



Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado com aditivos¹

Astrid Rivera Rivera², Telma Teresinha Berchielli², Juliana Duarte Messana², Paula Toro Velasquez², Ana Vera Martins Franco³, Lauriston Bertelli Fernandes³

¹ Pesquisa parcialmente financiada pela Premix.

² Departamento de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Campus Jaboticabal. Via de Acesso Profº Paulo Donato Castellane s/n. Jaboticabal, SP - CEP: 14884-900.

³ Premix.

RESUMO - Objetivou-se avaliar o efeito do uso de monensina, complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos no consumo de matéria seca e nutrientes, na estimativa da digestibilidade ruminal, nos parâmetros de fermentação ruminal (pH, concentração de nitrogênio amoniacal e de ácidos graxos de cadeia curta), na população de protozoários e na produção de metano. Foram utilizados seis bovinos e com peso corporal de 530 ± 15 kg, recebendo complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos (5 g/dia); monensina (5 g/dia); caulim (5 g/dia), usado como controle adicionado à dieta composta de feno de capim-tifton 85 (*Cynodon* spp.); e concentrado, na relação 80:20. O delineamento experimental adotado para análise do consumo e da digestibilidade foi o de blocos completos casualizados e, para análise dos parâmetros ruminais e da produção de metano, o de parcelas subdivididas. O consumo foi influenciado pelo uso de monensina na dieta, mas não diferiu entre os aditivos. As digestibilidades da matéria seca e dos nutrientes não foram influenciadas pelo fornecimento dos aditivos. A relação acetato:propionato nos animais alimentados com a dieta com monensina foi menor que naqueles que receberam o complexo de leveduras e ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos, diminuindo a perda de energia na forma de metano. O pH e a concentração de nitrogênio amoniacal foram adequados para o crescimento bacteriano. A concentração de metano não é alterada pelo uso dos aditivos testados.

Palavras-chave: ácidos graxos poliinsaturados, leveduras, metano, monensina

Ruminal fermentation and methane production of cattle fed Tifton 85 grass hay and concentrate with additives

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the effect of monensin, yeast complex, unsaturated fatty acids and amino acids on dry matter and nutrient intake, total and partial digestibility and ruminal parameters of ruminal fermentation (pH, ammonia nitrogen concentration and short chain fatty acids), the protozoa population and methane production. Six castrated steers, body weight 530 ± 15 kg were used, receiving yeast complex, polyunsaturated fatty acids and amino acids (5 g/dia), monensin (5 g/dia), caulim (5g/dia, used as control), added to a diet consisting of Tifton 85 (*Cynodon* spp.) hay and concentrate at 80:20. A randomized complete block design was used to analyze and a split-plot design was used to analyze ruminal fermentation and methane production. The intakes were influenced by monensin in the diet, and no difference was observed among the additives. The dry matter and nutrients digestibilities, were not influenced by supplementing with additives. The acetate:propionate ratio in the animals fed the diet with monensin was smaller than in those that received the yeast complex and polyunsaturated fatty acids and amino acids, decreasing the energy loss in the form of methane. The pH and ammonia nitrogen concentration were adequate to microbial growth. The methane concentration was not altered with the use of the amino acids tested.

Key Words: insaturated fatty acid, methane, monensin, yeast cells

Introdução

O metano caracteriza-se como um importante gás de efeito estufa que contribui com cerca de 15% do aquecimento global, além de estar diretamente relacionado à eficiência da fermentação ruminal e à consequente perda de energia nos

sistemas de produção (Cotton & Pielke, 1995). Pode ser considerado responsável por 6% a 18% da energia bruta da dieta que é perdida durante o processo fermentativo (Pedreira & Primavesi, 2006).

O metano é eliminado por bovinos e sua produção é proveniente da fermentação ruminal, que está relacionada

ao tipo de animal e ao consumo e à digestibilidade de alimento. Assim, existe a possibilidade da redução na produção desse gás pela modificação da fermentação ruminal, obtida por alteração do volumoso, do tipo e da quantidade de carboidrato suplementado à dieta, pela adição de lipídeos e pela manipulação da microbiota do rúmen com aditivos alimentares ou componentes naturalmente presentes no alimento (Mohammed et al., 2004; Pedreira, 2004).

Segundo Johnson & Johnson (1995), estratégias para aumentar a qualidade da forragem fornecida, o uso de carboidratos não-estruturais e de aditivos como os ionóforos, leveduras e ácidos graxos poliinsaturados melhoram a digestibilidade da dieta e a eficiência do metabolismo energético, diminuindo a emissão de metano.

O ionóforo monensina têm sido utilizado na alimentação de bovinos de corte por mais de 20 anos para aumentar a eficiência alimentar (Goodrich et al., 1984; Russell & Strobel, 1989). A monensina é mais eficiente contra bactérias gram-positivas – maiores produtoras de hidrogênio, precursor de metano – que contra as gram-negativas (Tedeschi et al., 2003; Morais et al., 2006).

Outra forma de manipulação da fermentação ruminal é o uso da suplementação lipídica na dieta, uma estratégia promissora para aumentar a eficiência no sistema de produção animal e os benefícios ambientais decorrentes da redução na metanogênese. Logo, a suplementação de dietas com ácidos graxos reduz a digestibilidade da fibra e aumenta o conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta, efeitos que podem estar relacionados às reduções no crescimento de bactérias e protozoários (Tamminga & Doreau, 1991) e ao recobrimento físico da fibra com lipídeos (Jenkins & McGuire, 2006).

Desta forma, avaliou-se o efeito do uso de aditivo no consumo de matéria seca e dos nutrientes na digestibilidade ruminal, nos parâmetros de fermentação ruminal e na produção de metano.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido na Fazenda Experimental da Empresa Premix, em Patrocínio Paulista, e na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, utilizando-se seis bovinos mestiços, machos castrados, canulados no rúmen, com peso corporal de 530 ± 15 kg e idade média de 4,5 anos. Esses animais foram alojados em baias individuais cobertas, providas de bebedouro e comedouro.

Estudaram-se os efeitos da suplementação, no nível de 5 g/dia, dos seguintes aditivos: complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos (Tabela 1); monensina sódica 5%; caulim, usado como controle. Esses aditivos foram fornecidos com a dieta-base, composta de feno de capim-tifton 85 (*Cynodon* spp.) e concentrado, na relação 80:20 (Tabela 2), balanceada para atender às exigências de manutenção dos animais (NRC, 1996).

Para estimativa da produção fecal, foram coletadas amostras de fezes durante sete dias, duas vezes ao dia, às 7h30 e às 16h30, que foram congeladas para, ao final do período, formarem uma amostra composta. A estimativa da produção fecal foi realizada utilizando-se fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) como indicador interno, com base na equação: Produção fecal (g/dia) = gramas de indicador ingerido/concentração do indicador nas fezes. A determinação de fibra em detergente ácido (FDA) foi realizada segundo Van Soest et al. (1991) e o coeficiente de digestibilidade no rúmen, por meio da equação: Coeficiente de digestão da MS = $100 \times [MS \text{ ingerida} - MS \text{ fecal} / MS \text{ ingerida}]$.

As amostras de líquido ruminal foram coletadas com bomba de vácuo aspiradora NEVONI® Ref. 5005-BR manualmente, filtrada em tecido duplo de algodão. As coletas foram realizadas antes do fornecimento da dieta e 2, 4, 8 e 12 horas após a alimentação, para determinação do pH, das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e dos ácidos graxos de cadeia curta.

A fermentação ruminal foi mensurada pela análise do pH e da concentração de N-NH₃ e ácidos graxos voláteis. A determinação do pH do líquido ruminal foi realizada logo após a coleta, em potenciômetro digital. Uma alíquota de 2 mL do fluido coletado foi acondicionada em frasco de plástico e congelada a -20 °C para posterior análise de ácidos graxos de cadeia curta, segundo método adaptado de Erwin et al. (1961), utilizando-se cromatografia gasosa.

Uma alíquota de 20 mL de fluido ruminal foi acidificada e congelada para posterior análise do nitrogênio amoniacal, realizada por destilação com hidróxido de potássio 2 N, conforme método descrito por Vieira (1980).

Tabela 1 - Composição do complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos, conforme níveis de garantia fornecido pelo fabricante

Ácido oleico	12 mg ^a
Ácido linoleico	12.000 mg
Metionina	2.400 mg
Lisina	11.400 mg
Tirosina	4.850 mg
Crômio	285 mg
Probiótico (leveduras)	$0,3 \times 10^8$ b

^a mg/kg, ^b Unidades formadoras de colônia.

Tabela 2 - Composição das dietas experimentais

Item	Aditivo		
	Complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos	Monensina	Caulim
Feno capim-tifton 85	80	80	80
Polpa cítrica	5,98	5,98	29,91
Gérmen de milho	6,00	6,00	6,00
Levedura seca	0,20	0,20	0,20
Farelo de amendoim	4,00	4,00	4,00
Casca de soja	1,20	1,20	1,20
Farelo de algodão 38%	0,19	0,19	0,19
Farelo de trigo	1,25	1,25	1,25
Carbonato de cálcio	0,56	0,56	0,56
Ureia	1,39	1,39	1,39
Cloreto de sódio	0,18	0,18	0,18
Premix mineral	1,47	1,47	1,47
Leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos (g/dia)	5,00	0,00	0,00
Monensina (g/dia)	0,00	5,00	0,00
Sem aditivo	0,00	0,00	0,00
Nutricional (%MS)			
Matéria orgânica	92,23	92,23	92,23
Proteína bruta	14,90	14,90	14,90
Fibra em detergente neutro	73,61	73,61	73,61
Fibra em detergente ácido	35,86	35,86	35,86
Lignina	5,09	5,09	5,09
Energia bruta (Mcal/kgMS)	4,10	4,10	4,10

As amostras dos alimentos, das sobras e das fezes foram encaminhadas ao Laboratório de Nutrição Animal (LANA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, para determinação do conteúdo de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), energia bruta (EB) e proteína bruta (PB), de acordo com AOAC (1990). A fibra em detergente neutro (FDN), a fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas e a lignina de acordo com Van Soest et al. (1991).

As amostragens de conteúdo ruminal para contagem de protozoários foram realizadas antes do fornecimento do alimento, no 5^o e 6^o dia de cada período experimental. A amostra foi transferida para um recipiente junto com uma solução de formaldeído 40% na proporção de 1:1. O método utilizado para a avaliação quantitativa e qualitativa dos gêneros de ciliados foi o descrito por Dehority (1984).

A produção de gás metano foi estimada pela técnica de produção de gases *in vitro*, de acordo com metodologia de Theodorou et al. (1994), modificada por Mauricio et al. (1999).

Estudaram-se os efeitos da adição de 0,1875 mg de complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos ou monensina ou caulim em 300 mg do substrato base composto de feno de capim-tifton 85 e concentrado, na relação 80:20. Cada dieta foi incubada em frascos de vidro (100 mL) com três repetições e uma réplica por repetição. Foram usados três brancos e um

substrato-padrão para um total de 22 frascos incubados. Em cada frasco foram adicionados o substrato-base, o meio de cultura (30 mL) e o inóculo (15 mL), sempre mantendo 55 mL de espaço livre para acúmulo dos gases produzidos.

O meio de cultura usado era composto por solução de macrominerais; solução de microminerais; solução tampão; solução de resazurina; meio "B" e água destilada. Para obtenção do inóculo, foram usados como doadores do líquido ruminal três novilhos mestiços castrados, canulados no rúmen, com peso corporal de 278 ± 12 kg e média de 24 meses de idade, adaptados durante 10 dias à dieta com volumoso (feno de capim-tifton 85) e concentrado na relação 80:20, balanceada para atender às exigências de manutenção dos animais (NRC, 1996).

Foram realizadas três incubações, cada uma com 24 horas de duração. Durante cada período de incubação, as leituras de pressão (psi) originadas dos gases acumulados foram registradas no transdutor de pressão PressDATA 800[®] em períodos de leitura de 9, 12 e 24 horas. Adicionalmente, amostras dos gases produzidos foram coletadas em seringas e imediatamente transvasadas a tubos de vacutainer de 5 mL, sem aditivo, para análises no Laboratório de Biomassa e Biodigestão Anaeróbia do Departamento de Engenharia Rural da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP). A leitura de CH₄ foi realizada em cromatógrafo de fase gasosa Finigan GC-2001, equipado

com as colunas Porapak Q e Peneira Molecular e detector de condutividade térmica.

O delineamento experimental utilizado para avaliar o consumo e coeficiente de digestibilidade foi de blocos inteiramente casualizados, composto de seis animais, três tratamentos e dois períodos de coleta. As análises estatísticas dos parâmetros ruminais (pH, ácidos graxos de cadeia curta e nitrogênio amoniacal) e da produção de metano foram realizadas em esquema de parcelas subdivididas, tendo na parcela os tratamentos e nas subparcelas o tempo de coleta. As análises de variância foram realizadas utilizando-se o procedimento GLM do programa SAS® (Littell et al., 2002) e, em caso de diferenças significativas ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste Tukey. Também foram ajustadas equações de regressão entre os parâmetros ruminais, o pH e a concentração de amônia em cada tempo de colheita da amostra após o fornecimento dos suplementos.

Resultados e Discussão

A redução no consumo dos nutrientes da dieta contendo monensina (Tabela 3) pode ser parcialmente explicada pela diminuição na taxa de reciclagem de sólidos e líquidos no rúmen e pelo consequente aumento do enchimento ruminal (Allen & Harrison, 1979), enquanto a reduzida motilidade ruminal induzida pela monensina pode ser causa da diminuição da reciclagem ruminal (Deswysen et al., 1987).

De modo semelhante, Medel et al. (1991) também verificaram que o fornecimento de monensina a bovinos em confinamento reduziu o consumo sem alterar o ganho de peso, ocasionando redução na conversão alimentar. Esse

menor consumo está relacionado também às mudanças no metabolismo energético e ao maior aporte de aminoácidos dietéticos no intestino delgado, em decorrência da diminuição na deaminação da proteína no rúmen.

As digestibilidades ruminais (Tabela 3) não diferiram entre os aditivos testados, mas sabe-se que alguns autores (Erasmus et al., 1992; Hegarty, 1999; Chaucheyras & Fonty 2001) têm comprovado que esses aditivos melhoram as condições ambientais no rúmen e estimulam o crescimento da população bacteriana, principalmente de bactérias celulolíticas, aumentando a digestibilidade de carboidratos estruturais. Neste experimento, a monensina não influenciou a digestibilidade de nenhum dos nutrientes avaliados (MS, MO, PB, FDN e FDA), portanto, apesar da diminuição no consumo de MS nos animais alimentados com a dieta contendo monensina, a taxa de passagem possivelmente não sofreu alteração significativa, o que está relacionado à relação volumoso:concentrado utilizada, de 80:20 na MS.

O pH ruminal é influenciado principalmente pela produção de saliva, por isso, animais alimentados com dietas contendo elevada porcentagem de alimentos volumosos normalmente apresentam pH ruminal sempre próximo à neutralidade, em virtude do maior estímulo de produção de saliva durante os processos de ingestão e regurgitação dos alimentos. Nesses casos, os efeitos da monensina sobre o pH são pouco expressivos. De acordo com de Veth et al. (2001), a digestibilidade da FDN reduz quando o pH ruminal permanece quatro horas em valores abaixo de 6,0 e a síntese microbiana reduz quando o pH permanece 12 horas abaixo desse valor. É possível, portanto, que o pH tenha se mantido na faixa considerada adequada para atuação dos microrganismos ruminais.

Tabela 3 - Consumo e digestibilidade de nutrientes em bovinos alimentados com volumoso, concentrado e aditivos

	Aditivo			CV (%)
	Complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos	Monensina	Caulim	
Matéria seca, %PC	1,52A	1,40B	1,51A	5,20
Matéria seca kg /PC ^{0,75}	73,45A	67,43B	73,04A	4,69
Matéria seca, kg/dia	8,23A	7,53B	8,15A	4,04
Matéria orgânica, kg/dia	7,59A	6,95B	7,51A	4,13
Fibra em detergente neutro, kg/dia	6,06A	5,54B	5,99A	4,18
Fibra em detergente ácido, kg/dia	2,95A	2,70B	2,92A	4,32
Proteína bruta, kg/dia	1,17A	1,06B	1,15A	4,43
Digestibilidade (%)				
Matéria seca	54,40	55,04	56,33	4,08
Matéria orgânica	52,02	3,28	54,59	5,19
Fibra em detergente neutro	54,93	55,39	55,99	3,77
Fibra em detergente ácido	53,34	53,83	53,81	4,57
Proteína bruta	58,87	61,15	60,02	6,57

CV - coeficiente de variação.

Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($P > 0,05$).

A presença de monensina na dieta influenciou o pH ruminal (Tabela 4). Embora não tenha diferido entre os aditivos estudados, o pH foi mais alto nos animais que receberam monensina, provavelmente em virtude do mecanismo proposto por Russel & Strobel (1989) de que a monensina atua no fluxo de íons na membrana celular da bactéria, aumentando o pH ruminal.

De acordo com Schelling (1984), a monensina atua sobre o metabolismo de energia e de nitrogênio no rúmen, aumentando a concentração de propionato e diminuindo a de metano no rúmen (Tabela 4). A maior concentração de ácido propiônico, e consequentemente menor relação acético:propiônico, foi observada para a dieta com monensina (pH 6,81). Conforme descrito por Zhen-hu et al. (2004), valores de pH superiores ou iguais a 6,8, além de outros fatores, favorecem o aumento de acetato:propionato.

A alteração da concentração de acetato:propionato observada com o fornecimento de monensina, inferior à obtida com as outras dietas, se deve ao efeito indireto da monensina, que reduz a população de bactérias fibrolíticas, que produzem principalmente acetato, liberando hidrogênio. Desta forma, a monensina melhora a eficiência do metabolismo energético, alterando as proporções dos ácidos graxos produzidos no rúmen e diminuindo a perda de energia na forma de metano (Bergen & Bates, 1984; Bagg, 1997).

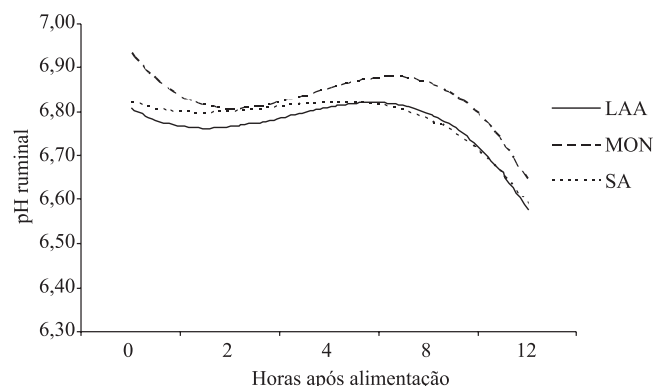
Nas concentrações de N-NH₃ ruminal (Tabela 4), a dieta com monensina apresentou as menores concentrações de N-NH₃ ruminal, uma vez que inibe a atividade das bactérias fermentadoras de aminoácidos, entre outras, e a desaminação e o nível de amônia ruminal.

Com o fornecimento da dieta com monensina, a concentração de N-NH₃ ruminal foi menor que com as outras dietas em todos os horários analisados, o que provavelmente está relacionado à redução da degradação da proteína dietética no rúmen, que está associada ao uso de monensina (Lana & Russel, 2001). No entanto, não houve curva de regressão que se ajustasse para as dietas contendo

monensina e o complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos. Duas horas após alimentação, foi observada maior concentração de N-NH₃ ruminal (Figura 2), associada à degradação das fontes proteicas provenientes do concentrado. A menor concentração ocorreu 8 horas após alimentação, correspondendo a sua utilização pelos microrganismos.

As concentrações de N-NH₃ ruminal foram suficientes para suportar o crescimento bacteriano, de acordo com o valor mínimo ideal citado por Satter & Slyter (1974), de 5 mg N-NH₃/100 mL. Entretanto, de acordo com Van Soest (1994), teores de N-NH₃ inferiores a 13 mg/100 mL no rúmen podem afetar a disponibilidade de nitrogênio para os microrganismos, comprometendo a ingestão e digestibilidade da fibra.

Observaram-se altos coeficientes de variação médios (Tabela 5), entretanto, devido à dinâmica da população microbiana no rúmen, coeficientes de variação elevados têm sido observados em experimentos dessa natureza (Coleman, 1979; Veira, 1986).



LAA =complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos; MON= monensina; SA= caulin (controle, sem aditivos)
 $pH_{LAA} = 6,80 - 0,036 T + 0,0112 T^2 - 0,00082 T^3, r^2= 0,51$ e $P=0,0003$;
 $pH_{MON} = 6,92 - 0,087 T + 0,0201 T^2 - 0,00124 T^3, r^2=0,49$ e $P=0,0004$;
 $pH_{SA} = 6,82 - 0,017 T + 0,0054 T^2 - 0,00047 T^3, r^2=0,47$ e $p= 0,0008$.
 Em que t é o tempo após a alimentação da manhã, expresso em horas.

Figura 1 - Variação diária do pH ruminal após a alimentação.

Tabela 4 - Parâmetros ruminiais de bovinos alimentados com volumoso, concentrado e aditivos

Parâmetro ruminal	Aditivo			CV (%)
	Complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos	Monensina	Caulim	
pH	6,75B	6,81A	6,76AB	1,27
N-NH ₃ (mg/dL)	7,38	6,61	7,65	40,12
Total de ácidos graxos de cadeia curta (mmol /L)	90,35A	81,16B	88,40A	7,13
Acetato (mmol/ L)	68,75A	67,48A	58,60B	6,75
Propionato (mmol /L)	14,37B	16,71A	13,20B	9,58
Butirato (mmol /L)	7,21A	5,83B	7,11A	11,87
Relação acetato:propionato	3,78B	3,05A	3,62B	7,50

CV - coeficiente de variação.
 Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem (P>0,05) pelo teste Tukey.

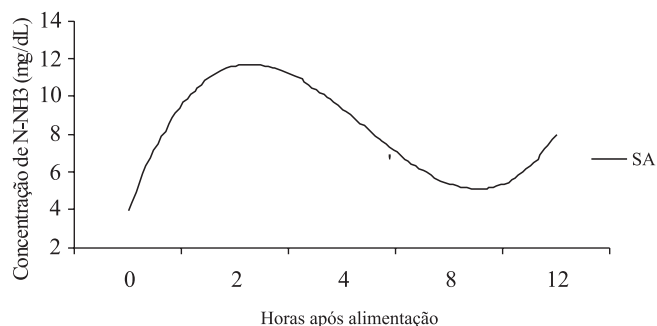


Figura 2 - Variação diária da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) no tempo AS = caulim (controle, sem aditivos)
 $N-NH_3 = 4,40 + 4,58 T - 0,96 T^2 + 0,05 T^3$, $r^2=0,57$ e $p<0,0001$.

Em que T é o tempo após a alimentação da manhã, expresso em horas.

Diferença significativa na população total de protozoários foi evidenciada quando fornecido o complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos em comparação à monensina. O aumento no número de protozoários ciliados observado com esse aditivo comprova o efeito da suplementação com *Saccharomyces cerevisiae*, que pode resultar no crescimento dessa população (Miranda et al., 1996; Arakaki et al., 2000). Por outro lado, a menor população observada com a suplementação com monensina pode estar associada ao efeito direto na viabilidade dos protozoários, como descrito por Bergen & Bates (1984), que determinaram efeito da monensina na estabilidade da membrana celular de protozoários.

O gênero *Entodinium* predominou entre os protozoários para todas as dietas estudadas, com concentração total que variou de 70,0 a 88,9%, concordando com a citação de Dehority (1991) e Martinele et al. (2008) de que, em geral, cerca de 90% da fauna de ruminantes é formada de entodínios. A concentração de protozoários do gênero *Dasytricha* foi menor ($P<0,05$) nos animais que receberam dieta com monensina em comparação àqueles que não receberam aditivos. Esse resultado sugere que esses protozoários podem ter alguma relação com as bactérias gram-positivas ou serem sensíveis à monensina.

A produção de metano não diferiu entre os aditivos estudados (Tabela 6). O volume de CH₄ foi similar entre as dietas durante o período de incubação (Figura 3) e não teve influência dos aditivos.

Embora a produção de metano estimada *in vitro* não tenha apresentado resposta a monensina, a quantificação de ácidos graxos de cadeia curta comprovou que a relação acetato:propionato foi menor, significando menor perda de energia. Observou-se também menor produção de metano quando fornecida monensina em comparação ao caulim (sem aditivos) durante o período de incubação (Figura 3).

Estudos *in vitro* têm demonstrado acréscimo na produção de CH₄ de 33 mL g⁻¹ MS com o aumento no teor de FDN (Getachew et al., 2005). Neste estudo os valores observados foram menores e não diferiram entre os aditivos utilizados nas dietas. Sabe-se que, quanto maior o teor de fibra de um ingrediente, maior a porcentagem de metano liberada.

Tabela 5 - Média do número de protozoários ciliados no rúmen ($\times 10^4$ /mL)

Protozoários ($n^\circ \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$)	Aditivo			CV (%)
	Complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos	Monensina	Caulim (sem aditivo)	
<i>Entodinium</i>	62,81	51,66	44,28	22,19
<i>Diplodiniinae</i>	28,75	23,44	21,79	29,40
<i>Isotricha</i>	10,94	8,83	13,47	37,96
<i>Dasytricha</i>	11,55AB	8,08B	12,84A	23,29
<i>Charonina</i>	16,69	12,62	11,70	34,13
Total	70,65A	53,18B	63,26AB	13,80

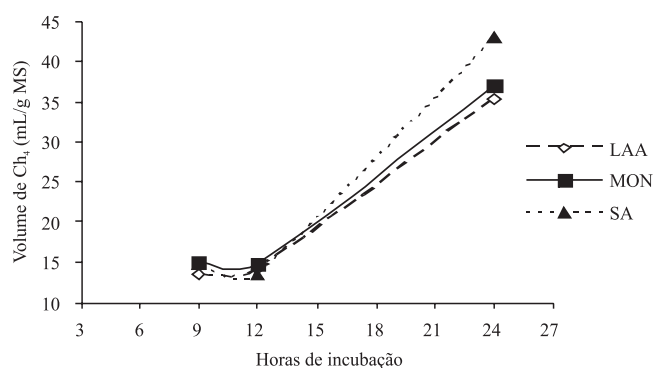
CV = coeficiente de variação.

Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem ($P>0,05$) pelo teste Tukey.

Tabela 6 - Valor médio do volume total de gás e de metano (CH₄) produzido por grama de matéria seca (MS) incubada

Volume de gás (mL/ g MS)	Aditivo			CV (%)
	Complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos	Monensina	Caulim (sem aditivo)	
Total	62,33	61,67	63,05	17,48
Metano	21,04	22,29	23,78	31,87

CV = coeficiente de variação.



LAA = complexo leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos; MON = monensina; AS = caulin (controle, sem aditivos).

Figura 3 - Produção de CH₄ do substrato e aditivos incubados durante 24 horas.

A relação do gás produzido com o metano teve acréscimo de volume 12 horas a partir da incubação, o que, de acordo com Fondevila & Barrios (2001), corresponde à somatória do gás direto e indireto: o maior é o indireto. O gás direto é produto da descarboxilação oxidativa do piruvato e o indireto, produto da reação entre o tampão e os ácidos graxos de cadeia curta para manter o pH do meio e, como descrito anteriormente, a maior produção de gás associa-se à formação de ácidos acético e butírico com a fermentação dos componentes estruturais do substrato.

Conclusões

A suplementação com monensina reduz a relação acetato:propionato, resultando em menor perda de energia. A produção de metano não reduz com adição de complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos nem com a adição de monensina no substrato incubado. Assim, pesquisas devem ser realizadas para verificar a persistência das respostas ao uso de aditivos e avaliar as vantagens e a relação custo/benefício do uso desses aditivos.

Referências

ALLEN, J.D.; HARRISON, D.G. The effect of dietary addition of monensina upon digestion in the stomachs of sheep. *Proceedings of the Nutrition Society*, n.38, p.32A, 1979.

ARAKAKI, I.C.; STAHRINGER, R.C.; GARRETT, J.E. et al. The effects of feeding monensin and yeast culture, alone or in combination, on the concentration and generic composition of rumen protozoa in steers fed on low-quality pasture supplemented with increasing levels of concentrate. *Animal Feed Science and Technology*, v.84, n.2, p.121-127, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. *Official methods of analysis*. 12.ed. Washington, 1098p. 1990.

BAGG, R. Mode of action of ionophores in lactating dairy cattle. Usefulness of ionophores in lactating dairy cattle. In: SYMPOSIUM HELD, 1997, Ontario. *Proceedings...* Ontario: Ontario Veterinary College, 1997. p.13-21.

BERGEN, W.G.; BATES, D.B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *Journal of Animal Science*, v.58, n.6, p.1465-1483, 1984.

CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reproduction Nutrition Development*, v.41, n.5, p.57-68, 2001.

COLEMAN, G.S. The role of rumen protozoa in the metabolism of ruminants given tropical feeds. *Tropical Animal Production*, v.4, n.3, p.199-213, 1979.

COTTON, W.R.; PIELKE, R.A. *Human impacts on weather and climate*. Cambridge University Press, 1995. 288p.

DEHORITY, B.A. *Rumen microbiology*. Wooster: OARDC/OSU, 1991. 87p.

DEHORITY, B.A. Evaluation of sub sampling and fixation procedures used for counting rumen ciliate protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*, v.48, n.1, p.182-185, 1984.

DESWYSEN, A.G.; ELLIS, W.C.; POND, K.R. Interrelationships among voluntary intake, eating and ruminating behavior and ruminal motility of heifers fed corn silage. *Journal of Animal Science*, v.64, p.835-841, 1987.

De VETH, M.J.; KOLVER, E.S. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, v.84, p.2066-2207, 2001.

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

ERASMUS, L.J.; BOTHA P.M.; KISTNER, A. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.75, n.8, p.3056-3065, 1992.

FONDEVILA, M.; BARRIOS, A. The gas production technique and its application to the study of the nutritive value of forages. *Cuban Journal of Agricultural Science*, v.35, n.3, p.187-196, 2001.

GETACHEW, G.; DePETERS, E.J.; ROBINSON, P.H. et al. 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, n.1, p.547-559, 2005.

GOODRICH, R.D.; GARRETT, J.E.; GAST, D.R. et al. Influence of monensin on the performance of cattle. *Journal of Animal Science*, v.58, p.1484-1498, 1984.

HEGARTY, R.S. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, v.50, n.8, p.1299-1305, 1999.

JENKINS, T.C.; McGUIRE, M.A. Major advances in nutrition: Impact on milk composition. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.1302-1310, 2006.

JOHNSON, K.A.; JOHNSON D.E. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, v.73, n.8, p.2483-2492, 1995.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumosos ou concentrados. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.30, n.1, p.254, 2001

LITTELL, R.C.; STROUP, W.W.; FREUND, R.J. *SAS for linear models*. 4.ed. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2002. 466p.

MARTINELE, I.; EIFERT, E.C.; LANA, R.P. et al. Efeito da monensina e do óleo de soja sobre os protozoários ciliados do rúmen e correlação dos protozoários com parâmetros da

- fermentação ruminal e digestivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.1129-1136, 2008.
- MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S. et al. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, n.4, p.321-330, 1999.
- MEDEL, M.; MERINO, P.; THOMAS, R. et al. Modo de acción del monensin en metabolismo ruminal y comportamiento animal. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.18, n.3, p.153-173, 1991.
- MIRANDA, R.L.A.; MENDOZA, M.G.D.; BÁRCENA-GAMA, J.R. et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v.63, n.2, p.289-296, 1996.
- MOHAMMED, N.; ONODERA, R.; ITABASHI, H. et al. Effects of ionophores, vitamin B6 and distiller's grains on in vitro tryptophan biosynthesis from indolepyruvic acid, and production of other related compounds by ruminal bacteria and protozoa. **Animal Feed Science and Technology**, v.116, n.3, p.301-311, 2004.
- MORAIS, J.A.S.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds.) **Nutrição de ruminantes**. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p.539-570.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 1996. 242p.
- PEDREIRA, S.M. **Estimativa da produção de metano de origem animal por bovinos tendo como base a utilização de alimentos volumosos: utilização da metodologia do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF₆)**. 2004. 136f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- PEDREIRA, S.M.; PRIMAVERSI, O. Impacto da produção animal sobre o ambiente. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds.) **Nutrição de ruminantes**. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p.497-511.
- RUSSEL, J.B.; STROBEL, H.J. Mini-review: the effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1-6, 1989.
- SATTER, L.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal Nutrition**, v.32, n.2, p.199-208, 1974.
- SHELLING, G.T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v.58, n.6, p.1518-1527, 1984.
- TAMMINGA, S.; DOREAU, M. Lipids and rumen digestion. In: JOUANY, J.P. (Ed.) **Rumen microbial metabolism and ruminant digestion**. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1991. p.151-164.
- TEDESCHI, L.O.; FOX D.G.; TYLUTKI, T.P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. **Journal Environmental Quality**, v.32, n.7, p.1591-1602, 2003.
- THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, n.1, p.185-197, 1994.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.
- VAN SOEST, J.P.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- VEIRA, D.M. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. **Journal Animal Science**, v.63, n.5, p.1547-1560, 1986.
- VIEIRA, P.F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteína e lipídeos em ração para ruminantes**. 1980. 98f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- ZHEN-HU, H.; GANG, W.; HAN-QING, Y. Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. **Biochemical Engineering Journal**, v.21, n.1, p.59-62, 2004.