UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

FLÁVIA ALVES MELO

**Pré-incubação de fezes para utilização como fonte alternativa de inóculo
microbiano para bioensaios *in vitro***

Pirassununga/SP

2018

FLÁVIA ALVES MELO

**Pré-incubação de fezes para utilização como fonte alternativa de inóculo
microbiano para bioensaios *in vitro***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos para
obtenção do título de Mestre em Ciências do
programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade e Animal

Orientador: Prof. Dr. Ives Cláudio da Silva
Bueno

Pirassununga/SP

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MF589p Melo, Flávia
Pré-incubação de fezes para utilização como fonte
alternativa de inóculo microbiano para bioensaios in
vitro / Flávia Melo ; orientador Ives Bueno. --
Pirassununga, 2018.
44 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Nutrição de ruminantes. 2. Avaliação de
alimentos. 3. Produção de gases in vitro. 4. inóculo
alternativo. I. Bueno, Ives, orient. II. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Flávia Alves Melo

Título: Pré-incubação de fezes para utilização como fonte alternativa de inóculo microbiano para bioensaios *in vitro*

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos para obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Professor Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Professor Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Professor Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico minha mãe Célia R. A. Melo e a minha irmã Débora R. Melo,
por toda luta, apoio, compreensão e amor que me oferecem.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus que me abençoa em todo momento.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos e ao seu corpo docente e funcionário, em especial aos professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação de Zootecnia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa.

Ao Prof. Dr. Ives Claudio da Silva Bueno, que me recebeu de braços abertos em sua equipe, que teve toda paciência e dedicação comigo durante este tempo que trabalhamos juntos e soube compreender minhas dificuldades práticas e pessoais, podendo assim me orientar e me dar todo apoio que foi preciso. Obrigada professor, o senhor foi fundamental para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À minha mãe Célia, por sempre estar ao meu lado, por todo carinho, amor e esforço para dar o melhor para mim. À minha irmã Débora que me apoia e me protege. Ao meu tio Henrique que me auxilia em resolver os meus problemas da maneira mais racional e tranquila. Obrigada por vocês sempre estarem ao meu lado, me aconselhando, apoiando e me dando força para tudo. Vocês são muito especiais para mim, amo vocês.

Ao meu pai, que com certeza me protege e certamente é meu anjo da guarda.

À Gabi Benetel, que além de companheira de pós-graduação, foi como uma irmã para mim, suportou todas as minhas crises, meus dias de mau humor, ela sempre ao meu lado com muita paciência. Além de ter me ajudar muito em tudo em relação ao meu projeto, ela foi a minha família em Pirassununga, estive ao meu lado nos momentos mais difíceis.

À toda equipe do Laboratório de Fermentabilidade Ruminal, pois sem uma equipe companheira não seria possível a realização deste trabalho.

Ao meu sobrinho que amo muito, que é minha alegria.

Ao meu namorado que esta ao meu lado, me apoiando, me ajudando em tudo que esta ao seu alcance e que nos momentos que precisava de uns puxões de orelhas ele sempre esteve disposto.

Ao meu cunhado Allan, por sempre me deixar atualizada em relação ao mercado agropecuário, por me incentivar como Zootecnista. E me mostrar que a vida não precisa ser levada tão a sério, mas que tudo tem suas consequências.

Aos professores Paulo Mazza e Ricardo Moro por participarem da minha banca de qualificação e darem sugestões que foram muito importantes para o termino do meu trabalho.

Aos meus avôs, meus tios e primos, pelo incentivo de cada um.

À minha amiga Keka, por todas as conversas divertidas que temos.

E a todos professores, colegas e funcionários, que de alguma forma me ajudaram e torceram por mim durante esses anos.

Aos animais, que participaram para que meu aprendizado fosse mais completo, que de alguma maneira conseguiam transmitir alegria e carinho.

E claro, aos meus cachorros por todo companheirismo, amizade, amor e alegria.

Obrigada a todos!

RESUMO

MELO, F.A. **Pré-incubação de fezes para utilização como fonte alternativa de inóculo microbiano para bioensaios *in vitro***. 2018. 43 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

As técnicas *in vitro* de produção de gases são usualmente empregadas em pesquisas na nutrição de ruminantes com a finalidade de simular a fermentação ruminal, possuindo diversas vantagens como facilidade de adoção, repetibilidade, uso minimizado de animais e baixo custo. Para tanto, é necessário a coleta de conteúdo ruminal, a qual geralmente é obtida com o uso de animais fistulados no rúmen, no entanto este tipo de cirurgia esta cada vez mais contestada. Frente a esse duelo, há um crescente interesse científico por pesquisas que forneçam alternativas ao inóculo ruminal. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de inóculo fecal submetidos à pré-incubações em substituição ao inóculo ruminal de bovinos na técnica *in vitro* de produção de gases em bioensaio de metanogênese (24 h) e de cinética fermentativa (72 h). Como doadores de inóculos ruminal e fecal foram utilizadas quatro novilhas Nelore portadoras de cânulas ruminal. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com cinco tratamentos e quatro blocos com duas réplicas analíticas para cada repetição. Sendo os tratamentos os inóculos: conteúdo ruminal (CR), fezes sem pré-incubação (F_0), e fezes com 12, 24 e 36 h de pré-incubação (F_{12} , F_{24} e F_{36} , respectivamente). Foram avaliados os efeitos da pré-incubação das fezes quando utilizado como inóculo fecal sobre a estimativa da degradabilidade ruminal, produção de metano e parâmetros de fermentabilidade. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS 9.3 verificando a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias, em seguida foram realizadas as comparações das médias pelo teste de Tukey. Em ambos os bioensaios (24 e 72 horas), os inóculos fecais pré-incubados por 24 ou 36 horas mostraram-se bom substituto ao inóculo ruminal para análises de degradabilidade *in vitro* da matéria seca e orgânica. Para as variáveis produção de total de ácidos graxos, perfil de ácidos graxo de cadeia curta, relação acético:propiónico e nitrogênio amoniacal, o inóculo sem pré-incubação (FE_0) foi o que mais se aproximou do inóculo referência. Para as produções de gases, produção de metano e fator de partição da matéria seca e matéria orgânica as fezes não foram eficientes.

Palavras-chave: bovinos, cinética fermentativa, conteúdo ruminal, metanogênese, produção de gases *in vitro*

ABSTRACT

MELO, F.A. **Pre-incubation of faeces for use as an alternative source of microbial inoculum for in vitro bioassays**. 2018. 43 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

The in vitro techniques of gas production are usually used in ruminant nutrition research with the purpose of simulating ruminal fermentation. This technique has several advantages such as ease of adoption, repeatability, minimized use of animals and low cost. Therefore, is necessary the collection of ruminal content, which is usually obtained with the use of fistulated animals in the rumen, however this type of surgery is increasingly challenged. Faced with this duel, there is a great scientific interest in research that provides alternatives to the ruminal inoculum. The objective of this research was to evaluate the use of fecal inoculum submitted to preincubation to replace rumen inoculum of Nelore in the in vitro technique of gas production in bioassay of methanogenesis (24 h) and fermentative kinetics (72 h). Four Nelore carrying ruminal cannula were donors of ruminal content and feces. The experimental design was a randomized block, with five treatments and four blocks with two analytical replicates for each replicate. The treatments were the inocula: ruminal contents (RC), faeces without preincubation (F0), and faeces with 12, 24 and 36 hours of preincubation (F₁₂, F₂₄ and F₃₆, respectively). Estimates of ruminal degradability, methane production and ruminal fermentability were evaluated. The data were analyzed by the statistical program SAS 9.3 verifying the normality of the residues and the homogeneity of the variances, the averages were compared by the Tukey test. In the two bioassays (24 and 72 hours), the fecal inocula preincubated for 24 or 36 hours were good substitute for the ruminal inoculum in analyzes of in vitro degradability of dry and organic matter. For the variables production of total fatty acids, short chain fatty acid profile, acetic: propionic and ammoniacal nitrogen, the inoculum without pre-incubation (F_{E0}) approached the reference inoculum. For gas production, methane production and partitioning factor of dry matter and organic matter were not efficient.

Keywords: bovine, fermentative kinetics, ruminal content, methanogenesis, in vitro gas production

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Nutrição e técnicas de avaliação de alimentos	11
2.2. Produção de gases <i>in vitro</i>	12
2.3. Microbiota do ruminal	13
2.4. Inóculo fecal	14
3. HIPÓTESE	16
4. OBJETIVOS	16
5. MATERIAL E MÉTODOS	16
5.1. Delineamento e tratamentos	16
5.2. Animais doadores	18
5.3. Coleta, preparo e pré-incubação dos inóculos	18
5.4. Inoculação	21
5.5. Bioensaio de metanogênese (BM)	22
5.6. Bioensaio de cinética fermentativa (BCF)	23
5.7. Análises	24
5.7.1. Composição química dos substratos	24
5.7.2. Degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica	24
5.7.3. Mensuração de pH	24
5.7.4. Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	24
5.7.5. Determinação de nitrogênio amoniacal	25
5.7.6. Análises estatísticas	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÕES	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

As perspectivas para o crescimento demográfico para 2050 é um aumento de 25% em relação à população de 2013 de 7,3 bilhões de pessoas (ONU, 2013). Com isso haverá uma necessidade no aumento da produção de alimentos, esta produção deverá ser muito eficiente, de maneira que produza maior quantidade de alimento utilizando menos recursos naturais (ARMSTRONG, 2009).

O Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo com 219 milhões de cabeças, cerca de 13,4% do rebanho mundial (ABIEC, 2017). Considerando a necessidade de crescimento de produção de alimento obtida através de melhoria na eficiência da produção, juntamente com o potencial produtivo brasileiro, uma alternativa seria focar nas lacunas da produção para conseguir atender a demanda exigida.

É conhecido que o aumento na eficiência da produção de ruminantes está bastante relacionado com fatores ligados à nutrição, sendo um deles o aproveitamento dos nutrientes, que podem garantir o melhor desempenho do animal. O bom aproveitamento de nutrientes sugere que grande parte da energia oferecida para o animal tenha sido aproveitada por ele e pela população microbiana presente no rúmen. Assim, avaliar a qualidade dos nutrientes e seu aproveitamento digestivo e metabólico é de grande importância (CANESIN et al., 2012).

Há diversas pesquisas que buscam avaliar o aproveitamento dos nutrientes ofertados na dieta e diferentes metodologias são utilizadas para este fim. Metodologias *in vitro* estão sendo cada vez mais empregadas nas pesquisas relacionadas à nutrição de ruminantes. No geral, há ampla aceitação das técnicas *in vitro*, isto devido à facilidade de sua adoção, repetibilidade, uso minimizado de animais e, também, ao baixo custo em relação às análises realizadas *in vivo* (GETACHEW et al., 2005).

As técnicas *in vitro* são usualmente empregadas com finalidade de simular a fermentabilidade ruminal, através da análise do perfil fermentativo e da quantificação de diversas variáveis como: ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal (N-NH_3), pH, metanogênese, variações nas populações microbianas e degradabilidade de nutrientes. Para execução da

técnica *in vitro* de fermentabilidade ruminal proposta por Bueno et al. (2005), faz-se necessária a utilização de amostras conteúdo ruminal (CR), onde durante as análises *in vitro* o CR é utilizado como inóculo, com função de fornecer uma microbiota que represente a existente no rúmen. Para obtenção de CR geralmente são obtidas de animais fistulados através de cirurgia, na qual se implanta uma cânula de borracha na parede ruminal após o afastamento da musculatura da parede abdominal e a sutura do rúmen ao peritônio e à pele (MUZZI et al., 2009). Também se pode obter o conteúdo ruminal através de sonda via esofágica, porém a coleta de conteúdo ruminal via cânula, possui a vantagem de obter uma amostra mais homogênea, enquanto pela coleta via sonda é mais difícil de alcançar uma representatividade amostral (LAVEZZO et al., 1988).

Na corrida em busca do aumento da produtividade de maneira mais eficiente, vem crescendo as preocupações relacionadas ao bem-estar dos animais, que contestam métodos que necessitam de animais fistulados, por sugerir que tal cirurgia seja considerada invasiva ao organismo do animal, tornando-se uma questão ética a ser discutida. Assim, há uma tendência na redução de pesquisas utilizando animais fistulados e uma crescente busca por materiais alternativos, para serem usados como inóculo, de maneira que não se faça necessária a utilização de conteúdo ruminal como padrão para análise e que também tragam resultados fidedignos.

A busca por fontes de inóculos alternativos vem sendo bastante estudada, utilizando diversas metodologias para manipulação deste inóculos, em técnicas de produção de gases já validadas. Com isso, surge a necessidade de validação de uma técnica para manipulação destes inóculos oriundos de fezes.

Portanto, este trabalho visa buscar uma alternativa de manipulação das fezes de bovinos, para que possam ser utilizadas como inóculo em análises de bioensaios *in vitro*, visto que a utilização de animais fistulados está se tornando atípica nesta área de estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Nutrição e técnicas de avaliação de alimentos

A nutrição está entre os principais custos da produção de ruminantes. Lopes et al. (2010) verificaram que 46,62% do custo de produção de fêmeas bovinas, da raça holandesa, nas fases de cria e recria, são referentes à alimentação. Gabler et al. (2000) encontraram despesas com alimentação ainda maiores, variando de 60,3 a 64,0%. Essa variação nos custos entre as duas pesquisas podem estar relacionada com o tipo de alimentação e também com os avanços ocorridos durante esses 10 anos em relação à nutrição. Portanto, sendo a alimentação o principal custo da produção de bovinos, é de extrema importância atingir o máximo de êxito neste ponto, obtendo-se assim o desempenho esperado.

A eficiência no desempenho dos animais está diretamente influenciada pelo consumo, que, por sua vez, tem relação com a concentração ou deficiência de nutrientes nos alimentos (ROMNEY; GILL, 2000). O consumo pode ser afetado por vários fatores, dentre eles: concentração de fibra no alimento, deficiência de proteína bruta e fósforo, elevada umidade, tipo de processamento, palatabilidade, estado de conservação, e também fatores físicos e fisiológicos dos ruminantes (LANA, 2007). O valor nutritivo da alimentação para ruminantes é determinado pela concentração dos componentes, assim como a taxa passagem e a digestão (SALLAN et al., 2010). Conhecer os alimentos e entender todo o mecanismo de digestão dos alimentos é de extrema importância para se alcançar o máximo de eficiência e desempenho na produção de ruminantes (JOBIM et al., 2011).

Há um grande número de técnicas para se avaliar os alimentos com o propósito de prever o desempenho animal, a partir de certas características dos alimentos (BUENO, 2002). Entre as técnicas existentes, podem ser citados métodos *in vivo*, *in vitro* e *in situ*. Ensaios *in vivo* envolvendo produção animal e digestibilidade são os melhores métodos para determinação dos valores nutricionais dos alimentos utilizados na nutrição de ruminantes (BERCHIELLI et al., 2006). A principal vantagem das avaliações *in vivo* é a possibilidade de se aproximar ao máximo das condições normais do ambiente, podendo assim

obter dados mais exatos sobre o valor nutritivo do alimento. Porém, esse método acaba sendo mais trabalhoso e de maior custo (ZICARELLI et al., 2011).

As técnicas *in situ* propostas por Mehrez e Ørskov (1977) são bastante utilizadas em pesquisas para estimar os parâmetros de degradação ruminal. A técnica é interessante por permitir um contato direto do substrato (ingrediente a ser estudado) com o ambiente ruminal, não necessitar de muitos animais e pode ser considerada rápida. Um ponto de entrave nesta técnica é a necessidade da utilização de animais canulados e há algumas críticas quanto à dificuldade de ação dos protozoários dentro das sacolas de náilon utilizadas na técnica.

Já a utilização de técnicas *in vitro*, para determinação da degradação dos alimentos, possuem os benefícios de serem rápidas, manterem a uniformidade físico-química do local de fermentação, menor custo e a vantagem de necessitarem de poucos animais fistulados (MALAFAIA et al., 1998).

2.2. Produção de gases *in vitro*

A técnica de produção de gases (THEODOROU et al., 1994; com adaptações de MAURÍCIO et al. 1999 e BUENO et al., 2005), é uma metodologia eficiente para estudar o valor nutritivo de alimentos por estimar os valores de digestibilidade aparente *in vivo* (MAURICIO et al., 1999). É uma metodologia que apresenta uma alta correlação com a digestibilidade e degradabilidade dos alimentos (MENKE et al., 1979; THEODOROU et al., 1994; BLUMMEL et al., 1997; MAURICIO et al., 1998; BUENO et al., 1999), por isso, é largamente utilizada. Esta técnica baseia-se no princípio da degradação dos nutrientes pela população de microrganismos presentes no rúmen, permite simular o ambiente ruminal *in vitro*, medir o desaparecimento do alimento no decorrer do tempo e mensurar a produção de gases (BUENO, 2002). Sendo assim, são técnicas bastante utilizadas para avaliação de alimentos. Também são muitas vezes utilizadas para avaliar efeitos que os alimentos possam ter na fermentação ruminal, degradabilidade da matéria orgânica e na produção de metano (ABDALLA et al., 2008).

Contudo, devido à precisão da técnica, pequenas variações podem gerar efeitos acumulativos sobre a produção de gases (ALVES, 2010). As principais variações estão associadas à coleta e à amostragem dos microrganismos ruminal, podendo conduzir a erros de estimativa (MOULD et al., 2005). Dentre as fontes de variação também estão os equipamentos utilizados (RYMER; GIVENS, 1997; LOWMAN et al., 1998; LÓPEZ et al., 1998), a espécie doadora do inóculo (CALABRÓ et al., 2004; CONE et al., 2002), a dieta do animal doador (CONE et al., 1996), o local de amostra do conteúdo ruminal no rúmen (MUETZEL et al., 2001), ao horário de coleta e ao método de obtenção do conteúdo ruminal (RYMER et al., 2005) e, por fim, a preparação do inóculo ruminal (PELL; SCHOIELD, 1993; RYMER et al., 1999). As fistulas ruminais facilitam na obtenção de uma coleta mais homogênea, porém, necessitam de animais com cirurgia (SALLES et al., 2003). Estas fontes variações podem ocasionar erros nos experimentos, ou diferença de resultados entre experimentos.

2.3. Microbiota do ruminal

O ambiente ruminal é considerado um ecossistema anaeróbio, que em condições normais possui uma temperatura média de 39 °C e pH próximo a 6,7. A população microbiana ruminal é composta por quatro tipos de microrganismos ativos no seu interior: bactérias, protozoários, arqueias e fungos (MARTINEZ et al., 2010), sendo as bactérias e arqueias constituintes de 60 a 90% da biomassa microbiana com cerca de 200 espécies (KOZLOSKI, 2002). Também é possível encontrar no ambiente ruminal vírus bacteriófagos, que são denominados viromes (ROSS et al., 2013). A relação existente entre o ruminante e os microrganismos é de simbiose. A população microbiana converte os alimentos em proteína microbiana e os produtos da fermentação podem ser utilizados pelo animal. Há um grande sinergismo e antagonismo entre os diferentes grupos de microrganismos presente no rúmen, o que dificulta o estudo dos grupos de maneira isolada (KAMRA, 2005).

A ação combinada existente dentro desta população possibilita a fermentação anaeróbia dos alimentos, permitindo a degradação pela ação de

complexos enzimáticos, que agem sobre a parede celular das plantas (VARGA; KOLVER, 1997).

A maior parte dos nutrientes do alimento, principalmente as fontes energéticas e proteicas, é transformada em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), em massa microbiana e em gases, como metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) e hidrogênio (H_2) (BAKER, 1999).

A fermentação ruminal de polissacarídeos (celulose, hemicelulose, pectina e amido) resulta na produção de ATP, que é utilizado no crescimento microbiano e na produção de ácidos graxos de cadeia curta, que fornecerão aminoácidos e energia ao animal hospedeiro. O acúmulo de AGCC dentro do rúmen tende a baixar o pH do fluído ruminal, porém esses ácidos orgânicos são rapidamente absorvidos através do epitélio ruminal (BERGMAN, 1990).

O excesso de H_2 no rúmen é eliminado pelas arqueias metanogênicas, utilizando-o para reduzir CO_2 e formar CH_4 (KOZLOSKI, 2002).

As técnicas *in vitro* de produção de gases são capazes de simular o ambiente ruminal em condições controladas (THEODOROU et al., 1994). Fontes alternativas de inóculos têm sido testadas para prover resultados semelhantes àqueles obtidos com o uso de fluido ruminal (MAURICIO et al., 1998; BUENO et al., 1999).

2.4. Inóculo fecal

A utilização de animais com cânula ruminal tem sido limitada, pesquisas buscando alternativa a utilização de animais com este tipo de cirurgia é cada vez mais estudadas. Há uma linha de pesquisa busca a utilização de fezes como inóculo para produção de gases *in vitro*. As fezes podem ser coletas de animais sem necessitar de nenhum tipo de cirurgia. Em diversos estudos que utilizaram fezes como inóculo, observam-se variações nos resultados obtidos, o que pode ser associado a vários fatores, como espécie do animal, concentração das fezes, protocolo de preparo, etc.

Maurício et al. (1998) utilizaram líquido ruminal e fezes de vacas em lactação para comparar a produção total de gases *in vitro* e o perfil de fermentação de dois substratos, demonstrando que a produção total de gases foi semelhante entre os dois tipos de inóculos. Entretanto, o perfil de

fermentação com fezes apresentou diferenças quanto ao período de incubação e ao tempo de colonização (lag time).

Quando Bueno et al. (1999) avaliaram o líquido ruminal e as fezes de bovinos e de ovinos como fontes de inóculos, observaram semelhanças nas degradabilidades do feno de alfafa, do feno de braquiária (28 dias) e da palha de trigo utilizando os inóculos de líquido ruminal e fezes de bovinos e de ovinos.

Alcalde et al. (2001) compararam o líquido de rúmen em dois tipos de colheita (via fístula ruminal ou sonda esofágica) com as fezes de bovino em duas diluições (tampão/fezes) e concluíram que o desenvolvimento de colônias de bactérias das fezes é diferente do observado para as bactérias encontradas no rúmen.

Müller (2000) concluiu que as fezes de bovinos possuem potencial para serem utilizadas como inóculo na estimativa da degradabilidade *in vitro* de matéria seca e de matéria orgânica de volumosos.

Cardoso et al. (2010) utilizaram conteúdo ruminal, fezes de bovinos, fezes de equinos e fezes de coelhos, na diluição de 100/300 (tampão/fezes) e concluíram que, de maneira geral, os inóculo de fezes não foram eficientes, sendo os valores observados inferiores aos valores obtidos com líquido de rúmen.

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

3. HIPÓTESE

A hipótese a ser testada é que inóculos oriundos de fezes, após sofrerem pré-incubação, possam apresentar um comportamento semelhante ao inóculo oriundo de conteúdo ruminal, em testes *in vitro*, para parâmetros da cinética fermentativa e da degradabilidade da matéria seca e da matéria orgânica.

4. OBJETIVOS

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar *in vitro* a produção acumulada de gases, de metano (CH₄), de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e a degradabilidade, usando inóculos de fezes pré-incubados, e tendo como referência os resultados obtidos com inóculo ruminal.

5. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal, do Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, em Pirassununga, SP. Os procedimentos realizados envolvendo o uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FZEA/USP, de acordo com o protocolo de nº 2996141117.

5.1. Delineamento e tratamentos

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados (DBC), com 5 tratamentos e 4 blocos (Figura 1), cada bloco refere-se a um animal doador de inóculo, constituindo assim a repetição. Os tratamentos utilizados foram: inóculo de conteúdo ruminal (CR), utilizado como referência; inóculo de fezes

sem pré-incubação (F_0); e inóculos de fezes com 12, 24 e 36 h de pré-incubação, sendo respectivamente F_{12} , F_{24} e F_{36} .

Figura 1 - Ilustração do delineamento experimental

CR: conteúdo ruminal; F_0 : fezes sem pré-incubação; F_{12} : fezes com 12 horas de pré-incubação; F_{24} : fezes com 24 horas de pré-incubação; F_{36} : fezes com 36 horas de pré-incubação; Br: branco.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Os tratamentos inóculos fecais pré-incubados (0, 12, 24 e 36 horas) e inóculo ruminal (utilizado como referência) foram usados para a fermentação *in vitro* de apenas um substrato intitulado dieta base, que foi composta por 50% de concentrado, 37,5% de capim elefante e 12,5% de alfafa, o substrato foi calculado de maneira que o teor de proteína bruta ficasse próximo a 13%. Na Tabela 1 está apresentada a composição bromatológica dos substratos.

Tabela 1 - Composição de matéria seca, matéria mineral e proteína bruta dos ingredientes utilizados como substrato

Substratos	MS	MM	PB	FDN	FDA	EE
Dieta base	90,17	10,22	13,40	38,27	28,23	3,78
Concentrado	88,48	9,23	17,24	12,60	9,73	6,37
Alfafa	91,26	9,68	24,67	42,72	41,45	2,03
Capim elefante	92,07	11,70	4,53	71,00	48,48	0,92

MS: Matéria seca; MM: Matéria mineral; PB: Proteína bruta; FDA: Fibra em detergente ácido; FDN: Fibra em detergente neutro; EE: Extrato etéreo.

Realizou-se um bioensaio de metanogênese (24 h) e outro de cinética fermentativa (72 h). Em todos os bioensaios foram observadas as variáveis produção acumulada de gases, degradabilidade, produção de AGCC e teor de

nitrogênio amoniacal. No bioensaio de metanogênese, também foi acompanhada a produção de metano.

5.2. Animais doadores

Os animais utilizados como doadores foram bovinos machos, castrados, da raça Nelore, com peso vivo médio de 590 ± 28 kg, portadores de cânula ruminal com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Os animais estavam sendo alimentados com silagem de milho e feno com acesso à mistura mineral e à água *ad libitum*.

5.3. Coleta, preparo e pré-incubação dos inóculos

Na semana anterior ao início da produção de gases, foram coletadas amostras de fezes diretamente do reto dos animais doadores, para determinação do teor de matéria seca das fezes, com a finalidade de corrigir o inóculo de maneira que ficassem com aproximadamente 5% de matéria seca. A correção foi realizada diluindo as fezes com solução tampão mineralizada.

As amostras, utilizadas para o preparo dos inóculos, foram obtidas no mesmo dia da incubação. Coletou-se aproximadamente 700 g de fezes, diretamente do reto de cada animal, que foram rapidamente acondicionadas em sacos plásticos, retirando as bolsas de ar e em seguida armazenadas em caixa térmica. As amostras de conteúdo ruminal para o preparo dos inóculos CR, foram obtidas de três pontos distintos do rúmen, introduzindo a mão via fístula ruminal. A fase líquida foi coletada com auxílio de duas camadas de campo cirúrgico, utilizados para filtrar o conteúdo. Coletou-se aproximadamente 400 mL da fase líquida e 400 mL de fase sólida de cada animal. As amostras de líquido foram armazenadas em garrafas térmicas e as de sólido foram armazenadas em sacos plásticos, com o mesmo procedimento descrito para as fezes.

Para o preparo de cada inóculo de fezes, foram pesados 500 g de fezes e adicionados a 1100 mL de solução tampão mineralizada, homogeneizados em liquidificador por 10 segundos, sob saturação de CO₂. Deste preparo, foram retirados 300 mL para constituir o inóculo F₀. Esta

amostra foi filtrada utilizando duas camadas de tecido cirúrgico e em seguida inoculada nos frascos correspondentes, o que sobrou no tecido foi descartado. Os restantes dos materiais preparados foram colocados em jarros de incubação da incubadora *in vitro* (TE150, Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba, Brasil). Dentro de cada jarro havia 12 saquinhos de tecido não tecido (TNT), após a introdução dos inóculos, os jarros foram saturados com CO₂, fechados e mantidos a 39°C. Cada saquinho de TNT utilizado para pré-incubação dos inóculos, possuía dimensão igual a 10x5 cm, contendo aproximadamente 6 g de substrato (3 g de concentrado, 0,93 g de alfafa e 2,07 g de capim elefante). A composição química destes ingredientes está apresentada na Tabela 1.

A cada 12 h, foram retirados 3 saquinhos e 300 mL da solução (inóculo) incubada. Estes 300 mL serviram, após filtração em duas camadas de tecido de algodão, como inóculo F₁₂, usado na incubação das garrafas correspondentes. Sempre que abertos os jarros e retirada esta alíquota, injetava-se CO₂ nos jarros e os retornavam para a incubadora. Após 24 e 36 h do início desta pré-incubação, o mesmo procedimento descrito para o inóculo F₁₂ foi feito para a obtenção dos inóculos F₂₄ e F₃₆, respectivamente. Figura 2 elucida todos os processos partindo inicialmente da coleta até a incubação dos inóculos de fezes.

Figura 2 - Ilustração demonstrando os passos da coleta, preparo e incubação dos inóculos fecais

Fonte: Adaptado de Benetel (2018).

No preparo dos inóculos de conteúdo ruminal utilizou-se o mesmo volume das fases líquidas e sólidas, homogeneizando-os em um liquidificador por 10 segundos, conforme descrito recomendado por Bueno (2002). O material resultante foi filtrado em duas camadas de tecido de algodão. As frações filtradas foram saturadas de CO₂ e mantidas a 39 °C até a inoculação. A Figura 3 elucida todos os processos partindo inicialmente da coleta até a incubação dos inóculos de conteúdo ruminal.

Figura 3 - Ilustração demonstrando a coleta, preparo e incubação dos inóculos rúmen

Fonte: Adaptado de Benetel (2018).

5.4. Inoculação

No horário zero, ou seja, no mesmo dia da coleta após o preparo dos inóculos de conteúdo ruminal (CR) e dos inóculos fecais, procedeu-se a inoculação dos frascos correspondentes CR e F₀. Após 12 h de pré-incubação, inocularam-se as garrafas F₁₂, após 24 h, as garrafas F₂₄ e após 36 h as garrafas F₃₆. A Figura 4 demonstra esquematicamente o cronograma usada para os ensaios.

Figura 4 – Cronograma dos horários inoculações

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

As inoculações foram realizadas através da injeção do inóculo em cada garrafa de incubação usando seringa plástica graduada. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha e agitados manualmente, e em seguida incubados em estufa de circulação forçada de ar a 39°C, permitindo desta forma o acúmulo de gases dentro de cada frasco. Este foi considerado o tempo zero e dado início a contagem dos tempos de fermentação.

5.5. Bioensaio de metanogênese (BM)

O bioensaio de metanogênese (BM) foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Theodorou et al. (1994) e Maurício et al. (1999) e adaptada por Bueno et al. (2005).

Foram utilizadas 80 garrafas, de vidro e com capacidade de 160 mL cada, previamente ao experimento foram lavadas com água destilada, secas e identificadas. Dentro de cada garrafa, foram pesados aproximadamente 0,25 g de concentrado, 0,0755 g de alfafa e 0,1725 g de capim elefante (Tabela 1), cada tratamento possuía duas garrafas com substrato e duas garrafas branco, ou seja, sem substrato apenas com o inóculo. Minutos antes da inoculação foram adicionadas foram adicionados 50 mL da solução tampão, em seguida 25 mL de inóculo (Figura 5). As medições da produção de gases acumulado para cada tratamento foram lidas após 4, 8, 12, 16, 20, 24 h de incubação. Paralelamente às mensurações de pressão em intervalos pré-determinados uma alíquota dos gases produzidos era coletada com auxílio de seringas descartáveis e armazenados em tubos de ensaio, previamente identificados e submetidos a vácuo para posterior quantificação do CH₄ por cromatografia gasosa. Após 24 h de incubação, as garrafas foram colocadas em recipientes com gelo, para inibir a fermentação, em seguida as garrafas foram abertas e coletadas amostras do líquido contido em cada garrafa foram coletadas para a determinação de AGCC e N-NH₃.

Figura 5 - Ilustração do preparo das garrafinhas para incubação

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.6. Bioensaio de cinética fermentativa (BCF)

O bioensaio de cinética fermentativa também foi realizados de acordo com a metodologia descrita por Theodorou et al. (1994) e Maurício et al. (1999) e adaptada por Bueno et al. (2005). Foram utilizadas 80 garrafinhas, sempre deixando duas garrafas para o “branco”, ou seja, sem substrato, e pesados aproximadamente 0,5 g de concentrado, 0,155 g de alfafa e 0,345 g de capim elefante 0,0755 g de alfafa e 0,1725 g de capim elefante nas demais garrafas (composição bromatológica na Tabela 1). Em cada garrafa de vidro foram adicionados 10 mL de inóculo e 90 mL de solução nutritiva. As medições da produção de gases acumulado para cada tratamento foram lidas após 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 40, 48, 60 e 72 h de incubação. No tempo final da incubação, 72 h, a fermentação foi interrompida e os frascos colocados em recipientes com gelo para inibir a fermentação. Amostras do conteúdo de cada garrafa foram coletadas para posterior determinação de AGCC e N-NH₃.

Para descrever a dinâmica da produção de gases no decorrer do tempo, aplicou-se o seguinte modelo exponencial proposto por France et al. (1993):

$$V_t = A \times \left(1 - e^{-b \times (t-L) - c \times (\sqrt{t} - \sqrt{L})} \right)$$

Onde:

V_t = volume final de gás acumulado no tempo t (mL);

A = potencial de produção de gases (mL);

L = fase *Lag* (h), ou tempo de colonização;

b e c = constantes matemáticas do modelo usadas para calcular a taxa fracional de produção de gases (μ , % h):

$$\mu = \frac{-b + c}{2 \times \sqrt{t}}$$

5.7. Análises

5.7.1. Composição química dos substratos

Foram realizadas as análises bromatológicas dos ingredientes utilizados como substratos, determinando os valores de MS, matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), segundo AOAC (1995), fibra em detergente neutro (FDN), e fibra em detergente ácido (FDA), segundo Van Soest (1994).

5.7.2. Degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica

A degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi obtida pela filtração dos resíduos da fermentação em cadinhos sinterizados (porosidade 1) forrados com uma camada de lã de vidro e posterior secagem em estufa (105°C) para determinação do resíduo. Após pesagem, os resíduos foram incinerados em forno mufla (550 °C) por 4 h e pela diferença dos pesos foi estimada a degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO). A relação entre a degradabilidade e a produção total de gases (mL) durante a produção em horas foi utilizada como índice de eficiência de síntese microbiana (FP: fator de partição; BLUMMEL et al., 1997).

5.7.3. Mensuração de pH

Após a coleta de fezes e de conteúdo ruminal, os valores de pH das amostras foram medidos por meio de um potenciômetro digital portátil (HANNA Instruments HI8424), calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0.

5.7.4. Quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

As concentrações de AGCC foram medidas por cromatografia em fase gasosa (GC-2014, Shimadzu, Japão), com o uso de uma coluna capilar (Stabilwax®, Restek, EUA) a 145°C (isotérmica) e um injetor split/splitless e detector dual FID a 250°C, utilizando o método descrito por Erwin et al. (1961), adaptado por Getachew et al. (2002). Utilizando gás hélio como gás de arraste, o ar sintético como comburente e o hidrogênio como combustível. As amostras

foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a 14500 g durante 10 min. O sobrenadante (800 µL) foi transferido para um frasco seco e limpo com 200 µL de ácido fórmico 98-100% PA ACS e 100 µL do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 mM, Chemservice, USA). O padrão externo foi preparado com ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservice, USA). Os cálculos para integração dos picos cromatográficos foram feitos utilizando o software GCSolution® (Shimadzu, Japão).

5.7.5. Determinação de nitrogênio amoniacal

Após a abertura das garrafinhas coletaram-se 2 mL do conteúdo e armazenou-os em tubos contendo 1 mL de solução de ácido sulfúrico 1N, em seguida e armazenou-os em congelador, até a realização das análises por colorimetria. As análises foram realizadas utilizando o kit Ureia Enzimática (Bioclin®), segundo método descrito por Kulasek (1972) e adaptado por Foldager (1977).

5.7.6. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o programa Statistical Analysis System, verificando a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias comparadas pelo teste de Levene. Em seguida, foram realizado comparação das médias pelo teste de Tukey. Foram considerados resultados significativos os valores de *P* iguais ou inferiores a 5%.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores mensurados de pH antes de cada inoculação estão apresentados na Tabela 2. Todos os inóculos se mantiveram com valores de pH próximos à neutralidade, possibilitando uma fermentação normal, pois, segundo Marino et al. (2009), a fermentação adequada ocorre em pH entre 5,5 e 7,2.

Tabela 2 - Valores dos pH antes das inoculações dos bioensaios

Tempo	Repetição	Inóculo	pH
0 h	1	CR	7,15
	2	CR	6,7
	3	CR	6,87
	4	CR	6,74
	1	FE ₀	7,49
	2	FE ₀	7,49
	3	FE ₀	7,39
	4	FE ₀	7,42
12 h	1	FE ₁₂	7,1
	2	FE ₁₂	7,03
	3	FE ₁₂	6,94
	4	FE ₁₂	6,93
24h	1	FE ₂₄	7,04
	2	FE ₂₄	6,54
	3	FE ₂₄	6,26
	4	FE ₂₄	6,56
36 h	1	FE ₃₆	6,55
	2	FE ₃₆	6,29
	3	FE ₃₆	6,69
	4	FE ₃₆	6,17

CR: conteúdo ruminal; F₀: fezes sem pré-incubação; F₁₂: fezes com 12 horas de pré-incubação; F₂₄: fezes com 24 horas de pré-incubação; F₃₆: fezes com 36 horas de pré-incubação; Br: branco.

Para os bioensaios de metanogênese e cinética fermentativa, as fontes de variações foram os blocos (animal doador do inóculo) e os tratamentos que se referem aos cinco diferentes inóculos, sendo estes o de conteúdo ruminal (CR) e os de fezes bovinas (FE) com quatro tempos de pré-incubação (0, 12, 24 e 36 h). Os blocos não apresentaram efeitos significativos para os

parâmetros analisados ($P>0,05$). Os resultados obtidos pelos bioensaios de metanogênese (BM) e cinética fermentativa (BCF) estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Parâmetros de fermentação do bioensaio de metanogênese

Variável*	Tratamentos					P valor	EPM
	CR	FE ₀	FE ₁₂	FE ₂₄	FE ₃₆		
Pacum (mL/g MS)	162,77 _a	67,41 _c	85,77 _{bc}	78,77 _{bc}	93,60 _b	<,0001	5,60
DIVMS (%)	50,84 _a	34,59 _a	38,97 _a	51,19 _a	44,42 _a	0,0511	4,10
FPMS (mg MSD/mL)	3,14 _b	4,60 _{ab}	4,61 _{ab}	6,51 _a	4,77 _a	0,0030	4,53
DIVMO (%)	36,26 _{ab}	28,22 _b	35,41 _{ab}	39,01 _a	41,20 _a	2,0000	2,07
FPMO (mg MOD/mL)	2,24 _b	4,19 _a	4,19 _a	4,98 _a	4,43 _a	0,2200	0,60
CH ₄ (mL)	11,04 _a	1,74 _b	1,20 _b	0,10 _b	0,07 _b	<,0001	1,13
CH ₄ (mL/g MSD)	22,87 _a	4,97 _b	3,00 _b	0,17 _b	0,16 _b	0,0004	2,56
C2 (mmol/g MSD)	7,56 _a	5,51 _{ab}	5,19 _b	4,78 _b	3,90 _b	0,0073	0,49
C3 (mmol/g MSD)	2,11 _{ab}	1,46 _b	2,42 _a	2,89 _a	2,99 _a	0,0010	0,21
C4 (mmol/g MSD)	2,09 _a	1,70 _{ab}	1,31 _{bc}	0,79 _c	0,75 _c	<,0001	0,13
T _{AGCC} (mmol/g MSD)	12,11 _a	8,99 _{ab}	8,83 _{ab}	8,49 _b	7,67 _b	0,0154	0,70
C2 : C3	3,55 _a	3,74 _a	2,17 _b	1,70 _c	1,34 _c	<,0001	0,16
N-NH ₃ (mL/dL)	19,05 _a	17,04 _{ab}	15,00 _{bc}	13,39 _c	13,51 _c	0,0004	0,58

CR: conteúdo ruminal; F₀: fezes sem pré-incubação; F₁₂: fezes com 12 horas de pré-incubação; F₂₄: fezes com 24 horas de pré-incubação; F₃₆: fezes com 36 horas de pré-incubação.

* DIVMS: degradabilidade *in vitro* da matéria seca; FPMS: fator de partição de matéria seca; DIVMO: degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica; FPMO: fator de partição de matéria orgânica; Pacum: produção de gases acumulada em 24 horas; CH₄: produção de metano; C2: ácido acético; C3: ácido propiônico; C4: ácido butírico; T_{AGCC}: total de ácidos graxos de cadeia curta produzidos; C2 : C3: relação C2 e C3; N-NH₃: nitrogênio amoniacal; EPM: Erro padrão da média.

^{a, b} média seguidas por letras diferentes, nas linhas, diferem entre si ($P<0,05$).

Tabela 4 - Parâmetros de fermentação do bioensaio de cinética fermentativa

Variável*	Tratamentos					P valor	EPM
	CR	FE ₀	FE ₁₂	FE ₂₄	FE ₃₆		
Pacum (mL/g MS)	212,88 ^a	165,94 ^b	162,38 ^b	161,22 ^b	161,09 ^b	<0,0001	
DIVMS (%)	68,84 ^a	63,53 ^b	62,61 ^b	62,69 ^b	65,12 ^b	0,0004	0,75
FPMS (mg MSD/mL)	3,23 ^b	3,84 ^a	3,86 ^a	3,90 ^a	4,04 ^a	<0,0001	0,07
DIVMO (%)	68,05 ^a	63,74 ^{bc}	63,29 ^c	63,85 ^{bc}	66,90 ^a	0,0013	0,72
FPMO (mg MOD/mL)	3,20 ^b	3,85 ^a	3,90 ^a	3,97 ^a	4,16 ^a	<0,0001	0,07
C2 (mmol/g MSD)	4,27 ^a	4,85 ^a	4,70 ^a	4,42 ^a	4,50 ^a	0,5167	0,25
C3 (mmol/g MSD)	1,88 ^c	1,92 ^c	2,37 ^{bc}	2,64 ^{ba}	3,02 ^a	0,0002	0,13
C4 (mmol/g MSD)	1,48 ^a	1,03 ^b	0,87 ^b	0,71 ^b	0,77 ^b	<,0001	0,08
T _{AGCC} (mmol/g MSD)	7,63 ^a	7,79 ^a	7,94 ^a	7,76 ^a	8,30 ^a	0,7000	0,35
C2:C3	2,28 ^{ab}	2,53 ^a	1,98 ^{bc}	1,69 ^{cd}	1,51 ^d	<0,0001	0,10
N-NH ₃ (mL/dL)	27,51 ^a	18,50 ^b	18,96 ^b	19,53 ^b	19,58 ^b	0,0006	

CR: conteúdo ruminal; F₀: fezes sem pré-incubação; F₁₂: fezes com 12 horas de pré-incubação; F₂₄: fezes com 24 horas de pré-incubação; F₃₆: fezes com 36 horas de pré-incubação.

* Pacum: produção de gases acumulada em 72 horas produção de gases acumulada por gramas de matéria seca; DIVMS: degradabilidade in vitro da matéria seca; FPMS: fator de partição de matéria seca por mL de gás produzido; DIVMO: degradabilidade in vitro da matéria orgânica; FPMO: fator de partição de matéria orgânica por mL de gás produzido; C2: ácido acético; C3: ácido propiônico; C4: ácido butírico; T_{AGCC}: total de ácidos graxos de cadeia curta produzidos; C2 : C3: relação entre ácidos acético e ácido propiônico; N-NH₃: nitrogênio amoniacal; EPM: Erro padrão da média.

^{a, b} média seguidas por letras diferentes, nas linhas, diferem entre si (P<0,05).

Os valores de produção de gases acumulada (Pacum), nos dois bioensaios (24 e 72 h), foram significativamente maiores ($P<0,05$) para o substrato incubado em inóculo ruminal (CR) quando comparado aos fecais (FE).

Analisando o bioensaio de metanogênese (24 h) a Pacum dos substratos incubados com inóculos fecais corresponderam de 40 a 60% do valor do inóculo de referência (CR=118,48 mL/g MS). Ao analisar somente os fecais (FE₀, FE₁₂, FE₂₄, FE₃₆) o inóculo que não foi submetido à pré-incubação (FE₀ = 49,07 mL/g MS) apresentou o menor valor de Pacum. A produção acumulada de gases durante o tempo em horas é apresentada na Figura 6, evidenciando que os tratamentos com inóculos fecais, apresentaram menores produção de gases em 24 horas, quando comparado com inóculo ruminal.

Figura 6 – Produção de gases acumulada, em mL por grama de matéria seca degradada, no bioensaio de metanogênese por cada tratamento

CR: conteúdo ruminal; F₀: fezes sem pré-incubação; F₁₂: fezes com 12 horas de pré-incubação; F₂₄: fezes com 24 horas de pré-incubação; F₃₆: fezes com 36 horas de pré-incubação.

No bioensaio de cinética fermentativa (72 h), os inóculos fecais não diferiram entre si, apresentando cerca de 80% do total de Pacum do inóculo ruminal.

Em diversos estudos comparando inóculo fecal com inóculo de conteúdo ruminal, também verificaram menores produções de gases com inóculos fecais. Goncalves e Borba (1996), Cone et al. (2002), Váradyová et al. (2005), Cavalcante (2013), Ramin et al. (2015) e Cavalcante (2017) também realizaram a comparação da produção de gases utilizando o inóculo ruminal ou fecal e confirmaram que o inóculo fecal produz menor volume de gases que o inóculo ruminal. Zicarelli et al. (2011) comparam as características da fermentação *in vitro* entre inóculos fecal e ruminal, utilizando substratos com diferentes proporções de volumoso:concentrado e observaram que a produção de gases *in vitro* foi sempre menor com inóculo fecal em relação ao inóculo ruminal, justificou que há diferença na natureza entre os microrganismos presentes no conteúdo ruminal e nas fezes e no estado de sobrevivência das bactérias fecais, que apresentam baixa atividade metabólica. Segundo Mauricio et al. (2001), a menor fermentação utilizando fezes é resultado de diversos fatores, como o fornecimento de substratos ao intestino grosso com menor

valor nutricional, o menor tempo de retenção na região colo-cecal, a menor população de bactérias e a ausência de protozoários, quando comparadas ao rúmen.

Na Tabela 3 e na Figura 7 são apresentados respectivamente, os parâmetros do modelo de France et al (1993) e o perfis da fermentação *in vitro* conforme cada tratamento (CR, FE₀, FE₁₂, FE₂₄ e FE₃₆).

Tabela 3 - Parâmetros do modelo de France et al. (1993) conforme cada tratamento

Variável	Tratamentos					P valor	EPM
	CR	FE ₀	FE ₁₂	FE ₂₄	FE ₃₆		
A (mL/g MS)	217,90 ^a	200,53 ^a	203,23 ^a	179,38 ^a	195,9 ^a	0,24	0,0003
L (h)	3,50 ^{ab}	3,96 ^a	2,94 ^b	2,89 ^b	3,52 ^{ab}	0,27	0,44
t _{1/2} (h)	23,56 ^a	31,90 ^a	48,64 ^a	38,46 ^a	26,95 ^a	0,22	0,004
B	0,0788 ^a	0,1533 ^a	0,0234 ^a	0,0277 ^a	0,0202 ^a	0,30	0,50
C	-0,2924 ^b	-0,1076 ^{ab}	-0,0274 ^{ab}	0,0157 ^a	0,0844 ^a	0,001	0,67

CR: conteúdo ruminal; F₀: fezes sem pré-incubação; F₁₂: fezes com 12 horas de pré-incubação; F₂₄: fezes com 24 horas de pré-incubação; F₃₆: fezes com 36 horas de pré-incubação.

A: volume final ou produção potencial de gases; b e c: constantes do modelo; L: tempo de colonização; t_{1/2}: tempo no qual a metade de "A" é atingida; EPM: erro-padrão da média.

^{a, b} média seguidas por letras diferentes, nas linhas, diferem entre si (P<0,05).

O volume final ou produção potencial de gases (A) foi maior para o tratamento CR, entretanto os demais tratamentos não diferiram significativamente do tratamento referencia. Mauricio et al. (2001), comparando o inóculo de fezes e o inóculo de conteúdo ruminal, para técnica de produção de gases *in vitro*, utilizando substratos diferentes, verificaram maiores valores para A, quando utilizado conteúdo ruminal. Simões (2012) também verificou maior produção potencial para inóculos de conteúdo ruminal, porém com diferença significativa. Essa divergência pode estar relacionada com particularidades importantes das duas pesquisas, sendo elas as espécies dos animais doadores, a dieta fornecida aos animais e o protocolo de preparo do inóculo de fezes, Simões (2012) preparou o inóculo de modo que apresentasse 3% de matéria seca, enquanto na pesquisa atual o desejado foi 5%, favorecendo assim maior quantidade microrganismo por mL, possibilitando uma maior produção de gases.

O tempo no qual a metade de “A” é atingida ($t_{1/2}$) apresentou um valor médio igual 33,90 h e não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. O tempo de colonização (L médio = 3,62 h), não apresentou diferença significativa entre o tratamento CR e os demais, porém, FE_0 foi significativamente diferente de FE_{12} e FE_{24} . Simões (2012) não encontrou diferença significativa para nenhuma das duas variáveis. Mauricio et al. (2001) compararam os inóculos ruminal e fecal de vacas para técnica de produção de gases *in vitro* e encontraram um tempo de colonização superior para o inóculo fecal, justificando a menor atividade ou concentração de microrganismos, porém já demonstraram um grande potencial do inóculo alternativo para a técnica *in vitro*.

Figura 7 - Perfis médios de produção de gases, da cinética de fermentação *in vitro* (72 h), por tratamentos, ajustados pelo modelo de France et al. (1993)

CR: conteúdo ruminal; F_0 : fezes sem pré-incubação; F_{12} : fezes com 12 horas de pré-incubação; F_{24} : fezes com 24 horas de pré-incubação; F_{36} : fezes com 36 horas de pré-incubação.

A taxa de fermentação dependente do tempo do modelo de France et al. (1993), é apresentada na Figura 8, observa-se que as fezes, independente do tratamento, precisariam de um tempo maior para atingir uma produção semelhante a CR. Similar ao encontrado nessa pesquisa, Zicarelli et al. (2011) verificou que com inóculo ruminal uma taxa de produção de gases maior do

que com fezes, o CR apresentou a tendência parabólica clássica, aumentou até um máximo, diminuiu rapidamente até 48 horas de incubação e depois tendeu lentamente para zero, enquanto o comportamento das fezes foi mais complexo.

Figura 8 - Taxa de fermentação (μ) (France et al. 1993) dos inóculos CR, FE₀, FE₁₂, FE₂₄ e FE₃₆

CR: conteúdo ruminal; F₀: fezes sem pré-incubação; F₁₂: fezes com 12 horas de pré-incubação; F₂₄: fezes com 24 horas de pré-incubação; F₃₆: fezes com 36 horas de pré-incubação.

Analisando de forma geral a produção de gases total, verifica-se que a fermentação foi mais lenta no para as fezes inicialmente e aumenta gradualmente à medida que a população de microrganismos se reestabelece com o tempo (VÁRADYOVÁ et al., 2005), provavelmente devido a produção de gases mais lenta, alguns parâmetros no modelo de France et al. (1993) podem ter sido superestimados.

A DIVMS em 24 h não diferiu ($P>0,05$) entre os tratamentos mas observou-se que FE₂₄ e FE₃₆ apresentaram valores mais próximos a CR e superiores aos demais tratamentos (FE₀ e FE₁₂). O tratamento FE₀ (34,59 %) apresentou o menor valor de DIVMS. Com essas observações é possível concluir que os microrganismos das fezes após pré-incubação de pelo menos 24 horas são capazes de degradar o substrato testado, de forma semelhante ao inóculo ruminal em bioensaios de metanogênese. No bioensaio de cinética

fermentativa (72 h), apresentou resultados significativamente diferentes quando comparado o inóculo ruminal (CR=68,8) com os demais para DIVMS, os inóculos fecais em qualquer tempo de pré-incubação não apresentaram diferenças significativas entre eles, porém, observa-se que com 36 horas de pré-incubação o inoculo teve um aumento na DIVMS ($FE_0=63,53$; $FE_{12}=62,61$; $FE_{24}=62,69$ $FE_{36}=65,12$). Hughes et al. (2012) compararam diferentes concentrações de fezes bovinas frescas (25 a 45 g de fezes/100 mL de solução tampão) com o inóculo ruminal e obtiveram semelhanças entre o inóculo ruminal e o inóculo fecal confeccionado com 45 g de fezes/100 mL de solução tampão, concluindo que o aumento da concentração de fezes aumentava a quantidade de microrganismos no inóculo e conseqüentemente a atividade microbiana do mesmo. A diferença no comportamento na DIVMS entre o bioensaio de 24 e de 72 horas, pode ser explicada, uma vez que para o bioensaio de 72 horas utiliza-se inóculo mais diluído (10 mL de inóculo e 90 mL solução tampão), quando comparado com o bioensaio 24 horas (25 mL inóculo e 50 mL de solução).

As fezes também apresentaram resultados satisfatórios para DIVMO, no bioensaio de metanogênese, todos os tratamentos que utilizaram fezes foram semelhantes ao referência. No bioensaio de cinética fermentativa, apenas o FE_{36} não diferiu significativamente do CR, porém, os demais tratamentos em média tiveram resultados menores que o CR de apenas 6,5%.

Mauricio et al. (2001) concluíram que o matéria fecal tem potencial como inóculo alternativo ao ruminal para a técnica de produção de gases *in vitro* para avaliar para degradabilidade.

O fator de partição (FP) é uma variável utilizada para relacionar quantos mg de MS degradada *in vitro* são necessários para produzir 1 mL de gases totais durante o processo de fermentação. Em ambos os bioensaios o FPMS e o FPMO foram menores para o inóculo CR, resultados esses esperados quando se analisa os valores de DIVMO e Pacum. Posada et al. (2012) também observaram um maior fator de partição do inóculo fecal (4,47 mg/mL) comparado ao inóculo ruminal (2,18 mg/mL), justificado pela menor competição decorrente da baixa densidade de microrganismos presentes no inóculo fecal.

Ao adotar o uso de inóculos fecais como substituto do inóculo ruminal outras variáveis como nitrogênio amoniacal, produção de metano e produção do total de AGCC e suas proporções também devem ser analisadas.

No presente trabalho, o metano foi avaliado apenas no bioensaio de 24 horas, a maior produção com o tratamento CR (11,04%) diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Fon e Nsahlai (2012) também observaram maior produção de metano com o uso de inóculo ruminal comparado a inóculos de fezes fresco e cultivado.

A produção de metano para os tratamentos com fezes não diferiram estatisticamente em relação. Porém, o maior valor entre eles ($F_0 = 1,74$ mL) correspondeu aproximadamente 15,8% da produção de metano do inóculo ruminal. Ramin et al. (2015) obtiveram valores de produção de metano, superiores ao da presente pesquisa, com o uso de inóculo fecal 48,9% da produção obtida com o inóculo ruminal. A produção de metano é resultante principalmente da ação dos microrganismos do grupo das arqueias metanogênicas, sendo que no rúmen estão intimamente associadas com os protozoários ciliados (FINLAY et al., 1994). A relação estabelecida pelos dois microrganismos é de simbiose, em que as metanogênicas, por utilizarem hidrogênio produzido pelos ciliados, favorecem a manutenção de um ambiente ruminal adequado, ao desenvolvimento dos mesmos (VAN SOEST, 1994). Os protozoários são sensíveis a pH baixos, como o do abomaso, portanto, não sobrevivem a passagem (HOBSON, 1971). Com isso, as fezes não apresentam atividade de protozoários, reduzindo assim a atividade das arqueias, explicando assim a baixa produção de metano pelos tratamentos com inóculos fecais.

A produção total de AGCC por grama de matéria seca degradada, no bioensaio de metanogênese, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos CR e FE_0 , os demais tratamentos apresentaram valores inferiores ao CR, porém, sem diferença estatística do FE_{12} . Enquanto no bioensaio de cinética fermentativa não houve diferença significativas entre os tratamentos. Em ambos os bioensaios, o CR apresentou uma produção maior de C2 e C4, com isso uma maior relação C2 : C3. Essas variações podem ser explicadas, pois a diferença da população microbiológica dos indivíduos que fermentam carboidratos fibrosos e semelhança das populações que fermentam

carboidratos não fibrosos (indivíduos/mL, espécies), entre os inóculos fecais e ruminal (MOULD et al., 2005). Sendo que a população de bactérias celulolíticas do líquido ruminal pode ser de 10 a 1000 vezes maior do que a presente nas fezes (KERN et al. 1974). Portanto os metabolitos gerados a partir de inóculos oriundo de conteúdo ruminal e fezes podem apresentar diferenças. . A pré-incubação das fezes utilizando uma dieta com boa disponibilidade de carboidratos solúveis, pode ter favorecido ainda mais as populações de bactérias não celulolíticas, que são maioria nas fezes, resultando assim em uma alteração no perfil de ácidos graxos. Na figura 9 e 10 estão apresentados o perfil de ácidos graxo de cadeia curta por tratamento produzido nos bioensaios de metanogênese e cinética fermentativa respectivamente.

Figura 9 - Perfil de ácidos graxo de cadeia curta por tratamento produzido no bioensaio de metanogênese

CR: conteúdo ruminal; F₀: fezes sem pré-incubação; F₁₂: fezes com 12 horas de pré-incubação; F₂₄: fezes com 24 horas de pré-incubação; F₃₆: fezes com 36 horas de pré-incubação; acet: ácido acético; prop: ácido propiônico; but: ácido butírico.

Figura 10 - Perfil de ácidos graxo de cadeia curta por tratamento produzido no bioensaio de cinética fermentativa

CR: conteúdo ruminal; F₀: fezes sem pré-incubação; F₁₂: fezes com 12 horas de pré-incubação; F₂₄: fezes com 24 horas de pré-incubação; F₃₆: fezes com 36 horas de pré-incubação; acet: ácido acético; prop: ácido propiônico; but: ácido butírico

Analisando concentração de nitrogênio amoniacal, verificou-se que para ambos os bioensaios, foram maiores quando utilizado CR. Para o bioensaio de metanogênese apenas o FE₀ não diferiu significativamente do inóculo referência, enquanto para o bioensaio de cinética fermentativa, todos os inóculos oriundos de fezes para esse parâmetro diferiram do inóculo de CR. O resultado encontrado pela presente pesquisa contrasta com o obtido por Cavalcante (2017) que não verificou diferença significativa entre inóculos oriundos de fezes e inóculo de conteúdo ruminal para bioensaio de 24 horas.

7. CONCLUSÕES

A utilização de fezes com o mesmo protocolo de preparo, sugerido na pesquisa, não foi eficiente para avaliar a produção de gases *in vitro*, fator de partição e produção metano. Porém, mostrou ser uma boa alternativa quando a intensão for avaliar degradabilidade e produção de ácidos graxos de cadeia curta total.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALCALDE, C.R.; MACHADO, R.M.; SANTOS, G.T.; PICOLLI, R.; JOBIM, C.C. Digestibilidade in vitro de alimentos com inóculos de líquido de rúmen ou de fezes de bovinos. *Acta Scientiarum* 2001; 23: 917-921.

ALVES T.C. **Desenvolvimento ponderal, características da carcaça e eficiência da nutrição energética e proteica no metabolismo ruminal de búfalos e produção de gases in vitro**. 2010. 146 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analyses**. 16. ed. Washington: AOAC, 1995. 1051 p.

ARMSTRONG, W.D.; A demanda mundial por proteína animal suas implicações para a indústria de alimentos para animais. **Midwest Swine Nutrition Conference**. 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE – ABIEC. Perfil da pecuária no Brasil, Relatório anual. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/Sumario.aspx>, Acesso: 05 de fevereiro de 2018.

BAKER, S.K. Rumen methanogens and inhibition of methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.50, n.8, p. 1293-1298, 1999.

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

BERGMAN, E. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological reviews**, v. 70, n. 2, p. 567, 1990. ISSN 0031-9333.

BLÜMMEL, M.; STEINGAB, H.; BECKER, K. The relationship between in vitro gás production, in vitro microbial biomass yield and ¹⁵N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. **Bristh Journal of Nutrition**, v. 77, p. 911-921, 1997.

BUENO, I.C.S. et al. Uso de líquido ruminal e fezes de bovinos e ovinos como fonte de inóculo para a técnica in vitro de produção de gás. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 36, 1999. Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: SBZ, 1999, p. 122.

BUENO, I.C.S. **Cinética digestiva e síntese microbiana ruminal em ovinos alimentados com fenos de três qualidades distintas**. Piracicaba, 2002. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2002.

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

CANESIN, R.C.; FIORENTINI, G.; BERCHIELLI, T.T. Inovações e desafios na avaliação de alimentos na nutrição de ruminantes. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. v.13, n.4, p.938-953. Salvador, 2012.

CAVALCANTE, S.E.A.S. **Uso de inóculo fecal de ovinos para avaliação de alimentos para ruminantes**. Teresina, 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, 2013.

CAVALCANTE, S.E.A.S. **Fonte de microrganismos alternativa ao inóculo ruminal na avaliação in vitro de alimentos para ruminantes**. Teresina, 2013. 67 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, 2017.

CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H.; BACHMANN, H. Influence of inoculum source on gas production profiles. **Animal Feed Science and Technology**, v. 99, p.221–231, 2002.

ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.

FINLAY, B.J. et al. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. **FEMS Microbiology Letters**, v.117, p.157-161,1994.

FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; THEODOROU, M.K.; LISTER, S.J.; DAVIES, D.R.; ISAC, D. A model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminant feeds. **Journal of Theoretical Biology**, v.163, p. 99–111, 1993.

FOLDAGER, J. **Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation**. 1977. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Michigan State University, East Lasing, MI. 1977.

GABLER, M.T.; TOZER, P.R.; HEINRICHS, J.A. Development of a cost analysis spreadsheet for calculating the costs to raise a replacement dairy heifer. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n.5, p.1104-1109, 2000.

GETACHEW, G.; DEPETERS, E.J.; ROBINSON, P.H.; FADEL, J.G. Use of an in vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. **Animal Feed Science and Technology**, v.123, p.547–559, 2005

GONCALVES, L.M.B.O.; BORBA, A.E.S. Study of gas production capacity by three sources of inocula. **J. Agric. Sci. Camb.** v.127, p. 511–515, 1996.

HOBSON, P.N. Rumen micro-organisms. **Prog. Ind. Microbiol.** V.9, p.42-77, 1971,.

JOBIM, C.C. et al. Cinética de degradação ruminal dos fenos de alfafa e Tifton-85 e da silagem de milho. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.32, n.2, p.747-758, 2011.

KAMINSKI, M.; KARTANOWICZ, R.; JASTRZEBSKI, D.; KAMINSKI, M. M. Determination of carbon monoxide, methane and carbon dioxide in refinery hydrogen gases and air by gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 989, p. 277–283, 2003.

KERN, D.L. et al. Ponies vs. steers: microbial and chemical characteristics of intestinal ingesta. **J. Anim. Sci.** v.38, p.559-564, 1974.

KOZLOSKI, G. B. Bioquímica dos ruminantes. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2002. 139p.

KULASEK, G. A. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood cells using urease and phenol reagent. **Pol Arch Weter**, v. 15, p. 801-810, 1972.

LANA, R.P. **Nutrição e alimentação animal**: mitos e realidades. 2. ed. Viçosa: Suprema Gráfica, 2007.

LAVEZZO, O.E.N.M. et al. Influência de métodos de coleta de fluido ruminal sobre os parâmetros de fermentação em bovinos alimentados com diferentes fontes de proteína. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 17, n. 3, p. 281-291. Viçosa, 1988.

LOPES, M.A. et al. Custos de produção de fêmeas bovinas da raça holandesa nas fases de cria e recria em um sistema de produção de leite no sul de minas gerais. *B. Indústr.anim.*, v.67, n.1, p.09-15. Nova Odessa, 2010.

MALAFIA, P.A.M. et al. Cinética Ruminal de Alguns Alimentos Investigada por Técnicas Gravimétricas e Metabólicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa v.27, n.2, p.370-380, 1998.

MARINO, C.T. et al. Preparado de anticorpos policlonais como aditivo alimentar para bovinos. **Archivos. Zootecnia**. V. 58, p. 109-119, 2009.

MARTINEZ, M.E. et al. Comparison of fermentation of diets variable composition and microvial populations in the rumen of sheep and RUITEC fermenters . II Protozoa population and diversity of bacterial communities. *Journal of Dairy Science*, v.93, p.3699-3712, 2010

MAURICIO, R.M. et al. Semi automated of *in vitro* gas production technique using a pressure transducer. In. ANNUAL MEETING BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, Scarborough: BSAS, p.70. Scarborough, 1998.

MAURICIO, R.M. et al. Uso de líquido ruminal e fezes como fonte de inóculo para técnica in vitro de produção de gases. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35. Botucatu, 1998. **Anais...** Botucatu: SBZ, p.314 – 316, 1998.

MAURICIO, R.M. et al.. Semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science Technology**, v.79, p. 321–330, 1999.

MAURICIO, R.M. et al. Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for in vitro gas production technique for evaluating forages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 89, p. 33–48, 2001.

MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R. The use of a Dacron bag technique to determine rate of degradation of protein and energy in the rumen. **Journal Agriculture Science**, v.88, p.645-650, 1977.

MENKE, K. H. et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. **Journal of Agriculture Science**, v. 93, p. 217-222, 1979.

MOULD, F.L. et al. In vitro microbial inoculum: a review of its function and properties. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, p. 31-50, 2005.

MÜLLER, M. Avaliação da técnica de inóculo fecal para a determinação da digestibilidade in vitro. 2000. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

MUZZI, L. A. L.; MUZZI, R. A. L.; GABELLINI, E. L. A. Técnica de fistulação e canulação do rúmen em bovinos e ovinos. *Ciênc. agrotec.* vol.33, no. spe. Lavras, 2009.

ONU BR. Organização das Nações Unidas no Brasil. **População mundial deve atingir 9,6 bilhões em 2050, diz novo relatório da ONU**. Brasil, 13 jun. 2013. Disponível em <https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-atingir-96-bilhoes-em-2050-diz-novo-relatorio-da-onu/>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2016.

Posada, S.L.; Noguera, R.R.; Segura, J.A. Ruminant feces used as inoculum for the in vitro gas production technique. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 25, p. 592-602, 2012.

RAMIN, M.; LEROSE, D.; TAGLIAPIETRA, F.; HUHTANEN, P. Comparison of rumen fluid inoculum vs. faecal inoculum on predicted methane production using a fully automated in vitro gas production system. **Livestock Science**, v.181, p. 65-71, 2015.

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

ROMNEY, K. G.; GILL, M. Intake of forages. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; OMED, H. M. (Ed.) **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap.3, p.43-63.

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

SALLAM, S.M.A. et al. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*) fresh or residue leaves on methane emission in vitro. **Italian Journal of Animal Science**, Pavia, v.9, n.3, p-299-303, 2010.

SIMÕES, N.S. **Uso de inóculo de fezes como substituição do conteúdo ruminal de bubalinos na técnica *in vitro* de produção de gases**. 2012. 31 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil, 2012.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B.; FRANCE, J.; A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Anim. Feed Sci. Technol.** 48, 185–197, 1994.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VARGA, A. G.; KOLVER, E. S. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. **Journal Nutrition**, v.127, n.esp., p.819-823, 1997.

VARADYOVÁ, Z.; BARAN, M.; ZELENÁK, I. Comparison of two in vitro fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, p. 81-94, 2005.

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