da saliva artificial.....	36
Tabela 4:	Composição química dos alimentos (%).....	46
Tabela 5:	Resultados das variáveis tomadas no Frasco 1...	49
Tabela 6:	Resultados das variáveis tomadas no Frasco 2...	50
Tabela 7:	Resultados das variáveis tomadas no Frasco 3...	51
Tabela 8:	Resultados das variáveis tomadas no Frasco 4...	52
Tabela 9:	Quadro de análise de variância do pH.....	55
Tabela 10:	Quadrados médios para efeito de tratamento sobre a variável pH.....	60
Tabela 11:	Quadro de análise de variância do NH ₃	62
Tabela 12:	Quadro de análise de variância da DISI.....	65
Tabela 13:	Quadrados médios para efeito de tratamento sobre a variável DISI.....	66
Tabela 14:	Quadro de análise de variância de C ₂	69
Tabela 15:	Quadro de análise de variância de C ₄	71
Tabela 16:	Quadrados médios para efeito de tratamento sobre a variável C ₂	72
Tabela 17:	Quadrados médios para efeito de tratamento sobre a variável C ₄	73
Tabela 18:	Quadro de análise de variância de C ₃	75
Tabela 19:	Quadrados médios para efeito de tratamento sobre a variável C ₃	75
Tabela 20:	Quadro de análise de variância do AGV total....	77
Tabela 21:	Quadrados médios para efeito de tratamento sobre a variável Total de AGV.....	78
Tabela 22:	Quadro de análise de variância de C ₂ /C ₃	80
Tabela 23:	Quadrados médios para efeito de tratamento sobre a variável C ₂ /C ₃	80
Tabela 24:	Quadro de análise de variância da contagem total de protozoários.....	83

LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

	Página
Tabela 1. Coeficientes de correlação entre as variáveis tomadas no frasco 1.....	98.
Tabela 2. Coeficientes de correlação entre as variáveis tomadas no frasco 2.....	99.
Tabela 3. Coeficientes de correlação entre as variáveis tomadas no frasco 3.....	100.
Tabela 4. Coeficientes de correlação entre as variáveis tomadas no frasco 4.....	101.
Tabela 5. Volume diário de saliva infundida (ml) nos fermentadores.....	102.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RUSITEC	- Técnica de Simulação Ruminal
T	- tratamento
BAH	- bagaço auto-hidrolisado
MM	- mistura mineral
NH ₃	- nitrogênio amoniacal
AGV	- ácidos graxos voláteis
C ₂	- ácido acético
C ₃	- ácido propiônico
C ₄	- ácido butírico
Total	- produção total de AGV
DISI	- digestibilidade <i>in situ</i> da matéria seca
Prot.	- contagem de protozoários
MS	- matéria seca
EE	- extrato etéreo
FB	- fibra bruta
CZ	- cinza bruta
PB	- proteína bruta
ADF	- ácido detergente fibra
NDF	- neutro detergente fibra

VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE SIMULAÇÃO RUMINAL (RUSITEC) E SEU USO PARA ESTUDO DA MANIPULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO

Autor: Humberto Maciel França Madeira

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando Machado

RESUMO

Um estudo de validação da Técnica de Simulação Ruminal, bem como da sua utilização para manipulação da fermentação ruminal, foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zoologia da ESALQ/USP, em Piracicaba, S.P.

Um sistema de fermentação contínua contendo quatro fermentadores foi utilizado. A eles foi fornecida diariamente, por 6 dias, uma dieta única contendo (100% MS) 5,95 g de bagaço de cana-de-açúcar auto-hidrolisado, 2,94 g de farelo de algodão, 2,03 g de grão de sorgo moído, 0,30 g de mistura mineral e 0,11 g de uréia. Esta dieta era incubada nos os fermentadores dentro de sacolas de nylon. Este período pré-tratamento foi chamado de Fase I. Após este período, os fermentadores passaram a receber 3 doses do ionóforo lasalocida, fornecido junto à mistura mineral, nas

quantidades de 1,5 $\mu\text{g/ml}$, 3,0 $\mu\text{g/ml}$ e 6,0 $\mu\text{g/ml}$, aos frascos 2, 3 e 4, respectivamente. O frasco 1 foi mantido como controle. O período em que os fermentadores receberam ionóforo foi de 9 dias, sendo este chamado de Fase II. Após esta o aparelho foi desmontado. Durante todo o período experimental (fases I e II) foi infundida continuamente saliva artificial, contendo tampões, na quantidade suficiente para promover a renovação de um volume de fermentador (850 ml) por dia, com uso de uma bomba peristáltica.

Durante as duas fases foram medidas as seguintes variáveis: pH, produção de nitrogênio amoniacal (NH_3), contagem de protozoários, produção individual dos ácidos acético (C_2), propiônico (C_3) e butírico (C_4), produção total de AGV e proporção de ácido acético/propiônico (C_2/C_3). Estas variáveis foram tomadas a partir de análises do fluido efluente diário dos fermentadores. A partir do resíduo de digestão da dieta contido em sacola de náilon, após 48 horas, foi tomada a variável degradação *in situ* da fração insolúvel da matéria seca da dieta (DISI). O volume de saliva infundido (VS) foi medido indiretamente pelo volume de efluente obtido para cada fermentador, diariamente.

A primeira parte do estudo, aquela de validação do sistema RUSITEC, consistiu da análise dos resultados das

variáveis no período pré-tratamento (6 dias), bem como os relativos a segunda fase para o frasco controle (frasco 1). Uma vez que os resultados se mostraram semelhantes entre si, bem como semelhantes àqueles contidos em literatura, obtidos com animais recebendo dietas semelhantes, principalmente com relação as variáveis pH, degradação da matéria seca e relação acético/propiónico, o sistema foi considerado validado.

O estudo de manipulação da fermentação pela adição do ionóforo lasalocida foi feito sobre os dados da fase II, onde o fermentadores receberam 3 doses de lasalocida. Para a análise estatística dos dados, feita confrontando-se os valores das variáveis dois a dois entre fermentadores, se utilizou o procedimento GLM do programa SAS (1985), por meio de análise de variância por mínimos quadrados. Devida a alta correlação entre os valores de VS e as demais variáveis, esta entrou no modelo como covariável. A inesperada variação no VS foi causada por problemas no funcionamento da bomba peristáltica.

A adição de lasalocida aos fermentadores promoveu alteração no pH somente em um fermentador, porém devido ao pequeno volume de saliva proporcionado àquele frasco. Não houve efeito também sobre a variável NH_3 ($p=0,12$), porém havendo uma tendência de aumento do nível de NH_3 com aumento

da dose. Para a variável DISI se observou um acentuado efeito da adição do ionóforo ($p=0,0001$), diminuindo a degradação com o aumento da dose. A diferença entre o frasco controle e a maior dosagem atingiu 27% (61,54% e 45,23%, respectivamente). O fornecimento de ionóforo promoveu também um decréscimo crescente na produção de C₂ e C₄, concomitante ao aumento da dose ($p=0,0001$). Um aumento na produção de C₃ também ocorreu ($p=0,0001$), porém não em quantidade suficiente para, em termos de número de moles totais, compensar a queda no C₂ e C₄, de forma que a variável Total foi significativamente diferente entre o controle e os tratamentos ($p=0,0001$), sendo os valores de 44,48 mmoles, 36,18 mmoles, 35,03 mmoles e 32,94 mmoles, para o frasco controle, dose 1, dose 2 e dose 3, respectivamente. Houve diferença também entre os valores de C₂/C₃ do controle e dos frascos tratados ($p=0,0001$), sendo os mesmos de 2,33, 1,31, 1,12 e 1,03. Os valores de contagem de protozoários não sofreram efeito de tratamento ($p=0,11$), porém houve diferença entre períodos, considerando os quatro frascos em conjunto (1^{os} 6 dias vs. últimos 9 dias). O que se observou foi uma diminuição da ordem de três vezes (12×10^3 para 5×10^3).

A análise em conjunto destes dados mostram que os efeitos da adição de lasalocida à fermentações conduzidas no

RUSITEC são semelhantes àquelas obtidas *in vivo*, vindo a reforçar a validação do sistema, sendo ele uma interessante ferramenta para estudos de fermentação ruminal.

**THE RUMEN SIMULATION TECHNIQUE (RUSITEC) VALIDATION AND ITS
USE FOR A STUDY ON MANIPULATION OF FERMENTATION**

Author: Humberto Maciel França Madeira

Advisor: Paulo Fernando Machado, PhD

SUMMARY

To validate the Rumen Simulation Technique (RUSITEC) as well as to test its use for the manipulation of fermentation a study was conducted at the Laboratório de Nutrição Animal, Departamento de Zoologia, ESALQ/USP, in Piracicaba, state of São Paulo, Brazil.

A four-vessel continuous fermentation apparatus was used. Each fermentor was fed the same diet consisting of 5.95 g steam-treated sugarcane bagasse, 2.54 g cottonseed meal, 2.03 g sorghum grain, 0.30 g mineral mixture and 0.11 urea, dry-matter basis. The diet was incubated daily in the vessels for a 48 h period, for 6 days. On the 7th day, 3 increasing doses of lasalocid (1.5 µg/ml, 3.0 µg/ml and 6.0 µg/ml) were added to the mineral mixture of three vessels and the remaining was kept as control. The ionophore was added daily

for 9 days. During the entire experimental period artificial saliva was infused continuously by a peristaltic pump into the fermentors (0.85 l each), with a dilution rate of 1/day.

The effluent aliquots were analyzed for pH, ammonia-N (NH_3), acetic acid (C_2), propionic acid (C_3), butyric acid (C_4), total VFA (Total), C_2/C_3 ratio and total protozoa.

The substrate residue was analyzed for *in situ* dry-matter disappearance (DISI). The saliva volume (VS) was measured indirectly from effluent total volume, for each vessel.

The first part of the study or the validation phase consisted of the analyses of data collected for the first 6 days from the 4 fermentors as well as those collected from the control vessel during the second period. Since the data collected were similar among treatments and to those obtained *in vivo* reported in the literature, the technique was considered validated.

The manipulation of fermentation study by the use of the ionophore lasalocid consisted of the analyses of data collected for the last 9 days when 3 doses were added to fermentors. For the statistical analysis, with the use of mean confrontation 2 by 2 for all variables, the SAS

(1985) GLM procedure was used. Due to the high correlation values between VS and other variables, VS was included in the model as a covariate. The VS unexpected variation was caused by mechanical problems of the peristaltic pump.

Lasalocid addition to fermentors promoted a pH change in one fermentor only but it was due to the low saliva volume infused into that vessel. There was no effect upon the NH_3 variable (0.12), although a tendency of increase in its value occurred with increasing doses. For the variable DISI, it was observed a large effect of ionophore addition ($p=0.0001$), i.e., a linear decrease in degradation with increasing doses. The difference between the control fermentor and that with the highest dose was 27% (61.54% and 45.23%, respectively). The use of lasalocid also promoted a decrease in C_2 and C_4 production concomitant to dose increasement ($p=0.0001$). An increase in C_3 production was also observed ($p=0.0001$) but it did not offset the decrease in C_2 and C_4 , when results were expressed as total number of moles. This fact led to a marked difference ($p=0.0001$) among the control Total value and treatment values. (44.48 mmoles, 36.18 mmoles, 35.03 mmoles and 32.94 mmoles for control, dose 1, dose 2 and dose 3 vessels, respectively. There was also a difference between C_2/C_3 means for control and treatment vessels ($p=0.0001$)

(2.33, 1.31, 1.12 and 1.03). Protozoal total count was not affected by lasalocid addition ($p=0.11$), but there was a difference between periods when the four vessels were taken together (first 6 days compared with last 9 days). A three-fold decrease was observed: 12×10^3 for the validation period and 5×10^3 for the treatment period.

A global analysis of data shows that the effects of lasalocid addition to RUSITEC fermentors are similar to those obtained *in vivo*, reinforcing its validation and making it a powerful tool for rumen fermentation studies.

1. INTRODUÇÃO

Os ruminantes têm tido papel fundamental na produção agropecuária no decorrer da história, proporcionando à humanidade carne, leite, roupas e energia para trabalho. A adaptabilidade desses animais a diferentes climas e diferentes dietas é a principal causa da sua utilização de forma tão maciça e universal.

O aspecto peculiar de digestão de tecido vegetal de forma tão eficiente, através da simbiose com microrganismos do rúmen, os torna particularmente importantes. Vencendo a inabilidade enzimática dos mamíferos em digerir ligações β -1,4 de glicose, a associação dos animais ruminantes com a flora ruminal os permite utilizar aquele que é o mais abundante componente orgânico do planeta, a celulose.

A identificação desses microrganismos se iniciou em 1843, inicialmente com protozoários, e desde então os estudos de microbiologia do rúmen se desenvolveram bastante, até que em 1948 foram identificadas espécies de bactérias celulolíticas. Paralelo a esses acontecimentos,

o cultivo de microrganismos *in vitro* foram se desenvolvendo, de forma que na década de 50, principalmente devido ao trabalho inestimável de Robert E. Hungate, estas técnicas estavam dominadas.

A colaboração para a nutrição de ruminantes que a manipulação *in vitro* desses microrganismos tem trazido é muito grande. A quantificação da degradação dos diversos constituintes da dieta dos ruminantes pelas principais espécies presentes no rúmen é uma realidade. Um grande salto foi dado quando se iniciaram os estudos com sistemas *in vitro* de fermentação contínua, onde então foi possível a manutenção de uma população mista e por tempo indeterminado.

Diversos sistemas contínuos foram desenvolvidos, e aquele de particular interesse nesse trabalho, a Técnica de Simulação Ruminal (RUSITEC), vem hoje tendo uso bastante difundido, trazendo a sua colaboração para a melhor compreensão do complexo ecossistema ruminal.

Os objetivos do presente trabalho foram: 1) validar a Técnica de Simulação Ruminal para estudos de manipulação da fermentação e 2) estudar o efeito de diferentes doses do ionóforo lasalocida sobre a fermentação de dieta a base de bagaço de cana-de-açúcar auto-hidrolisado, suplementada com farelo de algodão, utilizando-se o RUSITEC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sistemas de fermentação contínua *in vitro*

2.1.1. Histórico

A utilização de sistemas *in vitro*, visando reproduzir eventos que ocorrem no rúmen, vem sendo feita há algumas décadas. Em virtude da elevada complexidade do ecossistema ruminal, a sua redução a sistemas de laboratório que mantenham as características originais de fermentação, do material retirado do rúmen, é de elevada utilidade.

Em trabalho pioneiro, PEARSON & SMITH (1943), estudando o metabolismo de uréia no rúmen, incubaram conteúdo ruminal em meio com uréia, amido, KH_2PO_4 e sulfato de ferro, e a população se manteve, quando observada microscopicamente, similar à original por até 4 horas de incubação, sem que tivesse sido tomado maiores cuidados referentes à anaerobiose.

Desde então refinamentos da técnica *in vitro* foram sendo feitos. Ainda na década de 40 se desenvolviam esforços dos microbiologistas em geral a fim de definir

teorias e equações que regessem a cinética de fermentação de sistemas contínuos. Em trabalho de grande repercussão, MONOD (1950), intitulado "La Technique de Culture Continue: Théorie et Applications", lança as bases teóricas do uso de sistema contínuo de fermentação, em condição de equilíbrio dinâmico. Nesta condição o crescimento microbiano ocorre numa taxa constante, bem como uma composição do meio constante. O uso, entretanto dessa técnica foi restrito, principalmente em virtude de críticas de vários pesquisadores, nos primeiros anos subseqüentes. HERBERT *et alii* (1956), testaram a validade do tratamento teórico de Monod, confirmando as equações por ele estabelecidas. Por estas equações, é possível calcular (predizer) a concentração de microrganismos e substrato no meio, em condição equilíbrio dinâmico bem como predizer as variações desses parâmetros quando se promove modificações do meio, como concentração e taxa de diluição (MONOD, 1950).

O tratamento então definido neste trabalho pioneiro ainda hoje é utilizado, apesar do fato que os estudos com cultura contínua, mais recentemente, têm se preocupado com condições de oscilação e modificações transitórias sobre o equilíbrio dinâmico (HARRISON & TOPIWALA, 1974).

A primeira utilização de um sistema contínuo para cultura de bactérias do rúmen foi realizado por LOUW *et alii* (1949). Por questionar a validade de trabalhos em

recipientes fechados feito por outros autores, principalmente no que se refere a remoção dos produtos finais de fermentação não gasosa, este autor sugere a presença de um saco de diálise. Este saco semipermeável, contendo o inóculo e o alimento, é mantido submerso dentro de um recipiente de vidro maior, com água a 39°C, com a qual faz as trocas osmóticas.

O saco semipermeável é provido por uma entrada de solução tampão, bem como uma saída para o fluido do fermentador, a fim de se analisar o pH. Paralelamente, tubos de entrada e saída de gases também se encontram presentes.

Apesar da simplicidade de construção, a manipulação desse fermentador era difícil, exigindo controle do pH a cada 2 horas e agitação do fluido a cada 1/2 a 1 hora. O trabalho foi feito a fim de se medir a degradação de celulose (papel de filtro) neste fermentador, quando comparado a um sistema sem o saco semipermeável, ou seja, sem que houvesse remoção contínua dos produtos de fermentação não gasosos. Os dados mostraram que o sistema semipermeável promoveu um aumento de até 80% na digestão de celulose. Este trabalho, desenvolvido na Cornell University, não apresenta infusão contínua de tampão, de forma que a duração da incubação fica determinada em função da capacidade do banho-maria realizar as trocas osmóticas. Assim sendo, as incubações realizadas não ultrapassaram 24 horas.

O uso desse tipo de sistema, com a presença de uma membrana de diálise teve então o uso difundido, conforme

pode-se observar nos trabalhos subsequentes de HUHTANEN & GALL (1952) e WASSERMAN *et alii* (1952). Aliado ao uso do saco semipermeável, outra técnica descrita anteriormente colaborou sobremaneira para os estudos de fermentação ruminal *in vitro*. Esta técnica foi a de preparo de saliva artificial com composição semelhante àquela dos ruminantes, conforme trabalho original de McDOUGALL (1948).

Entretanto, no uso de sistemas *in vitro* não havia qualquer padronização, principalmente referente aos critérios de estabelecimento de validade dos estudos. WARNER (1956) então descreve aqueles que seriam os critérios necessários para esta validação, de forma que a grande maioria dos trabalhos posteriores, de diferentes autores, utilizou estes critérios. A colaboração ao desenvolvimento das técnicas *in vitro*, trazida por essa padronização, foi preciosa. Os principais critérios de Warner são: a) manutenção da quantidade e aparência normais das bactérias e protozoários; b) manutenção de taxas normais de digestão de celulose, amido e proteína, e as interações normais entre essas taxas; e c) a habilidade de previsões quantitativas de resultados *in vivo*. Porém, o autor sugere que o uso de mais critérios é sempre desejável.

O aparelho de cultura contínua proposto por Monod, bem como aquele de Herbert e colaboradores, onde a adição e remoção contínua de meio eram proporcionadas, foi utilizado para fermentação ruminal inicialmente por ADLER *et*

alii (1958), conforme pode ser visto na Figura 1, aparelho do tipo quimiostático.

Figura 1 - As partes principais do aparelho de fermentação contínua. A) Câmara de fermentação B) Termômetro de contato C) Manto de aquecimento D) Termostato E) Ventilador elétrico F) Agitador G) Gyco - Piro - Tran (Transformador) H) Imã I) Frasco de nutrientes J) Agitador K) grampo magnético L) e M) Reguladores de pressão

FONTE: ADLER *et alii*, 1958 - Cornell Vet. Vol 48(1):53

Este tipo de aparelho apresenta as características básicas de controle até hoje presentes em qualquer sistema de fermentação contínua, apenas tendo substituição por aparelhos mais sofisticados, mas que proporcionam os mesmos controles. Neste trabalho os autores fizeram diversas incubações, cada uma de 10 horas, com intuito de estudar a taxa de crescimento médio da população mista do rúmen incubada, tendo a proteína como substrato limitante. Os resultados mostraram claramente um aumento da taxa de crescimento dos microrganismos com aumento da taxa de diluição. O crescimento microbiano foi estimado a partir de determinações de nitrogênio do fluido efluente do sistema.

Um aparelho bastante semelhante foi utilizado por BOWIE (1962), que sugere que os microrganismos do rúmen predominantemente estão na fase exponencial de crescimento. Assim sendo, segundo o autor, os sistemas *in vitro* contínuos devem simular com maior precisão o ecossistema ruminal. Dados mais recentes, entretanto, indicam para o rúmen uma situação de crescimento dentro de uma fase de desaceleração, entre as fases exponencial e estacionária (BERGEN *et alii*, 1982), representada por valores de taxa de crescimento específico médio no rúmen de 6%/h. Em seu trabalho, Bowie mantém a fermentação por 8 horas.

Uma evolução significativa ao estudo de culturas contínuas foi apresentada no trabalho de RUFENER *et alii* (1963), onde foi utilizado um equipamento de fermentação

múltipla, com seis fermentadores sendo operados simultaneamente. Ainda é utilizado o saco de diálise, apesar de haver fluxo contínuo de saliva que proporcionava a renovação de 1,43 volumes por dia. Tanto para a adição de substrato como de saliva foram calculados com base nos valores médios equivalentes a um bovino adulto de 500 kg, com volume ruminal de 70 litros. Os resultados do trabalho, quando foram utilizados diferentes níveis de alimentação e diferentes proporções de forragem e grãos, foram bastante consistentes. O experimento teve duração de 8 dias e critérios como produção de ácidos graxos voláteis (AGV), gases (CO₂ e metano), tamanho da população microbiana e degradação de celulose, se apresentaram similares às condições *in vivo*. Um detalhe importante é que havia adição de substrato (feno e concentrado) na forma moída ou diretamente aos fermentadores, a cada 10 horas.

Este mesmo grupo de pesquisadores da University of Illinois promoveram alterações no aparelho, conforme trabalho de SLYTER *et alii* (1964). Principalmente no que se refere aos fermentadores propriamente ditos, que foram modificados de uma garrafa plástica para um recipiente de vidro com 4 entradas, estes se tornaram de manipulação mais fácil. No seu experimento de validação foi utilizada apenas uma dieta (3,2:1 / feno de alfafa:concentrado) em três fermentadores. A taxa de produção de AGVs, principal critério utilizado se mostrou igual nos três fermentadores.

Um dado importante, também observado no trabalho de RUFENER *et alii* (1963), foi o decréscimo na população de protozoários na ordem de 100 (cem) vezes. O aparelho foi mantido com fermentações adequadas por 21 dias, de forma que os autores concluem que se pode obter funcionamento "normal" do sistema, por quanto tempo se desejar. Em virtude da estabilização da população de protozoários e da taxa de produção de AGVs em 4 dias, este é o tempo sugerido como aquele para obtenção do "steady-state". Convém lembrar que a taxa de renovação foi de 1,5 vezes/dia.

Um sistema contínuo bastante complexo em sua construção é apresentado por HOBSON (1965a), onde está presente apenas um fermentador de 120 ml de capacidade. Um aspecto interessante desse aparelho é a ausência de saco de diálise, tendo a remoção de produtos sendo feita apenas por diluição do meio. Outro aspecto importante é que todo aparelho é sujeito a esterilização em autoclave, além de elevada garantia de anaerobiose. Um aparelho dessa complexidade é necessário quando se pretende estudar culturas puras anaeróbias, o que é feito no trabalho subsequente deste autor (HOBSON, 1965b). Neste trabalho foi estudada a taxa de crescimento de 3 espécies (*Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium* e uma espécie lipolítica), em função de diferentes taxas de diluição. Os resultados mostraram que é possível se cultivar espécies ruminais em culturas contínuas por períodos prolongados. Com o aumento da taxa de diluição,

para as três espécies, foi observado um aumento na taxa de crescimento específico, até que se atingisse a diluição de "wash-out", confirmando as proposições teóricas de MONOD (1950) e HERBERT *et alii* (1956). Pelos dados obtidos, o autor ainda sugere que o valor de Y_{ATP} (gramas de células/mol de ATP fermentado) é variável entre espécies e dentro de cada espécie, conforme a taxa de crescimento. Assim sendo, o estudo com culturas intermitentes não se mostra adequado para estimativas precisas de Y_{ATP} (HOBSON, 1965b).

Em trabalho apresentado na 54th Meeting of the American Society of Animal Science, JOHNSON (1966) faz extensa revisão sobre as técnicas *in vitro* de fermentação ruminal. Neste trabalho o autor destaca a elevada colaboração dessas técnicas na compreensão do funcionamento do rúmen, bem como suas limitações. O uso do termo "rúmen artificial", feito deliberadamente por diversos pesquisadores é criticado, uma vez que apenas alguns aspectos do ecossistema ruminal são transferidos para o sistema *in vitro*. Porém, simular todas as condições reinantes *in vivo* exatamente não é interessante, pois é a simplificação do sistema ruminal que permite na prática se atingir os objetivos desejados. Um aparelho que simulasse com precisão o rúmen, com a tecnologia hoje disponível, se tornaria de manipulação muito difícil, quem sabe impossível. Sete diferentes usos de sistemas *in vitro* são sugeridos: 1) estudos de digestão de celulose; 2) utilização de nitrogênio

não protéico; 3) metabolismo intermediário, para culturas puras e mistas; 4) estudos de simbiose entre microrganismos; 5) estudo de taxas em situações não "steady-state"; 6) efeito de drogas e aditivos; 7) avaliação de forragens.

Dando continuidade aos estudos de crescimento de culturas puras, HOBSON & SUMMERS (1967), fizeram modificações ao aparelho original, permitindo medição instantânea de pH e potencial de oxi-redução (Eh). Foram cultivadas então duas espécies bacterianas, Bacteroides amylophilus e uma espécie lipolítica identificada com 5S. Os resultados novamente levaram os autores a destacar a variação na taxa de crescimento, bem como o Y_{ATP}, com a variação na proporção de energia para manutenção das bactérias, sendo maior em menores taxas de diluição (HOBSONS & SUMMERS, 1967).

Até meados da década de 60, portanto, os aparelhos de cultura contínua eram basicamente do tipo quimiostático, com adição do substrato direto ao fermentador ou diluído na saliva infundente. Uma modificação interessante foi proposta por AAFJES & NIJHOF (1967), onde o alimento é incubado 2 vezes por dia no fermentador dentro de um saco de nylon, de forma a permitir a quantificação da degradação de matéria seca. Apesar da simplicidade do aparelho, que não permitia duplicatas, pois era constituído de um único fermentador, a análise dos resultados indicou que o mesmo funcionou adequadamente, mantendo uma população similar a original. Entretanto, os resultados de proporção

entre os ácidos graxos produzidos, bem como a degradação final do alimento (feno) incubado por 48h, se mostraram diferentes daqueles obtidos com um animal nas diferentes condições. A saber, a proporção de acético no fermentador foi menor, bem como a degradação total do alimento. Apesar dessas diferenças a colaboração que este trabalho trouxe foi no sentido de mostrar que, para estudos com populações mistas, aparelhos de relativa simplicidade podem ser usados.

A dificuldade de manutenção da população de protozoários nos níveis iniciais, quando da incubação, levou ABE & KUMENO (1973) a desenvolverem um aparelho quimiostático, semelhante àquele de SLYTER *et alii* (1964), cujas modificações principais foram feitas no sistema de diálise, sendo o saco semipermeável substituído por um sistema de oito tubos com membrana permeável ligados a um tanque com solução de diálise. O bombeamento contínuo da solução promove a remoção contínua dos produtos de fermentação. Os dados obtidos com o uso desse sistema, quando comparados àqueles obtidos sem o sistema de diálise, mostraram boa manutenção na população de protozoários, principalmente quando a taxa de diluição era menor (0,5 volumes/dia vs. 1,2 volumes/dia). Porém, mesmo nesta condição (com diálise, com 0,5 de "turn-over"), a população de protozoários Holotricha diminuiu a 1/3 após 4 dias.

ISAACSON *et alii* (1975) utilizaram um quimiostático com a finalidade de definir o efeito de taxas

de diluição crescentes sobre a eficiência de utilização de energia por uma população mista, retirada do rúmen. Este trabalho clássico teve como resultados principais um aumento de 100% no Y_{GLU} (gramas de células produzidas por mol de glicose fermentada) quando a taxa de diluição passou de 0,02 para 0,12/h. A menor proporção de energia gasta para manutenção das células (15%) em altas taxas de diluição é portanto responsável pelo elevado crescimento nestas condições, enquanto o inverso (55% de gasto de energia para manutenção) aconteceu na menor taxa de diluição (2%/h).

O problema não sanado, de diminuição da população de protozoários *in vitro*, já ressaltado no trabalho de ABE & KUMENO (1973), é novamente alvo de estudos no trabalho de HOOVER *et alii* (1976). O uso de taxas de renovação acima de 1,0 volume/dia é colocado como o causador da diminuição da população de protozoários nos fermentadores contínuos, uma vez que o tempo de geração desses microrganismos é maior do que seu tempo de permanência no fermentador. Visando eliminar este problema, os autores propõem um quimiostático onde a taxa de diluição da fase sólida é menor que da fase líquida. A saída de sólidos do fermentador se faz pela parcela diluída no líquido efluente do fermentador, enquanto que mais uma parcela de fase líquida é removida por meio de um filtro interno ao fermentador, cujo diâmetro dos poros é de 105 μ m.

Com uso de aparelho, conseguiu-se então

diferentes taxas de remoção. Apesar de ter havido certa variação na contagem total de protozoários nas quatro incubações do trabalho, onde houve variação na taxa de renovação total (1,32 a 1,52 volumes/dia), em todas elas a população de protozoários se manteve em valores próximos a contagem do inóculo.

Os trabalhos publicados a partir desta data, até os dias de hoje, quase na totalidade utilizaram os sistemas *in vitro* propostos por HOOVER *et alii.* (1976) e o RUSITEC, a ser apresentado na próxima seção, não tendo sido relatado qualquer aparelho com diferenças dignas de nota.

2.1.2. Técnica de Simulação Ruminal (RUSITEC)

Os aparelhos utilizados para estudos de fermentação ruminal têm sido de vários tipos, conforme o histórico descrito no item anterior. Normalmente, o tipo de estudo realizado (objetivos) define o tipo de aparelho. Ocasionalmente é conveniente usar um aparelho complexo, a fim de permitir controle de vários aspectos da fermentação. Entretanto, o que se observa é que o uso subsequente de cada aparelho descrito na literatura é muito pequeno, em geral devido às dificuldades de operação (CZERKAWSKI, 1986). Segundo este autor, mais da metade dos sistemas de fermentação ruminal não foram utilizados novamente pelos autores, sendo algumas vezes usados por outros.

Com a finalidade de propor um aparelho de uso facilitado, que permitisse estudar a distribuição, síntese e fluxo de matéria microbiana nos diversos compartimentos do rúmen, CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE (1977) descrevem a Técnica de Simulação Ruminal (RUSITEC). Este aparelho, do tipo contínuo, onde se utilizam sacos de nylon para incubação dos alimentos, permite a definição de 3 compartimentos: a fase sólida, representada pelas partículas de alimento dentro da sacola; a fase líquida, no fluido do fermentador e uma fase intermediária, correspondente aos fluidos de drenagem livre da sacola de nylon. Esta fase estaria associada as partículas menores que se liberam da fase sólida, tendo a elas associada uma população microbiana predominantemente de bactérias amilolíticas e algumas celulolíticas. As figuras 2 e 3 abaixo mostram um esquema de um fermentador RUSITEC e os compartimentos presentes no RUSITEC representado de forma esquemática, respectivamente (CZERKAWSKI, 1986).

Figura 2 - Esquema de um fermentador do RUSITEC. L, líquido "ruminal"; N, sacola de nylon com digesta sólida; G, parafuso de vedação com O-ring; S, haste de agitação; V, válvula de amostragem; C, reservatório perfurado móvel; I, entrada para saliva; O, saída de efluentes. (CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE, 1977).

Figura 3 - Representação Esquemática do RUSITEC

Representação Esquemática do RUSITEC e um Diagrama de Fluxo para ilustrar o Modelo de 3 Compartimentos do Sistema.

Q , C , K são quantidades, concentrações e taxas de síntese microbiana específicas, respectivamente. V é o volume e R é a taxa específica de fluxo de água. Como exemplo, o fluxo de água do compartimento 1 para o 2 é: $R_{12} \cdot V_1$ (CZERKAWSKI, 1986).

A característica que torna o RUSITEC um sistema ímpar para estudos de fermentação ruminal *in vitro* é a de permitir se trabalhar com alimento sólido. Isto permite não só se poder avaliar a degradabilidade da dieta, mas também, e principalmente, permitir uma simulação muito mais real do ecossistema ruminal. Isto porque sabidamente a população microbiana associada às partículas de alimento representam geralmente mais de 50% da massa microbiana total (CHUNGATE, 1966).

A facilidade de construção e operação levou a um uso bastante intenso da Técnica de Simulação Ruminal. A própria equipe do Hannah Research Institute (Escócia), chefiada por Julian Czerkawski o empregou em diversos trabalhos, bem como autores de outras instituições, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Uso da Técnica de Simulação Ruminal para diferentes fins e em diferentes locais.

Estudo	Local	Referência
Validação do sistema, sacolas de nylon e efeito da quantidade de alimento e taxa de diluição	Hannah Research Institute-Escócia	CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE 1977
Uso de alimento solúvel e matriz sólida inerte	Hannah Research Institute-Escócia	CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE 1979
Efeito da monensina na fermentação	Rowett Research Institute-Escócia	WALLACE <i>et alii</i> 1980
Efeito da monensina e inibidor de metanogênese	Imperial Chemical Industries Ltd - Inglaterra	STANIER & DAVIS 1981
Efeito da monensina e lasalocida	Colorado State University - EUA	FULLER & JOHNSON 1981
Efeito da monensina sobre a fermentação	Rowett Research Institute-Escócia	WALLACE <i>et alii</i> 1981

Tabela 1 - Uso da Técnica de Simulação Ruminal para diferentes fins e em diferentes locais (cont.)

Estudo	Local	Referência
Atividade de urease	Hannah Research Institute-Escócia	CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE 1982
Metabolismo do 1,2-propanediol	Hannah Research Institute-Escócia	CZERKAWSKI <i>et alii</i> 1984
Monitoramento da produção de gases	University College, Cardiff - Gales - Reino Unido	HILLMAN <i>et alii</i> 1985
Fluxo de líquido pelas sacolas de nylon e retirada parcial do "pool" de partículas	International Atomic Energy Agency; Vienna Áustria	CZERKAWSKI 1986
Fermentação de <u>Humulus</u> <u>lupulus</u>	Hannah Research Institute-Escócia	KRISHNA <i>et</i> <i>alii</i> 1986

Tabela 1 - Uso da Técnica de Simulação Ruminal para diferentes fins e em diferentes locais. (cont.)

Estudo	Local	Referência
Vantagens e limitações do uso do RUSITEC: Revisão	5 laboratórios do INRA França	BLANCHART <i>et alii</i> 1989
Degradação de palha de trigo, com e sem presença de fungos	INRA; Université Blaise Pascal - França	HILLAIRE <i>et alii</i> 1990
Influência do <u>Aspergillus orizae</u> sobre a fermentação	Rowett Research Institute-Escócia	NEWBOLD <i>et alii</i> 1991
Estudo do metabolismo de etanol no rúmen	Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon	DURIX <i>et alii</i> 1991
Efeito da bentonita sobre a fermentação	Rowett Research Institute-Escócia	WALLACE & NEWBOLD 1991

Cabe ressaltar que estes trabalhos não representam a totalidade de trabalhos publicados com uso do RUSITEC, principalmente não relacionando diversos trabalhos de pesquisadores franceses do INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), publicados a partir do final da década de 80., além de trabalhos realizados na Alemanha.

2.2. Ionóforos

2.2.1. Modos de Ação

Monensina, o mais conhecido dos ionóforos utilizados para ruminantes, é um composto produzido por linhagens de *Streptomyces cinnamomensis*, inicialmente utilizado como agente coccidiostático na avicultura. A observação de que possuía atividade moderada sobre microrganismos gram-positivos, levou pesquisadores de ruminantes a utilizarem este composto. RICHARDSON *et alii* (1976) foram pioneiros em apresentar resultados acerca do efeito da monensina sobre a fermentação ruminal *in vitro* e *in vivo*. O mais consistente resultado observado foi um aumento na proporção molar de ácido propiônico com um concomitante declínio na proporção de ácidos acético e butírico. Em função disso, estes autores calcularam uma economia teórica de energia para animais suplementados, em torno de 5,6%, uma vez que o metabolismo de propiônico proporciona maior eficiência no metabolismo energético no rúmen (CHUNGATE, 1966).

Estes resultados iniciais do uso de ionóforo levaram diversos autores a estudarem os efeitos no rúmen desses compostos, visando sempre incremento na produção animal. Sob aspecto mais amplo, a fermentação ruminal está acompanhada de perdas tanto de energia como de nitrogênio na forma amoniacal. Portanto, a eficiência de produção pode ser

aumentada se for feito um ajuste favorável da digestão e saída de nutrientes do rúmen (CHALUPA, 1980). Este autor propõe as seguintes alternativas de trabalho: a) proteção dos componentes dietéticos contra o ataque de microrganismos; b) controle do balanço das espécies microbianas ou de suas atividades (CHALUPA, 1980).

Dentro das técnicas disponíveis para manipulação daquilo proposto neste segundo item, o uso de ionóforos é o mais utilizado e pesquisado.

Apesar da grande quantidade de trabalhos publicados com uso de ionóforos, o modo de ação de cada um deles até hoje não está bem estabelecido. Acredita-se que a maioria dos efeitos observados pela utilização de lasalocida e monensina, os mais utilizados para ruminantes, pode ser simplificada a um único evento: a dissipação do gradiente de prótons entre o fluido ruminal e a célula bacteriana (BERGEN & BATES, 1984).

Os ionóforos são substâncias lipofílicas, de peso molecular de 500 a 2000. O exterior da molécula é hidrofóbico, porém seu interior é hidrofílico, e capaz de se ligar a cátions (RUSSEL & STROBEL, 1989). Em virtude das membranas celulares serem compostas por membrana lipídica dupla, uma elevada energia de ativação é necessária para translocação de íons. Os ionóforos são capazes de neutralizar e carregar íons, facilitando seu transporte através das membranas, entretanto eles diferem entre si

quanto a afinidade e preferência por cátions (SPEARS, 1990).

Assim sendo, a ação específica do ionóforo irá depender, além da sua natureza (afinidade e preferência por cátions), dos gradientes iônicos, formados entre o fluido ruminal e o interior das bactérias.

RUSSELL (1987), observou que as concentrações de K^+ e Na^+ é maior intracelularmente, com um gradiente de 70 e 2,7 vezes respectivamente, mantendo um pH bem mais elevado que extracelularmente.

A bactéria mantém, de forma ativa, o pH interno elevado, a fim de utilizar a força próton motiva, gerada pelo gradiente de pH (ΔpH) e pelo gradiente elétrico (ΔY), para a célula (KASHKET, 1985). A ação do ionóforo, portanto, se faz alterando o fluxo normal de íons pelas bactérias, promovendo um influxo de H^+ , pelo efluxo de K^+ (RUSSEL & STROBEL, 1989) ou Na^+ (BERGEN & BATES, 1984). O aumento de H^+ no interior da célula promove um decréscimo no pH, diminuindo portanto o ΔpH e consequentemente a força próton motiva. Para manter o pH interno favorável, a célula força a saída de H^+ pela ação da ATPase ligada a membrana, que age mais intensamente que em condição sem o ionóforo. Isto acaba acarretando uma exaustão total do ATP intracelular, com severos danos a sobrevivência das bactérias (BERGEN & BATES, 1984).

As bactérias que apresentam, além da fosforilação a nível de substrato, a fosforilação oxidativa na presença de citocromos, acabam por dominar o meio com ionóforos, pois possuem maior capacidade de geração de ATP. As bactérias mais afetadas são as gram-positivas e *Butyrivibrio fibrisolvens*, uma gram-negativa sem a típica camada de peptidoglicanas.

O resultado final dessa ação dos ionóforos será o de diminuir portanto a proporção de ácido acético, pois bactérias como *Ruminococcus spp* são inibidas, e um consequente aumento na proporção de ácido propiônico. A inibição desses produtores de H₂ acabam acarretando também uma menor formação de metano (RUSSEL & STROBEL, 1989).

2.2.2. Estudos com ionóforos *in vitro*

O efeito da monensina *in vitro* foi estudado com detalhes por VAN NEVEL & DEMEYER (1977), incubando inóculo ruminal em "roll tubes". Os efeitos principais foram a inibição parcial da metanogênese e aumento na produção de propionato. Quando incubado o inóculo em meio específico para metanogênicas, observou-se que os efeitos não eram devidos a uma ação tóxica da monensina sobre as bactérias metanogênicas, mas sim devido a diminuição de produção de hidrogênio. O crescimento dos microrganismos foi consideravelmente menor, porém a degradação do substrato não

diminuiu. Em incubação com caseína, a monensina teve efeito diminuindo a degradação de proteína, observando-se níveis de nitrogênio amoniacal menores, bem como acúmulo de nitrogênio na forma α - amino.

CHEN & WOLIN (1979), estudaram os efeitos de monensina e lasalocida sobre o crescimento de metanogênicas e espécies sacarolíticas do rúmen. Por este estudo as espécies *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Butyrivibrio fibrisolvens* foram inibidos por 2,5 μ g de monensina ou lasalocida por ml, sendo as espécies *Bacteroides succinogenes* e *B. ruminicola* somente inibidos a 20 μ g/ml. As diversas espécies metanogênicas sofreram inibições em diferentes concentrações, porém sempre elevadas. Os autores então sugerem que tanto a monensina como a lasalocida agem no rúmen selecionando as bactérias do gênero *Bacteroides*, produtoras de succinato, além de *Selenomonas ruminantium*, que foi insensível a 40 μ g/ml, bactéria esta utilizadora do succinato e produtora de ácido propiônico. A seleção contra *Ruminococcus* e *Butyrivibrio*, produtores de H₂, levam a depressão na produção de metano no rúmen.

Trabalhando com a Técnica de Simulação Ruminal (RUSITEC), WALLACE *et alii* (1980) reportaram os efeitos da adição de 33 μ g/ml como sendo de diminuição na degradação dos alimentos, bem como na redução na produção de AGVs. Quando em dieta com concentrado, a adição do ionóforo reduziu em 55% a produção de metano. A taxa de acetato/propionato não

sofreu efeito neste trabalho, e o fato do trabalho ter sido de curta duração (4 dias de adição de monensina aos fermentadores) levaram os autores a concluir que nesse período ainda não haviam sido selecionadas as espécies bacterianas.

Os dados obtidos por HENDERSON *et alii* (1981), com incubação de culturas puras com presença de diferentes doses de monensina, confirmaram aqueles obtidos por CHEN & WOLIN (1979). Além disso, o trabalho mostrou o decréscimo na degradação de celulose em níveis baixos de monensina, de 1 $\mu\text{g/l}$ para fibras de algodão e 3 a 5 $\mu\text{g/l}$ para papel de filtro moído.

Trabalhando com doses de 1,15 e 1,54 $\mu\text{g/ml}$ de monensina; 1,14; 2,17 e 4,56 $\mu\text{g/ml}$ de lasalocida no RUSITEC, FULLER & JOHNSON (1981), observaram redução na produção de metano, tanto para dieta volumosa quanto concentrada. Na dieta concentrada foi observado aumento na proporção de ácido propiônico, entretanto sem aumento na produção total de AGVs. A digestibilidade praticamente não foi alterada, e a degradação da proteína foi significativamente menor. O crescimento bacteriano total, entretanto, não foi inibido nem por lasalocida nem monensina. Todos esses efeitos acima relatados foram observados de maneira similar para todas as dosagens, quando comparadas com o controle.

WALLACE *et alii* (1981), com uso do RUSITEC, fizeram incubações por 50 dias, com doses de monensina de

2,4; 11,9 e 60 $\mu\text{g/ml}$. Em todas as dosagens foram observados decréscimos na produção de acetato e butirato; aumento substancial na produção de propionato, além da diminuição na produção de metano. A digestibilidade da matéria seca diminuía com a adição de monensina, pela ação sobre a degradação da porção fibrosa, que diminuiu. O YATP tendem a aumentar com a adição de monensina, porém tal fato só foi observado na dose mais elevada. Uma aparente diminuição na atividade deaminativa também foi observada.

Utilizando um sistema de fermentação contínuo, tipo quimiostático, NEWBOLD & WALLACE (1988), estudaram o efeito da adição de monensina aos fermentadores onde foi simulada condição de acidose láctica. Estes fermentadores possuíam co-cultura de 4 espécies: Megasphaera elsdenii, Selenomonas ruminantium, Streptococcus bovis e Lactobacillus sp. A adição de monensina foi capaz de prevenir o acúmulo ácido láctico, mas não teve capacidade de reverter um quadro de acidose láctica, quando introduzida no meio após 24 horas, o que aconteceu com a adição de tetronasina, outro ionóforo estudado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zoologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo - Campus de Piracicaba, no período de 11 a 27 de dezembro de 1990.

3.2. Material

3.2.1. Aparelho de fermentação contínua

Foi utilizada a Técnica de Simulação Ruminal, conhecida por RUSITEC, sendo o aparelho similar ao descrito por CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE (1977), com pequenas modificações: agitação dos fermentadores mais intensa, promovida por 12 ciclos de movimento sobe/desce da haste de agitação (Figura 4); deslocamento vertical das garrafas dentro do fermentador de 3,5 cm, e volume nominal de 850 ml (Figura 5).

O aparelho foi fabricado sob encomenda pela Tecnal S.A.¹

¹ Tecnal Equipamentos para Laboratório Ltda. Piracicaba, S.P.

Figura 4. Vista geral do RUSITEC e acessórios. 1) Motor 2) haste de agitação sobe/desce 3) Banho-maria com agitação de água 4) Fermentador 5) Erlenmáiers para coleta de efluente 6) Bolsa de coleta de gases 7) Reservatório de saliva 8) Bomba peristáltica.

Figura 5. Vista de um fermentador e suas partes.

- 1) Saída para efluente 2) Abertura para retirada de amostras 3) Haste agitadora 4) Entrada de saliva 5) Fluido ruminal 6) Garrafa de nylon 7) Sacola de nylon 10 X 20 cm 8) Reforço plástico.

O bombeamento da saliva artificial se fez pelo uso de bomba peristáltica, marca Micronal, modelo B 332 II. Os gases de fermentação foram coletados em balões de polietileno com a superfície externa metalizada, com capacidade para 6 litros. O efluente era recebido em erlenmáiers de 1,5 l, onde era adicionado 5 ml de cloreto de mercúrio na concentração de 10 g/l, a fim de cessar a fermentação.

3.2.2. Animais Doadores

Foram retirados inóculos líquido e sólido, para incubação da fermentação *in vitro*, de 2 bovinos adultos fêmeas, providos de cânula ruminal. Os inóculos líquidos retirados de dois animais, na mesmas quantidades, foram homogeneizados para então a mistura resultante ser transferida para os fermentadores. O inóculo sólido sofreu o mesmo tratamento. O inóculo sólido foi obtido pela coleta do conteúdo ruminal com uso de um béquer de 120 ml. O inóculo líquido foi obtido pela filtração do conteúdo ruminal em 4 camadas de pano-de-queijo.

Anteriormente à coleta, os animais estavam adaptados por 30 dias à dieta de bagaço auto-hidrolisado, sorgo, uréia e sal mineralizado, balanceada para manutenção.

3.2.3. Dieta dos fermentadores e sacos de incubação

Os quatro fermentadores recebiam dieta a base de bagaço auto-hidrolisado, grão de sorgo moído e farelo de algodão (Tabela 2).

O bagaço auto-hidrolisado foi tratado à pressão e vapor, submetido a 13 kgf/cm^2 de pressão por 6 minutos, preparado no hidrolisador da Usina São Martinho - Pradópolis - SP.

Os tratamentos foram obtidos pelo fornecimento de doses crescentes do produto comercial Taurotec², com garantia de fábrica de concentração de lasalocida sódica mínima de 15%, valor este utilizado para estimativa das doses, a saber, 1,5, 3,0 e 6,0 $\mu\text{g/ml}$. A dose intermediária corresponde a dose recomendada pelo fabricante para animais à campo.

Para se fazer a redução para o sistema *in vitro* foi considerado um rúmen com capacidade de 70 litros e taxa de renovação de 1,3/dia. A dose menor utilizada correspondeu portanto a metade da dose intermediária, e a maior ao dobro da mesma.

O ionóforo foi misturado à mistura mineral, para então ser adicionado a dieta. A dieta foi introduzida nos fermentadores dentro de sacos de dacron, tecido em náilon monofilamento, com tamanho de poros de 44 μm , fabricado por 2 Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos

Tripette & Renaud, Suíça. As dimensões dos sacos foram de 10 x 20 cm.

Tabela 2 - Dieta dos fermentadores (g de MS/dia)

Ingrediente	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4
BAH	5,95	5,95	5,95	5,95
Far. Algodão	2,94	2,94	2,94	2,94
Sorgo	2,03	2,03	2,03	2,03
MM + LS	0,3000	0,3077	0,3154	0,3308
Uréia	0,11	0,11	0,11	0,11

MM - Mistura Mineral LS - Lasalocida

3.2.4. Saliva Artificial

A composição da saliva artificial pode ser observada na Tabela 3, sendo baseada na saliva de McDOUGALL (1948) com adição de microminerais conforme BLANCHART *et alii* (1989).

A quantidade de saliva infundida nos

fermentadores foi ajustada para proporcionar renovação de 1 volume de fermentador/dia (850 ml).

Tabela 3 - Composição química da saliva artificial

Macroelementos	g/l
NaHCO ₃	9,80
Na ₂ HPO ₄	3,69
KCl	0,57
NaCl	0,47
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,15
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,05
Microelementos	mg/l
FeSO ₄ . 7H ₂ O	36,80
MnCl ₂ . 4H ₂ O	22,30
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4,40
CoCl ₂ . 6H ₂ O	1,20
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,98
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,20

3.3. Métodos Experimentais

3.3.1. Tratamentos

Os tratamentos consistiram de um controle (sem lasalocida sódica) e três níveis crescentes: 1,5 $\mu\text{g/ml}$; 3,0 $\mu\text{g/ml}$ e 6,0 $\mu\text{g/ml}$. Estas doses foram fornecidas em função do volume dos fermentadores (850 ml), de forma que as quantidades totais fornecidas foram 1,2750 mg/dia; 2,5500 mg/dia e 5,1000 mg/dia respectivamente para os tratamentos 6, 7 e 8. Para que a análise comparativa entre frascos fosse realizada, tanto na fase I (sem ionóforo) como na fase II (com ionóforo), considerou-se oito tratamentos, sendo T1 a T4 correspondentes aos quatro frascos na fase I, e T5 a T8 correspondentes aos quatro frascos na fase II.

3.3.2. Delineamento experimental

A adaptação dos fermentadores teve duração de seis dias, tendo, a partir do sétimo dia, sido adicionados diariamente os tratamentos com lasalocida sódica para os frascos 2, 3 e 4, correspondentes aos níveis de 1,5 $\mu\text{g/ml}$; 3,0 $\mu\text{g/ml}$ e 6,0 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Foram coletadas amostras durante 16 dias, para permitir comparações das variáveis antes e depois dos tratamentos.

3.3.3. Estabelecimento das culturas nos fermentadores e trocas diárias.

Para estabelecimento das culturas nos fermentadores e para se efetuarem as trocas diárias utilizou-se a técnica descrita por CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE (1977). Dois sacos de náilon foram incubados, sendo uma contendo a dieta sob estudo e outra contendo conteúdo ruminal (inóculo sólido). Completando a incubação, foram adicionados 300 ml de saliva artificial previamente aquecidas a 38°C e 300 ml de inóculo líquido, obtidos conforme 3.2.2. Após isto feito, o fermentador recebia influxo de CO₂ por aproximadamente 5 minutos, estando a bolsa de coleta de gás ainda desconectada. Após este período, a bolsa era conectada e cessado o influxo de CO₂.

O estabelecimento das culturas foi feito às 10h.

Após 24 horas, os fermentadores foram abertos, sendo o saco contendo inóculo sólido retirado e lavado no interior de um saco de polietileno (15 x 30 cm) com saliva artificial. Foram utilizados 80 ml de saliva, sendo 40 ml para uma primeira lavagem, com massageamento suave do saco. O líquido foi então transferido para um béquer de 250 ml. A seguir foi feita uma segunda lavagem, e o líquido adicionado ao béquer, sendo então o retornado líquido resultante das duas lavagens ao fermentador. Toda esta operação de lavagem foi desempenhada o mais rapidamente possível (aproximadamente

1,5 minutos).

Substituindo-se o saco de inóculo retirado, foi colocado um novo saco com a dieta descrita na Tabela 2. Dessa forma, a partir do terceiro dia obteve-se diariamente um saco cujo tempo de residência no fermentador foi de 48h, o qual foi submetido ao mesmo procedimento que aquele do saco com conteúdo sólido e determinada a degradabilidade *in situ* da fração insolúvel da matéria seca (DISI), conforme CASTRO (1989).

Todo este procedimento onde se retirava a sacola que havia permanecido 48h no fermentador e substituída por outra com dieta será a partir de agora chamada de "troca".

O horário da troca diária, com pequenas variações, foi mantida (início as 10h).

3.3.4. Coletas do efluente

Do primeiro ao último dia (16 dias), no horário da troca, o volume do efluente coletado nos erlenmáiers foi medido, homogeneizado e retirada uma alíquota de 50 ml, que foi transferida para frascos de vidro de 100 ml, tipo "snap cap", com parafilm entre a tampa e o frasco, e armazenada em frizer a -14° Celsius. Esta alíquota posteriormente foi utilizada para contagem de protozoários. Uma segunda alíquota de 50 ml era utilizada para a determinação imediata do pH. Uma terceira alíquota de 50 ml foi transferida para

tubo de centrífuga, previamente imerso em água e gelo, e em seguida centrifugada a 5.500g por 20 minutos. Duas alíquotas de 1 ml do sobrenadante foram transferidos para frascos de vidro de 5 ml, tipo "snap cap" e adicionados 0,2 ml de ácido fórmico em cada frasco. Estes frascos posteriormente foram armazenados em frizer a - 14 graus Celsius para posterior determinação de AGV. Uma quarta alíquota de 2 ml foi transferida em duplicata para tubo de centrífuga contendo 1 ml de tungstato de sódio 10% (p/v), adicionando-se em seguida 1 ml de ácido sulfúrico gelado 1N. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 5.500 g por 20 minutos, e o sobrenadante transferido, para frascos iguais aos utilizados para AGV e armazenado em frizer, para posterior determinação de N-NH₃.

Alíquotas para contagem de protozoários eram coletadas com volume de 10 ml, adicionando-se 10 ml de formalina (formaldeído 37%) em frascos de 100 ml tipo "snap cap" e mantidos a temperatura ambiente.

3.4. Métodos Analíticos

3.4.1. Análises químico-bromatológicas

Foram feitas análises de matéria seca em estufa (MS), extrato etéreo (E.E.), cinza bruta (CZ), fibra bruta (FB) e proteína bruta, conforme a A.O.A.C. (1965) dos alimentos incubados.

As determinações de fibra detergente neutro (FDN) e fibra detergente ácido (FDA) foram efetuadas segundo GOERING & VAN SOEST (1970).

3.4.2. Determinação de pH

O pH de fluido ruminal dos animais doadores e do efluente dos fermentadores foi determinado em potenciômetro digital, marca DIGIMED, modelo TE-902.

3.4.3. Volume do efluente

O volume do efluente coletado nos erlenmâiers foi determinado diretamente utilizando-se proveta graduada de 1,00 l, subtraindo-se o valor da solução de cloreto de mercúrio (5 ml).

3.4.4. Determinação do N-NH₃

Foi utilizado o método colorimétrico CHANEY & MARBACH (1962), com modificações segundo WEATHERBURN (1967). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Coleman Junior II, modelo 6/20, da Coleman Instruments Division. A curva padrão foi obtida a partir de solução de sulfato de amônio, sendo os valores de absorbância utilizados em equação de regressão do tipo $y = ax + b$, então

utilizado para estimar a concentração das amostras, transformadas em mg N-NH₃.

3.4.5. Determinação de AGV

Utilizou-se método baseado em cromatografia gasosa, utilizando-se cromatógrafo a gás CG 37-D, da Instrumentos Científicos CG Ltda, com coluna de vidro de 4 pés de comprimento e 1/8 de polegada de diâmetro, empacotada com Carbopack[®]. O detector utilizado foi de ionização de chama.

Foi utilizado nitrogênio como gás de arraste, na vazão de 30 ml/minuto; oxigênio como comburente, na vazão de 400 ml/minuto; e hidrogênio como combustível, na vazão de 40 ml/minuto. Trabalhou-se com o vaporizador a temperatura de 195 graus Celsius, a coluna de separação a 120 graus Celsius e o detector a 205 graus Celsius.

As determinações foram efetuadas injetando-se 1 microlitro de amostra para cada determinação, sendo o número de repetições por amostra aquele necessário para que a diferença entre leituras fosse inferior a 7%.

Os cálculos das concentrações de AGV foram realizados por um programa para microcomputadores tipo PC, sendo a placa e o "software" desenvolvidos pela Anacom Software (programa INTEGRA). Os cálculos foram realizados comparando-se as amostras a uma solução padrão contendo 63%

de ácido acético (C₂), 20% de ácido propiônico (C₃) e 8% de ácido butírico (C₄), e o restante de isoácidos (isobutírico, isovalérico, 2 metil butírico e valérico). A concentração final da solução padrão foi de 8,76 mM/dl.

A partir dos resultados de concentração molar individual dos AGV, em mM/dl, foram calculadas as seguintes variáveis: concentração total de AGV (CT) em mM/dl, quantidade total (QT) expresso em mM/dia, multiplicando-se CT pelo volume de efluente, e relação molar C₂/C₃.

3.4.6. Determinação de degradabilidade *in situ*

Os sacos retirados dos fermentadores após 48h de degradação eram lavados em água corrente por 1,5 min, com manipulação moderada. Posteriormente estes foram mantidos em estufa a 60 graus Celsius com ventilação forçada de ar, por 48h e pesados posteriormente.

A estimativa da degradabilidade *in situ* total da MS (DIST) e degradabilidade *in situ* da fração insolúvel da MS, foram feitos conforme CASTRO (1989).

3.4.7. Contagem de protozoários

Determinou-se a população de protozoários nos fermentadores, a partir da coleta do efluente, segundo o método de PURSER & MOIR (1959). A determinação do número de

protozoários por mililitro foi feita utilizando-se microscópio óptico, usando-se a câmara de Sedgwick-Rafter para contagem das amostras, coradas pelo verde brilhante diluídas em glicerol 30%. A definição do número de campos a serem contados foi feito pelo método gráfico proposto por CASSEL (1965).

3.5 Análise Estatística

Inicialmente fez-se um estudo exploratório a fim de se determinar eventuais correlações entre as variáveis. Para tal utilizou-se o procedimento CORR (SAS, 1985). Feito isto, observou-se elevados índices de correlação entre a variável volume de saliva (VS) e demais variáveis.

O equipamento foi previamente ajustado para um volume fixo, porém o mesmo não apresentou bom funcionamento. Em virtude disto, a variação no volume de saliva promoveu as correlações acima citadas.

A análise estatística propriamente dita foi feita utilizando-se de análise de variância por mínimos quadrados, confrontando-se tratamentos entre fases dentro do mesmo frasco, e entre frascos, com uso do procedimento GLM (SAS, 1985). A variável VS entrou no modelo como covariável. Para comparações das duas fases, entre si, considerando-se os quatro frascos conjuntamente, foram obtidos os contrastes ortogonais correspondentes, com uso do SAS (1985).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição Bromatológica da Dieta Base

Os resultados das análises bromatológicas dos ingredientes da dieta (100% MS) são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição química dos alimentos (%)

Ingrediente	MS	EE	FB	CZ	PB	ADF	NDF
BAH	43,0	3,9	37,2	3,3	1,1	54,4	57,0
Sorgo grão	86,4	5,2	3,3	2,2	12,5	8,1	16,5
Far. Algodão	86,3	2,3	30,9	5,0	23,1	42,24	58,8

Considerando-se as quantidades de cada ingrediente apresentadas na Tabela 2 e a composição dos mesmos acima apresentada, obtêm-se uma dieta com 9,2% de PB. Coletas de efluente dos fermentadores em período pré-experimental proporcionaram níveis de nitrogênio amoniacal de cerca de 2,0 mg/dl, acima do nível mínimo obtido *in vitro* por SATTER &

SLYTER (1974) necessário para 95% de crescimento máximo dos microrganismos (1,7 mg/dl).

A quantidade de alimento em função do volume é muito importante em experimentos *in vitro*, para que não se atinja elevadas produções de subprodutos de fermentação. Isto porque nesses sistemas geralmente a remoção destes está ausente ou não se faz tão eficientemente como *in vivo*, podendo comprometer a fermentação por excesso de ácidos no meio. Em fermentadores tipo batelada a concentração de substrato não deve ultrapassar 1% do volume do frasco (VAN SOEST, 1982). O nível utilizado neste experimento, onde se utilizou fermentadores contínuos, foi de aproximadamente 1,3%. No trabalho original com RUSITEC, de CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE (1977), os autores observaram máxima produção de subprodutos de fermentação por g de alimento digerido quando se forneceu níveis de substrato entre 1,2% e 1,8%, estando portanto num nível adequado aquele utilizado neste trabalho.

4.2 - Validação do RUSITEC

Por se tratar de um equipamento fora-de-série, uma avaliação geral dos dados obtidos se fez necessária para que se validasse o sistema.

As primeiras tentativas de promover fermentação ruminal nos frascos do RUSITEC foram infrutíferas. Foi vital que se conseguisse vedação total dos frascos para que se atingisse o desejado nível de anaerobiose. Para tanto, a

lubrificação da haste agitadora (ver Figura 5) com graxa de silicone precisa ser feita com elevada frequência (diariamente, no horário da troca). Isto para que seu atrito com os O-rings presentes na tampa do frasco não leve a um desgaste prematuro destes, que comprometeriam a vedação dos frascos. A pressão a que os O-rings são submetidos deve ser a máxima possível, pelo rosqueamento do parafuso de acrílico da parte superior da tampa do frasco, desde que não comprometa o sobe/desce da haste agitadora, e conseqüentemente não force o motor.

Após sanado o problema de anaerobiose, foram realizados testes para que se definisse a quantidade ideal de alimento incubado, bem como o pH da saliva artificial infundida, a fim de que estes fatores levem a um pH adequado dentro dos fermentadores (6,5 a 7,2). Para cada dieta, previamente ao período experimental, é necessário que se conduza testes a semelhança destes aqui realizados. No caso do presente trabalho, iniciaram-se os testes utilizando-se um nível de 7,0 g de alimento na sacola (BAH + Sorgo + Far. de Algodão). Nestes níveis a fermentação não se mostrou adequada, pois, sem que se corrigisse o pH da saliva (por volta de 8,3), a atividade fermentativa não foi suficiente para manter um nível de pH fisiológico, mas sim níveis acima de 7,6, de forma que após dois dias a fermentação já foi considerada perdida. Nestas condições pode-se observar ao microscópio que a população de protozoários já estava toda

morta.

Apresentavam-se então duas soluções para esse problema. Ou se abaixava o pH da saliva pela infusão de CO₂, ou se aumentava o nível de alimentação. Foi feita a segunda opção. Então, passou-se a testar níveis maiores de alimento nas sacolas, até um nível ao redor de 10,0 g de alimento, que proporcionava pH médio nos fermentadores ao redor de 6,9. Desta forma se optou-se trabalhar com um total de 11,05 de alimento, o que representou uma concentração 1,3 %, peso/volume. O experimento conduzido então sob estas condições poderia então estar sujeito aos critérios de validação, uma vez que conseguiu-se manter os frascos com fermentação tipo ruminal por vários dias.

Os critérios de validação propostos por WARNER (1956) podem ser aplicados sobre os dados apresentados nas Tabelas de 5 a 8, que apresentam os dados médios de todas as variáveis tomadas nos 4 frascos de fermentação. De maneira indireta os critérios são checados pelos dados de pH tomados nos diversos dias, pela degradação da MS do material (DISI) e pelo padrão de fermentação (relação C₂/C₃). Os dados de interesse nesta análise são aqueles referentes ao frasco 1 (ambas as fases) e aqueles referentes aos três outros frascos durante a fase I apenas. Isto porque estes dados deveriam ser todos semelhantes, já que as condições impostas aos fermentadores eram as mesmas (controle).

A existência de dados perdidos foi devida a

problemas operacionais na coleta das amostras, que inviabilizaram suas análises.

Os dados de pH mostram que houve uma adaptação dos fermentadores nos 3 primeiros dias. O pH do inóculo foi de 5,9 (dia 0) e após 2 a 4 dias os fermentadores se equilibraram numa faixa de pH de 6,8 a 6,9. Após atingida esta faixa, os valores se mantiveram praticamente inalterados.

Os resultados de degradação da fração fibrosa (DISI) mostraram tendência semelhante, sendo que os sacos com alimento incubados a partir do segundo dia passaram a apresentar valores constantes de degradação,, ao redor de 62%. Para este alimento, bagaço auto-hidrolisado, CASTRO (1989) obteve valores de degradação *in situ* de cerca de 58%. Sendo a dieta do presente experimento composta por 53% de BAH, e com um total de ADF de 38%, este valor médio obtido de DISI pode ser considerado semelhante àqueles *in vivo*.

Uma importante indicação de que o fermentador funcionou adequadamente pode ser verificado pelos dados de correlação entre produção total de AGV e DISI, cujos coeficientes se situam entre 0,6 e 0,9 (Apêndices 1 a 4), indicando maior produção de AGV quando a degradação era aumentada ou vice-versa.

No tocante ao padrão de fermentação, pode-se observar que inicialmente a relação C_2/C_3 esteve por volta de 2,3, subindo gradualmente até atingir 2,6. Este dado pode ser comparado a outros dados da literatura, em dietas a base de BAH. SILVA (1990), trabalhando com animais recebendo dieta

com 55% de BAH, além de milho e farelo de algodão, em proporções semelhantes a este trabalho, obteve valores de cerca de 2,7 para a relação C_2/C_3 . CASTRO (1989), obteve valores na faixa de 3,0, para uma dieta de 65% de BAH, 16% de milho e 19% de concentrado protéico comercial, dados *in vivo*.

Estes dados analisados em conjunto vêm mostrar que o sistema simulou adequadamente o rúmen, observando-se uma fase inicial de adaptação dos fermentadores de cerca de 4 a 6 dias, para então se estabilizarem, semelhantemente ao sistema semi-contínuo apresentado por MACHADO (1986). Tal fato pode ser visualizado nas Figuras 6 a 9.

O nível de nitrogênio amoniacal nos fermentadores se manteve relativamente constante, apesar de baixo. Um maior fornecimento de uréia deveria ter sido adotado, entretanto, o nível médio atingido (1,7 mg/100 ml) não impediu o desenvolvimento de uma população típica de rúmen, o que pode ser checado pelas outras variáveis (pH, AGV e DISI).

A população de protozoários apresentou um decréscimo significativo no decorrer dos dias após a instalação da fermentação, o que já foi relatado por CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE (1977), que também obtiveram redução da ordem de 4 vezes a população inicial.

4.3 Resultado das Variáveis Ruminais - Efeito dos Tratamentos

4.3.1. Resultados de pH

O estudo da análise de variância dos dados de pH foram realizados eliminando-se os dados obtidos nos dias 0, 1, 2, e 8, dias considerados como de adaptação às novas dietas. O quadro de análise de variância, incluindo-se os dados de coeficiente de variação médio dos dados de pH se encontram na Tabela 9. A Figura 10 mostra os dados comparativos do pH médio de cada tratamento. Todas as figuras apresentadas contém os valores das médias ajustadas, em função da variação do volume de saliva.

Tabela 9 - Quadro de análise de variância do pH.

C. V.	G. L.	Q. M	Valor F	Pr > F
Tratamento	7	0,01078	2,66	0,0254
Coleta	7	0,00382	1,01	0,4418
VS	1	0,00249	0,65	0,4270
Resíduo	36	0,00379		
Total	51			
Coeficiente de Variação		0,90%		

Observa-se pela tabela 9 que houve efeito de tratamento. Pela Tabela 10 observa-se que, o tratamento 5

**Figura 6. pH dos Frascos controle
(T1 a T4)**

**Figura 7. NH_3 dos Frascos controle
(T1 a T4)**

Figura 8. Degradabilidade in situ dos frascos controle (T1 a T4)

Figura 9. Relacao C2/C3 dos Frascos controle (T1 a T4)

Figura 10. pH medio dos frascos nas duas fases

diferiu dos demais, havendo um decréscimo do pH do frasco 1, da fase I para a fase II, devendo ser devido ao inesperado decréscimo do volume de saliva (VS), mesmo porque não houve diferença dos tratamentos 6, 7 e 8 quando comparados individualmente com os outros considerados controle (2, 3 e 4).

Tabela 10. Quadrados médios para efeito de tratamento sobre a variável pH. (*)

Tratamento(i) (j)	1	2	3	4	5	6	7	8
1								
2	0,31							
3	0,70	0,17						
4	0,09	0,52	0,04*					
5	0,03*	0,21	0,02*	0,61				
6	0,71	0,13	0,99	0,04	0,01**			
7	0,99	0,26	0,71	0,09	0,01**	0,63		
8	0,68	0,47	0,43	0,17	0,03*	0,34	0,62	

(*) probabilidade de se rejeitar a hipótese < que o valor indicado (H_0 : quadrado mínimo (i) diferente de (j))

Experimentos onde não se observou redução significativa na produção total de AGV causada pela adição de ionóforo também não apresentaram variação no pH. BOGAERT *et alii*

(1989) não observaram diferença entre o frasco controle, recebendo dieta volumosa, e o frasco suplementado com 33 $\mu\text{g/ml}$ de lasalocida. Semelhantemente, FULLER & JOHNSON (1981), apesar de não apresentarem as estatísticas referentes a variação no pH, obtiveram, para o frasco controle valor de 7,23, enquanto que os fermentadores recebendo 32,5, 65 e 130 $\mu\text{g/ml}$ apresentaram valores de 7,23, 7,22 e 7,21. Estes valores são referentes aos frascos recebendo dieta volumosa. Para os frascos com dieta rica em grãos, se observou valores de 7,03, 6,96, e 7,00 para os três tratamentos, enquanto o frasco controle apresentou pH de 7,09. Estes dados em conjunto mostram a ausência de efeitos da lasalocida sobre o pH dos fermentadores.

4.3.2 - Resultados de Nitrogênio Amoniacal (NH_3)

O estudo da análise de variância dos dados de NH_3 se encontram na Tabela 11. A comparação visual pode ser feita pela Figura 11.

Tabela 11 - Quadro de análise de variância do NH₃.

C. V.	G. L.	Q. M	Valor F	Pr > F
Tratamento	7	9,40410	1,81	0,1195
Coleta	7	14,21004	2,72	0,0249
VS	1	40,55165	7,81	0,0087
Resíduo	32	166,24158		
Total	47			
Coeficiente de Variação		15,46%		

A falta de efeito da lasalocida, entre tratamentos, foi provavelmente causada pelo nível baixo de nitrogênio amoniacal presente nos fermentadores, nível este que seja talvez inadequado o uso do método de nitrogênio amoniacal de CHANEY & MARBACH, pela falta de sensibilidade. Neste nível, a concentração média das amostras era de 1,7 mg/100 ml. O coeficiente de variação médio entre as quadruplicatas de cada amostra foi de 15% (dados não apresentados). O elevado coeficiente de variação entre as médias (15,46%) pode também ter sido causador da falta de efeito de tratamento. Entretanto a análise feita contrastando-se ortogonalmente a fase I com a fase II, considerando-se os fermentadores em conjunto, apresentou um valor de F de 4,43 e uma probabilidade de 0,0433, portanto significativa. Os dados

**Figura 11. Producao media (mg/dia)
de nitrogenio amoniaco dos frascos nas
duas fases**

deste trabalho, considerando-se as restrições estabelecidas acima, mostraram tendência de aumento do nível de $N-NH_3$ nos fermentadores (Figura 7). Dados da literatura mostram que a monensina pode promover diminuição da degradação de proteína, levando a elevação dos níveis de nitrogênio amoniacal ruminal *in vivo*. Entretanto, para a lasalocida, apesar desta também promover uma menor degradação de proteína, o nível de nitrogênio amoniacal não é afetado (Thivend & Jouany, 1986, citados por VAN NEVEL & DEMEYER, 1988), fato este considerado intrigante pelos autores.

4.3.3. Resultados de Degradação *in situ* da fração insolúvel (DISI)

A Tabela 12 mostra a análise de variância dos dados de DISI, realizados eliminando-se os dados obtidos nos dias 0, 1, 6 e 7, dias considerados como de adaptação às novas dietas. A Figura 12 mostra os dados comparativos da DISI média de cada tratamento.

Tabela 12 - Quadro de análise de variância da DISI.

C. V.	G. L.	Q. M	Valor F	Pr > F
Tratamento	7	220,24689	42,63	0,0001
Coleta	6	15,39127	2,98	0,0216
VS	1	1,30883	0,25	0,6185
Resíduo	29	5,16465		
Total	43			
Coeficiente de Variação		4,11%		

Observa-se pela tabela 12 que houve efeito altamente significativo de tratamento. A comparação entre tratamentos presentes na Tabela 13 mostram que 6,7 e 8 diferiram do controle e entre si, com exceção do fato de não ter havido diferença entre os tratamentos 6 e 7.

Tabela 13. Quadrados médios para efeito de tratamento sobre a variável DISI. (*)

Tratamento(i) (j)	1	2	3	4	5	6	7	8
1								
2	0,47							
3	0,92	0,42						
4	0,82	0,60	0,75					
5	0,83	0,30	0,91	0,65				
6	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**			
7	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,21		
8	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	

(*) probabilidade de se rejeitar a hipótese < que o valor indicado (H_0 : quadrado mínimo (i) diferente de (j))

Portanto, todos os níveis de lasalocida utilizados, e de forma crescente, promoveram decréscimo na degradação de fibra no rúmen. A redução, dos tratamentos controle para o 6 (1,5 $\mu\text{g/ml}$) foi de 61,54% para 50,97%, ou seja, um decréscimo de 17% na degradação. A redução promovido pelo nível intermediário (tratamento 7), quando comparado ao controle foi de 20%. Já para a dose mais elevada, esta redução foi de 27%.

Dados obtidos *in vivo* (RICKE *et alii*) mostram que a adição de lasalocida promove pequena diminuição na taxa de

Figura 12. Degradabilidade in situ
media (%) dos frascos nas duas fases

saída de líquidos do rúmen, e um maior decréscimo da taxa de saída de sólidos (13%). Este aumento no tempo de retenção de sólidos no rúmen promove maior tempo para a digestão microbiana da fibra, levando a um aumento na digestibilidade total da fibra (SPEARS, 1990). Entretanto, no presente estudo, o tempo de permanência dos alimentos foi o mesmo (48h) tanto para o controle como para as dietas com lasalocida. Sob estas condições, apenas o efeito negativo do ionóforo sobre a degradação da fibra foi permitido. Trabalhos conclusivos mostram que a adição de lasalocida *in vitro* promove uma diminuição na degradação de fibra. BOGAERT *et alii* (1989), utilizando o RUSITEC, obtiveram diminuição de 12% na degradação de celulose de papel de filtro adicionado aos fermentadores. FULLER & JOHNSON (1981) observaram um decréscimo de 5% no desaparecimento da matéria seca no RUSITEC, trabalhando com doses de 32,5, 65 e 130 $\mu\text{g/ml}$ de lasalocida.

WALLACE *et alii*, (1981) trabalhando com o ionóforo monensina, reportaram decréscimo na degradação da matéria seca de dieta a base de feno e cevada (75% de feno). Esta diminuição foi devida exclusivamente a diminuição na degradação da celulose e hemicelulose, sendo a fração não fibrosa do alimento não afetada. Na dose mais baixa utilizada (2,4 $\mu\text{g/ml}$), a redução na degradação de celulose foi de 27%, enquanto na dose mais alta (50 $\mu\text{g/ml}$) a redução foi de 55%. HENDERSON *et alii*, trabalhando com culturas puras *in vitro* a

degradação de celulose de fibras de algodão foi quase totalmente inibida com dose de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de monensina.

Estas diferenças na diminuição da degradação de fibra nos diversos trabalhos sugerem que propriedades químicas e físicas associadas às diferentes fontes de fibra influenciam a resposta, em termos de degradação destes materiais, aos ionóforos (SPEARS, 1990).

4.3.4 Resultados de Produção de AGV.

A análise de variância dos dados de produção de ácido acético se encontram na Tabela 14. Os dados dos dias 1, 8 e 9, considerados como de adaptação às novas dietas foram desconsiderados. A Figura 13 mostra os dados comparativos da produção de C₂ para os diferentes tratamentos.

Tabela 14 - Quadro de análise de variância de C₂.

C. V.	G. L.	Q. M	Valor F	Pr > F
Tratamento	7	150,18293	22,04	0,0001
Coleta	7	30,42159	4,46	0,0027
VS	1	15,53676	2,28	0,1441
Resíduo	24	6,81470		
Total	39			
Coeficiente de Variação		11,15%

Figura 13. Producao media (mm/dia) de acido acetico dos frascos nas duas fases

Os dados referentes ao ácido butírico estão apresentados na Tabela 15 e Figura 14.

Tabela 15 - Quadro de análise de variância de C₄.

C. V.	G. L.	Q. M	Valor F	Pr > F
Tratamento	7	3,91142	32,96	0,0001
Coleta	7	0,51612	4,35	0,0031
VS	1	0,09620	0,81	0,3769
Resíduo	24	0,11869		
Total	39			
Coeficiente de Variação		20,01%		

A análise das Tabelas 15 e 16 mostram que houve efeito da adição do ionóforo sobre a produção de C₂ e C₄. A presença de efeito para coleta deve ter sido causada pela adaptação dos fermentadores às novas dietas com presença de lasalocida. A observação dos dados contidos nas Tabelas 6 a 9 permite constatar que após o início da administração do ionóforo, no dia 7, os valores para estas duas variáveis tiveram tendência decrescente, atingindo seu valor mínimo no dia 16.

Os desdobramentos da análise de variância destas variáveis se encontram nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16. Quadrados médios para efeito de tratamento sobre a variável Cz (*)

Tratamento(i) (j)	1	2	3	4	5	6	7	8
1								
2	0,03*							
3	0,51	0,14						
4	0,24	0,32	0,59					
5	0,06	0,69	0,24	0,52				
6	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**			
7	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,23		
8	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,02*	0,25	

(*) probabilidade de se rejeitar a hipótese < que o valor indicado (Ho: quadrado mínimo (i) diferente de (j))

Tabela 17. Quadrados médios para efeito de tratamento sobre a variável C₄ (*)

Tratamento(i) (j)	1	2	3	4	5	6	7	8
1								
2	0,02*							
3	0,07	0,55						
4	0,45	0,10	0,26					
5	0,04*	0,66	0,85	0,19				
6	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**			
7	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,43		
8	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,05*	0,20	

(*) probabilidade de se rejeitar a hipótese < que o valor indicado (H₀: quadrado mínimo (i) diferente de (j))

A análise global dos dados de produção de C₂ e C₄ mostra uma redução altamente significativa, quando comparados os frascos tratados com os não tratados. Entre os frascos tratados a menor dosagem foi estatisticamente diferente da maior (P<0.05), sendo a dose intermediária não estatisticamente diferente das outras duas, apesar de ter apresentado valores também intermediários. Aliado a isto, a produção de C₃ foi estatisticamente superior (Tabela 19).

Figura 14. Producao (mm/dia)
de acido butirico dos frascos nas
duas fases

Tabela 18 - Quadro de análise de variância de Cs.

C. V.	G. L.	Q. M	Valor F	Pr > F
Tratamento	7	14,13333	10,78	0,0001
Coleta	7	12,96873	9,89	0,0001
VS	1	5,27696	4,02	0,0562
Resíduo	24	1,31128		
Total	39			
Coeficiente de Variação		8,27%		

Tabela 19. Quadrados médios para efeito de tratamento para a variável Cs.

Tratamento(i) (j)	1	2	3	4	5	6	7	8
1								
2	0,05*							
3	0,68	0,12						
4	0,57	0,15	0,88					
5	0,47	0,01**	0,26	0,20				
6	0,01**	0,34	0,01**	0,02*	0,01**			
7	0,01**	0,09	0,01**	0,01**	0,01**	0,25		
8	0,01**	0,12	0,01**	0,01**	0,01**	0,35	0,82	

(*) probabilidade de se rejeitar a hipótese < que o valor indicado (Ho: quadrado mínimo (i) diferente de (j))

Figura 15. Producao media (mM/dia) de acido propionico dos frascos nas duas fases

A semelhança entre os frascos tratados e o tratamento 2 não apresenta explicação, causado por algum fator não controlado, que provocou um alto valor médio de Ca no tratamento 2 (14,12, bem acima do valor médio dos tratamentos 1, 3, 4 e 5, de 12,23). Entre os tratamentos com lasalocida não houve diferença para a variável Ca como pode ser visualizado na Figura 15.

A alteração na produção individual dos ácidos resultou num decréscimo significativo na produção total de AGV (Tabelas 20 e 21, Figura 16), quando comparados os frascos controle aos tratados.

Tabela 20 - Quadro de análise de variância da produção total de AGV.

C. V.	G. L.	Q. M	Valor F	Pr > F
Tratamento	7	138,99268	9,18	0,0001
Coleta	7	93,24707	6,16	0,0003
VS	1	51,01854	3,37	0,0788
Resíduo	24	15,13618		
Total	39			
Coeficiente de Variação		9,92%		

Tabela 21. Quadrados médios para efeito de tratamento sobre a variável Total de AGV.

Tratamento(i) (j)	1	2	3	4	5	6	7	8
1								
2	0,03*							
3	0,50	0,12						
4	0,33	0,21	0,75					
5	0,10	0,48	0,34	0,52				
6	0,14	0,01**	0,04*	0,02*	0,01**			
7	0,07	0,01**	0,02*	0,01**	0,01**	0,59		
8	0,02*	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,14	0,33	

(*) probabilidade de se rejeitar a hipótese < que o valor indicado (H_0 : quadrado mínimo (i) diferente de (j))

O efeito da adição de lasalocida aos fermentadores sobre a relação C_2/C_3 foi substancial. O valor médio para os frascos controle foi de 2,20, diferindo significativamente ($P < 0,001$) dos frascos tratados, cujo valor médio foi de 1,15, quando contrastados ortogonalmente. A Figura 17 ilustra a comparação das médias dos tratamentos, e as Tabelas 22 e 23 se referem ao quadro de análise de variância para os dados da relação C_2/C_3 .

Figura 16. Producao total (mm/dia) de acidos graxos volateis dos frascos nas duas fases

Tabela 22 - Quadro de análise de variância de Cz/Cs.

C. V.	G. L.	Q. M	Valor F	Pr > F
Tratamento	7	2,09470	126,68	0,0001
Coleta	7	0,03780	2,29	0,0619
VS	1	0,00069	0,04	0,8402
Resíduo	24	0,01653		
Total	39			
Coeficiente de Variação		7,33%		

Tabela 23. Quadrados médios para efeito de tratamento para a variável Cz/Cs

Tratamento(i) (j)	1	2	3	4	5	6	7	8
1								
2	0,98							
3	0,99	0,99						
4	0,40	0,41	0,39					
5	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**				
6	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**			
7	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,02*		
8	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,01**	0,22	

(*) probabilidade de se rejeitar a hipótese < que o valor indicado (Ho: quadrado mínimo (i) diferente de (j))

Figura 17. Relacao acetico/propionico
media dos frascos nas duas fases

Dados de trabalhos onde se adicionou lasalocida a sistemas *in vitro* mostraram tendências diferentes com relação a resposta em produção desses ácidos. Decréscimo na produção de C₂ e C₄ foi observado por BARTLEY *et alii* (1979), e aumento na produção de C₃, sem que houvesse efeito na produção total de AGV. Trabalhando com o RUSITEC, FULLER & JOHNSON (1981) obtiveram redução na produção de C₂ e C₄ com doses semelhantes de lasalocida, com dieta exclusiva de feno de alfafa. Não houve aumento na produção de propiônico, na dieta de feno, levando assim a um decréscimo na produção total de AGV. Já para a dieta rica em grãos, houve aumento na produção C₃. Além disso, a relação C₂/C₃ diminuiu com ambas as dietas, não estatisticamente. Diferentemente, BOGAËRT *et alii* (1989), também com uso do RUSITEC, observaram aumento na produção de AGV total, não significativa, uma vez que aumentou a produção de C₃ ($P < 0,01$) nos fermentadores, mas não houve alteração na produção de C₂ e C₄.

Uma provável explicação para os dados de Bogaërt e colaboradores é de que estes trabalharam com inóculo de animais previamente adaptados ao ionóforo por um mês, o que não ocorreu neste experimento e nos de Fuller & Johnson e Bartley *et alii*. WALLACE *et alii* (1981) reportaram que a adaptação dos microrganismos ao ionóforo monensina leva a um aumento na produção de ácido acético, após atingida a adaptação. CHEN & WOLIN (1979) observaram que *Bacteroides ruminicola*, que inicialmente tem suas contagens altamente

diminuídas, acaba por se adaptar à presença de monensina no meio.

4.3.5 Resultados da Contagem de Protozoários

Os dados referentes a análise de variância das contagens de protozoários se encontram na Tabela 24.

Tabela 24 - Quadro de análise de variância da contagem total de protozoários.

C. V.	G. L.	Q. M	Valor F	Pr > F
Tratamento	7	2704176	1,93	0,1095
Coleta	7	14339326	10,21	0,0001
VS	1	618591	0,44	0,5132
Resíduo	24	1404535		
Total	39			
Coeficiente de Variação		36,11%		

A análise da Figura 18, onde são apresentadas as médias dos tratamentos, permite dizer que houve uma sensível redução entre as fases, confirmados pelo contraste ortogonal feito entre elas, que se mostrou estatisticamente diferente, com $P < 0,0097$. Tal fato se deveu ao conhecido efeito do

RUSITEC de este não manter a população original de protozoários do inóculo (CZERKAWSKI & BRECKENRIDGE, 1977). Pelos dados das Tabelas 6 a 9 se percebe que os valores se equilibraram ao redor do dia 5, não se alterando posteriormente, nem mesmo com adição de ionóforos.

A falta de efeito da adição de ionóforo sobre a população de protozoários vai de encontro ao reportado por CHALUPA (1984), onde se observou a elevada sensibilidade da população de entodiniomorfos à lasalocida.

Uma provável explicação para o caso do presente trabalho é que a contagem total foi feita apenas sobre o compartimento 1 do rúmen, que corresponde aos microorganismos livres em suspensão no fluido ruminal. CZWERKAWSKI (1986) observa porém que até 90% da população de protozoários pode estar associada a partícula (compartimento 3) ou fracamente associada à partículas (compartimento 2), o que foi evidenciado por BAUCHOP & CLARKE (1976). Dessa forma, é possível que tenha havido uma migração da população de protozoários do compartimento 3 para o 1, além de um efeito da lasalocida diminuindo a população total de protozoários. Para se confirmar estas especulações se faz necessário um estudo onde contagens tanto sobre o fluido como sobre o material sólido das sacolas sejam realizadas.

Figura 18. Contagem de protozoários (un./ml) dos frascos nas duas fases

5. CONCLUSÕES

* O equipamento desenvolvido pelo Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zoologia da ESALQ - USP, conhecido como Técnica de Simulação Ruminal (RUSITEC), foi considerado validado em função dos resultados obtidos, tendo ele comportado fermentação do tipo ruminal. Isto o torna interessante instrumento para estudos de manipulação da fermentação ruminal.

* O uso de baixas doses de lasalocida em sistema contínuo *in vitro*, semelhante às recomendadas *in vivo*, pode promover alterações no padrão de fermentação também semelhantes às promovidas *in vivo*.

* A degradação ruminal *in vitro* da porção fibrosa da dieta a base de BAH e farelo de algodão é diminuída pela adição do ionóforo lasalocida.

6 - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AAFJES, J.H. & NIJHOF, J.K. A simple artificial rumen giving good production of volatile fatty acids. British Veterinary Journal, 123(10): 436, 1967.
- ABE, M. & KUMENO, F. *In vitro* simulation of rumen fermentation: apparatus and effects of dilution rate and continuous dialysis on fermentation and protozoal population. J. Anim. Sci., 36(5): 941, 1973.
- ADLER, J.H.; DYE, J.A.; BODGES, D.E.; WILLIAMS, H.H. Growth of microorganisms in an *in vitro* continuous-flow system on protein-free diet. The Cornell Veterinarian, 48(1): 53, 1968.
- A.O.A.C. Official methods of analysis. Association of Official Agricultural Chemists. Tenth edition. Washington, D.C. 1965.

- BARTLEY, E.E.; HEROD, E.L.; BECHTLE, R.M.; SAPIENZA, D.A.; BRENT, B.E. Effect of monensin or lasalocid, with and without niacin and amichloral, on rumen fermentation and feed efficiency. J. Anim. Sci., 49:1066, 1978
- BAUCHOP, T. CLARKE, R. T. R. Attachment of the ciliate Epidinium crawley to plant fragments in the sheep rumen. Appl. Envir. Microb. 32: 417, 1976.
- BERGEN, W.G. & BATES, D.B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. Journal of Animal Science, 58(6): 1465, 1984.
- BERGEN, W.G.; BATES, D.B.; JOHNSON, D.E.; WALLER, J.C.; BLACK, J.R. Protein synthesis and efficiency. In: PROTEIN REQUIREMENTS FOR CATTLE: SYMPOSIUM. Oklahoma State University, 1981. Proceedings. Stillwater, Oklahoma. OWENS, F.N. Ed., 1982.
- BLANCHART, G.; DURAND, M.; BARRY, J.L.; BOUILLER-ODUDOT, M.; JOUANY, J.P. Interêts et limites des fermenteurs à flux semi-continu de type RUSITEC dans le l'étude des fermentations du rumen. Ann. Zootech. 38: 285, 1989
- BOGAERT, C.; GOMEZ, L.; JOUANY, J.P.; JEMINET, G. Effects of the ionophore antibiotics lasalocid and cationomycin on ruminal fermentation *in vitro*. Anim. Feed Sci. Tech. 27:1, 1989.

- BOWIE, W.C. *In vitro* studies of rumen microorganisms using a continuous-flow system. American Journal of Veterinary Research 23: 852, 1962.
- CASSELL, E.A. Rapid graphical method for estimating the precision of direct microscopic counting data. Applied Microbiology, 13(3): 293-296. 1965.
- CASTRO, F.B. Avaliação do processo de digestão de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum sp L.*) auto-hidrolisado em bovinos. Piracicaba, 1989. 123p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP).
- CHALUPA, W. Chemical control of rumen microbial metabolism. In: RUCKEBUSH, Y. & THIVEND, P. Digestive physiology and metabolism in ruminants. Lancaster, M T P Press Ltd, 1980 vol 16, 325-327p.
- CHALUPA, W. Manipulation of rumen fermentation. In Recent Advances in Animal Nutrition. ed. W. Haresign & D.J.A. Cole. London, Butterworths, 1984, 143-60p.
- CHANEY, A.L. & MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. J. Clinical Chemistry. 8: 130-132, 1962.

- CHEN, M. & WOLIN, M.J. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 38(1) : 72, 1979.
- CZERKAWSKI, J.W. A simple model to describe the flow of large and small particles in the rumen systems. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE USE OF NUCLEAR TECHNIQUES IN STUDIES ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH IN DIFFERENT ENVIRONMENTS, 1, Viena, 1986. Proceedings Viena, International Atomic Energy Agency, 1986 488-499.
- CZERKAWSKI, J.W. An introduction to rumen studies. Pergamon Press, Oxford, England. 1986. 236p.
- CZERKAWSKI, J. & BRECKENRIDGE, G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (RUSITEC). British Journal of Nutrition. 38: 371. 1977.
- CZERKAWSKI, J.W. & BRECKENRIDGE, G. Effect of dilution rate on distribution and composition of bacterial matter in RUSITEC, using soluble food in presence of undigested hay residues. Proc. Nutr. Soc. 38 : 120A, 1979.

CZERKAWSKI, J.W. & BRECKENRIDGE, G. Experiments with long-term rumen simulation technique (RUSITEC); use of soluble food and an inert solid matrix. British Journal of Nutrition.42: 229, 1979.

CZERKAWSKI, J.W. & BRECKENRIDGE, G. Distribution and changes in urease (EC 3.5.1.5.) activity in rumen simulation technique (RUSITEC) Br. J. Nutr. 47: 331, 1982.

CZERKAWSKI, J.W.; PIATOVA, M.; BRECKENRIDGE, G. Microbial metabolism of 1,2 propanediol studied by rumen simulation technique.(RUSITEC)> J. Appl. Bact. 54: 81, 1984.

FULLER, J.R. & JOHNSON, D.E. Monensin and lasalocid effects on fermentation *in vitro*. Journal of Animal Science. 53(6) : 1574, 1981.

GOERING, H.K. & VAN SOEST, P.J. Forage fiber analyses (Apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington, D.C. Agricultural Research Service, USDA. 19p. Agricultural Research Handbook, #379. 1970.

HARRISON, D.E.F & TOPPIWALA, H.H. Transient and oscillatory states of continuous culture. In: Advances in Biochemical Engineering, vol 3 . Berlin, Springer-Verlag, 1974.

- HENDERSON, C.; STEWART, C.S.; NEKREP, F.V. The effect of monensin on pure cultures and mixed cultures of rumen bacteria. Journal of Applied Bacteriology, 51: 159, 1981.
- HERBERT, D.; ELSWORTH, R.; TELLING, R.C. The continuous culture of bacteria: a theoretical and experimental study. Journal of General Microbiology, 14: 601, 1956.
- HILLAIRE, M.C.; JOUANY, J.P.; FONTY, G. Wheat straw degradation, in , RUSITEC, in the presence and absence of rumen anaerobic fungi. Proc. Nutr. Soc. 49(2): 127A, 1990.
- HILLMAN, K.; LLOYD, D.; WILLIAMS, A.G. Continuous monitoring of fermentation gases in an artificial rumen system (RUSITEC) using a membrane-inlet probe on portable quadrupole mass spectrometer. In: DEGN, H., ed. Gas Enzimology. Reidel Publishing Company, 1985. p.201-6.
- HOBSON, P.N. Continuous culture of rumen bacteria: apparatus. Journal of General Microbiology, 38: 161, 1965a.
- HOBSON, P.N. Continuous culture of some anaerobic and facultatively anaerobic rumen bacteria. Journal of General Microbiology, 38: 167, 1965b.
- HOBSON, P.N. & SUMMERS, R. The continuous culture of anaerobic bacteria. Journal of General Microbiology, 47: 53, 1967.

- HODDER, W.H.; CROOKER, B.A.; SNIFFEN, C.J. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoal numbers in continous cultures of rumen contents. Journal of Animal Science. 43(2): 528, 1976.
- HUHTANEN, C.N. & GALL, L.S. The miniature artificial rumen and its uses. Journal of Animal Science. 11: 766, 1952.
- HUNGATE, R.E. The rumen and its microbes. New York, Academic Press, 1966. 534p.
- ISAACSON, H.R.; HINDS, F.C.; BRYANT, M.P.; OWENS, F.N. Efficiency of energy utilization by mixed rumen bacteria in continous culture. Journal of Dairy Science. 58(11) : 1645, 1975.
- JOHNSON, R.R. *In vitro* rumen fermentation techniques. In: SYMPOSIUM ON MICROBIAL DIGESTION IN RUMINANTS. Journal of Animal Science. 125: 792, 1966
- KASHKET, E.R. The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. Annual Rev. Microbiology, 39 : 219, 1985.
- KRISHNA, G. CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various preparations of spent hops (Humulus lupulus L.) using the rumen simulation technique (RUSITEC). Agricultural Wastes, 17 : 99, 1986.

- LOUW, J.G.; WILLIAMS, H.H.; MAYNARD, L.A. A new method for the study *in vitro* of rumen digestion. Science, 110: 476, 1949.
- MACHADO, P.F. Estudo dos efeitos da combinação isoácidos-monensina sobre a fermentação ruminal e desempenho de vacas em lactação. Tese Livre-Docência. Piracicaba. ESALQ - USP; 1986. 100p.
- MCDUGALL, E.I. Studies on ruminant saliva I. The composition and output of sheep saliva. Biochemical Journal, 43: 99, 1948
- MONOD, J. La technique de culture continue: théorie et applications. Annales de L'Institut Pasteur, Paris, 1950. vol.79, p.390.
- NEWBOLD, C.J. & WALLACE, R.J. Effects of the ionophores monensin and tetronasin on simulated development of ruminal lactic acidosis *in vitro*. Appl. Environ. Microb. 54 (12): 2981, 1988.
- N.R.C. Nutrient requirements of beef cattle. Sixth Revised Edition, Washington, D.C. 1984.
- PEARSON, R.M. & SMITH, J.A.B. The utilization of urea in bovine rumen III. The synthesis and breakdown of protein in rumen ingesta. The Biochemical Journal, 37 :153, 1943.

- PURSER, D.B. & MOIR, R.J. Ruminant flora studies in the sheep IX. The effects of pH on ciliate population of the rumen *in vivo*. Aust. J. Agr. Res., **10**: 555-564, 1959.
- RICHARDSON, L.F.; RAUN, A.P.; POTTER, E.L.; COOLEY, C.O.; RATHMACHER, R.P. Effect of monensin on rumen fermentation *in vitro and in vivo*. Journal of Animal Science, **43**: 657, 1976.
- RICKE, S.C.; BERGER, L.L.; VAN DEN AAR, P.J.; FAHEY, G.C. Jr. Effects of lasalocid and monensin on nutrient digestion, metabolism and rumen characteristics of sheep. J. Anim. Sci. **58**:194. 1984.
- RUFENER, W.H.; NELSON, W.D.; WOLIN, M.J. Maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. Applied Microbiology, **11**: 196, 1963.
- RUSSEL, J.B. A proposed model of monensin action in inhibiting rumen bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. J. Anim. Sci. **64**: 1519, 1987.
- RUSSEL, J.B. & STROBEL, H.J. Effects of ionophores on ruminal fermentation. Applied and Environmental Microbiology, **55**(10): 1, 1989.

SATTER, L.D. & SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. Br. J. Nutr. 32:199, 1974.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS User's Guide. Cary, SAS Inst. Inc., 1985.

SLYTER, L.L.; NELSON, W.O.; WOLIN, M.J. Modifications of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture. Applied Microbiology, 12(4): 374, 1964.

SPEARS, J.W. Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants. Journal of Nutrition, 120: 632, 1990.

STANIER, G. & DAVIES, A. Effects of the antibiotic monensin and an inhibitor of methanogenesis on *in vitro* continuous rumen fermentation. British Journal of Nutrition, 45: 567, 1981.

VAN NEVEL, C.J. & DEMEYER, D.I. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. Applied and Environmental Microbiology, 34(3): 251, 1977.

VAN NEVEL, C.J. & DEMEYER, D.I. Manipulation of rumen fermentation. In. The Rumen Microbial Ecosystem. ed. P.N. Hobson. Elsevier, Essex, England. 1988. 387-443p.

VAN SOEST, P.J. Nutritional Ecology of the Ruminant. O & B Books, Corvallis, USA. 1982. 374p.

WALLACE, R.J.; CHENG, K.J.; CZERKAWSKI, J.W. Effect of monensin on fermentation characteristics of the artificial rumen. Applied and Environmental Microbiology, 40:672, 1980.

WALLACE, R.J.; CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G. Effect of monensin on the fermentation of basal rations in the rumen simulation technique (RUSITEC). British Journal of Nutrition, 46: 131, 1981.

WARNER, A.C.I. Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen micro-organisms in so-called artificial rumen systems. Journal of General Microbiology, 14: 733, 1956.

WASSERMAN, R.H.; DUNCAN, C.W.; CHURCHILL E.S.; HUFFMAN, G.F. The effects of antibiotics on *in vitro* cellulose digestion by rumen micro-organisms. Journal of Dairy Science, 35: 571, 1952.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Analytical Chemistry, 39 (8): 971, 1967.

APENDICE

Tabela 1. Coeficientes de correlação entre as variáveis tomadas no frasco 1.

	Volume	pH	NH3	DISI	DIST	C2	C3
VOLUME	1,00	0,70	0,35	0,15	0,15	0,69	0,79
pH	0,70	1,00	-0,14	0,35	0,28	-0,34	0,18
NH3	0,35	-0,14	1,00	-0,09	0,00	0,57	0,07
DISI	0,15	0,35	-0,09	1,00	0,99	0,45	0,63
DIST	0,15	0,28	0,00	0,99	1,00	0,48	0,59
C2	0,70	-0,34	0,57	0,45	0,48	1,00	0,75
C3	0,79	0,18	0,07	0,63	0,59	0,75	1,00
C4	0,32	-0,60	0,04	0,38	0,34	0,72	0,54
Total	0,76	-0,26	0,38	0,58	0,57	0,96	0,89
C2/C3	-0,51	-0,70	0,47	-0,51	-0,44	0,04	-0,69
Protozoa	0,39	0,04	-0,31	0,60	0,60	0,62	0,95
	C4	Total	C2/C3	Protozoa			
VOLUME	0,32	0,76	-0,50	0,39			
pH	-0,60	-0,26	-0,70	0,04			
NH3	0,04	0,38	0,47	-0,31			
DISI	0,38	0,58	-0,51	0,60			
DIST	0,34	0,57	-0,43	0,60			
C2	0,72	0,96	-0,04	0,62			
C3	0,54	0,90	-0,69	0,95			
C4	1,00	0,73	0,05	0,64			
Total	0,73	1,00	-0,29	0,80			
C2/C3	0,04	-0,29	1,00	-0,81			
Protozoa	0,64	0,80	-0,81	1,00			

Tabela 2. Coeficientes de correlação entre as variáveis tomadas no frasco 2.

	Volume	pH	NH3	DISI	DIST	C2	C3
VOLUME	1,00	-0,36	0,20	0,25	0,25	0,64	0,84
pH	-0,36	1,00	-0,65	-0,51	-0,51	-0,63	0,38
NH3	0,20	0,65	1,00	-0,09	-0,70	-0,37	0,31
DISI	0,25	-0,50	-0,70	1,00	1,00	0,67	0,22
DIST	0,25	-0,50	-0,70	1,00	1,00	0,97	0,22
C2	0,64	-0,63	-0,37	0,67	0,67	1,00	0,68
C3	0,84	0,38	0,31	0,22	0,22	0,68	1,00
C4	0,52	-0,73	-0,56	0,73	0,74	0,97	0,52
Total	0,71	-0,55	-0,26	0,60	0,60	0,99	0,78
C2/C3	0,23	-0,74	-0,74	0,89	0,89	0,80	0,11
Protozoa	0,00	-0,27	-0,31	0,43	0,43	0,69	0,73
	C4	Total	C2/C3	Protozoa			
VOLUME	0,52	0,71	0,23	0,00			
pH	-0,73	-0,55	-0,74	-0,27			
NH3	-0,56	-0,26	0,74	-0,12			
DISI	0,73	0,60	0,89	0,43			
DIST	0,74	0,60	0,89	0,44			
C2	0,97	0,99	0,80	0,69			
C3	0,52	0,78	0,11	0,73			
C4	1,00	0,94	0,88	0,65			
Total	0,94	1,00	0,71	0,73			
C2/C3	0,88	0,71	1,00	0,26			
Protozoa	0,65	0,73	0,26	1,00			

Tabela 3. Coeficientes de correlação entre as variáveis tomadas no frasco 3.

	Volume	pH	NH3	DISI	DIST	C2	C3
VOLUME	1,00	0,07	0,68	0,76	0,75	0,83	0,06
pH	0,07	1,00	0,36	0,10	0,11	0,15	-0,30
NH3	0,68	0,36	1,00	0,61	0,61	0,55	0,39
DISI	0,76	0,10	0,61	1,00	1,00	0,95	-0,16
DIST	0,75	0,11	0,61	1,00	1,00	0,95	-0,15
C2	0,83	0,15	0,55	0,95	0,95	1,00	-0,08
C3	0,06	-0,30	0,39	-0,16	-0,15	-0,08	1,00
C4	0,81	0,06	0,45	1,00	1,00	0,98	-0,23
Total	0,84	0,08	0,61	0,91	0,91	0,99	0,07
C2/C3	0,79	0,21	0,44	0,99	0,99	0,96	-0,35
Protozoa	0,38	-0,36	0,16	0,63	0,63	0,74	0,37
	C4	Total	C2/C3	Protozoa			
VOLUME	0,80	0,84	0,79	0,38			
pH	0,06	0,08	0,21	-0,36			
NH3	0,45	0,61	0,44	0,16			
DISI	0,99	0,91	0,99	0,63			
DIST	0,99	0,91	0,99	0,63			
C2	0,98	0,99	0,96	0,74			
C3	-0,23	0,07	-0,35	0,37			
C4	1,00	0,95	0,98	0,67			
Total	0,95	1,00	0,90	0,80			
C2/C3	0,98	0,90	1,00	0,51			
Protozoa	0,67	0,80	0,51	1,00			

Tabela 4. Coeficientes de correlação entre as variáveis tomadas no frasco 4.

	Volume	pH	NH3	DISI	DIST	C2	C3
VOLUME	1,00	0,31	-0,06	0,45	0,44	0,30	0,03
pH	0,31	1,00	-0,02	-0,43	-0,48	-0,50	-0,17
NH3	-0,06	-0,02	1,00	-0,63	-0,63	-0,69	0,60
DISI	0,45	-0,43	-0,63	1,00	0,99	0,95	0,27
DIST	0,44	-0,48	-0,63	0,99	1,00	0,95	0,26
C2	0,31	-0,50	-0,69	0,95	0,95	1,00	-0,08
C3	0,03	-0,17	0,60	0,26	0,26	-0,08	1,00
C4	0,29	-0,38	-0,76	0,94	0,94	0,98	-0,24
Total	0,31	-0,58	-0,58	0,92	0,92	0,98	0,11
C2/C3	0,27	-0,39	-0,83	0,94	0,94	0,94	-0,40
Protozoa	0,22	-0,81	0,26	0,39	0,34	0,60	0,67
	C4	Total	C2/C3	Protozoa			
VOLUME	0,29	0,31	0,27	0,22			
pH	-0,38	-0,58	-0,39	-0,81			
NH3	-0,76	-0,58	-0,83	0,26			
DISI	0,94	0,92	0,94	0,39			
DIST	0,94	0,92	0,94	0,34			
C2	0,98	0,98	0,94	0,60			
C3	-0,23	0,11	-0,40	0,67			
C4	1,00	0,94	0,97	0,54			
Total	0,94	1,00	0,86	0,71			
C2/C3	0,97	0,86	1,00	0,23			
Protozoa	0,54	0,71	0,23	1,00			

Tabela 5. Volume diário de saliva infundido (ml) nos fermentadores.

Dia	FRASCO 1	FRASCO 2	FRASCO 3	FRASCO 4
1	864	598	860	919
2	844	865	866	875
3	857	771	956	776
4	758	594	805	854
5	1016	710	944	740
6	728	735	930	837
7	975	730	779	978
8	702	502	537	710
9	614	842	687	840
10	643	550	545	673
11	613	675	715	618
12	687	668	649	830
13	765	707	715	851
14	780	793	775	190
15	665	703	640	950
16	495	545	563	890