

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

Avaliação *in vitro* de leguminosas taniníferas tropicais para mitigação de metano entérico

CIBELE LONGO

Piracicaba
2007

CIBELE LONGO

Avaliação *in vitro* de leguminosas taniníferas tropicais para mitigação de metano entérico

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Energia Nuclear na Agricultura
Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

Piracicaba

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Longo, Cibele

Avaliação in vitro de leguminosas taniníferas tropicais para mitigação de metano entérico / Cibele Longo; orientador Adibe Luiz Abdalla. - - Piracicaba, 2007.

153 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Aquecimento global 2. Gases 3. Leguminosas forrageiras
4. Microrganismos celulolíticos 5. Nutrição animal 6. Ovinos I. Título

CDU 591.53:504.064

Dedico,

Aos meus pais

Darci Grimaldi Longo e Anibal Longo, por serem os facilitadores do meu caminho,
e

Aos meus avós (*in memorem*),

Rosa Bassan Grimaldi, Benedito Grimaldi, Cristino Longo e Natália Duran Longo,
por nos indicarem os caminhos.

AGRADEÇO

Ao Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla, por me orientar novamente e confiar este projeto em minhas mãos disponibilizando os suportes logísticos e técnicos necessários,

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e a Universidade de São Paulo pela oportunidade deste projeto,

Ao CNPq e CAPES pela concessão das bolsa de doutorado,

Ao Centro de pesquisa Forschungszentrum Jülich, em especial ao departamento de Agrosphera (ICG-IV) e ao Instituto de Ciências Animais da Universidade de Bonn, pelas condições de trabalhos,

Ao pesquisador Dr. Peter Burauel do Centro de Pesquisa de Jülich pelo rápido aceite da proposta e suporte necessário,

Ao Prof. Dr. Karl Heinz Südekum pela oportunidade e suporte para realização do experimento e pelas valiosas discussões,

Dr. Jürgen Hummel pelo apoio na condução do experimento, coletas e discussões,

Ao microbiologista Dr. Jost Liebich por sua orientação, por dividir seus conhecimentos e principalmente pela amizade,

À Profa. Dra. Dorinha M.S.S. Vitti, por suas sugestões e esclarecimentos, quando solicitados,

Ao pesquisador Edmilson J. Ambrosano, pelas sugestões na escolha das plantas,

Aos funcionários Lécio A. Castilho, J. Everaldo E. M. dos Santos, M. Regina Peçanha pelo respeito, dedicação e responsabilidade na participação dos experimentos,

A todos estagiários do departamento de Nutrição Animal do CENA, que aprendendo me ajudaram muito,

Aos velhos e novos amigos do departamento de Nutrição Animal, Ives Cláudio da S. Bueno, Sérgio Lucio S. Cabral Filho, Sarita P. Gobbo, Patrícia B. Godoy, Ana Paula Roque, Raquel S. D. Betini, Tanimara Soares, Alessandro P. Minho, Priscila Brigide, Antonio Baptista, Alcester Mendes, Lerner A. Oinedo, Eduardo F. Nozella, Sobby M. A. Salam, pelas discussões, troca de experiências e harmonioso convívio,

Aos amigos Sérgio Lucio C. Filho, Vlândia Correchel, Patrizia A. Bricarello, Roberta B. M. Sparovek, M. Beatriz Leite Meireles pelo apoio nos momentos mais necessários e pela amizade cada vez mais sólida e verdadeira,

Às queridas companheiras do grupo de estudos xamânicos, Carla, Rose, Cristine, Priscila, Juliana, Bia, Beta, Augusta e Ellen, por compartilharem suas energias, experiências, tristezas, alegrias e sonhos,

À querida amiga Alice Kiyomi Tachibana por me ajudar a acreditar nos meus talentos,

A toda minha família, pais, avós, irmã, cunhado, sobrinhos, tios e primos, por compreenderem minha ausência em muitas ocasiões,

A todos, o meu muito obrigada.

“Neste encontro com você, penso:

Não me interessa o que você faz para viver,

Eu quero saber o que de fato você busca e se é capaz de ousar sonhar e encontrar as aspirações de seu coração

Não me interessa a sua idade, eu quero sabe se você será capaz de se transformar em tolo para poder amar, viver seus sonhos, aventurar-se a estar vivo.

Eu quero saber se você tocou o centro de sua tristeza,

Se você tem sido exposto pelas traições da vida ou se tem se contorcido e se fechado com medo da próxima dor.

Eu quero saber se você é capaz de se sentar com a dor, a sua e a minha, sem tentar escondê-la, nem melhorá-la.

Eu quero saber se você pode ficar com a alegria, a minha e as sua.

Se você é capaz de dançar loucamente e deixar que o êxtase o envolva, até as pontas dos pés e das mãos sem querer nos aconselhar a ser mais cuidadosos, mais realistas, nem nos lembrar as limitações do ser humano.

Não me interessa se a história que você me conta é verdadeira.

Eu quero saber se você é capaz de desapontar o outro para ser verdadeiro consigo mesmo.

Se você é capaz de suportar a acusação de traição e não trair a própria alma.

Eu quero saber se você pode ser confiável e verdadeiro.

Eu quero saber se você pode ver a beleza mesmo quando o dia não está belo e se pode ligar a sua vida a presença de Deus.

Eu quero saber se você é capaz de viver com os fracassos, o seus e os meus, e mesmo assim se postar nas margens de um lago e gritar para os reflexos da lua: “Sim”.

Não me interessa onde você mora e nem quanto dinheiro você ganha, eu quero saber se é capaz de acordar depois da noite do luto e do desespero, exausto e ferido até a alma, e fazer aquilo que precisa ser feito.

Não me interessa o que você é e nem mesmo como chegou até aqui.

Eu quero saber se você irá postar-se comigo no centro do fogo e não fugir.

Não me interessa onde e com quem você estudou.

Eu quero saber o que o sustenta interiormente quando tudo o mais desabou.

Eu quero saber se você é capaz de ficar só consigo e se realmente é boa companhia para si, mesmos nos momentos vazios...”

(Palavras de um chefe indígena a forasteiros que chegavam ...)

Resumo

LONGO, C. **Avaliação *in vitro* de leguminosas taniníferas tropicais para mitigação de metano entérico.** 2007. 153 f Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

Os animais contribuem para o aumento da concentração de metano na atmosfera através da fermentação de tanques de esterco e da fermentação do trato digestivo (fermentação entérica). A fermentação entérica dos ruminantes, pseudo-ruminantes (cavalos, asno, mulas) e não ruminantes produzem em média 80 Tg/ano de metano e representam 28 % do metano antropogênico global emitido, dos quais 95 % provêm dos ruminantes. Os objetivos destes trabalhos foram (i) rastrear novos materiais com potencial forrageiro que contenham tanino e que promovam redução de metano entérico; (ii) estudar a influência dessas plantas sobre a produção de metano e parâmetros fermentativos *in vitro*; e (iii) estudar a influência dessas plantas sobre a população de *Fibrobacter succinogenes* e a comunidade metanogênica no meio de fermentação. Os resultados são apresentados na forma de capítulos, sendo o primeiro objetivo descrito no Capítulo 3, no qual é descrita a caracterização das leguminosas taniníferas *Stylobium aterrimum* (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala* (LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC). Estas plantas foram avaliadas pela composição química e quantificação de compostos fenólicos e bioensaio até 96 h de incubação *in vitro*; tendo *Cynodon x cynodon* (CYN) como controle para avaliar a produção de gás potencial (A), a fase lag (L), a taxa fraccional de fermentação (μ) e o incremento de gás devido à adição de PEG após 8, 24 e 48 h de incubação nas cinco plantas. As leguminosas tiveram melhor desempenho fermentativo que a gramínea, com exceção de MIC. Entretanto, a fermentação de todas leguminosas foi limitada diferentemente pela presença de tanino, da fibra indigestível ou pela ação aditiva de ambos. Entre todas as plantas, LEU mostrou ser uma forragem de boa qualidade para suplementação protéica em dietas de ovinos, assim como STA e STD, contanto que para estas haja um melhor manejo de produção para evitar o alto conteúdo de fibras, especialmente de FDA. MIC poderia ser incluído na dieta de ovinos em baixa concentração, não com a finalidade principal de suplementação protéica, mas explorando esta leguminosa como aditivo para mitigação de metano. No Capítulo 4 são apresentados os resultados de outro ensaio *in vitro* (segundo objetivo). A técnica *in vitro* de produção de gás foi utilizada para avaliar as quatro leguminosas taniníferas (STA, STD, LEU e MIC) e o CYN como controle em dois horários, no $t_{1/2}$ (tempo para obtenção da

metade da GP) e após 24 h de incubação, medindo a produção total de gás, metano, amônia, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), massa microbiana (MM) e a degradabilidade verdadeira da matéria seca (VDMS). A produção de metano em $t_{1/2}$ foi reduzida ($P < 0,05$) com adição das leguminosas em 17% e quando relacionado à VDMS, esta redução alcançou em média 50% com LEU e STA e 37% com MIC e STD. LEU e STA causaram aumento significativo na MM seguida por STD, MIC e CYN. A relação MM/SCFA em $t_{1/2}$ foram maiores para LEU (14,7) e STA (14,1) seguida por STD (6,1), MIC (5,6) e CYN (4,6). A maior MM para LEU e STA sugere uma produção de ATP maior, porém, as diferentes proporções de AGCC demonstraram diferentes rotas de aquisição de ATP. O Capítulo 5 se refere à quantificação de linhagens de bactéria ruminal, a qual foi realizada utilizando primers específicos para detecção de seqüências de gene 16S rDNA para metanogênicas e para a bactéria celulolítica *Fibrobacter succinogenes* através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Foi também investigado a influência das leguminosas na comunidade metanogênica através da eletroforese em gel com gradiente denaturante (DGGE) de seqüências de gene 16S rDNA. As metanogênicas em $t_{1/2}$ foram 2,0 e 0,9 vezes menores que com STA e LEU comparadas com o controle, mas foram 2,5 e 0,5 vezes maiores com MIC e STD. A população de *F.succinogenes* foi 2,3 e 1,8 vezes menores do que o controle quando LEU e STA foram incubadas. A análise de DGGE para metanogênicas resultou em diferente distribuição de bandas com os tratamentos. CYN apresentou algumas bandas mais fortes, as quais se tornaram fracas com as leguminosas, exceto em STA. Algumas bandas tanto desapareceram, como em LEU, STA e MIC, ou se tornaram mais fracas, especialmente em STA. MIC apresentou ligeiro aumento no número de bandas fracas. É confirmado que as plantas taniníferas estudadas foram capazes de reduzir a emissão de metano com diferentes proporções dos produtos finais de fermentação, afetando negativamente a população de *F. succinogenes* e causando alterações na estrutura da comunidade metanogênicas.

Palavras chaves: ruminante, ovinos, produção de gás, microrganismos, metanogênicas, tanino, fenólicos, metano

Abstract

LONGO, C. **In vitro evaluation of the taninniferous tropical legumes in order to mitigate enteric methane.** 2007. 153 p Thesis (Doctoral) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

Animals contribute to increasing the methane concentration in the atmosphere through the fermentation of livestock manure and the fermentation in the digestive tract, e.g, enteric fermentation. The enteric fermentation of ruminants, pseudo-ruminants (horses, donkeys, mules) and non-ruminants produce an average of 80 Tg/year of methane and comprise 28 % of global anthropogenic methane emission, from which 95% arise from ruminants. The aims of this study were (i) to scan new potential forage containing tannin, which may reduce enteric methane emission; (ii) to study the influence of those plants on methane production and fermentative parameters *in vitro*; (iii) to study the influence of those plants on the population of *Fibrobacter succinogenes* and the methanogen community in the fermentation fluid. The results are presented in the form of chapters, being the first objective studied described in the Chapter 3, in which refers to the characterization of the tannin-rich legumes *Stylobium aterrimum* (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala*(LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC). They were appraised for the chemical composition, quantification of phenolic compounds and bioassay up to 96 h *in vitro* incubation using *Cynodon x cynodon* (CYN) as control, to evaluate the potential gas production, (A), lag phase (L), fractional rate of gas production (μ) and the gas increment due to PEG addition after 8, 24 and 48 h incubation of the five plants. Legumes showed better fermentative performance (except MIC) than the grass. However, each legumes fermentation was limited differently by the presence of condensed tannin or the indigestible fiber or by the additive action of both. Among the plants, LEU showed good quality forage for protein supplementation in sheep diets as well as STA and STD as long there is an agriculture management to reduce indigestible fiber, specially ADF. MIC could be included in a sheep diet in low concentration, aiming not the protein supplementation, but exploiting it as an additive to methane mitigation. In Chapter 4 the second object is discussed describing an *in vitro* gas test to evaluate the four tannin-rich legumes (STA, STD, LEU and MIC), and CYN as control at two main time points: $t_{1/2}$ (time of half maximal gas production) and 24 h, measuring total gas production, methane, ammonia, short chain fatty acids (SCFA), microbial mass growth (MM) and true substrate degradability (TSD). Methane production at $t_{1/2}$ was reduced ($P < 0.05$) with addition of legumes by 17 % but when related to TSD this reduction reached on average 50 % with LEU and STA

and 37% with MIC and STD. LEU and STA caused a significant increase in MM followed by STD, MIC, and CYN. Additionally, high MM/SCFA ratios in $t_{1/2}$ were found in LEU (14.7) and STA (14.1) and followed by STD (6.1), MIC (5.6) and CYN (4.6). The higher MM in LEU and STA suggested higher ATP production; however, the different proportion of the SCFA demonstrated different routes of ATP acquisition. Chapter 5 refers to the quantification of specific strains of rumen bacteria, which was performed using designed primers for detecting 16S rDNA gene sequences for methanogens and the cellulolytic bacteria *Fibrobacter succinogenes* by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Also, the influence of those four legumes on the methanogenic community was investigated using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA gene. Methanogens at $t_{1/2}$ were 2.0 fold and 0.9 fold lower with STA and LEU compared to the control, but they were 2.5 fold and 0.5 fold higher with MIC and STD. *F. succinogenes* population was 2.3 and 1.8 fold lower than the control when LEU and STA was applied. DGGE analysis of the methanogenic population resulted in different band patterns with treatments. CYN presented some strong bands, which became weaker with the legumes, except in STA. Some bands either disappeared, as in LEU, STA and MIC, or became weaker, especially in STA. MIC increased slightly the number of weak bands. It is confirmed that the studied taninniferous plants were able to reduce enteric methane with different fermentation products proportions, as well negatively affected *F. succinogenes* population and caused changes in the methanogenic community structure.

Keywords: ruminant, ovine, gas production, microorganisms, methanogens, tannin, phenolic, methane

	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Metano como contaminante do ambiente	15
2.2. Metano entérico como perda energética	17
2.3. Aspectos gerais da produção de metano entérico	20
2.4. Formas de mitigação de metano entérico	22
2.5. Influência de plantas taniníferas na mitigação de metano	24
2.6. Influência de plantas taniníferas na degradabilidade, produção de amônia e ácidos graxos de cadeia curta	26
2.7. Microorganismos fibrolíticos e suas interações	30
2.7.1. Interrelações dos microorganismos e produção de AGCC	34
2.7.2. Interrelações de microorganismos e produção de amônia	37
2.7.3. Interrelações de metanogênicas e protozoários	38
2.8. Influência de plantas taniníferas sobre a microbiota ruminal	41
2.9. Influência de plantas taniníferas sobre metanogênicas e protozoários	44
3. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE PLANTAS RICAS EM TANINOS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL <i>IN VITRO</i>	47
RESUMO	47
ABSTRACT	48
3.1. Introdução	49
3.2. Materiais e Métodos	50
3.2.1. Origem das plantas	50
3.2.2. Determinação da composição química da forragem	51
3.2.3. Determinação de compostos fenólicos	52
3.2.4. Bio-ensaio in vitro de produção de gases na presença de polietileno glicol (PEG)	54
3.2.5. Delineamento e análise estatística	56
3.3. Resultados	57
3.4. Discussão	64

3.5. Conclusão	68
4. INFLUÊNCIA DE LEGUMINOSAS TANINÍFERAS NA PRODUÇÃO DE METANO ENTÉRICO E DE OUTROS PARÂMETROS RUMINAIS <i>IN VITRO</i>	70
RESUMO	70
ABSTRACT	71
4.1. Introdução	72
4.2. Material e Métodos	74
4.2.1. Origem e coleta das plantas, caracterização química e quantificação de compostos fenólicos	74
4.2.2. Ensaio <i>in vitro</i> de produção	75
4.2.3. Coleta e determinação de metano	77
4.2.4. Degradabilidade aparente <i>in vitro</i> e determinação de nitrogênio total no resíduo	78
4.2.5. Determinação do nitrogênio amoniacal e ácidos graxos de cadeia curta	78
4.2.6. Determinação da fibra e de nitrogênio em detergente neutro no resíduo	80
4.2.7. Estimativa da massa microbiana e degradabilidade verdadeira	81
4.2.8. Delineamento e análise estatística	82
4.3. Resultados	83
4.3.1. Produção de gás, produção de metano e degradabilidades	83
4.3.2. Degradabilidade verdadeira da proteína, N amoniacal e síntese microbiana	85
4.3.3. Ácidos graxos de cadeia curta e relação com massa microbiana produzida	88
4.4. Discussão	91
4.4.1. Partição de energia para produção total de gás	91
4.4.2. Degradação de proteína e produção N amoniacal	93
4.4.3. Partição de energia para massa microbiana e AGCC total	95
4.4.4. Ácidos graxos ramificados e n-valerato como indicadores de mudanças microbiológicas	97
4.4.5. Produção de metano: resultado das relações entre de AGCC, amônia e crescimento microbiano	100
4.5. Conclusão	101
5. INFLUÊNCIA DE PLANTAS TANINÍFERAS NA POPULAÇÃO DE FIBROBACTER SUCCINOGENES E METANOGENICAS RUMINAIS <i>IN</i>	

VITRO.	103
RESUMO	103
ABSTRACT	104
5.1. Introdução	106
5.2. Material e Métodos	108
5.2.1. Origem e coleta das plantas, caracterização química e quantificação de compostos fenólicos	108
5.2.2. Ensaio <i>in vitro</i> com plantas selecionadas	109
5.2.3. Avaliação e quantificação microbiana	109
5.2.3.1. Extração de DNA das amostras de conteúdo ruminal <i>in vitro</i> após $t_{1/2}$ e 24h de incubação	110
5.2.3.2. Real time PCR para metanogênicas e <i>Fibrobacter succinogens</i>	112
5.2.3.3. “Nested” PCR para metanogênicas	114
5.2.3.4. Efeito sobre a comunidade metanogênica	115
5.2.4. Delineamento e análise estatística	117
5.3. Resultados do qPCR	118
5.4. Resultados do DGGE	120
5.5. Discussão	126
5.6. Conclusão	134
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	135

1. Introdução Geral

O metano é um importante gás que compõe o chamado grupo “gases de efeito estufa”, representando 16 % da emissão global de gases (US-EPA, 2006a), dos quais 28 % advêm da fermentação entérica (US-EPA, 2006b). Existe um consenso internacional, tanto científico como político, da influência humana sobre o aquecimento global e impacto no clima no globo terrestre e da urgente necessidade de redução da emissão líquida dos gases de efeito estufa para a atmosfera.

Os principais produtos finais do metabolismo microbiano anaeróbico do rúmen são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e a amônia (NH₃), além de compostos indesejáveis tanto para o animal, como para alguns microorganismos ruminais, como nitrato (NO₃), gás carbônico (CO₂), metano (CH₄) e hidrogênio (H) (Church, 1993; Schofield, 2000). O CH₄, assim como o propionato (C₃), funciona como sumidouro de hidrogênio (H), sem os quais o ambiente ruminal, a fermentação e algumas populações de microorganismos seriam prejudicados (Moss, 1993). Portanto, a simples inibição da produção de metano (metanogênese) não garante melhor aproveitamento energético pelo animal e nem pelos microorganismos (Ungerfeld et al., 2004).

As alternativas para reduzir ou desviar a formação de metano entérico envolvem a manipulação da fermentação ruminal através de dois meios: (i) o uso de dietas que propiciem uma relação acetato:propionato (C₂:C₃) menor e (ii) ação direta sobre os microorganismos metanogênicos e/ou os produtores de H, como protozoários, fungos e principalmente as bactérias celulolíticas.

O Brasil possui uma variedade de leguminosas com potencial forrageiro ainda pouco estudadas e negligenciadas devido à presença de fatores antinutricionais,

como por exemplo, os taninos. Taninos condensados (TC) são polímeros de flavan 3-ol com diferentes pesos moleculares e capazes de complexar proteínas e outras macromoléculas. Esta complexação tem sido considerada algumas vezes benéfica por reduzir os prejuízos causados por nematóides (Niezen et al., 1995), por timpanismo e pela diminuição da degradação de proteína no rúmen (efeito “by pass”) (Waghorn et al., 1987; Reed et al., 1990). A avaliação *in vitro* de plantas ricas em taninos pode ser realizada utilizando o polietileno glicol (PEG) como agente complexante de tanino condensado no pH do rúmen (Makkar et al., 1995a).

Alguns experimentos contendo compostos fenólicos na dieta observaram redução da emissão CH₄ em até 16 % (Waghorn et al., 2002; Hess et al., 2003; Puchalla, et al., 2005). Outros estudos relataram a redução de populações de bactérias celulolíticas com a ação do tanino, sendo a *Fibrobacter succinogenes* a principal bactéria afetada (Singleton, 1981; Nelson et al., 1997; McSweeney et al., 2001a). Trabalhos de Bae et al. (1993); McSweeney et al. (2001a), (2001b); Guimarães-Beelen et al. (2006a), (2006b) mostraram ser o tanino condensado responsável pela redução da atividade de enzimas endoglucases. Os efeitos dos taninos são bastante variáveis em função da quantidade, do tipo de tanino e da reatividade.

As leguminosas utilizadas neste estudo foram escolhidas por apresentarem boa aceitabilidade pelo animal de acordo com os produtores e alto nível protéico. Estas leguminosas apresentaram também compostos fenólicos e tanino condensado em diferentes concentrações e origens, importantes atualmente como alternativas de redução de metano entérico.

A proposta deste estudo foi avaliar algumas plantas taniníferas tropicais quanto ao desempenho fermentativo, à capacidade de redução de metano e à

influência sobre a população de *Fibrobacter succinogenes* e a comunidade metanogênica em ensaios *in vitro*.

Os resultados foram apresentados na forma de capítulos. Nos dois primeiros capítulos estão contidas a introdução geral e a revisão de literatura. O terceiro capítulo descreve os resultados da caracterização da qualidade fermentativa de *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala*(LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC) e de *Cynodon x cynodon* (CYN) como controle através da técnica *in vitro* de produção de gases em ensaio com seringas por 96 h. O quarto capítulo apresenta a avaliação destas leguminosas quanto à produção total de gás (GP), produção de metano, amônia, massa microbiana (MM) e ácidos graxos de cadeia curta em dois horários, no $t_{1/2}$ (tempo para obtenção da metade da GP) e após 24 h de incubação, e finalmente o quinto capítulo avalia a influência dessas leguminosas no crescimento de *Fibrobacter succinogenes* e comunidade metanogênica após incubação *in vitro*.

2. Revisão de literatura

2.1. Metano como contaminante do ambiente

A partir de 1980, evidências científicas sobre a interferência humana no sistema climático, colocaram a questão da mudança climática no planeta e suas conseqüências ambientais na agenda política mundial. Após várias discussões entre membros do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), da Organização Meteorológica Mundial (OMM) e cientistas do “Intergovernmental Panel on Climate Change” (IPCC), os termos do Protocolo de Kioto oficialmente adotaram

metas de emissão dos gases de efeito estufa (GEE) para todos os países industrializados. De forma geral, estes países devem reduzir a emissão dos seis gases de efeito estufa a 5,2 % dos níveis de 1990 até 2010 (2008 a 2012).

Os seis gases definidos como GEE são: CO₂, CH₄, óxido nitroso (N₂O), hidrofluorcarbonos (HFCs), perfluorcarbonos (PFCs) e hexafluorido de enxofre (SF₆), os quais são oficialmente medidos em equivalentes de carbono (IPCC, 1996; UNFCCC, 1997a; US-EPA, 2006a). A maior concentração de GEE na atmosfera é de CO₂, porém o CH₄ e o N₂O têm um potencial de aquecimento de 23 e 296 vezes maior que o CO₂, respectivamente, devido a maior atividade específica destes compostos (Clark et al., 2001).

As principais fontes antropogênicas de emissão de CH₄ são as queimadas, a produção de combustível, as minas de carvão, os dejetos animais, a fermentação do trato digestório de animais (fermentação entérica), os cupins (conhecidos por térmitas), esgotos líquidos, o lixo sólido, o gás natural e as plantações de arroz. Dentre estas, a fermentação entérica é a principal fonte, responsável por 28 % da emissão de CH₄ global, seguida por gás natural (15 %), lixo sólido (13 %) e plantações de arroz (11 %) (US-EPA, 2006b).

Os animais podem contribuir diretamente com o aumento da concentração de metano através de duas vias principais: pela fermentação de dejetos orgânicos e pela fermentação entérica (Clark et al, 2001; Brasil, 2002; US-EPA, 2004).

A fermentação entérica de ruminantes (bovinos, ovinos, bubalinos etc) e animais monogástricos (suínos, cavalos, asnos e mulas) produz em média 80 Tg ano⁻¹ (teragrama por ano), que equivale aos 28 % da emissão antropogênica global de metano (US-EPA, 2006b). Segundo o IPCC (1996) os animais ruminantes são responsáveis por 95 % da produção de CH₄ proveniente dos animais. As

estimativas para a emissão global de CH₄ gerados pelos dejetos animais, tanto em reservatório de decantação como em pastos, é de 14 Tg/ano.

No Brasil, o último inventário da estimativa de contribuição de CH₄ por animais domésticos no período de 1986 a 1995 mostrou aumento gradativo anual neste setor (Brasil, 2006). Em 1995, a emissão total de CH₄ proveniente da pecuária foi 9.937,3 Gg (gigagrama), sendo 79 % produzido por gado de corte, 13 % por gado leiteiro e 4 % devido a fermentação de dejetos (Brasil, 2006). O últimos relatórios oficiais mostraram que o Brasil contribuiu com aproximadamente 10 % da emissão global de metano até 1995, juntamente com a União Européia (11 %) e EUA (8 %) (UNFCC, 1997; Brasil, 2002;).

Os esforços iniciados pela Embrapa de Rondônia (CPAF-Rondônia), Embrapa do Acre (CPAF-Acre) e Embrapa Meio Ambiente vêm contribuindo para o aumento e divulgação dos dados oficiais de emissões dos GEE totais, gás carbônico e metano no Brasil, provenientes das diferentes fontes antropogênicas.

2.2. Metano entérico como perda energética

O CH₄ é um subproduto da digestão de carboidratos pelos microorganismos presentes no trato digestório de herbívoros (Moss, 1993). Como o CH₄ não pode ser metabolizado pelo animal nem pelo microorganismo, a maior parte é removida do rúmen por expiração ou eructação, refletindo em perda de energia bruta (EB) da dieta.

A finalidade principal da ingestão de alimentos é a obtenção de energia através de processos bioquímicos para manutenção, crescimento, gestação e produção (carne, leite ou lã). Durante estes processos, ocorrem perdas de energia,

que devem ser minimizadas para obter melhor relação custo benefício na produção animal. A primeira perda ocorre na digestão, através da eliminação nas fezes de parte do alimento que não foi aproveitado pelo animal. A parte aproveitada é chamada de energia digestível (ED) aparente. Quando a energia da urina e dos gases é descontada da ED, obtém-se uma fração da energia que será absorvida pelo organismo, chamada de energia metabolizável (EM). Estes gases constituem na sua maioria CH_4 , CO_2 , traços de hidrogênio e de ácido sulfídrico (H_2S). Essas perdas gasosas são de grande importância para o ruminante devido ao alto valor energético embutido e a quantidade produzida no processo fermentativo. Cada grama de CH_4 contém 13 kcal/g (Maynard et al, 1984).

As primeiras avaliações realizadas por Forbes et al.* citado por Maynard et al. (1984) sobre perda de CH_4 , foram feitas em câmara calorimétrica alimentando bovinos com dietas contendo milho e alfafa e variando a quantidade oferecida de meia até duas vezes o requerimento energético para manutenção. Os autores observaram que a perda de energia por CH_4 representou de 6,4 a 9,8 % EB. Atualmente, o "Nutrition Research Council" para ovinos (NRC, 1985) afirma que a perda de CH_4 varia de 3 a 10 % EB devido ao tipo de dieta e ao nível de alimentação.

O CH_4 , quando expresso em porcentagem de EB consumida, é denominado pelo IPCC (1996) de Taxa de Conversão de Metano (TCM) e é de extrema importância para elaboração dos inventários de emissão de CH_4 entérico através de modelos de predição para estimativa global da emissão deste gás (IPCC, 1996; Johnson & Wards, 1996).

* FORBES, E. B. et al. Metabolismo energético dos bovinos, em relação ao programa de nutrição. **Journal of Agriculture Research**, v. 37, p. 253-300, 1928.

Os valores da TCM recomendados pelo IPCC (1996) provenientes de gado variam entre 5,5 a 6,5% EB consumida. Entretanto, estes valores são baseados em resultados obtidos com animais alimentados com forrageiras temperadas. Até pouco tempo atrás, existiam poucos trabalhos sobre TCM para ruminantes utilizando forrageiras tropicais, sendo o mais citado o de Margen et al. (1988). Após 2002, com a ratificação do Protocolo de Kioto, vários países tropicais se comprometeram a levantar dados sobre as emissões de GGE e maior investimento foi destinado às pesquisas neste aspecto do seto agropecuário.

No Brasil, foram realizados estudos pelo Ministério da Ciência e Tecnologia para levantamentos nacionais da emissão de metano por bovinos leiteiros (Primavesi et al., 2004) e de corte (Brasil, 2007) em gaiolas para avaliação de metabolismo e a pasto.

Primavesi et al. (2004) mostraram que vacas holandesas em lactação em pasto adubado de capim Tobiata (*Panicum maximum* L) e suplementada com concentrado contendo 20 % de proteína bruta produziram 147 kg CH₄/animal ano, enquanto que vacas mestiças (Holandesa x Zebu) em lactação sob pasto de *Brachiaria decumbens* Stapf. adubada e suplementadas com concentrado com 18 % de proteína bruta emitiram apenas 121 kg CH₄/animal ano. Além das diferenças entre raças, observa-se que estes valores são altos quando comparados com os valores médios encontrados na América do Norte (118 kg CH₄/animal ano) e leste Europeu (100 kg CH₄/animal ano), onde a produção média de leite é em média 6.700 e 4.200 kg/animal ano, respectivamente (IPCC, 1996), maior que a produção média do Brasil em 1997, estimada em aproximadamente 722 kg/animal ano (Brasil, 2002).

Kurihara et al. (1999), trabalharam com feno de duas gramíneas tropicais, *Dicanthium aristatum* e *Chloris gayana* (capim Rhodes), além de uma dieta com alta

concentração de grãos (alfafa+ concentrado) para avaliação da produção de CH₄ e partição de energia pelo gado tropical. Estes autores observaram valores da TCM para as duas gramíneas de aproximadamente 11 % EB consumida, ou seja, superiores aos recomendados pelo IPCC (1996); em contrapartida, a dieta de alto grão apresentou valor de 7 % EB, valor muito próximo ao recomendado do IPCC (1996). Com um consumo ainda maior de grãos, como no caso de dietas típicas de confinamento americano, o valor da TCM recomendado pelo IPCC (1996) é de 4 % EB (Kurihara et al., 1999).

Assim, a melhor qualidade da dieta e da forragem reduz a emissão de CH₄, entretanto, podem contribuir para o aumento do custo de produção inviabilizando o sistema. O conhecimento da origem do CH₄ e das possíveis vias de formação oferecem outras formas de promover sua mitigação completa ou parcial.

2.3. Aspectos gerais da produção de metano entérico

O sistema digestório de ruminantes é constituído por quatro compartimentos sendo o primeiro deles uma câmara fermentativa que permite a estes animais o aproveitamento de alimentos fibrosos, pouco digestíveis por monogástricos.

Este ambiente anaeróbico contém grande variedade de populações de microorganismos, as quais podem ser agrupadas em três grandes grupos: bactérias, protozoários e fungos. Muitas relações existem entres estes microorganismos, nas quais o subproduto da digestão de um é o substrato para outra espécie (Moss, 1993).

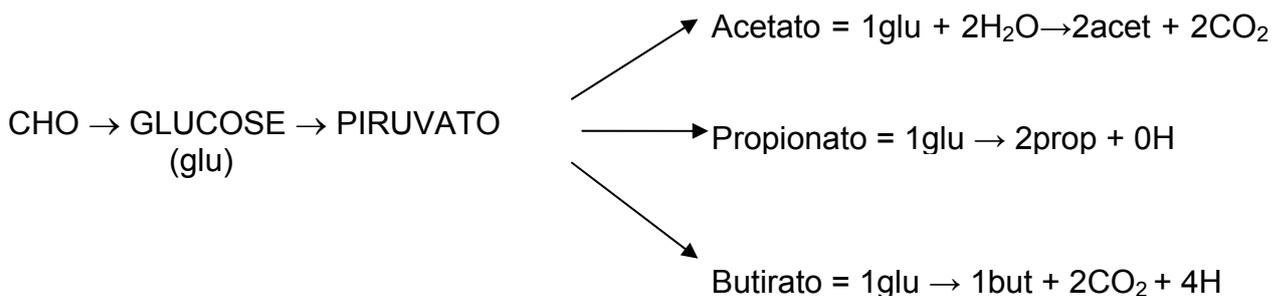
Os microorganismos atacam o alimento que chega ao rúmen gerando energia na forma de ATP (adenosina tri-fostato) para seu próprio crescimento. Os AGCC, os

quais são utilizados pelo ruminante como fonte de energia, e a NH_3 , que é um dos fatores para síntese de proteína microbiana, são produtos finais do metabolismo microbiano. Além destes, a fermentação anaeróbica ruminal também produz compostos inadequados para o animal e também para os microorganismos, como o NO_3 , CO_2 , CH_4 e H (Church, 1993; Schofield, 2000).

O CH_4 é produzido por um grupo específico de bactérias, chamado de metanogênicas, do domínio *Archaeobacteria* (Moss, 1993). O CH_4 pode ser também produzido por protozoários, os quais constituem até 20% dos microorganismos metanogênicos no rúmen. Bactérias metanogênicas podem utilizar principalmente H e formato como doadores de elétron produzindo metano, embora algumas bactérias possam também reduzir metanol, metilaminas e acetato (Moss, 1993).

Parte do CH_4 produzido pode ser absorvido pela parede ruminal, entrar na corrente sanguínea e ser eliminado via expiração. Entretanto, a maior parte é eliminada por eructação juntamente com CO_2 e traços de H , H_2S , nitrogênio (N) e oxigênio (O_2), na proporção de 1/3 de CH_4 e 2/3 CO_2 (Kozloski, 2002).

O H é produzido em maior ou menor concentração em função do roteiro metabólico de carboidratos (CHO), ou seja, da proporção relativa dos principais AGCC (acetato, propionato e butirato) (Maynard et al., 1984; Mackie et al., 2002), como pode ser observado no esquema abaixo.



Animais sob dietas ricas em grãos propiciam maior produção de propionato, não eliminando H no rúmen no final do processo. Por outro lado, dietas ricas em forragem propiciam maior desenvolvimento de bactérias celulolíticas, as quais geram no rúmen relação C2:C3 maior, promovendo excesso de H no rúmen. Neste caso, a ação de bactérias metanogênicas se torna indispensável para a manutenção do ambiente ruminal, pois o metano, funcionando como um sumidouro de H mantém o pH favorável para o desenvolvimento de outros microorganismos.

2.4. Formas de mitigação de metano entérico

Muitos esforços vêm sendo feitos para desviar a energia perdida como CH₄ para a formação de outros compostos metabolizáveis e, portanto, reduzir a emissão de metano para o ambiente. Existem várias opções de manejo para mitigação de metano na agricultura, as quais podem apresentar aspectos positivos ou negativos ao serem introduzidas no sistema de produção.

Algumas alternativas para a redução de metano são: a redução do tamanho do rebanho, mantendo o mesmo nível de desempenho; a melhoria da qualidade da dieta, através da suplementação com concentrado; a diminuição da parede celular das forragens e o aumento de proteína na dieta entre outras (Clark et al., 2001). Além disso, a produção inevitável de CH₄ devido à manutenção da estabilidade ruminal pode ser diluída através de estratégias que aumentem o consumo e a eficiência metabólica (O'Hara et al., 2003). Entretanto, embora sejam métodos eficientes, alguns podem não ser economicamente viáveis para o produtor e, portanto, inapropriados para inserção no sistema de produção animal.

É também possível reduzir a emissão de metano entérico manipulando a

fermentação ruminal através da adição de aditivos alimentares como os ionóforos e os probióticos. Segundo Clark et al. (2001) os ionóforos podem reduzir em até 8% a emissão de metano entérico, enquanto os probióticos apresentam baixo impacto na produção de metano por animal, em média 1,5%. Além disso, seu uso deve ser diário, o que o restringe aos animais confinados ou ao gado leiteiro.

Um estudo *in vitro* demonstrou que a adição na dieta de ácidos orgânicos, como malato e fumarato, os quais propiciam maior concentração de propionato, reduziram a produção de CH₄ (Martin et al., 1995). Como a adição direta destes ácidos parece ser ainda inviável economicamente, Callaway et al. (1997) verificaram que malato e fumarato estão presentes no tecido foliar, sendo possível promover cruzamentos entre plantas que resultem em variedades com altas concentrações destes ácidos.

Também o uso de plantas selecionadas e melhoradas que promovam melhor desempenho animal podem ser indicadas para mitigação de metano entérico. Entretanto, o impacto desta alternativa depende da produtividade atingida por essas plantas e do número de animais no rebanho (Clark et al., 2001; O'Hara et al., 2003).

Plantas alternativas com potencial forrageiro possuem compostos que apresentam efeito sobre a redução de CH₄. Gupta et al. (1993) afirmaram que folhas de *Enterolobium timbouva* (Timbaúba) defaunou o rúmen de búfalo. Woodward et al. (2001) e Waghorn et al. (2002) encontraram redução na emissão de metano alimentando gado leiteiro e ovinos, respectivamente, com leguminosas ricas em taninos. Ulyatt et al. (2002) também observaram redução da emissão de metano alimentando vacas leiteiras com gramínea Kikuiu (*Pennisetum clandestinum*). Dietas com plantas oleaginosas também têm demonstrado efeito sobre a redução de metano (Lovett et al., 2003). Embora o efeito anti-metanogênico tenha sido

observado com estas plantas, alguns dos compostos causadores da mitigação não foram identificados e o seu mecanismo de ação ainda é desconhecido ou pouco estudado.

Outras opções para mitigação de metano entérico ainda em estudo são: o uso de compostos halogenados, a imunização por vacina, a defaunação e o aumento da população de acetogênicos (Clark et al., 2001)

2.5. Influência de plantas taníferas na mitigação de metano

Alguns compostos secundários presentes em plantas tropicais, como a saponina e os taninos, podem modificar a fermentação ruminal. Quando presentes em altas concentrações na dieta podem diminuir a digestibilidade e a retenção de nitrogênio (MacDonald et al., 1995; Kaitho et al., 1998; MacMahon et al., 1999). Entretanto, quando ingeridos em doses baixas podem levar a efeitos positivos na digestão de ruminantes (MacNeil et al., 1998; Waghorn et al., 1998).

Estudos recentes têm verificado que os taninos podem também reduzir a metanogênese ruminal (Hess et al., 2003; Carulla et al., 2005; Longo et al. 2006). Embora ainda haja uma grande variabilidade nas respostas encontradas, provavelmente devido à grande diversidade de formas químicas deste composto, esta alternativa de mitigação tem chamado a atenção da comunidade científica.

Inicialmente este efeito foi observado em experimentos com água de lavagem das indústrias de óleo, de curtição de couro e de madeira. Em um experimento com água de lavagem de indústria de madeira, Field et al. (1991) observaram que a alta concentração de tanino presente inibiu o desenvolvimento de bactérias metanogênicas. Quando o tanino foi polimerizado em um composto colorido e não

tóxico por meio da aplicação de um pré-tratamento de auto-oxidação, houve aumento da concentração de metano de 19 para 40%. Segundo Hamdi & Garcia (1993), os baixos níveis de produção de metano que ocorrem em águas de lavagem do processamento de óleo de oliva, são causados pela presença de taninos, compostos fenólicos e óleos que são tóxicos para bactérias metanogênicas.

Efeitos do tanino presentes nas forragens têm sido demonstrados em ensaios *in vitro*. Como exemplo, McMahon et al. (1999), utilizando o sistema rusitec de fermentação *in vitro*, demonstraram que a substituição de alfafa (*Medicago sativa*) por *Onobrychis viciifolia*, uma leguminosa rica em tanino, resultou em decréscimo linear da concentração de enzimas digestivas (protease e endoglucanase), de NO₃ e de CH₄.

Semelhantes resultados foram também demonstrados em ensaios *in vivo*. Woodward et al. (2001) utilizaram ovinos alimentados com *Lotus pedunculatus* (leguminosa rica em tanino condensado), azevém (*Lolium multiflorum*) e alfafa (*Medicago sativa*) e observaram menor produção de metano por unidade de matéria seca consumida (MSC) com Lotus do que com as outras forrageiras (14,5, 20,4 e 19,0 g CH₄/kg MSC, respectivamente). Os mesmos autores conduziram outro ensaio com doze vacas em lactação (raça Friesian) alimentadas com silagem de Lotus e de azevém. Quando utilizaram silagem de Lotus, a emissão de metano foi reduzida de 35,1 para 26,9 g CH₄/kg MSC. Segundo Woodward et al. (2002), a leguminosa taninífera sulla (*Hedysarum coronarium*) quando foi oferecida a vacas leiteiras resultou em 19,5 em contraste com 24,6 g CH₄/kg MSC obtido em pasto de gramínea. Waghorn et al. (2002) demonstraram que o tanino em *L. pedunculatus* foi responsável pela redução da produção de metano em até 16% quando utilizada por ovinos.

Carulla et al. (2005), utilizando extrato de *Acacia mearnsii* (0,615 g/g TC) em dietas de *Lolium perenne* sozinho, *L. perenne* + trevo vermelho e *L. perenne* + alfafa para ovinos mantidos em gaiolas para ensaio de metabolismo, observaram que suplementação de TC reduziu 13% em média a emissão de metano, além de reduzir a concentração de NH₃ e a excreção de nitrogênio urinário.

O uso de forrageiras taniníferas parece, até o momento, ser uma alternativa promissora para reduzir a produção de metano. Entretanto, mais estudos são necessários para incorporar estas forragens nos sistemas de alimentação animal, avaliando os efeitos sobre os parâmetros ruminais e a metanogênese ruminal.

2.6. Influência de plantas taniníferas na degradabilidade, produção de amônia e ácidos graxos de cadeia curta

Com a presença de taninos no rúmen é esperada redução da produção de gases, da degradabilidade, da deaminação ruminal e da digestibilidade (Barry, 1985; Waghorn et al., 1987; Bae et al., 1993; D’Mello, 1995; Getachew et al., 2000b), o que porém pode refletir em aumento da síntese microbiana (Makkar et al., 1995b).

Os taninos e os compostos fenólicos agem sobre a fermentação ruminal de diferentes modos. Os taninos podem reduzir a degradação de nutrientes devido a complexação com proteína, enzimas e outras macromoléculas em pH ruminal, causando o chamado efeito “by pass” muitas vezes desejado na nutrição de ruminantes (Makkar et al., 1993, McNeill et al., 1998). O complexo tanino-proteína e seus efeitos estão relacionados não só à quantidade de taninos presente no rúmen, mas também ao pH ruminal, tipo de molécula (Makkar et al., 1995a; McNeill et al., 1998; Jones et al., 2000) e ao seu peso molecular (Osborne e McNeill, 2001). Esta

complexação pode ser benéfica ou deletéria dependendo se a proteína não degradada e adsorvida for subsequente liberada ou não no intestino (MacNeil et al., 1998; Kaitho et al., 1998).

Os taninos podem influir na sincronização da taxa de degradação de proteína e carboidratos no rúmen, interferindo na eficiência de utilização de N amoniacal pelas bactérias para síntese microbiana (Getachew et al., 2000b).

A estrutura molecular dos taninos também interfere no grau de ação destes no rúmen. Segundo Makkar et al., (1995b), a estrutura molecular do tanino condensado propicia ligações mais fortes e irreversíveis com a proteína do que os taninos hidrolisáveis que podem ser degradados pelos microorganismos. Osborne e McNeill (2001) trabalhando com *Leucaena* spp verificaram que taninos condensados com maior peso molecular precipitaram mais proteína que os com peso menor.

Quando extrato de *Quercus incana*, *Dichostachys cinerea* e *Acioa barteri*, contendo a mistura de tanino hidrolisado e condensado, foi incubado *in vitro* com feno, observou-se redução da degradabilidade verdadeira respectivamente de 3, 6 e 7 % com 0,47 mg tanino/mL e de 17, 21 e 27 % quando 0,93 mg tanino/mL foi aplicado (Makkar et al., 1995a). Essa variação de resposta com a mesma quantidade de tanino evidenciou seu efeito em função da planta, ou seja, pelo tipo de tanino. Incubações com *A. barteri* foram mais prejudicadas em termos de degradabilidade do que com *Q. incana*.

Também em Jones et al. (2000) a concentração de tanino condensado não teve relação com o aumento na digestibilidade *in vitro* de nitrogênio (DIVN) quando foi aplicado polietileno glicol (PEG) como agente complexante de tanino condensado. *Acacia boliviana* contendo menos de 20 equivalente gramas de leucocianidina (eq-g leuc)/kg MS, resultou em aproximadamente 35 % de aumento

na DIVN quando PEG foi aplicado, enquanto que *Leucaena leucocephala*, contendo em torno de 60 eq-g leuc/kg MS, não apresentou alteração. Isto sugeriu para os autores que os taninos e compostos fenólicos presentes em *L. leucocephala* foram pouco eficientes em complexar a proteína, apesar da maior concentração.

Em um trabalho realizado com plantas taniníferas tropicais foi demonstrado que *Sesbania sesban*, contendo 24 eq-catechin/kg MS de tanino condensado, apresentou capacidade de precipitação com BSA (albumina sérica bovina) quatro vezes maior que de *L. leucocephala* com 13 eq-catechin/kg MS, indicando relação direta com a maior concentração de tanino condensado em *S. sesban* (Vitti et al., 2005a). Entretanto, *Cajanus cajan*, contendo a menor concentração de tanino condensado (0,5 eq-catechin/kg MS), apresentou precipitação de BSA muito próxima de *L. leucocephala* nas mesmas condições experimentais.

Estes mesmos autores trabalhando com outras plantas taniníferas da região Nordeste do Brasil, onde o balanço hídrico anual é negativo devido à alta evaporação, mostraram em seus resultados que apesar da maior concentração de tanino condensado (eq-leuc/kg MS) presente em *Manihot pseudoglaziovii* (18,0) do que em *Sida cordifolia* (0,3), *Capparis flexuosa* (3,0) e *Anadenanthera macrocarpa* (11,0), a produção de gás da primeira foi similar à de *Sida cordifolia* e maior que as demais plantas (Vitti et al., 2005b).

Em geral, tanto em taniníferas tropicais como temperadas, existe variação do efeito dos taninos sobre a fermentação de ruminal não somente devido à maior concentração de tanino condensado, como também em função da planta e tipo de clima.

Blümmel et al. (1993) e Makkar et al. (1995a), utilizando plantas taniníferas *in vitro*, mostraram que quanto maior a degradabilidade verdadeira (VDMS) ou

aparente (ADMS) da matéria seca, maior a produção de gás ou de AGCC. Entretanto, houve uma relação inversa entre $N^{15}/100$ mg VDMS incorporado e AGCC/100mg VDMS (Makkar et al., 1995b), sugerindo que a nutrição particiona em favor da síntese de proteína mesmo na presença de taninos. Esses autores observaram diminuição da concentração de AGCC com a presença de ácido tânico e essa diminuição foi ainda mais acentuada com tanino condensado. Além disso, o tanino diminuiu a porcentagem de acetato, mas aumentou de propionato.

Aumentando a proporção de *Arachis pintoi* (TC = 29 mg/g) em dietas com *Brachiaria dictioneura in vitro*, Hess et al. (2003) observaram aumento gradativo da degradabilidade da matéria orgânica (DMO), de AGCC total e de iso-butirato, que foi associado a maior degradação da proteína. Em outro experimento também realizado por Hess et al. (2003), 1/3 de *B. dictioneura* foi substituído por *Arachis pintoi*, *Cratylia argentea* e *Calliandra calothyrsus* (em ordem crescente de TC presente), com e sem frutas de *Sapindus saponaria* (rica em saponina). *A. pintoi* apresentou também os melhores resultados entre as outras taniníferas, possivelmente devido sua menor concentração de taninos. *Calliandra calothyrsus* apresentou a menor DMO e AGCC total entre todas as plantas, porém aumentou acetato e diminuiu a produção de n- e iso-butirato, amônia e contagem de bactéria em relação ao controle. A produção de CH₄ também foi reduzida com esta leguminosa quando expressa em CH₄/d (dia) mas apresentou aumento em CH₄/g ADMO. *A. pintoi*, contendo a menor quantidade de TC, aumentou a ADMO, a degradabilidade da fibra em detergente neutro (DFDN) e da fibra em detergente ácido (DFDA) em relação ao controle. *Cratylia argentea* teve desempenho intermediário apresentando DMO e AGCC levemente inferiores que o controle e valor de C3 um pouco maior que *A. pintoi*. Porém, não apresentou diferença na concentração de n- e iso-butirato e amônia, o que sugeriu menor

degradação de proteína. Em geral os resultados deste experimento, foram relacionados pelos autores à alta concentração de fibras em *C. argentea* e altas concentrações de tanino em *C. calothyrsus*.

McSweeney et al. (2001a) afirmou que o menor desempenho de *C. calothyrsus* in vivo foi causada pela ação dos taninos no rúmen, mais pela complexação dos nutrientes do que pela inibição direta da atividade enzimática dos microorganismos.

A avaliação da influência de compostos fenólicos na produção de AGCC foi estudada por Getachew et al. (2000a). *Acacia angustissima*, *Calliandra calothyrsus*, *Dichrostachys cinerea* e *Acacia salicina*, contendo, respectivamente 17, 61, 124 e 262 e-g leuc/kg MS, foram incubadas por 24 h e a produção total de AGCC em mmol/40 mL foi reduzida em 77, 58, 31 e 26 %, respectivamente, em relação ao controle. Esses resultados afirmaram que o tanino afetou a produção total de AGCC, entretanto está alteração não esteve necessariamente relacionada com a quantidade de tanino condensado presente.

2.7. Microorganismos fibrolíticos e suas interações

A comunidade microbiana presente no rúmen e em outros compartimentos do animal ruminante envolve organismos do domínio *Archaeobacteria*, *Eubacteria* e *Eucaria* de acordo com a classificação de Woese et al., (1990), os quais existem em relação de mutualismo com o animal hospedeiro (Mackie et al., 2002). O domínio *Archaea*, em geral, é representado por organismos procariotos que vivem em ambientes extremos, no qual fazem parte as metanogênicas. Os representantes do domínio *Bacteria* são as bactérias comuns e do domínio *Eucaria* são todos os

eucariotos, incluindo os fungos, protoctistas (protozoários e algas), vegetais e animais. Estes organismos estão presentes no rúmen em alta densidade, diversidade e complexidade de relações.

Muitas relações existem entre estes microorganismos nas quais o subproduto da digestão de um é o substrato para outra espécie. Essas relações são chamadas de relações sintróficas (Miura et al., 1980; Moss, 1993; Reilly, 1998). Uma importante relação sintrófica esta relacionada ao hidrogênio, conhecida como “transferência interespecies de hidrogênio”. Como destacou Moss (1993), a transferência interespecies de hidrogênio é o principal fator que regula a concentração relativa de AGCCs formados no rúmen em função de uma mudança nos produtos finais de fermentação, como mostra o esquema no item 2.3 deste capítulo.

O hidrogênio é um produto de descarte do metabolismo de alguns microorganismos heterotróficos. A utilização do H por outros microorganismos reduz a pressão parcial no retículo-rúmen e conseqüentemente altera o esquema metabólico do microorganismo produtor de H em relação sintrófica com estes. Entre os principais microorganismos consumidores de H estão as metanogênicas e as bactérias redutoras de fumarato.

Metanogênicas utilizam principalmente H e também formato como doadores de elétron produzindo metano. A presença de metanogênicas no meio anaeróbico remove o H e diminui a pressão parcial de H, fazendo com que regeneração de NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotideo) seja realizada por outras vias, as quais variam em função da espécie fibrolítica envolvida (Moss, 1993; Reilly, 1998). A vantagem para o ruminante da presença de metanogênicas é que as espécies envolvidas em relações sintróficas se desenvolvem melhor e, portanto, há aumento da massa microbiana.

Selenomonas ruminantium ssp. ruminantium, *Selenomonas ruminantium ssp. (lactílica)*, *Fibrobacter succinogenes*, *Veillonella parvula* e *Wollinella succinogenes* oxidam hidrogênio através de fumarato como acceptor final de elétrons e possuem enzima fumarato desidratase (Asanuma et al., 1999). Estas bactérias competem com as metanogênicas por hidrogênio, o qual é um dos principais substratos para a metanogênese no rúmen. Porém, outro doador de elétron para redução de fumarato é o formato. Quando estas bactérias foram cultivadas com metanogênicas, houve diminuição da produção de metano, não somente pela maior utilização de formato, mas também de hidrogênio. Estes resultados sugeriram que a adição de fumarato em alimentos de ruminantes reduz a metanogênese e aumenta a produção de propionato no rúmen.

Bactérias do gênero *Ruminocci spp*, como *Ruminococcus flavefaciens* e *R. albus* e *Fibrobacter succinogenes* compõem um grupo importante de bactérias fibrolíticas presentes no rúmen (Lin et al., 1997; Koike e Kobayashi, 2001, Joblin et al., 2002).

Fibrobacter succinogenes é a bactéria fibrolítica mais abundante no rúmen e é essencial para produção indireta de propionato, pois não produz hidrogênio, mas succinato e formato como produtos finais de degradação (Lin et al., 1997; McSweeney et al., 2001a; 2001b). A degradação de celulose por *F. succinogenes* segue diferente modo de ação do que as bactérias *Ruminococi*, agindo sobre a parede celular do alimento produzindo acetato e succinato em seqüências acopladas (Reilly, 1998).

Como a atividade da enzima hidrogenase não é sensível à tensão provocada pelo acúmulo de hidrogênio, *F. succinogenes* não vive em relação sintrófica com metanogênicas, como *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*.

Entretanto, as metanogênicas utilizam o hidrogênio produzido por *F.succinogenes*, o qual é disponível como resultado da transferência interespecie de H.

A abundância de *F. succinogenes* em feno de *Orchardgrass* estimado por FISH (“fluorescence in situ hybridization”) foi de 6,9 a 8,1 % do total de bactérias em folhas e colmos, enquanto *Ruminococcus flavefaciens* foi presente somente em 0,34 a 0,58 % em grande extensão somente em folhas (Shinkai e Kobayashi, 2007). *F. succinogenes* foi localizada firmemente aderida não somente às bordas de áreas cortadas, mas também em áreas intactas. Apesar da maior concentração, *F.succinogenes* parece ser menos agressiva, sendo dominada por *R. flavefaciens* em situação de restrição de substrato (Fondevila e Dehority, 1996) e pelo fungo *Neocallimastix frontalis* quando em co-cultura com a metanogênica *Methanobrevibacter smithii* (Joblin et al., 2002). Também Koike e Kobayashi (2001), trabalhando com co-culturas de *F. succinogenes* e *R. flavefaciens*, reportaram que quando não há restrição de substrato, elas co-existem em igual tamanho de população. Porém, elas competiram por celobiose quando co-cultivadas em quantidade limitada de substrato, sendo *F. succinogenes* dominada por *R. flavefaciens*.

Em *Ruminococcus flavefaciens*, se a enzima hidrogenase, altamente sensível ao acúmulo de H, não está agindo, a regeneração de NAD é feita principalmente pela via de produção do succinato (Reilly, 1998). Isto significa que a produção de succinato é maior quando metanogênicas estão em pequena abundância. Quando *R. flavefaciens* cresce em co-cultura de metanogênica, a produção de acetato, ATP e hidrogênio aumentam à custa de succinato. A diminuição de succinato e aumento de acetato por *R. flavefaciens* em co-cultura de metanogênicas têm profundas conseqüências na produção animal (carne, leite, lã e couro).

Na presença de metanogênicas a manutenção da pressão parcial de hidrogênio é menor, e *Ruminococcus albus* altera a via de regeneração do NAD diminuindo a produção de etanol e aumentando acetato e hidrogênio. A maior produção de acetato é acompanhada de maior produção de ATP o que confere maior crescimento microbiano (Reilly, 1998; Moss, 1993). *R. albus* é dominante sobre *F. succinogenes* e *R. flavefaciens* em situação de limitação de alimento, provavelmente devido sua alta afinidade por celobiose (Shi & Weimer, 1996).

Selenomonas ruminantium tem um importante papel na produção de AGCC, particularmente propionato, produzindo apenas traços de hidrogênio. Quando esta foi cultivada com a metanogênica *Methanobacterium ruminantium* houve um decréscimo de propionato e aumento de acetato em consequência da redução da pressão de H (Moss, 1993). Espécies como *Selenomonas* e *Veillonella* têm menos substratos disponíveis para a produção de propionato, sofrendo, portanto maior competição com outras bactérias, principalmente metanogênicas (Reilly, 1998).

2.7.1. Interrelações dos microorganismos e produção de AGCC

Os ácidos graxos de cadeia curta ramificada (AGCC ramificada) são originados da degradação protéica e deaminação de aminoácidos (aa) também ramificados por bactérias não celulolíticas e por protozoários (El-Shazly, 1952; Slyter, et al., 1971; Miura, et al., 1980), enquanto que os principais AGCC ruminais (acético, propiônico e n-butírico) são principalmente originados da degradação de celulose (Wang et al., 1994).

Na década de 50, foi descoberto que bactérias celulolíticas requerem ácidos graxos de cadeia ramificada, principalmente ácido iso-valérico e iso-butírico, e

ácidos graxos de cadeia não ramificada como ácido valérico e capríco para seu crescimento (Bentley et al., 1954; Bryant e Doetsch, 1955; Bentley, et al., 1955). Ainda, Bentley et al. (1955), reportaram que a adição desses ácidos aumentou a taxa de degradação de carboidratos e a utilização de amônia. Wallace et al. (1997), foi mais detalhista em afirmar que *F. Succinogenes*, *R.flavefaciens* e *R.albus* requerem um ou mais ácidos graxos de cadeia ramificada (iso-butírico, iso-valérico e 2-metil-butírico) para sintetizar valina, iso-leucina e leucina via carboxilação redutiva e transaminação dos ácidos graxos.

Assim, pode se supor que o aumento da concentração desses ácidos e a baixa utilização de N amoniaco sejam indicativos de redução da população de bactérias dependentes desses fatores para sintetizar sua proteína microbiana (Noftsker et al., 2003). Estes eventos são resultados das relações de interdependência entre as espécies, ou seja, das relações sintróficas.

Miura et al. (1980), ao testar em co-cultura de *Bacteroides amylophilus* (bactéria amilolítica), *Megasphaera elsdenii* (aminoácido dependente) e *Ruminococcus albus* (bactéria celulolítica) em dieta basal com adição de amido, glucose e celobiose observaram crescimento das três espécies. Porém, quando somente *B. amylophilus* e *M. elsdenii* foram cultivadas juntas, houve apenas desenvolvimento de ambas quando o meio continha amido. Além disso, a concentração de iso-butirato foi maior quanto maior concentração de amido. Na ausência de amido nenhuma das duas espécies se desenvolveu. Os autores esclareceram que *B. amylophilus*, capaz de sintetizar proteína microbiana a partir de amido e NH_4^+ , são fontes de aa ramificado. Esses aminoácidos são decompostos para produzir AGCC ramificada essenciais, através da deaminação realizada por *M. Eldenii* e *B. ruminicola* entre outras.

Ao cultivar *B. amylophilus* e *R. albus* com adição de amido e celulose, houve crescimento de *B. amylophilus* mas o crescimento de *R. albus* somente foi observado após 96 h. Em co-cultura de *M. elsdenii* e *R. albus* em dieta basal sem amido, mas adicionando aa, houve aumento das duas populações logo após a adição. Quanto menor a concentração de aminoácidos suplementados, menor foi o crescimento de *M. elsdenii* e melhor o de *R. albus*, além de reduzir o tempo requerido para máximo crescimento. Embora o rúmen seja muito mais complexo, este experimento exemplifica a interdependência entre algumas espécies.

Ainda neste estudo, observou-se que estes eventos ocorreram em sucessão e não concomitantemente, ou seja, aa ramificados apareceram após 12 h de fermentação enquanto que os AGCC ramificada somente após 36 h (Miura et al., 1980). Porém, em experimentos iniciais, com suplementação de feno com caseína *in vivo*, Anison et al., (1954) reportaram elevação da concentração de iso-butírico, iso-valérico e 2-metil-butírico e também valérico em líquido ruminal coletado após 2 h da alimentação.

Whitelaw et al., (1984) relataram que a defaunação levou ao aumento de propionato e diminuição de butirato, o qual tem uma relação inversa com a formação de metano (Hobson, 1972). Segundo Itabashi et al. (1984), quase totalidade dos protozoários degrada carboidratos principalmente em butirato e acetato e menos em propionato.

Um experimento *in vitro* comparando inóculo faunado e defaunado, houve diminuição de n-butirato e valerato em aproximadamente 50 % quando defaunado. Ao utilizar óleo de coco, o inóculo faunado apresentou diminuição de n-butirato e n-valerato e também de metano, de protozoários e da contagem de bactérias. Em contrapartida, com o uso de óleo no inóculo já sem protozoário (defaunado) o n-

butirado não se alterou, mas houve redução de metano, da contagem de bactérias em 30 % e de n-valerato em 50 %. Acetato somente foi reduzido em defaunado com utilização de óleo, mas em contra partida, propionato se mostrou superior no inóculo defaunado, principalmente quando óleo foi adicionado. Estes resultados indicaram, entre outras coisas, que n-butilato está relacionado ao metabolismo de protozoário, enquanto n-valerato está relacionado não somente aos protozoários, mas também às bactérias. Além disso, ficou evidente que a emissão de metano é, em grande parte, controlada por protozoários (Dohme et al., 1999).

2.7.2. Interrelações de microorganismos e produção de amônia

Em termos de absorção de amônia, Hungate, (1966) ressaltou que a amônia é relativamente mais importante para microorganismos que degradam fibras do que os que utilizam açúcares solúveis. Como os microorganismos fibrolíticos levam mais tempo para se estabelecer nas partículas dos alimentos que chegam ao rúmen e como a degradação de celulose é mais lenta que o metabolismo de carboidratos solúveis, estes fibrolíticos devem utilizar formas de N que não sejam imediatamente utilizadas pelos organismos que atacam nutrientes solúveis, como os aminoácidos e peptídeos.

Para *Bacteroides succinogenes* a amônia foi essencial para o seu desenvolvimento, mesmo em presença de dezenove aminoácidos, de uma mistura de purina e pirimidina e de vitaminas do complexo-B (Bryant et al., 1959). Similarmente, Bryant e Robinson (1961) reportaram que as bactérias celulolíticas, *Ruminococcus flavefaciens* e *R. Albus*, cresceram somente com a presença de amônia.

Entretanto, trabalhos posteriores mostraram que aminoácidos são também importantes nutrientes para as bactérias celulolíticas. *R. flavefaciens* cresceu em meio contendo celobiose e caseína somente quando metionina esteve presente (Paterson e Kung, 1988). Ling e Armstead (1995) observaram que *Fibrobacter succinogenes* acumulou ¹⁴C presente nos aminoácido e peptídeo e Gengiz et al. (2001) relataram incorporação entre 43 e 51 % de N microbiano em meio contendo peptídeos (tripticase) ou aminoácidos.

Eschenlauer et al. (2002) estudando microorganismos produtores de amônia ruminal, relataram que algumas espécies com pequena população tiveram atividade deaminativa suficientemente alta. Estas bactérias foram isoladas anteriormente de rúmen de bovinos, ovinos e veados em pastagem e são conhecidas pela sigla em inglês HAP do termo “ammonia-hyperproducing bacteria” (Atwood et al., 1998). Alguns isolados de HAP possuem ampla função bioquímica podendo ser proteolíticos e/ou sacarolíticos (McSweeney et al., 1999; Eschenlauer et al., 2002). McSweeney et al. (1999) identificou estas bactérias em alta diversidade de espécies em caprinos recebendo leguminosa rica em tanino, *Calliandra calothyrsus*.

2.7.3. Interrelações de metanogênicas e protozoários

Existe uma grande diversidade de metanogênicas no rúmen (Wright et al., 2004) e a proporção relativa de espécies metanogênicas são influenciadas pela espécies do hospedeiros, composição e manejo da dieta e área geográfica (Ungerfeld et al., 2004).

Lin et al. (1997) observaram que o grupo *Archaea*, do qual as metanogênicas fazem parte, representa uma fração bastante funcional da microbiota ruminal,

embora seja numericamente pouco significativa, representando 0,5 a 3% do total de microorganismos.

As metanogênicas formam um grupo diverso que comporta doze gêneros (Moss, 1993; Mackie et al., 2002), sendo as espécies mais significantes no processo da metanogênese ruminal a *Methanobrevibacter ruminantium* e a *Methanosarcina barkeri*. Outros autores concordam que *Mb. ruminantium* é uma das espécies mais dominante no rúmen, porém destacam também a importância de *Metanomicrobium mobile* (Lin et al., 1997; Sharp et al., 1998; Ungerfeld et al., 2004).

A grande maioria dos organismos metanogênicos reduz CO_2 , utilizando H liberado por outras espécies, o que mantém o gradiente iônico na membrana e garante a produção de ATP. Assim, algumas espécies produtoras de H são influenciadas pela presença de metanogênicas devido à transferência interespecífica de H; conforme descrito no item 2.7.

As bactérias metanogênicas, diferem na sua preferência por substrato. *M. ruminantium* tem como principal substrato H e CO_2 , mas formato também pode ser utilizado quando em altas concentrações. Em contrapartida, *M. barkeri* utiliza para seu crescimento além de H e CO_2 , acetato, metanol (CH_3OH) e metilaminas (formadas no rúmen pela degradação de colina) e *Mb. smithii* se desenvolve somente na presença de formato e CO_2 (Moss, 1993).

Poucos estudos sobre a comunidade metanogênica através da técnica de eletroforese em gel de gradiente denaturante (DGGE) foram realizados em ambiente ruminal. Estudos em solo (Watanabe et al., 2004; Sugano et al., 2005), em lagos (Øvreas et al., 1997), reatores do tipo UASB (digestor anaeróbico de fluxo ascendente) (Keyser et al., 2006) e em rúmen (Christophersen et al., 2004) utilizando DGGE mostraram sucesso na obtenção de informação sobre a

comunidade metanogênica.

Christophersen et al., (2004) dividiram as populações de metanogênicas em três grupos: as de vida livre, as que vivem aderidas à superfície dos protozoários (ecto-simbiontes) e as que vivem dentro dos protozoários (endo-simbiontes). Trabalhando com três dietas a base de casca de aveia (controle), 30 e 70 % de grão de aveia, com seqüencial lavagem e centrifugações para separações dos grupos, esses autores concluíram que pelo menos alguma metanogênica de vida livre deve ser de espécie diferente das outras dependentes de protozoários. Foi também observada alta intensidade de algumas bandas no tratamento controle sem lavagem, as quais reduziram de intensidade ou desapareceram com o aumento de lavagens. Estas bandas possivelmente representaram as metanogênicas de vida livre, facilmente eliminadas com as lavagens, sugerindo sua maior abundância sobre outras populações e a facilidade de passagem para o pós-rúmen.

A interação entre metanogênicas e protozoários é bastante documentada (Vogels et al., 1980; Kreuzer et al., 1986; Hillman et al., 1988; Sharp et al., 1998; Tokura et al., 1999; Ungerfeld et al., 2004).

Kreuzer et al. (1986) relataram que defaunação reduziu a produção de metano em dietas com alta celulose. Hillman et al. (1988) mostraram que há transferência de hidrogênio entre metanogênicas e protozoários ciliados (“holotrich”), independentes da sensibilidade das metanogênicas pelo oxigênio que é consumido pelos protozoários em sua organela específica.

As associações com protozoários e metanogênicas são mais comuns com membros da família *Methanomicrobiales* (*Methanomicrobium mobile*) (Tokura et al., 1999). Membros da Família *Methanobacteriaceae*, da qual *Methanobrevibacter ruminantium* é a mais importante, são dominantes em meios ricos em protozoários

(Tokura et al., 1999; Ungerfeld et al., 2004), enquanto que *Mm. mobile*, são negativamente afetadas quando associadas à presença de protozoários (Sharp et al., 1998).

O conhecimento e entendimento das relações entre metanogênicas e protozoários são importantes para identificação de espécies resistentes ou tolerantes a certos inibidores da metanogênese, a sua persistência de ação e a melhor alternativa para redução de metano entérico.

2.8. Influência de plantas taníferas sobre a microbiota ruminal

O efeito de compostos fenólicos sobre os microorganismos pode ser resultado de uma ação bacteriostática, dificultando a sua adesão na parede da partícula e/ou complexando algumas enzimas digestivas (Getaschew et al., 2000b; Mcallister et al., 2005; Guimaraes-Beelen et al., 2006b), ou ainda de uma ação bactericida, agindo diretamente sobre a parede celular do microorganismo (Nelson et al., 1997). Estas ações dependem das características do substrato, do microorganismo e dos compostos fenólicos presentes.

Os microorganismos apresentam diferenças no tamanho e forma, que definem sua superfície específica. Esta característica aumentou a aderência de certas celulolíticas às moléculas de tanino como verificou Nelson et al. (1997). Também Varel e Jung (1986) observaram que a presença de compostos fenólicos interferiu diretamente na adesão de microorganismos à celulose. A presença de maior número ou tamanho de certas estruturas de adesão dos microorganismos, como os complexos de celulosoma, protuberâncias (fungos, *Ruminococcus flavofaciens*) ou conexões fimbriares (Krause et al., 2003), podem facilitar esta adesão. Além disso,

segundo McAllister et al. (1994) características físicas do substrato, como a cutícula, a malha protéica e o endosperma da parede celular e químicas, como a presença de metil-celulose, tanino condensado etc, também são responsáveis pela adesão do microorganismo à superfície da planta.

Vários estudos têm relatado a redução de populações de bactérias celulolíticas com a ação do tanino sendo a *Fibrobacter succinogenes* a principal bactéria afetada (Singleton, 1981; Nelson et al. 1997; McSweeney et al, 2001a).

F. succinogenes apresentou maior capacidade de complexar taninos purificados de Quebracho (*Schinopsis balansae* spp) e principalmente de Desmodium (*Desmodium ovalifolium*) e Myrtle (*Myrtus communis*) do que três gram-positiva cocci (*Streptococcus bovis*, *R. albus* e linhagem KN1) e *Provetella ruminicola* (Nelson et al., 1997). Ainda neste estudo, foi verificado que o crescimento microbiano foi mais afetado em *F. succinogenes* e *Streptococcus bovis*, enquanto que *Provetella ruminicola* e *R. albus* apresentaram alto nível de tolerância ao tanino. O tanino de Quebracho foi o que teve menos efeito inibidor sobre o crescimento microbiano, enquanto o de Myrtle apresentou a maior inibição.

Para Mcallister et al. (1994) é improvável que este efeito seja devido aos compostos fenólicos livres no fluido ruminal, pois estes são rapidamente metabolizados pelos microorganismos. Esta observação é suportada por outros experimentos que afirmaram que bactérias não aderentes foram menos afetadas pelo tanino (McAllister, et al., 1994; McSweeney et al., 2001b; Krause et al., 2003).

McAllister et al. (1994) sugeriram que o efeito do tanino em reduzir o crescimento de certas bactérias seja devido ao entrelaçamento de polímeros da parede celular através de dímeros de ácido ferúlico e cumárico (ácidos fenólicos), ou ainda pela acumulação de uma camada de substâncias fenólicas ao redor da

partícula à medida que os polissacarídeos são digeridos, a qual protege os tecidos mais internos da parede celular da planta, como mostrou Bae et al., (1993) através de microscopia eletrônica. Como *F. succinogenes* adere mais intimamente à celulose que outras celulolíticas (Krause et al., 2003; Bento et al., 2005; Shinkai e Kobayashi, 2007) isto pode explicar porque geralmente esta população é mais afetada pelo tanino que outras celulolíticas.

Entre as bactérias produtoras de H com menor aderência à partícula está a *Ruminococcus albus* e com maior tolerância aos taninos estão às bactérias *cocci* gram-positivas, como *Prevotella ruminicola*, *Streptococcus bovis* e *R. albus* (Nelson et al., 1997; McSweeney, 2001a), além das *rod* gram-negativas, pertencentes à classe *Proteobacteria* (Nelson et al., 1998; McSweeney et al., 2001b), e fungos como *Neocallimastix patriciarum* e protozoários, (McAllister et al., 1994; McSweeney et al., 2001b; Joblin et al., 2002). Estes organismos são importantes para futuros estudos sobre degradação de tanino condensado e maior exploração de seus benefícios no rúmen, como redução de metano e deaminação, porém sem detrimento da fermentação e produção animal.

A presença de tanino, ao diminuir diretamente algumas populações celulolíticas, favorece o desenvolvimento de outras devido à redução da competição, como sugerido por McSweeney et. al., (2001a). Estes autores verificaram que na dieta de ovinos contendo 30 % de *Calliandra calothyrsus* sem o uso de PEG houve redução das populações de *Ruminococcus spp* e *F. succinogenes*, sendo que em *F. succinogenes* esta redução foi ainda maior. Além disso, houve significativo aumento do grupo *Bacteroides-Porphyrromonas-Provotella*, predominantemente proteolíticas, que produzem como produtos finais de degradação de aminoácidos, amônia e AGCC ramificada, reconhecidos como fatores de crescimento das bactérias

celulolíticas (Slyter e Weaver, 1971; Miura et al., 1980; Nofitger et al., 2003). Assim, neste estudo, a ação de tanino, ao inibir o desenvolvimento de *Ruminococcus spp* e *F. succinogenes* facilitou o desenvolvimento dessas proteolíticas devido à menor competição.

Isto explica porque a eficiência da síntese microbiana, ou seja, mg de N microbiano/g MS nem sempre é afetada pela presença de tanino (Makkar et al., 1995b; McSweeney et al., 2001b;). Além da predominância de um novo grupo de microorganismo, a ação do tanino pode também desviar as rotas metabólicas, produzindo mais ATP, resultando em maior crescimento microbiano.

2.9. Influência de plantas taníferas sobre metanogênicas e protozoários

Ao estudar a influência de inibidores da metanogênese não só é importante avaliar sua ação sobre a comunidade microbiana, mas também como uma espécie individual é afetada. Algumas espécies resistentes a um inibidor podem ser selecionadas com o uso prolongado *in vivo* e a produção de metano retornar aos níveis anteriores (Ungerfeld et al., 2004).

Taninos condensados e hidrolisados têm demonstrado eficácia na redução de metano, porém sua ação pode ser deletéria a outros microorganismos importantes no complexo de relações ruminais (McMahon et al., 1999; Waghorn et al., 2002; Puchalla et al., 2005). Alguns trabalhos utilizando alguns inibidores da metanogênese, como as plantas taníferas (Wang et al., 1994; Hess et al., 2003; Abdalla et al., 2007), a saponina presente em *Sapindus saponaria* (Hess et al., 2003) e óleo (Dohme et al., 1999), mostraram a redução de população de protozoários ruminais, provavelmente devido à interligação entre estes grupos de

microorganismos.

Com o pastejo de *Lotus corniculatus* houve redução da população de protozoários em ovinos jovens (Wang et al., 1994) em comparação com animais inoculados com PEG através de fístula ruminal. Não houve diferença entre esses tratamentos quanto à % de acetato, propionato e n-butirato, porém a infusão de PEG aumentou a % de iso-butírico, iso-valérico e n-valérico após o 1º dia de infusão, sugerindo aumento da degradabilidade protéica por protozoários. Abdalla et al. (2007) suplementando cordeiros com *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth, observaram redução da emissão de metano e tendência na redução da população de protozoários.

Aumentando a proporção de *Arachis pintoii* (TC = 29 mg/g) em dietas com *Brachiaria dictioneura in vitro*, houve aumento do número total de bactérias com inclusão de 2/3 e 3/3 de *A. pintoii*, mas os protozoários totais foram maiores somente quando 1/3 e 2/3 de *A. pintoii* foi adicionado. Independente da proporção, a inclusão de *A. pintoii* elevou a % de protozoários *Endodiniomorphides* (Hess et al., 2003). Este resultado corroborou com o aumento da DM, de AGCC total e de iso-butirato obtido neste experimento, indicando maior degradação de proteína e sugerindo maior ação dos protozoários.

Em outro estudo, avaliando o uso de saponina na fermentação ruminal, somente houve redução de protozoários quando frutas de *Sapinus saponaria* foram adicionadas à *A. pintoii*, a qual, entre as leguminosas taniníferas testadas, foi a que apresentou melhor qualidade. Os autores sugeriram que *S. saponaria* não deve ser efetiva contra protozoários em dietas de baixa qualidade (Hess et al., 2003). Adição de *S. saponaria* também apresentou tendência na redução de amônia, porém houve redução de iso-butirato, um produto final da degradação de valina, indicando que

apesar da degradação aparente de N não ter sido afetada com o tratamento, pode ter havido mudanças nas vias de degradação de proteína.

3. Avaliação da influência de plantas ricas em taninos sobre a fermentação ruminal *in vitro*

Resumo

Quatro leguminosas ricas em tanino, *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala*(LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC), e feno de capim tifton 86, *Cynodon x cynodon* (CYN) como controle, foram testadas em ensaio *in vitro* de produção de gases utilizando seringas de vidro ("Hohenheim Futter Test" - HFT) com o objetivo de avaliar o potencial nutritivo para alimentação de ovinos quanto à produção de gases (PG) e à cinética fermentativa. A PG foi medida em 10 intervalos durante 96 h de incubação com três seringas para cada planta e em duas corridas, sendo os parâmetros cinéticos da fermentação (produção de gases potencial (A), fase "lag" (L) e taxa fraccional de fermentação (μ)) determinados por modelo exponencial. O tanino condensado nas leguminosas, expresso em equivalente leucocianidina, variou entre 20 (STA) e 105 (MIC) g/kg. MIC apresentou as maiores concentrações de fibra em detergente neutro (FDN) e de fibra em detergente ácido (FDA) (706 e 494 g/kg, respectivamente), enquanto LEU teve o menor valor de FDA (275 g/kg) e a maior quantidade de hemicelulose e não diferiu de STA e STD quanto ao conteúdo de FDN (em média 633 g/kg). A PG variou após 96 h entre 23 (MIC) e 47 (LEU) ml/200 mg sem PEG (polieteleno glicol) e entre 40 (MIC) a 51 (LEU) mL/200 mg com adição de PEG. Entre todas as plantas, MIC apresentou o menor desempenho fermentativo (PG e parâmetros cinéticos), enquanto LEU e STA apresentaram os maiores valores de PG ($P < 0,05$). A PG em LEU e STA não diferiram entre si ($P > 0,05$), exceto após 48 h sendo maior somente em LEU ($P < 0,05$). MIC sob ação de PEG apresentou aumento de 252, 283 e 224 % após 8, 24 e 48 h, respectivamente, entretanto, a produção de gases máxima (96 h) não foi superior a 40 mL/200 mg. PEG reduziu significativamente a fase "lag" de MIC de 11 para 2 h ($P < 0,05$), além de elevar A e reduzir μ ($P < 0,05$). Porém, não teve efeito sobre os parâmetros cinéticos em STA ($P > 0,05$) e o incremento de gás após 24 e 48 h foi menor (3,8 e 2,9 %, respectivamente) do que STD (6,2 e 4,9 %, respectivamente). LEU + PEG apresentou os maiores valores de produção de gases entre todas as plantas e aumento significativo de A ($P < 0,05$). Entretanto, não apresentou efeito sobre os outros parâmetros cinéticos estudados. O incremento de gás após 8 h em LEU + PEG foi maior ($P < 0,05$) que em STD + PEG, embora ambas apresentassem o mesmo conteúdo de tanino condensado. As leguminosas tiveram melhor desempenho fermentativo que a gramínea, com exceção de MIC.

Entretanto, a fermentação de todas as leguminosas foi limitada diferentemente pela presença de tanino, de fibra indigestível ou pela ação aditiva de ambos. Entre todas as plantas, LEU mostrou ser uma forragem de boa qualidade para suplementação protéica em dietas de ovinos, assim como STA e STD, contanto que para estas haja um melhor manejo de produção para evitar o alto conteúdo de fibras, especialmente de FDA. MIC poderia ser incluído na dieta de ovinos em baixa concentração, não com a finalidade principal de suplementação protéica, mas a explorando como aditivo para mitigação de metano.

Palavras chaves: bio-ensaio, gás, cinética fermentativa, taninos, fenólicos, PEG

Evaluation of the influence of tannin-rich plants on *in vitro* rumen fermentation

Abstract

Four legumes, *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala*(LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC), and *Cynodon x cynodon* grass hay (CYN) as control were tested in the Hohenheim Futter Test – HFT, aiming to evaluate their nutritional potential regarding to the gas production (GP) and the fermentative kinetic. GP was recorded at 10 intervals over 96 h of incubation (two runs with three syringes for each plant) and the GP parameters (potential gas production (A), lag phase (L) fractional rate of gas production (μ)) were determined by an exponential model. Condensed tannin in the legumes, expressed as leucocyanidin-equivalent, ranged from 20 (STA) to 105 (MIC) g/kg. MIC presented the highest concentration of neutral detergent fiber (FDN) and acid detergent fiber (ADF) (706 e 494 g/kg, respectively), whereas LEU had the lowest ADF (275 g/kg) and the higher hemicellulose e did not differ on NDF content in STA and STD (average 633 g/kg). The 96 h GP ranged from 23 (MIC) to 47 (LEU) mL/200 mg without PEG (polyethylene glycol) and from 40 (MIC) to 51 (LEU) mL/200 mg with PEG. Among all plants, MIC presented the lowest fermentative performance (GP and kinetic parameters), while LEU and STA showed the highest GP values ($P < 0.05$). The gas production in LEU and STA did not differ ($P > 0.05$) except at 48 h, being higher in LEU ($P < 0.05$). MIC with PEG presented gas increment of 252, 283 e 224 % at 8, 24 e 48 h, however, the maximal GP (96 h) was not higher than 40 mL/200 mg. PEG highly reduced lag phase in MIC from 11 to 2 h

($P < 0,05$), besides increased A value and reduced μ ($P < 0,05$). Nevertheless, PEG did not influence the kinetic parameters in STA ($P > 0,05$) and the gas increment at 24 and 48 h was lower (3.8 e 2.9 %, respectively) than STD (6.2 e 4.9 %, respectively). LEU + PEG presented the highest GP values among all plants and a significant increase of A ($P < 0,05$). However, it did not show effect on the other kinetic parameters. Gas increment of LEU + PEG at 8 h was higher than STD + PEG ($P < 0,05$), although both had the same condensed tannin amount. Legumes showed better fermentative performance (except MIC) than the grass. However, the each legumes fermentation was limited differently by the presence of condensed tannin or the indigestible fiber or by the additive action of both. Among the plants, LEU showed good quality forage for protein supplementation in sheep diets as well as STA and STD as long there is an agriculture management to reduce indigestible fiber, specially ADF. MIC could be included in a sheep diet in low concentration, aiming not protein supplementation, but exploiting it as an additive to methane mitigation.

Keywords: bio-assay, gas, fermentative kinetic, tannins, phenolics, PEG

3.1. Introdução

A utilização de leguminosas como suplementação protéica na dieta de ruminantes pode ser vantajosa do ponto de vista nutricional, econômico e ecológico.

O Brasil possui uma variedade de leguminosas com potencial forrageiro ainda pouco estudadas e negligenciadas devido à presença de fatores antinutricionais, como por exemplo, os taninos condensados (TC). Taninos condensados são polímeros de flavan 3-ol com diferentes pesos moleculares e capazes de complexar proteínas e outras macromoléculas. Esta complexação tem sido considerada algumas vezes benéfica por reduzir os prejuízos causados por nematóides (Niezen et al., 1995), por timpanismo e pela diminuição da degradação de proteína no rúmen (efeito “by pass”) (Waghorn, et al., 1987; Reed et al., 1990). Além disso, estudos recentes mostraram redução da emissão de metano entérico em até 16% com a

utilização de *Lotus sp.* (Waghorn et al., 2002; Hess et al., 2003; Carulla et al., 2005). A formação desses complexos (tanino condensado-proteína) é reversível e dependente do pH e do tipo de molécula (McAllister et al., 2005).

A avaliação *in vitro* de plantas ricas em taninos pode ser realizada utilizando o polietileno glicol (PEG) como agente complexante de tanino condensado no pH do rúmen (Makkar et al., 1995a). Este composto tem o potencial de inativar a ação dos taninos condensado sobre as proteínas, permitindo assim a avaliação de sua influência no aproveitamento de plantas taniníferas por ruminantes (Makkar et al., 1993).

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial nutritivo de quatro leguminosas ricas em taninos para uso em dietas de ovinos quanto à produção de gases e cinética fermentativa *in vitro*.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Origem das plantas

Quatro leguminosas ricas em tanino condensado, *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala* (LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC) foram obtidas de uma área experimental, sem calagem e adubação, do “Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios – Apta Regional Centro-Sul”, Piracicaba, SP. A coleta foi realizada em novembro de 2004 e em janeiro de 2005 quando as plantas estavam em estágio vegetativo. Caules maiores que 0,5 cm foram descartados.

O material coletado foi pré-seco em ambiente aberto e sombreado por

24 h. Em seguida, foi colocado em estufa de circulação de ar a 40 °C até peso constante (aproximadamente 72 h). O material foi moído a 1 mm em moinho tipo Willey e armazenado em câmara fria (4° C). Feno de tifton (*Cynodon x cynodon*) (CYN) foi usado como controle e obtido no comércio local.

3.2.2. Determinação da composição química da forragem

A avaliação da qualidade nutricional de todo material amostrado foi feita através de determinações químicas. A quantidade de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas segundo metodologia descrita em Association of Official Analytical Chemists (1995); de fibra em detergente neutro (FDN), de acordo com Mertens (2002) e de lignina em detergente ácido (LDA), de acordo com Robertson e Van Soest (1981).

Para as determinações químicas das plantas, uma amostra representativa foi moída em moinho tipo Willey e peneirada em malha de 1 mm. Todas as análises foram feitas com duas repetições para cada amostra. A quantidade de MS foi obtida pela secagem das amostras a 100 °C até peso constante em estufa de circulação de ar, calculando a diferença de massa antes e após a secagem. Para a determinação da matéria orgânica (MO) as amostras foram levadas à mufla a 500 °C por 4 h e o valor estimado por diferença entre o peso inicial e a quantidade de cinza. A energia bruta (EB) foi analisada por combustão em bomba calorimétrica adiabática.

3.2.3. Determinação de compostos fenólicos

As análises de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados foram realizadas no laboratório de nutrição animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (Piracicaba, SP, Brasil), de acordo com os trabalhos de Porter et al.[‡] citado por Makkar et al. (2000). As amostras foram moídas e peneiradas em malha com diâmetro de 0,5 mm (60 mesh). Para extração, 200 mg de amostra seca e moída foram transferidos para béqueres de 30 mL. Em seguida, adicionou-se 10 mL de solução de acetona 70%. Os béqueres foram colocados em banho de ultra-som (QH-Kerry) com gelo, por 20 min. Posteriormente, o material foi centrifugado a 700 x g (Centra IEC) por 10 min e temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubo de ensaio de 15 mL e utilizado para as determinações de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados por colorimetria, sendo denominado *extrato*. Foram feitas diluições do extrato quando necessárias.

a) Determinação de fenóis totais

Uma alíquota de 50 µL do extrato foi retirada e colocada em tubos de ensaio de 15 mL e o volume completado para 500 µL com água destilada. Posteriormente, 0,25 mL do reagente Folin 2 N e 1,25 mL de carbonato de sódio (40 g Na₂CO₃ em 200 mL água destilada) foram adicionados. Os tubos foram agitados em agitador elétrico e após 40 min foi medida a absorbância a 750 nm em espectrômetro

[‡]PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHANG, B.G. The conversion of proanthocyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. **Phytochemistry**, v.25, p.223-230, 1986.

UV/Visível (Lamba, modelo IZ150 – Perkin-Elmer).

A curva padrão foi preparada tomando-se alíquotas 0,00, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 e 0,10 mL de solução *stock* de ácido tânico (0,1 mg/mL). A concentração total de fenóis foi calculada em equivalente de ácido tânico, usando equação de regressão obtida pela curva padrão.

b) Determinação de taninos totais

Em tubos de ensaio de 15 mL foram pesados 100 mg de PVPP (polivinilpolipirrolidona) e pipetados 1000 µL de água destilada e 1000 µL de extrato. Estes tubos foram agitados e mantidos na geladeira (-4 °C). Após 15 min, esses tubos foram agitados novamente e centrifugados a 700 x g à 4°C por 10 min. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi transferido para outros tubos de ensaio de 15 mL adicionando-se 400 µL de água destilada em cada tubo.

Após agitação, foram adicionados 0,25 mL do reagente Folin 2 N e 1,25 mL do carbonato de sódio. Os tubos foram agitados novamente e após 40 min as amostras foram analisadas a 750 nm. O cálculo de taninos totais foi feito pela diferença entre as leituras dos tubos sem PVPP (fenóis totais) e os tubos com PVPP. A resposta foi expressa em equivalentes de ácido tânico.

c) Determinação de taninos condensados (Butanol-HCl)

Uma alíquota de 500 µL do extrato de cada amostra foi retirada e colocada em 3 tubos de ensaio de 15 mL. Posteriormente, foi adicionado 3 mL de reagente butanol-HCl e 0,1 mL de reagente férrico, sendo em seguida agitado em agitador elétrico. Após essa etapa, um dos tubos foi separado e guardado em local escuro, o qual foi denominado *branco*. Os dois outros tubos foram aquecidos a 100°C por 60

min. Após o resfriamento, todos os tubos foram analisados a 550 nm em espectrômetro UV/Visível (Lamba, modelo IZ150 – Perkin-Elmer). A concentração de tanino condensado foi expressa em equivalente grama de leucocianidina em porcentagem da MS (eq-g leuc/% MS), obtida conforme expressão: $A_{550nm} \times 78,26 \times \text{fator diluição} / \% \text{ MS}$.

3.2.4. Bio-ensaio *in vitro* de produção de gases na presença de polietileno glicol (PEG)

Quatro leguminosas ricas em tanino, *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala* (LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC), e feno de capim tifton 86 (*Cynodon x cynodon* - CYN) como controle, foram testadas em bio-ensaio *in vitro* de produção de gases utilizando seringas de vidro (“Hohenheim Futter Test” - HFT) (Menke e Steingass (1988; Makkar et al., 1995a), no Instituto de Ciências Animais da Universidade de Bonn, Alemanha.

O inóculo foi preparado com a fase líquida do conteúdo ruminal de dois ovinos machos, adultos e canulados da raça Blackface e alimentados com dieta de 50 % de feno de gramínea temperada e 50 % de concentrado contendo 20% de proteína bruta, os quais nunca tiveram contado com alimentos taniníferos.

A coleta de inóculo foi realizada antes da alimentação da manhã e imediatamente transferida para garrafas térmicas para transporte ao laboratório. O material foi coado através de duas camadas de tecido de algodão e misturado à solução nutritiva na proporção 1:2. A solução nutritiva foi previamente preparada segundo Menke e Steingass (1988), exceto pela concentração de NaHCO_3 que foi

reduzida a 33 g/L e de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, aumentada para 6 g/L, a fim de evitar escassez de nitrogênio durante prolongada incubação (Liu et al., 2002). A mistura foi mantida a 39 °C e saturada com CO_2 . sendo adicionada com dosador calibrado em 30 mL às seringas de vidro (100 mL). As seringas possuíam pistão lubrificado com silicone e precisão de leitura é de 0,5 mL.

Em cada seringa foram adicionados em triplicatas 200 mg de cada planta (tratamento) seca e moída a 1 mm juntamente com 30 mL da mistura inóculo+solução nutritiva. Cada tratamento foi também incluído em triplicatas com 200 mg do agente complexante de tanino condensado, o polietileno-glicol (PEG 6000) para avaliação da ação biológica do tanino.

Foram realizadas duas corridas e as medições de produção de gases acumulado para cada tratamento foram lidas manualmente após 0, 4, 8, 12, 24, 32, 48, 56, 72, 80 e 96 h de incubação. Triplicatas de amostras padrão de feno e de concentrado obtidas do Instituto de Nutrição Animal da Universidade de Hohenheim (Alemanha) foram incluídas em cada corrida e usadas para ajustes entre corridas.

Para descrever a dinâmica de produção de gases no decorrer do tempo, foi aplicado o seguinte modelo exponencial de acordo com France et al., (1993):

$$V_t = A \{1 - e^{-(b(t - L) - c(\sqrt{t} - \sqrt{L}))}\} \quad \mu = b + \left\{ \frac{c}{2\sqrt{t/2}} \right\},$$

onde V_t é o volume final de gás acumulado no tempo t (mL), A é o potencial de produção de gases (mL), L é a fase lag (h) e c e b são constantes matemáticas do modelo usadas para calcular a taxa fraccional de produção de gases (μ , %/h). Os parâmetros A , b , c e L foram estimados pela análise de regressão não linear (PROC NLIN) do software SAS (version 8.1; 2001), com valores mínimos estabelecidos em 80, 0,05, -0,15 e 5, respectivamente.

O tempo médio da produção de gases, representado por $t_{1/2}$ significa o tempo

(h) quando metade da curva assintótica de produção de gases foi alcançado e foi estimado de acordo com o seguinte modelo (Ørskov e McDonald, 1979):

$$t_{1/2} = (\ln 2/c) + L$$

O incremento de produção de gases devido a ação do PEG foi calculado após 8 (Inc8), 24 (Inc24) e 48 h (Inc48) de incubação pela relação entre o volume de gás produzido nas seringas com e sem PEG, sendo a produção de gases das seringas sem PEG considerada como 100 %.

Considerando que a retenção média da digesta no rúmen seja de 48 h, seria desejável que a maior parte do material ingerido fosse fermentado dentro deste período. Nestes termos, foram comparados, de acordo com Bueno et al. (2005), a relação G48/G96 (REL1) que sugere quanto da fermentação foi atingida nas primeiras 48 h em relação a fermentação observada total, e REL2 que representa quanto da fermentação observada total (G96) se aproxima da fermentação potencial estimada (A).

3.2.5. Delineamento e análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento de blocos totalmente casualizados, com cinco tratamentos (STA, STD, LEU, MIC e o controle CYN), duas corridas (blocos) cada qual em um rotor, e três réplicas para cada variável dependente estudada com e sem PEG. As fontes de variação foram controladas pela análise de variância, usando o procedimento glm (PROC GLM) do software SAS (version 8.1; SAS 2001) conforme modelo: $Y_i = \mu + P_i + E_i$, sendo:

Y_i = Variável dependente observada nos tratamentos;

μ = Média observada em Y_{ij} ;

P_i = Efeito do tratamento (i_1 = STA; i_2 = STD; i_3 = LEU; i_4 = MIC e i_5 = controle);

E_i = Erro experimental aleatório associado à Y_i , que, por hipótese, tem distribuição normal, com média zero e variância σ^2 .

As variáveis dependentes, analisadas com e sem PEG, foram: produção total de gás, fase lag, a taxa fraccional de fermentação, REL1 e REL2 e o incremento de gás devido ao PEG após 8, 24 e 48 h (Inc8), (Inc24) e (Inc48) com e sem PEG. As médias ajustadas (*lsmeans*) de cada variável dependente foram comparadas pelo teste *t* de Student à 5 % de probabilidade do erro.

3.3. Resultados

Na Tabela 3.1 são apresentados os resultados da análise químicas e quantificação de compostos fenólicos das plantas. A gramínea CYN, usada como controle, apresentou baixa PB e energia bruta e o maior valor de aFDN_{mo} ($P < 0,05$); porém, teve alta concentração ($P < 0,05$) de hemicelulose, juntamente com LEU, e valor intermediário de FDA_{om}, além da menor concentração de compostos fenólicos, como os fenóis totais, taninos totais e taninos condensados.

MIC, ao contrário, apresentou os mais elevados valores ($P < 0,05$) de compostos fenólicos e FDA_{om}, entretanto, mostrou algumas características nutricionais favoráveis, como o mais alto valor de energia bruta e valores intermediários de PB e hemicelulose ($P < 0,05$).

Tabela 3.1- Composição química das plantas: *Cynodon x cynodon* grass (CYN), *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala*(LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC)

	CYN	STA	STD	LEU	MIC	dpm [#]	P
MS	934 ^a	935 ^a	934 ^a	922 ^c	924 ^b	1	****
MO	904 ^d	937 ^c	942 ^{bc}	971 ^a	960 ^{ab}	5	**
PB	78 ^c	241 ^a	236 ^a	246 ^a	191 ^b	8	****
EE	14	27	29	35	56	nd	nd
aFDNmo	774 ^a	637 ^c	642 ^c	620 ^c	706 ^b	20	****
FDAmo	393 ^b	412 ^b	405 ^b	275 ^c	494 ^a	23	****
Hem	381 ^a	225 ^b	237 ^b	346 ^a	212 ^b	20	****
FT	6 ^e	55 ^d	72 ^c	114 ^b	151 ^a	4	****
TT	3 ^c	38 ^b	49 ^b	98 ^a	110 ^a	4	****
TC	0.2 ^d	20 ^c	64 ^b	56 ^b	105 ^a	3	****
EB ^{&}	17246 ^e	18236 ^d	18900 ^c	19435 ^b	20399 ^a	133	****

MS = matéria seca (g/kg Matéria Original) à 105 °C; MO = matéria orgânica (g/kg MS); PB = proteína bruta (g/kg MO); aFDNmo: fibra em detergente neutro com amilase e expressa excluindo cinza residual (g/kg MO); aFDAmo: fibra em detergente ácido expressa excluindo cinza residual (g/kg MO); Hem = hemicelulose = aFDNmo – aFDAmo (g/kg MO); FT = fenóis totais (eq-g de ácido tânico/kg MS); TT = taninos totais (eq-g ácido tânico/kg MS); TC: tanino condensado (eq-g de leucocianidina/kg MS), EB = energia bruta (kJ/kg). [&]análise em bomba calorimétrica. Médias na mesma linha seguida da mesma letra não diferem (P<0.05) pelo teste t de Student's; [#]dpm = desvio padrão da média; P = significância do erro: * <0,05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001.

LEU, STA e STD apresentaram os maiores valores de PB (P < 0,05) e valores intermediários de aFDNmo. Quanto ao tanino condensado, LEU e STD tiveram valores médios e similares (P > 0,05) de 64 e 56 eq-g de leuc/kg MS, respectivamente, porém LEU teve maior (P < 0,05) quantidade de fenóis totais, taninos totais e energia bruta que STD e o menor conteúdo (P < 0,05) de FDAmo entre todas as plantas testadas.

As duas leguminosas do gênero *Stizolobium*, STA e STD, não apresentaram diferenças entre si (P > 0,05) quanto a PB, aFDNmo, FDAmo e hemicelulose, porém

STA mostrou menor valor ($P < 0,05$) de fenóis totais, taninos condensados e energia bruta do que STD. STA teve aproximadamente um terço da concentração de tanino condensado presente em LEU e STD.

Houve diferenças ($P < 0,05$) quanto à energia bruta entre as plantas testadas que variou de 20399 a 17246 KJ/kg na seguinte ordem decrescente: MIC > LEU > STD > STA > CYN.

As curvas de produção de gases de cada tratamento com e sem PEG são mostradas na Figura 3.1. A produção de gases observada (mL/200 mg) após 8 (G8), 24 (G24), 48 (G48) e 96 h (G96) de incubação, bem como, o incremento de gás devido ao efeito da adição de PEG estão discriminadas na Tabela 3.2.

Entre todas as plantas, os maiores valores de produção de gases sem PEG foram atingidos por LEU e STA durante todo o período, as quais diferiram somente após 48 h de incubação. Por outro lado, MIC apresentou a menor produção de gases em todos os horários ($P < 0,05$) variando de 8 a 23 mL/200 mg MS (Tabela 3.2). Todas as plantas apresentaram incremento de gás devido a adição de PEG, exceto CYN e também STA após 8 h de incubação.

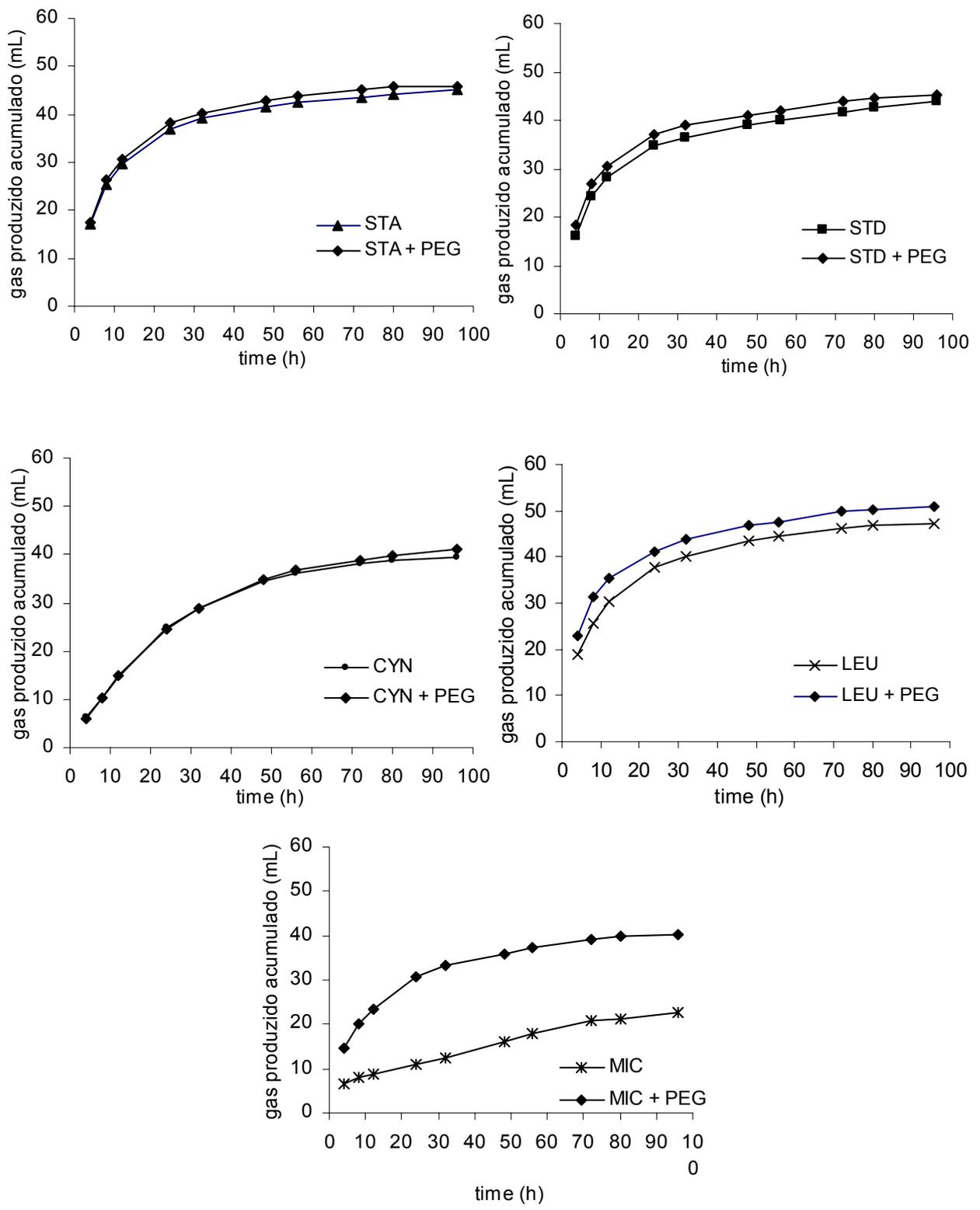


Figura 3.1. Cinética de produção de gás de Tifton (*Cynodon x cynodon*) (CYN); *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala* (LEU) e *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC). PEG = agente complexante de tanino, polietileno glicol

Tabela 3.2. Produção de gases observada (mL/200 mg) com e sem PEG[&] após 8 (G8), 24 (G24), 48 (G48) e 96 h (G96) de incubação das plantas testadas[§] e incremento de gás devido ao efeito da adição de PEG (Inc8, Inc24 e Inc48)

	G8	G24	G48	G96	Inc8	Inc24	Inc48
	mL/200 mg						
CYN	10,2 ^f	24,7 ^f	34,5 ^e	39,3 ^d	100 ^c	100 ^d	100 ^d
STA	25,4 ^{cd}	36,8 ^c	41,7 ^{cd}	45,2 ^{bc}	100 ^c	100 ^d	100 ^d
STD	24,2 ^d	34,8 ^d	39,2 ^e	44,1 ^c	100 ^c	100 ^d	100 ^d
LEU	25,7 ^{bc}	37,6 ^{bc}	43,4 ^b	47,2 ^b	100 ^c	100 ^d	100 ^d
MIC	8,0 ^g	10,8 ^g	16,2 ^f	22,8 ^e	100 ^c	100 ^d	100 ^d
CYN+PEG	10,4 ^f	24,5 ^f	34,7 ^e	41,0 ^d	101,5 ^c	99,1 ^d	100,7 ^d
STA+PEG	26,2 ^{bc}	38,2 ^b	42,9 ^{bc}	45,7 ^{bc}	103,3 ^c	103,8 ^c	102,9 ^c
STD+PEG	26,8 ^b	36,9 ^c	41,1 ^d	45,1 ^{bc}	110,5 ^b	106,3 ^b	104,9 ^{bc}
LEU+PEG	31,5 ^a	41,3 ^a	46,7 ^a	50,9 ^a	122,8 ^a	109,8 ^a	107,6 ^a
MIC+PEG	20,1 ^e	30,4 ^e	36,0 ^e	40,3 ^d	252,1 [§]	283,4 [§]	223,7 [§]
dpm [#]	0,37	0,31	0,50	0,72	1,31	0,66	0,67
P	****	****	****	****	****	****	****

[&]PEG = agente complexante de tanino, polietileno glicol; [§]Feno de Tifton (*Cynodon x cynodon*) (CYN); *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala* (LEU) e *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC). [§]valores retirados da análise estatística; Médias na mesma linha seguidas da mesma letra não diferem (P<0.05) pelo teste t de Student's; [#]dpm = desvio padrão da média; P = significância do erro: * <0,05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001.

Na Tabela 3.3 são apresentados os resultados de produção de gases potencial (A; mL), fase lag (L;h), o $t_{1/2}$ e taxa fraccional de fermentação (μ ;%/h) após 8, 24 e 48 h e a relação entre G48/G96 (REL1) e G96/A (REL2).

Apesar da complexação do tanino condensado por PEG, STA não melhorou o desempenho fermentativo, ou seja, os parâmetros cinéticos, L, A, μ , REL1 e REL2 não apresentaram diferença significativa e o incremento de gás após 24 e 48 h (3,8 e 2,9 %, respectivamente) foi menor do que em STD + PEG (6,2 e 4,9 %, respectivamente). Apesar desse maior incremento, ao se adicionar PEG à STD

observou-se que não houve alteração do perfil de produção de gases de STD em relação a STA, ou seja, o maior aumento de gás após 24 e 48 h em STD não foi suficiente para ultrapassar a produção de gases de STA + PEG ($P < 0,05$). Entretanto, STD apresentou aumento da produção de gases potencial (A), o que não ocorreu em STA + PEG. A diferença de gás produzido entre STA e STD, embora pequena, foi significativa, em torno de 5 %, e reduziu para 3 % com adição de PEG.

Tabela 3.3. Produção de gases potencial (A; mL), fase lag (L;h), $t_{1/2}$ (h) e taxa fraccional de fermentação (μ ;%/h) após 8, 24 e 48 h de incubação das plantas testadas[§] determinados por um [§]modelo exponencial e relação entre G48/G96 (REL1) e G96/A (REL2)

	A	L	$t_{1/2}$	μ_8	μ_{24}	μ_{48}	REL1	REL2
CYN	40,2 ^f	0,5 ^c	17	3,7 ^a	4,3 ^a	4,5 ^a	0,88 ^c	0,98 ^a
STA	69,9 ^b	3,0 ^b	6	1,8 ^c	3,0 ^d	3,5 ^d	0,92 ^a	0,65 ^{de}
STD	48,7 ^d	2,0 ^{bc}	6	2,3 ^b	3,2 ^{cd}	3,6 ^{cd}	0,89 ^{bc}	0,91 ^b
LEU	67,8 ^{bc}	2,5 ^b	7	2,0 ^{bc}	3,2 ^{cd}	3,6 ^{cd}	0,92 ^a	0,70 ^d
MIC	36,3 ^e	10,8 ^a	47	-0,6 ^d	1,1 ^e	1,8 ^e	0,71 ^e	0,63 ^e
CYN+PEG	41,9 ^f	0,7 ^c	-	3,4 ^a	3,9 ^b	4,2 ^b	0,85 ^d	0,98 ^a
STA+PEG	70,2 ^b	2,7 ^b	-	1,9 ^{bc}	3,1 ^{cd}	3,6 ^{cd}	0,94 ^{bc}	0,65 ^{de}
STD+PEG	66,3 ^c	2,7 ^b	-	1,9 ^{bc}	3,0 ^{cd}	3,5 ^d	0,91 ^{ab}	0,69 ^{dc}
LEU+PEG	76,3 ^a	2,4 ^b	-	2,2 ^{bc}	3,4 ^c	3,8 ^c	0,92 ^a	0,67 ^{cd}
MIC+PEG	47,4 ^d	1,9 ^{bc}	-	2,3 ^b	3,2 ^{cd}	3,6 ^{cd}	0,89 ^{bc}	0,85 ^c
dpm [#]	0,84	0,45	nd	0,15	0,11	0,09	0,01	0,01
P	****	****	nd	****	****	****	***	***

[&] tempo quando metade da curva assintótica de produção de gases foi alcançado (Orskov e McDonald, 1979); [§] feno de Tifton (*Cynodon x cynodon*) (CYN); *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala* (LEU) e *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC); [§] modelo descrito por France et al. (1993); G48 e G96 = produção de gases após 48 e 96 h, respectivamente; PEG = agente complexante de tanino, polietileno glicol. Médias na mesma linha seguidas da mesma letra não diferem ($P < 0.05$) pelo teste t de Student's; [#]dpm = desvio padrão da média; P = significância do erro: * $<0,05$; ** <0.01 ; *** <0.001 ; **** <0.0001 .

Em todos os horários observados, LEU + PEG apresentou os maiores valores de produção de gases entre todas as plantas e da produção de gases potencial, porém não houve alteração da taxa fraccional de fermentação em relação à fermentação sem PEG.

Apesar de possuir concentração de tanino condensado similar, LEU e STD apresentaram diferenças no incremento de gás com adição de PEG. No início da incubação (G8), houve aumento de 23 % na produção de gases em LEU + PEG e de somente 10 % com STD + PEG. Nessas duas plantas, o incremento de gás perdurou até 48 h, porém com valores menores, variando entre 5 e 10 % em relação as plantas sem PEG.

Ao contrário das outras leguminosas, MIC com adição de PEG teve incremento bastante elevado, sendo maior que 100 % em todos os horários. Além disso, houve aumento significativo de A, μ , REL1 e REL2 e redução da fase lag ($P < 0,05$).

Neste estudo, REL1 mostrou algumas diferenças entre as plantas testadas. STA e LEU apresentaram os maiores ($P < 0,05$) valores de REL1 (92 %), enquanto CYN e STD mostraram valores levemente inferiores ($P < 0,05$) (88 e 89 %, respectivamente) e MIC atingiu somente 71 % da sua fermentação após 48 h. Com a adição de PEG não houve alteração da REL1 para STD, STA e LEU, somente para CYN e MIC ($P > 0,05$). MIC + PEG apresentou aumento de 25 % na REL1.

A REL2 nas plantas sem PEG seguiu a seguinte ordem: CYN > STD > LEU \geq STA > MIC ($P < 0,05$), apresentando valores que variaram de 98 a 63 %. A presença do PEG não alterou ($P < 0,05$) a REL2 de CYN, STA e LEU ($P > 0,05$), mas reduziu 25 % em STD + PEG e aumentou 35 % em MIC + PEG.

O valor de $t_{1/2}$ em STA, STD e LEU apresentou valores baixos e semelhantes

de 6, 6 e 7 h, respectivamente. Em contrapartida a fermentação de MIC resultou em $t_{1/2}$ alto e acima de 24 h.

3.4. Discussão

O valor nutritivo das forragens depende da sua capacidade de possuir nutrientes essenciais aos animais e aos microorganismos e da facilidade destes serem solubilizados ou degradados no rúmen pelos microorganismos ou no pós-rúmen por ação química (Kaitho et al., 1998).

Com base na composição química (Tabela 3.1), observa-se que a utilização de CYN sozinho não atenderia as exigências nutricionais de ovinos em crescimento (NRC, 1985), necessitando ser suplementado por leguminosas e/ou concentrado para uma dieta melhor equilibrada.

O alto conteúdo de fibras e compostos fenólicos apresentados por MIC em nosso estudo, não parece estar ligado à maturidade da planta ou estágio vegetativo como suposto em outros trabalhos (McDowell e Valle, 2000, Sultan et al., 2003). O maior valor de FDAmo e compostos fenólicos em MIC do que em LEU é supostamente devido a diferentes condições de estresse do local de origem, já que ambas foram igualmente originadas de ponteiros de rebrota. LEU foi colhida de uma área plana e sombreada em algumas horas do dia, enquanto que MIC estava em área inclinada e a pleno sol durante todo o dia, o que propicia por exemplo, maior estresse hídrico.

De acordo com a literatura, o maior estresse hídrico e de temperatura estão diretamente associados ao aumento do conteúdo de compostos secundários, entre eles o tanino condensado (Reed et al., 1990; Vitti et al. 2005b). Guimarães-

Beelen et al. (2006a) utilizaram também *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC) originada da Caatinga, Sobral (CE), colhendo folhas terminais para simulação de pastoreio. Os autores observaram maior valor de tanino condensado (154 g/kg) do que mostrou MIC neste estudo (105 g/kg), porém menor conteúdo de FDN (476 e 706 g/kg, respectivamente).

O conteúdo de proteína bruta em LEU foi semelhante ao apresentado por Bonsi et al. (1997) e Kaitho et al. (1998), porém a concentração de tanino condensado e de FDN neste estudo foram maiores que os reportados pelos autores. MIC e LEU por terem sido colhidas também de ponteiros de ramos era esperada baixa concentração de fibras, o que não ocorreu especialmente em MIC, que apresentou alto valor para FDN e FDA.

Apesar da maior concentração de tanino condensado, LEU apresentou maior produção de gases após 48 h do que STA, em concordância com as outras características químicas favoráveis presentes em LEU, como por exemplo, a menor concentração de fibra pouco digestível (FDA). O bom desempenho de leucena foi também observado por Bonsi et al. (1997) em um estudo *in situ* com quatro tratamentos: leucena + milho, sesbânia + milho, torta de caroço de algodão + milho e capim *Eragrostis tef* como controle. Os resultados mostraram que o maior desaparecimento da MS após 6 e 48 h foi obtido no tratamento envolvendo leucena.

Este resultado corrobora com a alta REL1 encontrada em LEU neste estudo. Os autores reportaram fase lag muito semelhante ao valor observado neste estudo quando LEU foi incubada *in vitro* (2,2 h x 2,5 h, respectivamente). Estudos *in vitro* utilizando plantas evidenciam a ação do tanino condensado em reduzir a produção de gases potencial e a taxa fracional taniníferas (Makkar et al., 1995a; Getachew et al., 2000a). Entretanto, o efeito do PEG em STA apresentou baixa resposta em

produção de gases e não alteração dos parâmetros fermentativos como seria esperado, o que sugere que houve baixa influência de tanino condensado e dos outros compostos fenólicos no desempenho fermentativo desta leguminosa. É suposto que o alto conteúdo de FDA em STA tenha sido mais limitante à fermentação do que o tanino condensado.

STD, apesar de apresentar características químicas similares a STA, exceto pela maior concentração de tanino e fenóis totais, resultou em menor produção de gases que STA após 24 e 48 h, mostrando direta influência do tanino condensado em STD.

Embora LEU e STD possuíssem a mesma quantidade de tanino condensado, o menor incremento de gás em STD sugere a influência de outros fatores limitantes na sua fermentação, como alto FDN e FDA ou, possivelmente, também a diferenças no tipo de molécula de tanino (Kaitho et al., 1998; McNeill et al., 1998; Min et al., 2003; Hervás et al., 2003). LEU ao mostrar-se mais responsiva à ação do PEG, mesmo já tendo o melhor perfil fermentativo entre as plantas estudadas, indica o tanino condensado como um fator limitante para seu melhor aproveitamento.

O menor valor de REL1 em comparação às outras plantas quando MIC foi incubado sem PEG pode estar relacionado à longa fase lag e a baixa taxa fraccional de produção durante todo período de incubação.

MIC apresentou valor negativo para μ_8 (Tabela 3.3). Entretanto, segundo France et al. (1993) μ não pode ser negativo e deve satisfazer algumas condições. Nesta leguminosa, duas condições não foram satisfeitas. $c \geq -2b\sqrt{t}$ e $t \geq \text{lag}$, onde c é uma das constantes do modelo exponencial utilizado, ou seja, MIC apresentou lag time alto (10,8 h) e maior que 8 h, diferentemente das demais plantas testadas. Sendo lag o período necessário para início da fermentação, este valor negativo

evidencia a ausência de fermentação até 8 h nesta leguminosa.

A fermentação de MIC apresentou também o menor valor de REL2, não devido ao valor de A, porém mais uma vez devido à baixa taxa fraccional de fermentação e ao alto valor da fase lag, aproximadamente três vezes maior que as outras leguminosas. Estes fatores contribuíram para reduzir o valor de G96.

Ao incubar os substratos com PEG nas seringas, MIC teve incremento de gás maior de 100 % em todos os horários fazendo com que superasse a produção de gases de CYN ($P < 0,05$). Entretanto, mesmo com a complexação do tanino por PEG, MIC atingiu, assim como CYN, valores baixos de produção de gases e apresentou baixa produção de gases potencial. Estes resultados evidenciam que houve ação conjunta da maior quantidade de fibra pouco digestível (FDA) presente em MIC e da alta quantidade de tanino condensado, não permitindo que MIC atingisse os valores de produção de gases mostrados pelas outras leguminosas.

Quando PEG complexou o tanino em MIC, a fase lag foi 1/5 menor que quando sem PEG, contribuindo para o aumento da taxa fraccional de fermentação de MIC em todos os horários. Conseqüentemente, a produção de gases após 48 h foi maior, o que justifica o aumento do valor da REL1 nesta planta. No estudo *in situ* por Guimarães-Beelen et al. (2006a) quando *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth foi tratada com PEG, observou-se aumento de 112 % da taxa de degradação (Kd). Apesar disso, o aumento da degradabilidade potencial e da degradabilidade efetiva foi da ordem de 25 e 32 %, respectivamente.

O aumento da REL2 ocorrido em MIC + PEG expressou o aumento das taxas de fermentação e do potencial de produção de gases provocados pela ação de PEG, e estes dois fatores fizeram com que MIC pudesse atingir valores maiores de produção de gases após 96 h. Em STD + PEG a REL2 foi reduzida em 25 % embora

o potencial de produção de gases também tenha sofrido aumento. Porém as taxas fracionais de fermentação e a fase lag não apresentaram diferenças, fazendo com que STD não atingisse seu platô de produção de gases em 96 h de incubação.

Os baixos valores de REL2 em LEU e STA sem PEG demonstram que o platô de produção de gases também não foi atingido até o final de 96 h de incubação. STA apresentou baixa taxa fracional de produção de gases nas primeiras 8 h de incubação, fazendo com que esta planta necessitasse de mais tempo para atingir seu potencial. A adição de PEG em STA não alterou significativamente o potencial de produção de gases, a fase lag, a taxa fracional de fermentação, REL1 e REL2, porém houve aumento da produção de gases após 24 h. Este incremento da produção de gases foi causado pelo efeito do PEG, inibindo a ação do tanino presente. Entretanto, o alto conteúdo de FDA foi provavelmente um fator mais limitante ao melhor desempenho da fermentação de STA. Desta forma, é suposto que em STA tenha ocorrido ação aditiva de TC e FDA.

Em LEU, o PEG não alterou os parâmetros estudados com exceção do potencial de produção de gases e da produção de gases em todos os horários, mostrando que o efeito do tanino condensado foi mais importante no desempenho desta leguminosa.

3.5. Conclusão

Em geral, as leguminosas tiveram melhor desempenho fermentativo que a gramínea, com exceção de MIC. Entretanto, a fermentação de todas as leguminosas foi limitada diferentemente pela presença de tanino, de fibra indigestível ou pela ação aditiva de ambos.

O tanino condensado e outros compostos fenólicos em STA não influenciaram a cinética fermentativa e tiveram pequena influência na produção de gases em contraste à LEU que mostrou ter como principal fator limitante o tanino. Em MIC e STD houve uma ação aditiva do tanino condensado e de fibras indigestíveis limitando a fermentação.

LEU mostrou ser uma forragem de boa qualidade para suplementação protéica em dietas de ovinos, assim como STA e STD, contanto que para estas haja um melhor manejo de produção para evitar o alto conteúdo de fibras. MIC poderia ser incluído na dieta de ovinos em baixa concentração, não com a finalidade principal de suplementação protéica, mas a explorando como aditivo para mitigação de metano.

4. Influência de leguminosas taniníferas na produção de metano entérico e de outros parâmetros ruminais *in vitro*

Resumo

Plantas taniníferas apresentam habilidades para reduzir o metano entérico produzido por ruminantes, porém o mecanismo de ação não é completamente entendido. O objetivo deste estudo foi investigar a influência de plantas ricas em taninos no processo de degradação *in vitro* visando à mitigação de metano. A técnica *in vitro* de produção de gases ("Hohenheim Gas Test" - HFT) foi utilizada para avaliar quatro plantas ricas em taninos: *Stylobium aterrimum* (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala* (LEU) e *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC); e ainda feno de Tifton (*Cynodon x cynodon* - CYN) como controle. O teor de tanino condensado (TC) foi de 20, 64, 56, 105 e 0,2 g/kg matéria seca (MS) respectivamente para STA, STD, LEU, MIC e CYN. A produção de gases total (PG), metano (CH₄), amônia, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), crescimento de massa microbiana (MM) e degradabilidade verdadeira da MS (VDMS) foram avaliados no tempo $t_{1/2}$ (tempo para obtenção da metade da PG) e após 24 h de incubação. A produção de metano no $t_{1/2}$ foi reduzida ($P < 0,05$) com a adição das plantas teste em 17 % e quando relacionado à VDMS, esta redução alcançou em média 50 % com LEU e STA e 37% com MIC e STD. LEU também resultou em maiores PG e VDMS em $t_{1/2}$ (94 mL/g MS e 727 g/kg respectivamente). Em contraste, MIC apresentou PG e VDMS comparativamente menores (82 mL/g MS e 450 g/kg), mas não sendo menor que CYN (416 g/kg). LEU e STA apresentaram um aumento significativo em MM seguido por STD, MIC e CYN. A relação MM/AGCC em $t_{1/2}$ foram maiores para LEU (14,7) e STA (14,1) seguida por STD (6,1), MIC (5,6) e CYN (4,6). O maior valor de MM para LEU e STA sugere uma produção de ATP maior, porém, as diferentes proporções de AGCC demonstraram diferentes rotas de aquisição de ATP. A produção de acetato em LEU e STA não diferiu ($P > 0,05$) do controle (CYN – 19 mmol/L \pm 0.9). MIC apresentou maior concentração de acetato (27 mmol/L) e propionato (8 mmol/L), enquanto que STA apresentou valores menores ($P < 0,05$). Porém, em %mmol os maiores valores de acetato foram atingidos em STA e STD (73 %), enquanto LEU apresentou a maior proporção de propionato (25%). Em 24 h, houve leve diminuição da proporção dos ácidos graxos maiores (acetato e propionato) em comparação com $t_{1/2}$. A proporção de acetato em 24 h de incubação foi novamente menor em LEU e variou entre 66 e 71%, enquanto

propionato apresentou menor variação entre todas as plantas. Em geral, as plantas taníniferas demonstraram capacidade em reduzir o metano entérico com proporções de produtos de fermentação diferentes. Embora todos os tratamentos contribuíssem para a redução de metano, os parâmetros fermentativos estudados sugerem que somente LEU e STA poderiam contribuir para maior produção animal com maior eficiência.

Palavras chaves: fermentação, rúmen, ácidos graxos, amônia, degradabilidade, gás, tanino, fenólicos

Influence of tannin-rich plants in enteric methane production and other fermentation parameters *in vitro*

Abstract

Tanniferous plants have demonstrated abilities to reduce enteric methane by ruminants, however, the mechanism of action is not completely understood. The aim of this study was to investigate the influence of tanniferous plants on the degradation process concerning to methane mitigation. The *in vitro* Hohenheim Gas Test technique was applied to evaluate four tannin-rich plants: *Stylobium aterrimum* (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala*(LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC) and *Cynodon x cynodon* (CYN) as control, containing condensed tannin (CT) at 20, 64, 56, 105 and 0,2 g/kg dry matter (DM), respectively. The production of total gas (GP), methane (CH₄), ammonia, short chain fatty acids (SCFA), microbial mass growth (MM) and true substrate degradability (TSD) were measured at two main timepoints: $t_{1/2}$ (time of half maximal gas production) and 24 h. Methane production at $t_{1/2}$ was reduced ($P < 0,05$) with addition of legumes by 17% and when related to VDMS this reduction reached on average 50% with LEU and STA and 37% with MIC and STD. LEU resulted also in the highest GP (94 mL/g DM), which was accompanied by the highest VDMS (727 g/kg). In contrast, MIC presented the lowest GP value (82 mL/g DM) and a comparably low VDMS (450 g/kg), but not being lower than CYN (416 g/kg DM). LEU and STA caused a significant increase in MM followed by STD, MIC, and CYN. Additionally, high MM/SCFA ratios in $t_{1/2}$ were found in LEU (14.7) and STA (14.1) and followed by STD (6.1), MIC (5.6) and CYN (4.6). The higher MM in LEU and STA suggested higher ATP production; however, the different proportion of the SCFA demonstrated different routes of ATP acquisition. Acetate production of LEU and STA did not differ ($P > 0,05$) of the

control (19 mmol/L \pm 0.9). MIC showed the highest acetate (27 mmol/L) as well as the highest propionate (8 mmol/L) concentration, followed by LEU, while STA presented the lowest value ($P < 0,05$). Nevertheless, the highest values in %mmol for acetate were reached by STA and STD (73%), while LEU presented the highest propionate proportion (25 %). After 24 h, there were slightly lower reduction in the major SCFA (acetate e propionate) compared to $t_{1/2}$. Acetate proportion in 24 h incubation was again lower in LEU and varied between 66 and 71 %, while propionate presented lower variation among all plants. In general, tanniferous plants were able to reduce enteric methane with different fermentation products proportions. Although all of the treatments contributed to reduction of methane, the studied fermentative parameters suggest that only LEU and STA could contribute to increase animal production with higher efficiency.

Keywords: fermentation, rúmen, fatty acids, ammonia, degradability, gas, tannin, fenólicos

4.1. Introdução

O metano contribui com 16 % do total de emissões gases do globo terrestre, dos quais 28 % são originados da fermentação entérica (US-EPA, 2006a; 2006b). O metano entérico (CH_4) é um subproduto da digestão de carboidratos pelos microorganismos presentes no trato digestivo de herbívoros (Moss, 1993). Como o metano não pode ser aproveitado nem pelo animal e nem pelos microorganismos, é eliminado principalmente por eructação, representando perda energética e redução da eficiência de produção.

Os microorganismos atacam o alimento que chega ao rúmen gerando energia na forma de ATP (adenosina tri-fostato) para seu próprio crescimento. Um dos produtos finais do metabolismo microbiano são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), os quais são utilizados pelo ruminante como fonte de energia, e amônia (NH_3), que é rapidamente utilizada para síntese de proteína microbiana. Entretanto, a fermentação anaeróbica também gera compostos indesejáveis tanto para

microorganismo como para o animal, como nitrato (NO₃), CO₂, CH₄ e H₂ (Church, 1993; Schofield, 2000).

O H é produzido em maior ou menor concentração em função do roteiro metabólico de carboidratos, ou seja, da proporção relativa dos AGCC (Maynard et al., 1984; Mackie et al., 2002). A simples inibição da metanogênese não garante melhoria na eficiência energética do rúmen (Ungerfeld et al., 2004), sendo necessário o redirecionamento do H para outros sumidouros de H através de alteração das rotas metabólicas. O acúmulo de H no rúmen pode causar desordem metabólica prejudicando o desenvolvimento de várias populações microbianas que alteram o processo de degradação ruminal e conseqüentemente prejudicam o animal hospedeiro. Assim, é necessária a recolocação do H na forma de metano e propionato, os dois mais importantes sumidouros deste elemento.

Vários estudos têm sido realizados para estudar a influência de leguminosas taniníferas na fermentação ruminal. McMahon et al. (1999), por exemplo, em um ensaio *in vitro* (rusitec), demonstraram que a substituição de alfafa (*Medicago sativa*) por *Onobrychis viciifolia*, uma leguminosa rica em taninos, resultou em decréscimo linear da concentração de enzimas digestivas (protease e endoglucanase), NO₃ e da produção de metano com o aumento da quantidade de *Onobrychis* na dieta.

Utilizando gaiolas para estudo de metabolismo, Puchalla et al. (2005) observaram que matéria seca consumida (MSC) foi maior em caprinos alimentados com a leguminosa taninífera *Lespedeza cuneata* do que com mistura de *Digitaria ischaemum* e *Festuca arundinacea*, assim como a degradabilidade da MS (DMS) estimada *in vitro*. Carulla et al. (2005) utilizando extrato de *Acacia mearnsii* (0,615 g/g tanino condensado) em dietas de *Lolium perenne* sozinho, *L. perenne* + trevo vermelho e *L. perenne* + alfafa para ovinos mantidos em gaiolas para ensaio de

metabolismo observaram que suplementação de tanino condensado (TC) reduziu 13% em média a emissão de metano, além de reduzir a concentração de NH₃ e a excreção de nitrogênio urinário.

As alternativas para reduzir ou desviar a formação de metano entérico envolvem a manipulação da fermentação ruminal através do uso de dietas que propiciem uma relação acetato:propionato (C2:C3) menor, ou ação direta sobre os microorganismos metanogênicos e/ou os produtores de H₂, como protozoários, fungos e principalmente as bactérias celulolíticas.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de quatro plantas taníníferas sobre a produção de metano entérico e parâmetros ruminais *in vitro*.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Origem e coleta das plantas, caracterização química e quantificação de compostos fenólicos

Quatro leguminosas ricas em tanino condensado, *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala* (LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC) foram obtidas no “Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios – Apta Regional Centro-Sul”, Piracicaba, SP e *Cynodon x cynodon* (CYN) (controle) obtida de produtores locais. A avaliação da qualidade nutricional de todo material amostrado foi feita através de determinações químicas de acordo com a A.O.A.C (1995) e a quantidade de compostos fenólicos determinada em extratos obtidos a partir de tratamento com solução aquosa de

acetona (Makkar et al., 2000) conforme descrito no Capítulo 3, itens 3.2.2 e 3.2.3, respectivamente. A origem e os procedimentos de coleta e preparo das plantas estão descritos no Capítulo 3, item 3.2.1

4.2.2. Ensaio *in vitro* de produção

O ensaio *in vitro* de produção de gases, utilizando seringas de vidro (“Hohenheim Futter Test” - HFT) (Menke e Steingass (1988; Makkar et al., 1995a), foi realizado no Instituto de Ciências Animais da Universidade de Bonn, Alemanha para avaliar quatro leguminosas ricas em tanino, *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala* (LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC), e feno de capim tifton 86 (*Cynodon x cynodon* - CYN) como controle.

O inóculo foi preparado com a fase líquida do conteúdo ruminal de dois ovinos machos, adultos e canulados da raça Blackface e alimentados com dieta de 50 % de feno de gramínea temperada e 50 % de concentrado contendo 20% de proteína bruta, os quais nunca tiveram contado com alimentos taniníferos.

A coleta de inóculo foi realizada antes da alimentação da manhã e imediatamente transferida para garrafas térmicas para transporte ao laboratório. O material foi coado através de duas camadas de tecido de algodão e misturado à solução nutritiva na proporção 1:2. A mistura foi mantida a 39 °C e saturada com CO₂, sendo adicionada com dosador calibrado em 30 mL às seringas de vidro (100 mL). As seringas possuíam pistão lubrificado com silicone e precisão de leitura é de 0,5 mL.

Em cada seringa foram adicionados 375 mg de cada planta (tratamento) seca

e moída a 1 mm juntamente com 30 mL da mistura inóculo+solução nutritiva. As incubações foram realizadas em duas corridas com medições e coletas realizadas após 0, $t_{1/2}$ e 24 h de incubação. Triplicatas de amostras de feno padrão e de concentrado obtidas do Instituto de Nutrição Animal da Universidade de Hohenheim (Alemanha) foram incluídas em cada corrida e usadas para ajustes entre corridas.

O $t_{1/2}$, ou seja, o tempo correspondente a metade da curva assintótica de produção de gases foi calculado como $t_{1/2} = (\ln 2/c) + \text{leg}$, conforme modelo exponencial de Orskov e McDonald (1979) e determinado em ensaio prévio (capítulo 3, Tabela 3.3) em 96 h de incubação.

Foi incubado um conjunto de seis seringas para os horários 0, $t_{1/2}$ e 24 h de cada amostra e do branco (solução nutritiva + inóculo sem substrato), as quais, após leitura de gás e coleta de metano, foram retiradas da estufa e imediatamente colocadas em gelo para paralização da fermentação. Deste conjunto, duas seringas foram usadas para a determinação de nitrogênio total no resíduo e para estimativa da degradabilidade aparente da matéria seca (ADMS); outras duas, utilizadas para determinação de nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e para estimativa da degradabilidade verdadeira da matéria seca (VDMS) e massa microbiana (MM); e o conteúdo das duas últimas seringas foi congelado (-20 C) para posterior extração de DNA e aplicação nos estudos microbiológicos (Capítulo 5).

Frascos de vidro (5 mL), previamente preenchidos com gás inerte (Nitrogênio, N) e lacrados, foram utilizados para armazenamento do gás coletado durante a incubação para posterior determinação de metano.

Após a leitura do volume de gás, 0,25 μL de N foi retirado do frasco e a mesma alíquota de gás foi imediatamente retirada com seringa de vidro e injetada no frasco. Com o mesmo procedimento foi coletado gás padrão metano (100 % CH_4 , Air

Products Co.) para correção da diluição e controle de alterações de pressão e temperatura.

4.2.3. Coleta e determinação de metano

O metano foi determinado através de detector de ionização de chama (FID) em cromatógrafo gasoso SRI 8610 C (SRI Instruments, Torrance, California, USA) com injetor de entrada (modificado) de 2 mL de *loop* e carregador automático de amostra (Autosampler Gilson 222 XL Liquid Handler), além de coluna Porapak Q (4m x 2mm DI) e gás de arraste N (35 mL/min). A temperatura do forno foi fixa em 40 °C. Esta análise foi gentilmente realizada no laboratório de Nutrição de Plantas da Universidade de Bonn, Alemanha.

Os frascos de vidro para coleta de metano, foram previamente submetidos a vácuo e preenchidos com N até pressão de 1000 mBar. A pressão dos frascos foi medida anterior à injeção da amostra para conhecer o limite de abertura da válvula de entrada no cromatógrafo e também verificar se a temperatura de coleta alterou significativamente a quantidade de moléculas (n) de metano coletado. A curva padrão foi composta de seis padrões variando entre 1,7 ppm e 300 ppm (Air Products Co.) e foi repetida a cada 36 amostras. A correção das diluições das amostras foi feita de acordo com o metano padrão coletado no dia da incubação em frascos separados também preenchidos e calibrados com de gás N.

4.2.4. Degradabilidade aparente *in vitro* e determinação de nitrogênio total no resíduo

O conteúdo de duas seringas foi transferido para tubos de 70 mL com tara previamente conhecida, os quais foram submetidos a três centrifugações a 20000 x g por 20 min, intercaladas com duas lavagens do resíduo em solução salina de NaCl (4 g/L). Após a primeira centrifugação, 20 mL do sobrenadante foram armazenados em dois frascos (10 mL em cada) a -20 °C para posterior análise de AGCC e N-NH₃, respectivamente.

Ao final das lavagens, resíduo foi congelado a -20 °C e liofilizado por 24 h e a umidade restante foi removida colocando os tubos em estufa de circulação de ar a 40 °C por 3 h. Os tubos com material liofilizado foram pesados após secagem permitindo cálculo da degradabilidade aparente como: ADMS = 375 mg x % MS – (mg MS resíduo–mg MS resíduo branco 0 h) (Blümmel et al., 1997).

Em seguida, este material foi utilizado para análise de N total realizada em analisador LECO C/N (LECO Corporation, FP 328, Stand 1992, version 1.0), calibrado com padrão (EDTA). Para esta análise, foram preparadas cápsulas com papel alumínio contendo amostra do material residual com peso conhecido.

4.2.5. Determinação do nitrogênio amoniacal e ácidos graxos de cadeia curta

Para análise de nitrogênio (N) amoniacal e amônia (NH₃) o volume do sobrenadante foi descongelado a temperatura ambiente e todo o volume disponível (aproximadamente 10 mL) foi submetido à destilação à vapor pelo método de Kjeldahl. Após destilação da amostra, o material condensado foi coletado em

solução de H_2SO_4 (0,05 M) + indicador, o qual foi titulado com solução P.A. de NaOH 0,05 M. Água deionizada foi usada como branco sendo também destilada e titulada com NaOH. O número de moles de N amoniacal (ou amônia) foi determinado através do volume de NaOH usado na titulação da amostra e do branco e corrigido com fator NaOH (F_{NaOH}), calculado a cada análise ou troca de solução conforme equações descritas abaixo.

$$N\text{-NH}_3 \left(\frac{M_{\text{NaOH}}}{1000} \right) \times F_{\text{NaOH}} \times (V_{\text{NaOH branco}} - V_{\text{NaOH amostra}})$$

Onde,

M_{NaOH} = concentração molar do NaOH padrão P.A usado = 0,05 molar

F_{NaOH} = fator NaOH

$V_{\text{NaOH branco}}$ = volume de NaOH necessário para neutralizar o branco (água+indicador)

$V_{\text{NaOH amostra}}$ = volume de NaOH necessário para neutralizar a amostra

$$\text{Fator}_{\text{N}} = \frac{V_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times 2 \times M_{\text{H}_2\text{SO}_4}}{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}}}$$

Onde,

$V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = volume conhecido de H_2SO_4 padrão P.A. = 10 mL

$M_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = concentração molar do H_2SO_4 padrão P.A usado = 0,05 molar

V_{NaOH} = volume NaOH padrão P.A. necessário para neutralizar H_2SO_4 padrão

P.A.

M_{NaOH} = concentração molar do NaOH padrão P.A usado = 0,05 molar

A análise dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi realizada em cromatógrafo gasoso (CG - Perkin Elmer Auto System) com gás hélio (99% de pureza) como gás de arraste. A curva de calibração foi estabelecida com seis padrões com concentrações crescentes. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante, obtido conforme descrito no item 4.2.2.2, foi misturada em tubo de 1,5 mL a 100 µL de ácido fórmico (98-100 % P.A) e centrifugado por 10 min à 18400 x g em 25 °C (Hermili Z233MK). Após centrifugação a mistura foi transferida para tubo de vidro apropriado, os quais foram assentados em carrossel de leitura do CG. As leituras foram feitas nas amostras coletadas após 0 h, $t_{1/2}$ e 24 h e no branco 0 h. A produção de AGCC líquida (mmol/L) foi determinada subtraindo o valor de AGCC do branco em 0 h dos valores de AGCC das amostras após $t_{1/2}$ e 24 h.

4.2.6. Determinação da fibra e de nitrogênio em detergente neutro no resíduo

Para a determinação de fibra (FDN) e de nitrogênio (NIDN) em detergente neutro após $t_{1/2}$ e 24 h de incubação no resíduo da fermentação, o conteúdo da seringa foi transferido para saquinhos para análise de fibras (porosidade de 28 - 38 µm). A seringa foi lavada várias vezes com solução de detergente neutro e em seguida despejada nos saquinhos, evitando perda de material sólido. Os saquinhos foram fervidos por 1 h em solução previamente aquecida (60 – 80 °C) de detergente neutro. Em seguida repassados com água quente (100 °C) e individualmente em água corrente deionizada para retirada de todo material solúvel e restante de solução.

Os saquinhos contendo material filtrado foram congelados e em seguida liofilizados por 24 h. A umidade residual foi eliminada colocando os saquinhos em

estufa de circulação de ar a 40 °C por 3 h. Os saquinhos foram pesados após secagem e a quantidade de FDN do resíduo foi calculada como: $FDN_{\text{resíduo}} = MS_{\text{saquinho}} - \text{tara}$. A quantidade de nitrogênio aderida à fibra (NIDN) foi determinada em analisador LECO C/N conforme descrito em 4.2.2.2.

4.2.7. Estimativa da massa microbiana e degradabilidade verdadeira

A massa microbiana foi estimada considerando que a quantidade total de N em cada seringa corresponde ao N microbiano (NM), ao N aderido a FDN (NIDN) e ao N amoniacal (N-NH₃) no resíduo. Foi desconsiderando o N nos aminoácidos e peptídeos por ser muito baixo.

A produção de NM e da massa microbiana (MM) no tempo t foram calculados conforme equação descrita abaixo (Makkar, 2005; Grings et al., 2005):

Total N na seringa (antes da incubação) = NM + NIDN + N-NH₃ (após incubação)

Assim o NM e MM estimado no tempo t foi calculado como:

$$NM (g)t = N \text{ total resido } (0h) - (NIDN + N-NH_3)t$$

$$MM (g)t = NM (g)t \times 100 / \% N \text{ na fração microbiana}$$

A porcentagem de nitrogênio na fração microbiana utilizada neste cálculo foi 7,7 % de acordo com Makkar e Becker (1996) e portanto:

$$MM = NM (g) \times 100 / 7,7$$

A técnica de tratamento de resíduo com solução de detergente neutro (NDS) quando usada em resíduos de incubações de plantas taniníferas pode superestimar o valor de degradabilidade verdadeira (VDMS) (Makkar et al., 1997). Neste estudo,

VDMS foi calculado indiretamente, subtraindo a massa microbiana do resíduo aparentemente não degradado como sugerido em Makkar (2005), conforme equação abaixo. O fator de partição (FP) foi estimado pela razão entre g VDMS e a produção total de gás acumulado em cada horário:

$$\text{VDMS (g/kg)} = \frac{\text{MS}_{\text{inicial}} - (\text{Res original liq} - \text{MM})}{\text{MS}_{\text{inicial}}} \times 1000$$

$$\text{FP} = \text{VDMS/mL gas}$$

Onde,

$$\text{Res}_{\text{original liq}} \text{ (g)} = \text{Resíduo original líquido} = \text{Resíduo} - \text{Resíduo}_{\text{branco 0h}}$$

$$\text{MS}_{\text{inicial}} \text{ (g)} = \text{matéria seca inicial}$$

$$\text{MM (g)} = \text{massa microbiana}$$

4.2.8. Delineamento e análise estatística

Foi utilizado um delineamento de blocos ao acaso, com cinco tratamentos (STA, STD, LEU, MIC e o controle CYN), duas corridas (blocos), cada qual em um rotor, e duas réplicas para cada variável dependente estudada. As fontes de variação foram controladas pela análise de variância, usando o procedimento glm (PROC GLM) do software SAS (version 8.1; SAS 2001) conforme modelo:

$$Y_i = \mu + P_i + E_i, \text{ sendo:}$$

$$Y_i = \text{Variável dependente observada nos tratamentos;}$$

$$\mu = \text{Média observada em } Y_i;$$

$P_i = \text{Efeito do tratamento (} i_1 = \text{STA; } i_2 = \text{STD; } i_3 = \text{LEU; } i_4 = \text{MIC e } i_5 = \text{controle);}$

$$E_i = \text{Erro experimental aleatório associado à } Y_i, \text{ que por hipótese tem}$$

distribuição normal, com média zero e variância σ^2 .

As variáveis dependentes foram a produção total de gás, de metano emitido, a concentração de N-NH₃, de AGCC e a massa microbiana. As médias ajustadas (*lsmeans*) de cada variável dependente foram comparadas pelo teste t de Student a 5 % de probabilidade do erro.

4.3. Resultados

4.3.1. Produção de gás, produção de metano e degradabilidades

Foram encontradas diferenças em relação à produção de gases, de metano, de AGCC e de crescimento microbiano entre as plantas testadas após $t_{1/2}$ e 24 h (Tabela 4.1).

Após $t_{1/2}$, LEU e MIC apresentaram respectivamente a maior (94 mL/g MS) e a menor (82 mL/g MS) produção de gases acumulado ($P < 0,05$). O Tifton (CYN) e as duas *Stylozobium*, STD e STA, não apresentaram diferença ($P > 0,05$) e produziram em média 88 mL/g MS de gás. Em 24 h de incubação, a produção de gases acumulada variou entre 59 e 171 mL/g MS. STA produziu 93 % mais gás que em $t_{1/2}$, enquanto que em STD, LEU e CYN este aumento foi de 83, 82 e 36 %, respectivamente. A produção de gases em MIC em 24 h foi menor que em $t_{1/2}$, pois esta leguminosa atingiu a metade da curva assintótica ($t_{1/2}$) após 47 h, o que corresponde a um período superior ao $t_{1/2}$. Desta forma, o desempenho fermentativo de MIC em 24 h deve ser comparado com cuidado com as outras plantas.

Em contrapartida, a menor emissão de gás (mL) acumulado por g de VDMS

em $t_{1/2}$ foi apresentado por LEU e STA, seguida por STD e MIC ($P < 0,05$). Após 24h, STA também produziu mais gás como visto anteriormente, apresentando um valor 72 % maior que em $t_{1/2}$, enquanto LEU continuou apresentando o menor valor ($P < 0,05$) entre todas as plantas.

Table 4.1. Produção de gases, metano (CH₄), degradabilidade aparente (ADMS) e verdadeira (VDMS) da matéria seca e degradabilidade da fibra em detergente neutro (DFDN) na fermentação *in vitro* de *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala*(LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth e *Cynodon x cynodon* (CYN) em $t_{1/2}$ e 24 h.

	CYN	STA	STD	LEU	MIC	dpm1	P
mL gas/g DM							
8 h	51,2 ^b	107,5 ^a	103,5 ^a	102,2 ^a	38,9 ^b	1,69	****
$t_{1/2}$ h	87,9 ^b	87,6 ^b	87,9 ^b	93,9 ^a	81,8 ^c	1,75	****
24 h	119,2 ^c	168,7 ^a	160,7 ^b	170,6 ^a	59,5 ^d	1,21	****
mL gas/g VDMS							
$t_{1/2}$	211,2 ^a	150,3 ^c	177,3 ^b	129,2 ^d	182,0 ^b	3,80	****
24 h	264,3 ^b	278,0 ^a	252,3 ^c	227,1 ^d	143,0 ^e	2,37	****
mL CH ₄ /g MS							
$t_{1/2}$ h	16,4 ^a	13,5 ^b	14,2 ^b	13,2 ^b	13,6 ^b	0,47	****
24 h	24,1 ^c	39,1 ^a	35,3 ^b	33,1 ^b	12,3 ^d	1,09	****
mL CH ₄ /g VDMS							
$t_{1/2}$	39,5 ^a	23,0 ^c	28,8 ^b	18,2 ^d	30,7 ^b	0,97	****
24 h	53,4 ^b	64,5 ^a	55,4 ^b	44,9 ^c	27,0 ^d	2,98	****
ADMS (g/kg)							
$t_{1/2}$	301,2 ^{bc}	313,6 ^b	278,0 ^{bc}	353,7 ^a	264,7 ^c	12,12	****
24 h	296,1 ^c	487,7 ^a	439,6 ^b	502,2 ^a	173,5 ^d	14,63	****
VDMS (g/Kg)							
$t_{1/2}$	416,6 ^d	585,9 ^b	494,2 ^c	727,2 ^a	450,5 ^{cd}	18,14	****
24 h	450,7 ^c	607,4 ^b	637,5 ^b	751,3 ^a	416,4 ^c	40,29	****
DFDN (g/Kg)							
$t_{1/2}$	426,6 ^e	611,2 ^b	609,3 ^c	716,0 ^a	537,1 ^d	9,39	****
24h	469,4 ^d	722,4 ^b	706,0 ^b	778,0 ^a	496,1 ^c	8,30	****

dpm = desvio padrão da média (n = 4); Médias na mesma linha com letras diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$); P significância do modelo, sendo *** $< 0,001$; **** $< 0,0001$.

A produção acumulada de metano/g MS em $t_{1/2}$ foi reduzida em todos os tratamentos com leguminosas em relação ao controle ($P < 0,05$). A incubação de CYN resultou em 16,4 mL/g MS, enquanto LEU, STA, STD e MIC apresentaram em média 13,6 mL/g MS, representando uma redução de 17 %. Após 24 h, a produção de metano foi maior em STA e não diferiu entre STD e LEU ($P > 0,05$), que apresentaram maiores valores que CYN e MIC ($P < 0,05$). Quando expresso em CH_4 acumulado por g VDMS, LEU apresentou o menor valor seguido por STA ($P < 0,05$). STD e MIC não apresentaram diferença ($P < 0,05$) entre si e foram mais eficientes em economizar metano que CYN. Em resumo, a redução de metano expressa em mL/VDMS alcançou em média 50 % com LEU e STA e 37 % com MIC e STD. STA após 24 h apresentou a maior perda de CH_4 mL/g VDMS ($P < 0,05$).

LEU apresentou os maiores valores ($P < 0,05$) de degradabilidade aparente e verdadeira após $t_{1/2}$ (354 e 727 g/kg) e 24 h (502 and 751 g/kg); e MIC apresentou, juntamente com STD e CYN, os menores valores de ADMS em $t_{1/2}$ ($P < 0,05$). Em 24 h, a ADMS em STA foi maior que em STD ($P < 0,05$), porém essas plantas não diferiram ($P > 0,05$) quanto a VDMS, apresentando valores intermediários. A VDMS em $t_{1/2}$ foi menor em CYN e MIC e seguiu a seguinte ordem decrescente: LEU>STA>STD>MIC>CYN. O fator de partição (FP) variou entre 4,8 e 7,8 em $t_{1/2}$ e entre 3,6 e 7,0 em 24 h

4.3.2. Degradabilidade verdadeira da proteína, N amoniacal e síntese microbiana

A degradabilidade verdadeira da proteína bruta (DPB) (Tabela 4.2) em $t_{1/2}$ apresentou o maior valor quando LEU, STA e STD foram utilizadas, alcançando em

média $842 \pm 0,84$ g/kg MS, enquanto MIC (644 g/kg MS) e CYN (748 g/kg MS) apresentaram os menores valores ($P < 0,05$). Após 24 h, a DPB variou entre 632 e 942; LEU, STA e STD não apresentaram diferença ($P > 0,05$).

Em $t_{1/2}$, MIC apresentou a maior concentração de N amoniacal (mmol/L) (Tabela 4.2) juntamente com STD ($P < 0,05$), que foi seguida por STA. O controle, CYN, e LEU apresentaram o menor ($P < 0,05$) valor e não diferiram entre si ($P > 0,05$). A produção de N amoniacal em 24 h variou de 15 a 28 mmol/L, sendo que o maior valor foi obtido na incubação de STA ($P < 0,05$).

A produção líquida de amônia (NH_3) em mmol/g MS em $t_{1/2}$ (Tabela 4.2) evidenciou a maior produção de N amoniacal em STA e MIC ($P < 0,05$), os quais não diferiram estatisticamente de STD, apesar do valor 34 % menor apresentado por esta leguminosa.

A menor ($P < 0,05$) massa microbiana (MM) (Tabela 4.2) foi obtida em CYN em $t_{1/2}$ e também 24 h ($P > 0,05$). MIC e STD não apresentaram diferença ($P > 0,05$) quanto a MM total produzida em $t_{1/2}$ e 24 h, porém STD foi mais eficiente (0,218 mg/g MS) que MIC (0,185 mg/g MS) em $t_{1/2}$ e ocorrendo o inverso após 24 h. LEU apresentou a maior produção e eficiência de produção de massa microbiana nos dois horários ($P < 0,05$). Após 24 h, a massa microbiana reduziu em todas as plantas em relação à $t_{1/2}$, com exceção de MIC. A eficiência da produção microbiana variou entre 0,250 mg/g MS em LEU a 0,099 mg/g MS em CYN.

Table 4.2. Degradabilidade verdadeira da proteína bruta (DPB), amônia total (NH₃), nitrogênio amoniacal líquido (liqN-NH₃§), produção (MM) e eficiência de produção de massa microbiana (EMM) na fermentação *in vitro* de *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala*(LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth e *cynodon x cynodon* (CYN) em t_{1/2} e 24 h

	CYN	STA	STD	LEU	MIC	dpm	P
DPB (g/Kg)							
t _{1/2}	747,8 ^b	847,5 ^a	802,3 ^{ab}	875,8 ^a	644,5 ^c	30,9	***
24 h	728,0 ^b	925,8 ^a	901,3 ^a	942,0 ^a	632,3 ^c	32,8	****
Total NH₃ (mmol/L)							
t _{1/2}	15,9 ^c	18,6 ^b	19,6 ^{ab}	15,5 ^c	21,4 ^a	0,70	****
24 h	18,7 ^c	28,5 ^a	22,7 ^b	20,0 ^{bc}	15,1 ^d	1,30	****
liqN-NH₃§ (mg/g MS)							
t _{1/2}	-3,8 ^b	-7,9 ^a	-5,1 ^{ab}	-4,1 ^b	-7,1 ^a	0,81	**
24 h	-3,5 ^d	-16,4 ^a	-10,5 ^b	-6,2 ^c	-0,5 ^e	0,89	****
liqNH₃§ (mmol/g MS)							
t _{1/2}	-0,23 ^b	-0,56 ^a	-0,37 ^{ab}	-0,29 ^b	-0,51 ^a	0,06	*
24 h	-0,25 ^c	-1,17 ^a	0,75 ^b	-0,44 ^c	-0,04 ^d	0,06	****
liqNH₃§ (mmol/g DPB)							
t _{1/2}	-4,0 ^{ab}	-2,8 ^{abc}	-1,9 ^{bc}	-1,4 ^c	-4,1 ^a	0,72	*
24 h	-4,4 ^{ab}	-5,3 ^a	-3,5 ^b	-1,9 ^c	-0,3 ^d	0,31	****
MM (mg)							
t _{1/2}	40,3 ^d	96,8 ^b	76,4 ^c	129,5 ^a	64,3 ^c	5,6	****
24 h	34,9 ^b	44,2 ^b	69,4 ^a	86,6 ^a	84,5 ^a	8,8	**
EMM mg/g DM							
t _{1/2}	0,115 ^e	0,275 ^b	0,218 ^c	0,375 ^a	0,185 ^d	0,0004	****
24 h	0,099 ^e	0,126 ^d	0,198 ^c	0,250 ^a	0,244 ^b	0,0004	****
MM/AGCC§							
t _{1/2}	4,6 ^b	14,1 ^a	6,1 ^b	14,7 ^a	5,6 ^b	1,54	****
24 h	2,8 ^d	2,8 ^d	4,5 ^c	6,1 ^b	12,8 ^a	0,23	****

§NH₃ 0 branco – NH₃ t, onde t é o tempo final; §relação entre a massa microbiana (mg) e a produção total líquida de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC, mmol/L); dpm = desvio padrão da média (n = 4); Médias na mesma linha com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05); P significância do modelo, sendo *** < 0,001; **** < 0,0001.

4.3.3. Ácidos graxos de cadeia curta e relação com massa microbiana produzida

A produção de AGCC total líquido, acetato, propionato, isobutirato, n-butirato, isovalerato e n-valerato foram afetados pelos tratamentos (Tabela 4.3). Em $t_{1/2}$, MIC mostrou a maior concentração de AGCC total (mmol/L) e individualmente (acetato, propionato, iso-butirato, n-valerato e iso-valerato) ($P < 0,05$), com exceção de n-butirato. LEU, STD e CYN apresentaram valor semelhante de AGCC total líquido ($P > 0,05$), sendo superior a STA ($P < 0,05$). Quanto à eficiência de produção de AGCC (mmol líquido/g MS), STD e MIC apresentaram maior valor que LEU e CYN, enquanto STA apresentou a menor eficiência ($P < 0,05$).

Em relação à produção de acetato, STA, LEU e CYN não apresentaram diferenças significativas, apresentando o menor valor ($P < 0,05$) entre todas as plantas. STA apresentou também o menor valor de propionato e n-butirato, e juntamente com LEU teve o menor valor de n-valerato ($P < 0,05$). O menor valor de iso-butirato e iso-valerato foi apresentado por LEU e por LEU e STD, respectivamente ($P < 0,05$). A relação entre acetato e propionato (C2:C3) foi maior em STD ($P < 0,05$), seguindo a seguinte ordem decrescente: STD>STA>MIC>CYN>LEU.

Após 24h, MIC apresentou o menor valor de AGCC total e de todos ácidos individualmente ($P < 0,05$). A produção líquida de AGCC, acetato e n-valerato foram maiores em STD e STA ($P < 0,05$), e a produção de propionato em LEU, STD e STA foram similares e maiores que CYN e MIC ($P < 0,05$). Entre as leguminosas, iso-valerato e iso-butirato tiveram a mesma seqüência decrescente: STA>STD>LEU>MIC ($P < 0,05$).

A relação da massa microbiana e AGCC total líquido (MM:AGCC) em $t_{1/2}$ foi superior em LEU e STA, diferindo grandemente de STD, MIC e CYN ($P < 0,05$). Esta relação diminuiu em todas as plantas após 24 h ($P < 0,05$), exceto em MIC que, ao contrário, apresentou um valor 2,3 vezes maior que o seu valor em $t_{1/2}$. LEU alcançou em 24 h o segundo maior valor de MM:AGCC, enquanto CYN e STA apresentaram o mais baixo valor desta relação ($P < 0,05$).

Table 4.3. Concentração (mmol/L) e proporção (%mmol) de ácidos graxos total líquido^S (AGCC) e individual líquido produzidos durante a fermentação *in vitro* de *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala*(LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth e *cynodon x cynodon* (CYN) em $t_{1/2}$ e 24 h

	CYN	STA	STD	LEU	MIC	dpm	P
AGCC líquido ^S (mmol/L)							
$t_{1/2}$	29,0 ^b	25,0 ^c	31,2 ^b	29,5 ^b	38,1 ^a	1,26	***
24 h	41,7 ^c	50,7 ^{ab}	51,3 ^a	48,4 ^b	22,0 ^d	1,03	***
AGCC líquido (mmol/mg MS)							
$t_{1/2}$	0,25 ^{bc}	0,21 ^c	0,36 ^a	0,26 ^b	0,33 ^a	0,021	
24 h	0,36 ^b	0,45 ^a	0,44 ^a	0,41 ^{ab}	0,19 ^c	0,023	
Acetato $t_{1/2}$							
mmol/L	19,1 ^c	18,3 ^c	22,9 ^b	20,1 ^c	26,5 ^a	0,87	***
%mmol	65,9	73,2	73,4	68,0	69,7		
Acetato 24 h							
mmol/L	27,4 ^c	34,5 ^a	35,0 ^a	32,1 ^b	15,7 ^d	0,51	***
%mmol	65,7	68,0	68,2	66,3	71,4		
Propionato $t_{1/2}$							
mmol/L	6,5 ^c	5,1 ^d	6,0 ^c	7,3 ^b	8,1 ^a	0,26	***
%mmol	22,2	20,3	19,3	24,6	21,4		
Propionato 24 h							
mmol/L	8,7 ^b	10,1 ^a	10,4 ^a	10,9 ^a	4,9 ^c	0,24	***
%mmol	20,8	20,0	20,2	22,2	22,1		
Iso-butirato $t_{1/2}$							
mmol/L	0,26 ^{ab}	0,22 ^b	0,21 ^b	0,14 ^c	0,29 ^a	0,02	***
%mmol	0,90	0,89	0,67	0,47	0,76		

Continua....

Continuação...

		CYN	STA	STD	LEU	MIC	dpm
Iso-butirato 24 h							
mmol/L	0,53 ^b	0,73 ^a	0,59 ^b	0,48 ^c	0,04 ^d	0,03	***
%mmol	1,91	1,44	1,15	0,99	0,18		
n-butirato t _{1/2}							
mmol/L	2,4 ^a	0,8 ^d	1,4 ^c	1,5 ^{bc}	1,7 ^b	0,10	***
%mmol	8,3	3,3	4,6	5,3	4,6		
n-butirato 24 h							
mmol/L	3,5 ^a	3,1 ^a	3,6 ^a	3,4 ^a	0,7 ^b	0,25	***
%mmol	8,5	6,1	6,9	7,1	3,2		
iso-valerato t _{1/2}							
mmol/L	0,36 ^b	0,25 ^c	0,15 ^d	0,13 ^d	0,52 ^a	0,02	***
%mmol	1,3	1,0	0,5	0,4	1,4		
iso-valerato 24 h							
mmol/L	0,83 ^c	1,35 ^a	0,97 ^b	0,79 ^c	0,10 ^d	0,03	***
%mmol	2,0	2,7	1,9	1,6	0,5		
n-valerato t _{1/2}							
mmol/L	0,42 ^c	0,37 ^d	0,49 ^b	0,38 ^{cd}	0,86 ^a	0,02	***
%mmol	1,5	1,5	1,6	1,3	2,3		
n-valerato 24 h							
mmol/L	0,69 ^b	0,89 ^a	0,84 ^{(a)b}	0,70 ^b	0,58 ^c	0,02	***
%mmol	1,7	1,8	1,6	1,4	2,6		
C2:C3							
t _{1/2}	2,96 ^d	3,61 ^b	4,40 ^a	2,77 ^e	3,26 ^c	0,04	***
24 h	3,16 ^b	3,40 ^a	3,38 ^a	2,96 ^c	3,23 ^b	0,05	***

[§]AGCC_t – AGCC_{0 branco}, onde t é o tempo final; dpm = desvio padrão da média (n = 4); Médias na mesma linha com letras diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05); P significância do modelo, sendo *** < 0,001; **** < 0,0001.

4.4. Discussão

4.4.1. Partição de energia para produção total de gás

A quantidade de gás produzido em experimentos *in vitro* é a forma de medir indiretamente importantes eventos nutricionais que ocorrem no rúmen (Schofield, 2000). Entretanto, a produção de gases apresenta uma grande variação em função do substrato e das condições do rúmen, particionando a energia diferentemente para produção de ATP, massa microbiana, AGCC, calor e gases. A alta produção de gases não significa necessariamente alta eficiência de produção, pois gás ($\text{CO}_2 + \text{CH}_4$) representa perda energética pelos microrganismos e conseqüentemente para o animal hospedeiro (Moss, 1993). Portanto, para o animal é interessante que fermentação gere a máxima síntese microbiana, alta produção de ácidos graxos, especialmente propionato, com baixo custo, ou seja, com baixa perda de gás e calor.

Com a presença de taninos é esperada redução da produção de gases, da degradabilidade e da deaminação de proteína devido à complexação de proteína e outras macromoléculas em pH ruminal (Barry, 1985; Kumar e D'Mello, 1995), o que reflete em aumento da síntese microbiana (Makkar et al., 1995b).

LEU apresentou a maior produção de gases em $t_{1/2}$ e em 24 h, embora a concentração de tanino condensado tenha sido maior que STA e a mesma que em STD. Mesmo com PEG, STA e STD não alcançaram a produção de gases apresentada por LEU, mostrando que o potencial de produção de LEU foi superior principalmente que em STD. Entretanto, observou-se que a maior produção de gases em LEU não representou perda excessiva da energia, pois o volume de gás

produzido/g VDMS foi o mais baixo entre todas as plantas. Estes resultados podem ser atribuídos às características químicas mais favoráveis em LEU, como a baixa quantidade de fibras indigestíveis e alta concentração de hemicelulose, que compensaram a ação dos taninos. Estas características também explicam a maior degradabilidade aparente e verdadeira da MS, PB e de FDN encontrada em LEU em relação ao controle e as outras leguminosas.

STA teve potencial de produção levemente menor que LEU, porém nesta, a influência dos taninos foi menor que em LEU como mostrou o menor efeito de PEG em bio-ensaio discutido no Capítulo 3 (Tabela 3.2) e Longo et al. (2006) o que sugere que a principal influência na performance de STA foi a maior concentração de FDN e FDA em STA do que pelo tanino, como mostra a menor degradabilidade de FDN (DFDN). MIC e STD apresentaram maior deslocamento da energia obtida na matéria orgânica degradada para a produção de gases. As causas parecem ser: a ação bastante efetiva dos taninos, como mostrou o alto incremento de gás nestas plantas (Tabela 3.2) e a alta concentração de FDN e FDA (Tabela 3.1) que reduziram a degradabilidade aparente e verdadeira da MS, FDN e PB (Tabela 4.1), principalmente em MIC.

Neste estudo, assim como em Getachew et al.. (2000b), o fator de partição (mg VDMS/mL gás) foi acima da amplitude teórica esperada de 2,75 a 4,41 (Blümmel et al, 1997) devido a distorções na estimativa da massa microbiana por solução de detergente neutro nas plantas com tanino (Makkar et al., 1995c; Makkar et al.,1997; Getachew, et al.,2000b). Embora os valores de VDMS possam estar distorcidos, a produção de gases por g de VDMS foi coerente com os efeitos sobre a quantidade de massa microbiana produzida e a eficiência na síntese microbiana (Tabela 4.2)

4.4.2. Degradação de proteína e produção N amoniacal

Neste estudo, a produção de amônia total (Tabela 4.2) não parece ter sido prejudicada pela presença de tanino nas plantas testadas, ao contrario do observado na maioria dos experimentos com plantas taniníferas (Waghorn et al, 1987; Barry, 1985; Kumar e D’Mello, 1995; Getachew et al., 2000b). Assim surpreende, que principalmente MIC, a qual teve baixa degradabilidade da proteína, tenha apresentado alta concentração e eficiência de produção de N amoniacal. Entretanto, Perez-Maldonado e Norton (1996) mostraram que gramíneas e leguminosas contendo diferentes quantidades de tanino condensado não apresentaram diferenças na concentração de N amoniacal *in vivo* (mmol/L). Além disso, apesar do tanino ter protegido a proteína da degradação por microorganismos no rúmen, como foi demonstrado pelos autores, não houve prejuízo da síntese microbiana, digestibilidade da MO, da concentração de AGCC e suas proporções.

Na fermentação *in vitro*, como não há reciclagem ou absorção de NH₃ pelo animal, a quantidade de amônia *in vitro* é resultado do balanço entre degradação, utilização pelos microorganismos e morte bacteriana que libera amônia (Getachew et al., 2000b). Como a degradabilidade da proteína em MIC foi baixa, é possível que tenha havido baixa absorção por bactérias celulolíticas que, como ressaltou Hungate (1966), a amônia é a fonte de nitrogênio mais importante para este grupo de microorganismos. A baixa produção de massa microbiana e a baixa degradação de FDN em MIC sustentam esta hipótese.

Além disso, foram identificados por McSweeney et al. (1999) em plantas taniníferas, microrganismos altamente produtores de amônia, os *HAP*, os quais

mesmo em pequena população têm uma alta eficiência de deaminação. Como MIC teve alta produção de N amoniacal líquido em mmol/g DPB e mmol/g MS, é possível que estes microorganismos estejam atuando em MIC e compensando a baixa degradabilidade. Em resumo, os motivos para o alto acúmulo de N amoniacal apresentado por MIC apesar da baixa degradabilidade da proteína, podem estar relacionados à presença de organismo HAP ou à baixa absorção por bactérias celulolíticas.

A degradação de proteína e deaminação em plantas taniníferas estão relacionadas com a força de ligação entre o tanino e a proteína durante a complexação no rúmen, que por sua vez é influenciada pelo tanino envolvido (Makkar et al., 1995a) e seu peso molecular (Osborne e McNeill, 2001). No caso de STA houve menor quantidade de tanino condensado, reconhecido como mais complexante que o tanino hidrolisável, do que em STD e LEU, sugerindo que a maior deaminação da proteína degradada em STA tenha sido em função da baixa influência do tipo de tanino presente. LEU e STD, apresentaram a mesma quantidade de tanino condensado e não apresentaram diferença estatística na produção líquida de N amoniacal /g DPB ou /g MS, embora LEU tenha apresentado valor numericamente inferior para estes parâmetros e superior para degradabilidade da proteína do que STD.

Os maiores valores de amônia apresentados por STA, STD e LEU em 24 h do que em $t_{1/2}$, sugerem a continuidade da degradação, a qual parece não ter ocorrido em CYN e MIC. Em MIC, como foi esclarecido, 24 h é um período antes do $t_{1/2}$ e por isso o seu menor valor de amônia.

4.4.3. Partição de energia para massa microbiana e AGCC total

A relação de entre MM:AGCC são relacionadas inversamente (Hungate, 1966; Leng, 1993). Isto se justifica visto ser AGCC, assim como os gases, eliminados pelos microorganismos no processo de obtenção de ATP para seu crescimento. Quanto maior a incorporação de ATP maior será o crescimento microbiano e, por conseguinte menor AGCC e/ou gás por unidade de matéria orgânica degradada (Schofield, 2000). Entretanto, esta relação varia em função do sistema de alimentação (Leng, 1993), ou seja, quanto menor a relação entre proteína e carboidratos fermentecíveis, maior será a geração de ATP e maior a relação MM:AGCC. Neste estudo LEU e STA apresentaram similares e altos valores de MM:AGCC, o que sugere que em $t_{1/2}$ estas plantas apresentaram suficiente produção de ATP para crescimento microbiano. Portanto, pode-se inferir em termos relativos que a maior produção e eficiência de síntese microbiana com LEU e STA em $t_{1/2}$ foi devida a maior partição de energia para crescimento microbiano e a menor produção de gases/VDMS nestas leguminosas. Estes resultados corroboram com Makkar et al. (1995b), que conclui que com a adição de tanino e/ou saponina os nutrientes degradados são preferencialmente direcionados para síntese microbiana.

Após 24 h, todas as plantas, com exceção de MIC, diminuíram sua eficiência na produção microbiana, provavelmente devido a lise microbiana e exaustão de nutrientes, justificando os menores valores de MM:AGCC. Em MIC houve inversão destes valores entre $t_{1/2}$ e 24 h devido $t_{1/2}$ ser mais longo que 24 h nesta planta.

As plantas taniníferas geralmente reduzem a produção de AGCC (Makkar et al., 1995b; Salawu et al., 1997; Getachew et al., 2000a) e a digestão de celulose, mas podem aumentar a eficiência de produção microbiana (Makkar et al., 1995b).

Neste estudo, somente STA apresentou redução de AGCC total líquido e não houve alteração da concentração em LEU e STD em relação ao controle CYN. Porém MIC apresentou aumento da produção de AGCC líquido total em mmol/L.

Embora, estes resultados não sejam totalmente consistentes com os outros estudos, eles corroboram com os resultados encontrados de massa microbiana, que como foi esclarecido tem uma relação inversa com a produção de AGCC (Leng, 1993). Como STD e LEU foram semelhantes na produção de AGCC, era esperado que ambas partitionassem igualmente para produção de proteína microbiana. Entretanto STD apresentou menor produção de massa microbiana que LEU. STD foi mais “eficiente” na produção de AGCC que LEU (0,356 vs 0,257 mmol/g MS), ou seja, sua partição de energia se deslocou principalmente para produção de AGCC e gases. Os motivos para isso podem estar na alteração da composição microbiológica e/ou desvio de rota de degradação da matéria em função da menor qualidade química de STD. A menor relação MM:AGCC em STD sugere menor geração de ATP que em LEU, o que evidencia uma rota de degradação de carboidratos com maior produção de C2 e menor de C3. STD apresentou a maior relação C2:C3 o que corrobora com esta hipótese.

Semelhante efeito ocorreu com STA, a qual embora tenha apresentado menor produção de AGCC que o controle, não teve aumento da síntese microbiana na mesma proporção, mostrando um valor ligeiramente inferior que LEU. Assim, é provável que parte do material degradado em STA que não pôde ser convertido em MM foi perdido na forma de gás total e metano. Os maiores valores de gás (mL/g MS) e de metano (ml/g VDMS) em STA e STD que em LEU, sustentam estas hipóteses.

Os motivos que fizeram com que o material degradado em STA não pudesse

ser melhor aproveitado para síntese microbiana ficam ainda sem confirmação. A possível hipótese é que a diminuição ou eliminação de algum grupo de microorganismos (bactéria ou protozoário) ocorreu direta ou indiretamente através da redução de enzimas ou de fatores de crescimentos relacionados a este grupo. A alta concentração de N amoniacal, fator de crescimento de bactérias celulolíticas, principalmente de *Fibrobacter succinogenes* (Wells e Russel, 1996), e a baixa concentração de n-butirato, subproduto da degradação por protozoários, sugerem esta possível explicação. Da mesma forma ocorreu com MIC em $t_{1/2}$ ao aumentar a produção de AGCC, refletindo em menor massa microbiana.

A eficiência da síntese microbiana *in vitro* diminui com o tempo devido a exaustão dos nutrientes no meio e a lise de células microbianas (Getachew et al, 2000a). Todas as plantas, com exceção de MIC apresentaram menor produção e eficiência de síntese microbiana após 24 h em consistência com o incremento de produção de AGCC. Para MIC, como o período de 24 h ocorreu antes do $t_{1/2}$ desta leguminosa, é provável que tenha ocorrido exaustão dos nutrientes *in vitro* antes de ocorrer alcançar máxima degradação ($t_{1/2}$) que no caso de MIC ocorreu após 47 h de incubação. Com isto houve menor eficiência na síntese microbiana e possivelmente lise de microorganismos em $t_{1/2}$. O fator de partição e a relação MM:AGCC em MIC maiores em 24 h que em $t_{1/2}$ são consistentes com esta análise.

4.4.4. Ácidos graxos ramificados e n-valerato como indicadores de mudanças microbiológicas

A quantidade dos ácidos orgânicos é um reflexo das rotas bioquímicas utilizadas pelos microorganismos no processo de degradação da matéria orgânica,

do tipo de microorganismo presente e da composição química do substrato.

Os ácidos graxos de cadeia curta ramificada (AGCC ramificada), isto é, iso-butilato, iso-valerato e α -metil-butilico, estão relacionados à degradação da proteína (El-Shazly, 1952). Anison (1954) afirmou seguramente que a quantidade de AGCC ramificados depende da taxa e da extensão de degradação da proteína da dieta ou proteína microbiana e também da taxa de absorção desses ácidos pelos microorganismos celulolíticos. Se a taxa de absorção for aproximadamente constante, qualquer mínima alteração na concentração desses ácidos durante, por exemplo, um período de jejum provavelmente indica aumento da degradação de lise microbiana. Assim, alterações nas concentrações desses ácidos são importantes indicativos de mudança na complexa dinâmica microbiológica ruminal.

As baixas %mmol de AGCC ramificados, de n-butilato, n-valerato e a baixa produção líquida de N amoniacal apresentados por LEU em $t_{1/2}$ sugerem (i) baixa degradação e deaminação de proteína, (ii) redução da atividade ou populações de protozoários, (iii) alta taxa de absorção pelas bactérias celulolíticas. A hipótese (i) se baseia no fato de que a degradação de proteína por bactérias não celulolíticas e protozoários resulta em maior concentração de amônia e de iso-butilico, iso-valérico e outros ácidos graxos maiores de cadeia ramificada (El-Shalzy, 1952; Miura et al., 1980). Entretanto, alta degradabilidade da proteína, da MO e de fibras, bem como o alto crescimento microbiano apresentada por LEU, não sustentam a hipótese de baixa degradabilidade protéica.

A menor concentração de n-butilato e de metano em $t_{1/2}$ apresentada pelas leguminosas indica que todas podem ter sofrido, em diferentes graus e modos de ação redução na população ou atividade de protozoários (Whitelaw et al., 1984; Domhe et al., 1999). Porém, como entre todas as leguminosas LEU apresentou a

maior % de n-butirato é suposto que a redução de protozoários se houve, não parece ter sido o fator mais importante na redução de metano por LEU.

Os AGCC ramificada e também alguns de cadeia não ramificada, como ácido caprônico e n-valerato, são fatores de crescimento de bactérias celulolíticas e efetivos em aumentar a taxa de digestão de carboidratos e aumentar a utilização de amônia por bactérias celulolíticas (Bentley et al., 1955; Miura et al., 1980; Noftsker et al., 2003). A hipótese de que houve maior taxa de absorção de AGCC por bactérias celulolíticas em LEU é sustentada pela maior produção de massa microbiana e maior degradação de FDN obtida nesta leguminosa.

É sabido que o tanino pode inibir o crescimento de protozoários (Wang et al., 1994; Getachew et al., 2000b; Abdalla et al., 2007), o que resultará em menor concentração de AGCC ramificados e também de metano. Em STA, a produção de n-butirato foi 60% menor que o controle enquanto que as outras leguminosas apresentaram redução somente entre 38% (LEU) a 45% (STD e MIC).

A proporção dos outros ácidos se manteve sem alteração em relação ao controle, com exceção de iso-valerato, conhecido como sendo subproduto da quebra de leucina (El-Shazly, 1952; Wang et al., 1994) que foi 20 % menor. Estes resultados sugerem que houve diminuição da atividade ou da população de protozoários, e que apesar da degradação de proteínas não ter sido afetada, houve alteração do perfil fermentativo da proteína. A redução de metano por esta leguminosa pode estar ligada a este efeito. Porém mais estudos são sugeridos para confirmar essas hipóteses.

Em STD, degradação de celulose em $t_{1/2}$, embora não tão eficiente como em LEU, foi efetiva, como mostrou os altos valores de C2, C3 e n-butirato. Porém, os baixos valores de iso-butirato e iso-valerato e a baixa produção de amônia

(mmol/g MS), indicaram baixa degradação de proteína. O n-valerato é um subproduto da quebra dos aminoácidos argenina, ornitina, prolina e ácido aminovalérico e lisina (El-Shazly, 1952; Wang et al., 1994) e um dos mais importantes fatores de crescimento de bactérias celulolíticas (Bentley et al., 1955). O maior valor de n-valerato apresentado por STD que em STA e LEU, sugere a eliminação de alguma bactéria celulolítica dependente deste ácido, menor eficiência deste grupo de bactérias ou ainda a mudança no padrão de degradação de fibras de proteína por esta leguminosa.

Em contrapartida, em MIC os valores dos AGCC ramificados, de n-valerato e N amoniacal foram bastante elevados em $t_{1/2}$. A baixa degradabilidade da proteína, de matéria orgânica e de fibras nesta leguminosa são antogônicos a esses resultados. Assim, é suposto que bactérias ou grupos de bactérias dependentes destes compostos, como as bacterias celulolíticas tenham sido inibidas ou prejudicadas. É provável que tenha ocorrido lise microbiana, que eleva a produção de amônia e altera a concentração de ácidos graxos ramificados.

4.4.5. *Produção de metano: resultado das relações entre de AGCC, amônia e crescimento microbiano*

Mudanças no tamanho e composição das populações microbianas podem influenciar as quantidades relativas dos AGCC, o que terá efeito na produção e na proporção de metano (Moss, 1993). Metano e propionato são rotas através das quais o bioecossistema rúmen-microorganismo descarta o hidrogênio (Reilly, 1998), entretanto, a rota por metano representa menor eficiência energética. Neste estudo, todas as leguminosas reduziram a emissão de metano, entretanto o modo de ação e

a eficiência variaram entre as plantas. Em geral, taninos reduzem a emissão de gás e aumenta a eficiência da produção microbiana (Makkar et al., 1995b), porém, o tipo de tanino e o tamanho da molécula podem influir na afinidade com a proteína o que altera sua eficiência de complexação.

A redução de metano em STD e MIC não foi tão eficiente como em STA e LEU. A menor produção de metano/g VDMS e a maior relação C3:C2 em LEU após $t_{1/2}$ estão de acordo com a maior eficiência da síntese microbiana em $t_{1/2}$.

O tanino também tem demonstrado ter efeito anti-protozoário o que aumenta a eficiência na síntese de proteína microbiana (Wang et al., 1994; Makkar et al., 1995b; Abdalla et al., 2007) reduzindo metano. Assim, baseando-se nos resultados de metano, AGCC totais, AGCC ramificados e N amoniacal é suposto ter havido redução da população ou atividade de protozoários em todas as plantas, porém esta redução foi menor em LEU. Para esta leguminosa, a redução de metano está relacionada com a maior eficiência e crescimento bactérias celulolíticas e o desvio da rota para produção de C3. No entanto, a redução metano em STA parece ter sido devida redução da população ou atividade de protozoários e a mudança de rota de degradação. Em STD e MIC embora ambas tenham reduzido metano, elas foram menos eficientes na partição de energia, o que aumentou gás e conseqüentemente a perda por metano, através da alteração da rota de degradação de fibras e proteína e/ou diminuição de grupo de bactérias celulolíticas.

4.5. Conclusão

Embora todas as plantas reduzissem metano, somente LEU e STA demonstraram ser capazes de contribuir com maior produção animal com maior

eficiência.

Em todas as leguminosas houve redução da emissão de metano, porém a proporção dos outros parâmetros ruminais (degradabilidade, produção de amônia, massa microbiana e de AGCC) sugeriram que houve alteração das rotas de fermentação e que essas rotas diferiram em função da planta e de suas características químicas e físicas. A maior produção de gases e de metano em STD e MIC em $t_{1/2}$ evidenciaram que as rotas escolhidas para degradação da matéria orgânica foram menos eficientes que em STA e principalmente em LEU.

5. Influência de plantas taniníferas na população de *Fibrobacter succinogenes* e metanogênicas ruminais *in vitro*.

Resumo

A degradação de alimentos no rúmen envolve populações de microorganismos diferentes que estão intimamente relacionados e influenciados pelo processo de transferência de hidrogênio entre espécies. A literatura tem mostrado que o tanino condensado tem capacidade bacteriostática e/ou efeito bactericida. O objetivo deste estudo foi investigar a influência de plantas tropicais ricas em tanino sobre as populações de *Fibrobacter succinogenes* e de metanogênicas. A técnica *in vitro* de produção de gases (“Hohenheim Gas Test” - HFT) incubadas com plantas ricas em tanino: *Stylobium aterrimum* (STA), *Stylobium deeringianum* (STD); *Leucaena leucocephala*(LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC) e *Cynodon x cynodon* (CYN), como controle, foi utilizada para prover material da comunidade ruminal obtido no tempo para obtenção da metade da produção de gases ($t_{1/2}$) e após 24 h de incubação. O conteúdo de tanino condensado (TC) das plantas foi 20, 64, 56, 105 e 0,2 g/kg matéria seca (MS), respectivamente, para STA, STD, LEU, MIC e CYN. DNA extraído do conteúdo das seringas foi usado como “template”. A quantificação de *Archaea* metanogênicas e *Fibrobacter succinogenes* em relação às bactérias totais do rúmen foi realizada através da reação em cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). Além disso, foi investigada a comunidade de metanogênicas através da técnica “DGGE” (denaturing gradient gel electrophoresis) de genes 16S rRNA amplificados em reação de PCR comum. metanogênicas no tempo $t_{1/2}$ foram 2,0 e 0,9 vezes menor com STA e LEU quando comparadas com o controle, porém apresentaram aumento de 2,5 e 0,5 vezes com MIC e STD. A população de *F. succinogenes* foi 2,3 e 1,8 vezes menor que o controle quando LEU e STA foram incubadas. Embora MIC apresentasse o mais alto valor de TC e STD, o mesmo valor de LEU, a redução da população *F. succinogenes* com MIC e STD foi somente 0,14 e 0,23 vez menor que o controle. A análise de DGGE da população de metanogênicas resultou em padrões de distribuição de bandas diferentes. CYN

apresentou algumas bandas com maior intensidade as quais se tornaram mais fracas com os tratamentos. Algumas bandas ficaram mais fracas, especialmente em MIC e STD, mas não em STA e LEU. MIC parece ter aumentado o número de bandas fracas. As plantas ricas em tanino afetaram negativamente a população de *Fibrobacter succinogenes* e causaram mudanças na estrutura da comunidade de metanogênicas.

Palavras chaves: taninos, microorganismos, metanogênicas, PCR, DGGE, rúmen

Influence of tanniferous plants on rumen *Fibrobacter succinogenes* population and methanogens and *in vitro*

Abstract

Feed degradation in the rumen involves different microorganism populations, which are closely interrelated and influenced by the interspecies hydrogen transfer process. Literature has showed that condensed tannin has a bacteriostatic and/or bactericidal effect. The aim of this study was to investigate the influence of tropical tanniferous plants on *Fibrobacter succinogenes* and methanogen populations. The *in vitro* gas production technique (Hohenheim Gas Test), incubated with four different tannin-rich plants: *Stylobium aterrimum* (STA), *Stylobium deeringianum* (STD); *Leucaena leucocephala* (LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth (MIC) and *Cynodon x cynodon* (CYN) as control, was used to provide ruminal community material, obtained at $t_{1/2}$ (time of half maximal gas production) and 24 h after incubation. The condensed tannin (CT) content of the plants was 20, 64, 56, 105 and 0,2 g/kg dry matter (DM), respectively for STA, STD, LEU, MIC and CYN. DNA was extracted from syringes contents and used as templates. Quantification of methanogenic *Archaea* and *Fibrobacter succinogenes* in relation to total rumen bacteria was performed by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Additionally, the methanogenic community

was investigated using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rRNA genes amplified in normal PCR. Methanogens at $t_{1/2}$ were 2.0 and 0.9 fold lower with STA and LEU compared to the control, but they increase in 2.5 and 0.5 fold higher with MIC and STD. *F. succinogenes* population was 2.3 and 1.8 fold lower than the control when LEU and STA was applied. Although MIC presented the highest CT and STD had as much CT as LEU, the reduction of *F. succinogenes* population with MIC e STD was only 0.14 and 0.23 fold lower to the control. DGGE analysis of the methanogenic population resulted in different band patterns. CYN presented some strong bands, which became weaker in the tested treatments. Some bands became weaker, especially in MIC e STD, but not in STA e LEU. MIC seemed to increase the number of weak bands. The tannin-rich plants negatively affected *Fibrobacter succinogenes* population and caused changes in the structure of the methanogenic community.

Keywords: tannins, microorganisms, methanogens, PCR, DGGE, rumen

5.1. Introdução

A comunidade microbiana presente no rúmen e em outros compartimentos do animal ruminante envolve organismo do domínio *Archaeobacteria*, *Eubacteria* e *Eucaria*, a qual existe em relação de mutualismo com o animal hospedeiro. O domínio Archaea em geral é representado por organismos procariotos que vivem em ambientes extremos, da qual fazem parte as metanogênicas. Os representantes do domínio Bacteria são representados por bactérias e do domínio Eucaria são todos os eucariotos, incluindo os fungos, protoctistas (protozoários e algas), vegetais e animais. Estes organismos estão presentes no rúmen em alta densidade, diversidade e complexidade de relações.

A degradação de fibras envolve em um primeiro momento fungos, protozoários ciliados e bactérias celulolíticas (Joblin et al., 2002), gerando compostos indesejáveis tanto para os microorganismos como para o animal, como o nitrato (NO_3), gás carbônico (CO_2), metano (CH_4) e hidrogênio (H) (Church, 1993; Schofield, 2000). A metanogênese é um processo de perda de energia realizada pelos organismos metanogênicos, porém indispensável para garantir o adequado pH ruminal. Assim, a simples inibição deste processo não garante melhoria na eficiência energética do animal, pois é necessário redirecionar o H resultante para outros sumidouros que não o metano, como por exemplo, propionato (C_3)

As alternativas para reduzir ou desviar a formação de metano entérico envolvem a manipulação da fermentação ruminal através de dois meios: (i) o uso de dietas que propiciem uma relação acetato:propionato ($\text{C}_2:\text{C}_3$) menor e (ii) uma ação direta sobre os microorganismos metanogênicos e/ou os produtores de H_2 , como protozoários, fungos e principalmente as bactérias celulolíticas.

Fibrobacter succinogenes é a bactéria fibrolítica mais abundante no rúmen (Lin et al., 1997; McSweeney et al., 2001a, 2001b) que não produz hidrogênio, mas succinato e formato como produtos finais de degradação e é essencial para produção indireta de propionato. A degradação de celulose por *F. succinogenes* segue diferente modo de ação do que as bactérias *Ruminococci* (*Ruminococcus flavefaciens* e *R. albus*), outro importante grupo de bactérias celulolíticas. As *F. succinogenes* agem sobre a parede celular do alimento produzindo acetato e succinato em seqüências acopladas. Como a atividade da enzima hidrogenase não é sensível à tensão provocada pelo acúmulo de hidrogênio. *F. succinogenes* não vive em relação sintrófica com as metanogênicas, ou seja, esta celulolítica não é afetada pela presença de metanogênicas como são as *Ruminococcus albus* e *R. flavefaciens*. Entretanto, as metanogênicas podem se beneficiar do H disponibilizado por outras relações de transferência interespecie de H nas quais *F. succinogenes* pode estar envolvida (Reilly, 1998).

Plantas ricas em taninos demonstraram efeito na redução da emissão de metano entérico (Woodward et al., 1999; Waghorn, 2002), entretanto sua ação complexante, bacteriostática ou bactericida (Getachew et al., 2000a) ainda é pouco conhecida. Vários estudos têm relatado redução das populações de bactérias celulolíticas com a ação dos taninos sendo a *Fibrobacter succinogenes* a principal bactéria afetada (Singleton, 1981; Nelson et al., 1997; McSweeney et al., 2001a).

Segundo Getachew et al. (2000a), os taninos têm também efeito antilítico, ou seja, diminui a atividade das enzimas responsáveis pela expansão da parede celular do microorganismo (Wells e Russel, 1996), inibindo seu desenvolvimento. O tanino condensado também inibe a atividade de enzimas por ação complexante, como as endoglucases (Bae et al., 1993, Guimarães-Beelen et al., 2006a; McSweeney et al.,

2001a, 2001b).

Os taninos também podem, ao reduzir ou inibir a atividade de uma população dominante, favorecer outro grupo de microrganismos menos dominante. McSweeney et al. (2001a) reportou que o uso de 30 % da taninífera *Calyandra callothursus* em dietas de ovinos reduziu a população de *Ruminococcus spp* e *Fibrobacter succinogenes* enquanto que o grupo *Bacteroides-Porphyromonas-Provotella*, que inclui várias bactérias proteolíticas, não apresentou alteração significativa. Com o uso de PEG, houve aumento significativo apenas de *Ruminococcus spp* e o grupo *Bacteroides-Porphyromonas-Provotella* diminuiu a abundância da sua população. Os autores concluíram que a redução da população celulolítica com ação dos taninos pode ter permitido às populações de proteolíticas competirem mais efetivamente por nutrientes. Assim, é possível que os grupos de organismos beneficiados com ação dos taninos sejam os do tipo que produzem menos H ou que direcionem o H para outros sumidouros, como succinato, propionato ou butirato.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de plantas taniníferas na população de *Fibrobacter succinogenes* e metanogênicas do rúmen.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Origem e coleta das plantas, caracterização química e quantificação de compostos fenólicos

Quatro leguminosas ricas em tanino condensado, *Stylobium aterrimum* L

(STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala*(LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* (MIC) foram obtidas no “Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios – Apta Regional Centro-Sul”, Piracicaba, SP e *Cynodon x cynodon* (CYN) (controle) obtida de produtores locais. A avaliação da qualidade nutricional de todo material amostrado foi feita através de determinações químicas de acordo com a A.O.A.C (1995) e a quantidade de compostos fenólicos determinada em extratos obtidos a partir de tratamento com solução aquosa de acetona (Makkar et al., 2000) conforme descrito no Capítulo 3, itens 3.2.2 e 3.2.3, respectivamente. A origem e os procedimentos de coleta e preparo das plantas estão descritos no Capítulo 3, item 3.2.1.

5.2.2. Ensaio *in vitro* com plantas selecionadas

Os ensaios *in vitro* de produção de gases foram conduzidos Instituto de Ciências Animais da Universidade de Bonn, Alemanha, de acordo com Menke e Steingass (1988), utilizando amostras da planta controle (CYN) e das quatro leguminosas, *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala*(LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* (MIC), conforme descrito no item 4.2.2 do Capítulo 4.

5.2.3. Avaliação e quantificação microbiana

Um estudo microbiológico foi realizado no Centro de Pesquisas de Juelich, Alemanha, utilizando técnicas biomoleculares para quantificação das populações de

Fibrobacter succinogenes e metanogênicas do rúmen de ovinos. O DNA foi extraído do conteúdo das seringas provenientes do ensaio *in vitro* de produção de gases coletado após $t_{1/2}$ e 24 h e congelado a -20°C , conforme descrito no Capítulo 4, item 4.2.2.

A quantificação de organismos metanogênicos e de *Fibrobacter succinogenes* foi estimada através da ampliação de seqüências de gene 16S rRNA com “primer” específico pela técnica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR quantitativo - qPCR). Para a análise da composição da comunidade metanogênica foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de gradiente denaturante (DGGE).

As condições específicas do PCR, tais como temperatura de anelamento, número de ciclos, concentração de DNA, quantidade de primers, composição dos reagentes da reação, e do DGGE, como a concentração e o gradiente do agente denaturante, foram determinados em testes preliminares.

5.2.3.1. *Extração de DNA das amostras de conteúdo ruminal in vitro após $t_{1/2}$ e 24h de incubação*

As seringas destinadas ao estudo microbiológico após 0 h, $t_{1/2}$ e 24 h de incubação tiveram a fermentação interrompida com imersão em gelo e o conteúdo transferido para recipiente com tampa. Após homogeneização, uma alíquota de 10 mL foi coletada e transferida para um tubo devidamente identificado, sendo imediatamente congelado a -20°C . Todo o material utilizado neste procedimento foi previamente autoclavado.

Para a extração de DNA foram seguidas as recomendações descritas em Yu e Foster, (2005). O conteúdo das seringas foi descongelado e uma alíquota de 1,5

mL foi transferido para micro tubos (2 mL) contendo 0,25 g de esferas de Zircônio e uma esfera de cerâmica (0,25 ") e centrifugado por 5 min a 14000 x g para quebra da parede celular. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" re-suspendido com 1000 µL de solução tamponante, 100 µL de solução de acetato de potássio e 100 µL de água Milli-Q autoclavada. Como os tratamentos continham compostos fenólicos, 25 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP, Sigma Chemical) foi também adicionado como agente complexante destes compostos.

Em seguida, as amostras foram congeladas a -80 °C por 15 minutos e descongeladas em água corrente. Cada tubo foi vigorosamente agitado em agitador mecânico por 2 min. Este processo foi repetido mais uma vez e ao final os tubos foram centrifugados a 4 °C por 15 min a 14000 x g. Uma alíquota de 300 µL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo e foi adicionada 600 µL de solução complexante ("glassmilk"). Os tubos foram agitados por 5 min em mesa agitadora para tubos, intercalando com inversão manual a cada minuto. Ao final, os tubos foram centrifugados a 10000 x g por 1 min e o sobrenadante descartado cuidadosamente.

Foram adicionados ao "pellet", 500 µL de solução de etanol frio para lavagem, agitando em seguidas os tubos vigorosamente para re-suspender o "pellet". Os tubos foram novamente centrifugados a 10000 x g por 1 min e o sobrenadante, cuidadosamente, descartado. Nova centrifugação a 10000 x g por 20 s foi realizada para remover o etanol residual.

Finalmente, foi adicionado 110 µL de água Milli-Q autoclavada e os tubos agitados por 1 min a 10000 x g. Uma alíquota de 80 µL do sobrenadante foi transferida para novos tubos, devidamente identificados, e congelada para ser usada como "template" (substrato) para as reações de PCR.

O material obtido foi concentrado e purificado utilizando reagentes para limpeza de DNA, Wizard® DNA Clean up System em minicolunas (Promega Co., Madison, EUA) seguindo protocolo do fabricante.

Finalmente, a qualidade da extração, pureza e a quantidade de DNA na solução obtida foram avaliadas através da razão entre a absorbância A260 e A280 em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000.

5.2.3.2. *Real time PCR para metanogênicas e Fibrobacter succinogens*

Para amplificação de seguimentos de DNA através da reação qPCR foram utilizados os “primers”: forward 5'-GTT CGG AAT TAC TGG GCG TAA A-3' e reverse 5'- CGC CTG CCC CTG AAC TAT C-3' para *Fibrobacter succinogens*; e os “primers”: forward 5'- TTC GGT GGA TCD CAR AGR GC-3' e reverse 5'- GBA RGT CGW AWC CGT AGA ATC C-3' para metanogênicas (MWG Biotech, Ebersberg, Alemanha), sendo diluídos conforme recomendações do fabricante.

A reação de qPCR foi realizada em ciclador térmico da Bio-Rad iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) usando 12,5 µL de solução de reação (IQ™ Sybr® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, CA, USA), 1 µL de cada par do “primer” específico (10 pmol/µL), 8 µL de água Milli-Q e 2,5 µL de “template” (DNA original) diluído 1:10. As condições do ciclador foram: um ciclo a 50 °C por 2 min e 95 °C por 2 min para desnaturação inicial, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min para anelacção e alongação do produto. A análise de dissociação do PCR para verificação da especificidade dos DNAs gerados pela reação (amplicons) foi feita elevando a temperatura a 95 °C por 2 min seguido por 60 °C durante 15 s. A detecção da fluorescência ocorreu no final das etapas de desnaturação e extensão (Denman e

McSweeney, 2005).

Durante a fase exponencial da reação de PCR, o ciclo no qual a fluorescência acima do background é considerada detectável é conhecido por Ct (cycle threshold), o qual é utilizado para quantificação da amplificação gênica (Denman e McSweeney, 2005). Neste estudo, foi utilizada a variação do Ct (Δ Ct) para estimativa da alteração populacional de *Fibrobacter succinogenes* ou metanogênicas sob influência dos tratamentos, o qual foi calculado pela diferença dos valores observados de Ct entre o gene objetivo (*F. succinogenes* ou metanogênicas) e um gene referência (normalizador):

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{(\text{gene objetivo})} - \text{Ct}_{(\text{gene referência})}$$

Dentro da área de ecologia microbiana de rúmen seqüências de gene 16S rRNA têm sido utilizadas como gene referência para esta quantificação (Denman e McSweeney, 2005). Assim, todos os resultados de qPCR foram normalizados com os resultados obtidos da reação de qPCR com “primer” para bactéria geral (forward 5'-CGG CAA CGA GCG CAA CCC-3' e reverse 5-CCA TTG TAG CAC GTG TGT AGC C-3').

Os dados obtidos foram calculados e interpretados pelo método de $\Delta\Delta$ Ct, no qual a alteração na população de *F. succinogenes* e metanogênicas após $t_{1/2}$ e 24 h foi expressa comparando-se o Δ Ct sob influência da planta controle (CYN) com o Δ Ct sob influência dos tratamentos (leguminosas):

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{Ct}(\text{control}) - \Delta\text{Ct}(\text{tratamentos})$$

5.2.3.3. “Nested” PCR para metanogênicas

Alíquotas de 1 µL de “template” foram usadas para a amplificação de seqüências de 16S rDNA em “nested” PCR com volume total de reação de 50 µL, contendo 2,5 µL dNTPs (2 mM cada, ATP, TTP, GTP, CTP), 5,0 µL de cada par dos “primers” (MWG Biotech, Ebersberg, Alemanha), 5,0 µL de solução tampão (10x), 5,0 µL MgCl₂ (25 mM), 2,0 µL BSA (10 mg/mL; BioLabs Inc., New England), 0,6 µL Taq DNA polimerase e 23,9 µL de água Milli-Q (Millipore, Eschborn, Alemanha).

Os “primers” 348aF (5' TCC AGG CCC TAC GGG-3') e 915aR (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3') foram usados neste primeiro PCR por terem sido aplicados para seqüenciar 16S rDNA do grupo *Archaea* (Watanabe et al., 2004) entre o nucleotídeo 348 e 915 de acordo com a numeração da *Escherichia coli*. O PCR iniciou com 94 °C por 10 min e foi conduzido em 40 ciclos, cada ciclo consistindo de: 1 min a 61 °C e 2 min a 72 °C. A extensão final ocorreu a 72 °C e durou 8 min.

A presença de produtos da reação foi observada através de eletroforese em gel de agarose (2 %) em 100 V por 60 min sob solução tamponante de TAE (2 %) (Tris-acetate-ethylenediaminetetraacetic acid) e aplicação direta de 2,5 µl de solução de brometo de etila (10 mg/mL).

As bandas foram cuidadosamente cortadas e processadas com solução de extração de DNA em gel (QIAex II - Qiagen, Hilden, Alemanha). Alíquotas de 2 µL da solução final foram utilizadas como “template” no segundo PCR, o qual continha os mesmos reagentes e quantidades do PCR anterior além de 23,0 µL de água Milli-Q e 5 µL dos “primers” específicos para 16S rDNA de *Archaea* metanogênica 357aF-GC (5' -CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC CTA CGG GGC GCA GCA G- 3') e 691R (5' -GGA TTA CA6 GAT TTC AC-

3'). Estes "primers" foram delineados (Watanabe et al., 2004) por modificação dos "primers" PARCH 340f (Øvreas et al., 1997) e 0690aR (Achenbach e Woese ** citado por Watanabe et al., 2004), respectivamente.

As condições de amplificação foram 94° C por 10 min, 35 ciclos de 94° C por 1 min, 58° C por 1 min e 72° C por 2 min e extensão final a 72 °C for 8 min. A presença dos produtos do PCR foi confirmada em eletroforese em gel de agarose (2 %) nas mesmas condições anteriores. Todas as reações de PCR foram acompanhadas de um controle positivo com *Methanothermobacter thermoautotrophicus* e do controle negativo (reagentes sem "template").

Os produtos finais de PCR foram, em seguida, purificados com reagentes apropriados (QIAquick PCR Purification, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) para micro-centrífuga, seguindo protocolo do fabricante. Este material foi posteriormente aplicado em DGGE para estudo das possíveis variações na comunidade metanogênica.

5.2.3.4. *Efeito sobre a comunidade metanogênica*

O método de eletroforese em gel de gradiente denaturante ("denaturing gradient gel electrophoresis" – DGGE) tem por princípio básico a desnaturação das pontes de hidrogênio existentes entre as duas fitas de DNA através das bases purinas, adenina (A) e guanina (G) e das bases pirimidinas, tiamina (T) e citosina (C). Como a adenina se liga a tiamina por duas ligações de pontes de H, enquanto que entre a citosina e guanina ocorrem três ligações, as regiões de DNA ricas de C e

** ACHENBACH, L.; WOESE, C. 16S and 23S rRNA –like primers. In: SOWERS, K. R.; SCHREIBER, H. J. (Ed.). Archaea. A laboratory manual. Methanogens. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1995. p. 521-523.

G tornam se mais resistentes à desnaturação. O gradiente de desnaturação em um gel de DGGE aumenta de cima para baixo, ou seja, o maior gradiente de desnaturação ocorre no final do gel. Desta forma os organismos que contém menor quantidade de regiões de C e G denaturam rapidamente e paralisam no início do gel, enquanto que organismos ricos em C e G só são paralisados mais ao final. Com isso é possível separar populações de organismos amplificados com os mesmos “primers” presentes em uma única banda da reação de PCR (Fisher e Lerman, 1979).

O DGGE foi realizado no sistema DCode “Universal Mutation Detection System” (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando gels de poliacrilamida (6% [m/v] acrilamida, 0,1% [m/v] persulfato de amônio, 0,1% [v/v] TEMED [N, N, N', N' tetrametil-etilenodiamina], em solução tampão 1 X TAE [tris acetato EDTA; Bio-Rad]) com gradientes denaturante de 40 a 60 %. O 100 % denaturante corresponde a 7 M de uréia e 40 % de formamida (CH_3NO) (m/v) em solução tampão TAE a 60 °C e voltagem constante de 60 V por 16 h. As bandas de DNA foram reveladas através de coloração de prata como descrito em Meyer et al. (1991).

Os produtos do “nested” PCR purificados foram aplicados no DGGE contendo o agente tamponante e fixador de banda, bromofenol azul, na proporção de 5:1 do produto de PCR e fixador. Como a concentração de fragmentos de DNA dos produtos de PCR (“nested” PCR) variaram entre 20 e 70 ng/ μL , a concentração dos produtos de DNA foi corrigida antes da aplicação no DGGE com o objetivo injetar entre 280 a 300 ng por aplicação.

O gel foi escaneado (DUO Scan f 40, Agfa) e as imagens analisadas utilizando o software GelCompar II (Bio-Rad, Hercules, USA), no qual as bandas foram devidamente inspecionadas quanto à quantidade e intensidade. A intensidade

do background foi subtraído selecionando o tamanho do disco rolator em 5. A posição e o pico de intensidade de cada banda relativa a intensidade cumulativa de todas as bandas para cada linha do gel (amostra) foram calculados e somente bandas acima de 1 % foram consideradas na análise.

O método estatístico de análise de “cluster” utilizando o coeficiente de similaridade de Sorense-Dice e Pearson foi escolhido para verificação de similaridade dos tratamentos após $t_{1/2}$ e 24 h sobre a comunidade metanogênica (Compaq II). As matrizes de similaridade obtidas foram aplicadas em dendograma UPGMA (“Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages”).

Os índices de diversidade escolhidos para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a comunidade metanogênica foram o Shannon-Weimer Index (H), o Eveness (E) e o número total de espécies (S). H representa a abundância e similaridade das espécies presentes, o qual foi calculado com a proporção (p_i) das espécies i em relação ao número total de espécies.

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

Sendo S o número de espécies (“Richness”), o índice de similaridade E foi calculado dividindo H por H_{\max} ($H_{\max} = \ln S$) o qual possui variação entre 0 e 1, sendo 1 a completa similaridade.

$$E_f = H / H_{\max} = H / \ln S$$

5.2.4. Delineamento e análise estatística

Para avaliação dos índices de diversidade, H, S e E, foi realizado um delineamento de blocos ao acaso, com cinco tratamentos (STA, STD, LEU, MIC e o controle CYN), duas corridas de gel (blocos) e duas linhas para cada tratamento em cada gel. As fontes de variação foram controladas pela análise de variância, usando o procedimento GLM (PROC GLM) do software SAS (version 8.1; SAS 2001) conforme modelo:

$$Y_i = \mu + P_i + E_i, \text{ sendo:}$$

Y_i = Variável dependente observada nos tratamentos;

μ = Média observada em Y_i ;

P_i = Efeito do tratamento ($i_1 = \text{STA}$; $i_2 = \text{STD}$; $i_3 = \text{LEU}$; $i_4 = \text{MIC}$ e $i_5 = \text{controle}$);

E_i = Erro experimental aleatório associado à Y_i , que por hipótese tem distribuição normal, com média zero e variância σ^2 .

As variáveis dependentes foram H, S e E, cujas médias ajustadas (lsmeans) e comparadas pelo teste t de Student a 5 % de probabilidade do erro.

Para interpretação dos resultados de qPCR o valor de $\Delta\Delta Ct$ das repetições foi estimado por mediana devido a alta variabilidade encontrada quando analisado pela média.

5.3. Resultados do qPCR

A incubação das leguminosas estudadas resultou em diminuição da abundância relativa da população de *Fibrobacter succinogenes* em relação ao controle CYN após $t_{1/2}$ (Figura 5.1a). A maior redução foi promovida por LEU e STA que apresentaram valor de $\Delta\Delta CT$ 2,34 e 1,84 vezes menor, respectivamente, que o

controle CYN. MIC e STD reduziram a população de *F. succinogenes* em 0,14 e 0,23 vez em relação à população original em CYN. A incubação de todas as leguminosas após 24 h causou redução de *F. succinogenes*, variando entre 0,45 em STD e 2,07 em MIC em relação ao controle, como mostra a Figura 5.1b.

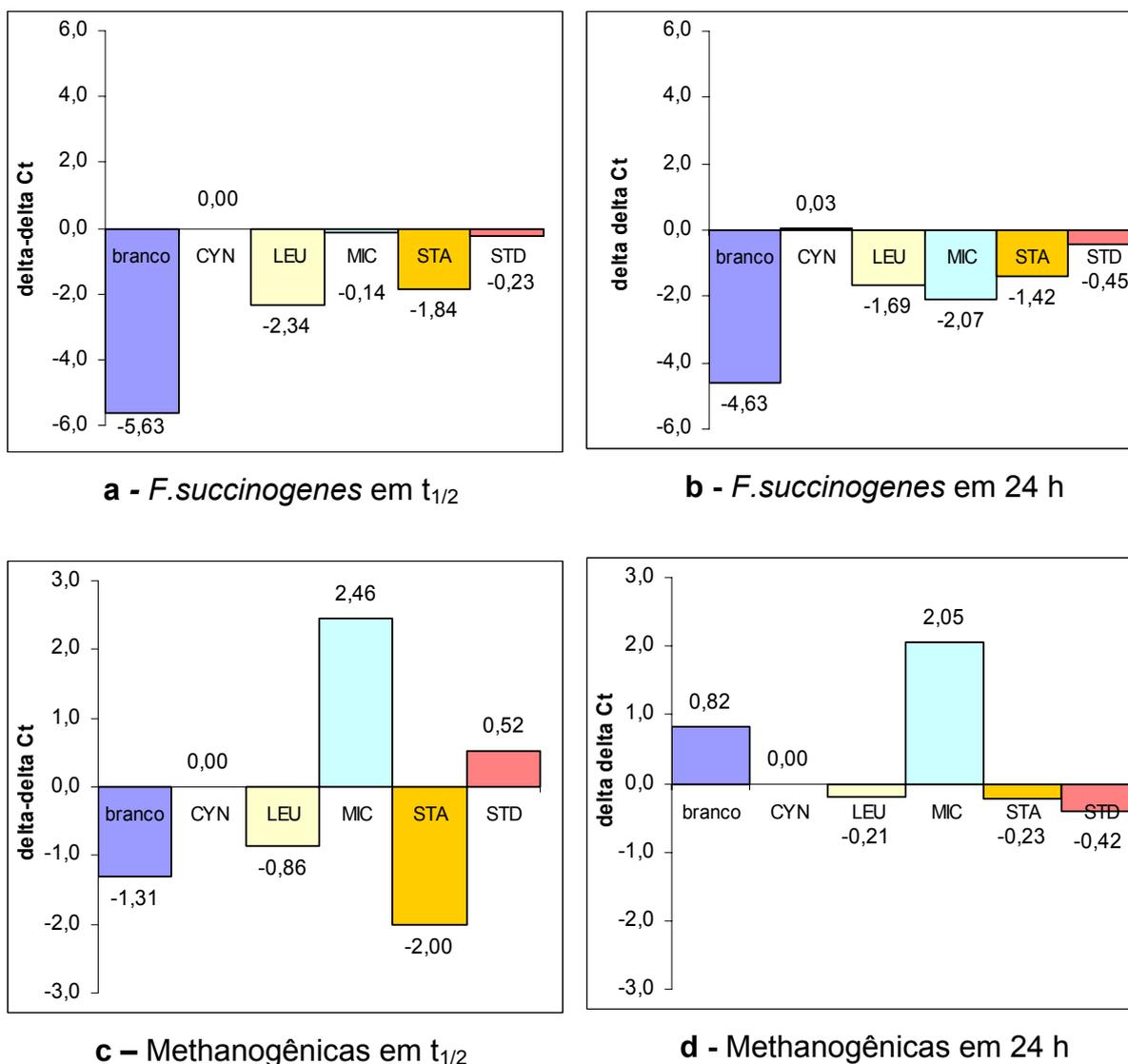


Figura 5.1 - Avaliação do crescimento microbiano relativo da população de *Fibrobacter succinogenes* (a) e metanogênicas (c) em $t_{1/2}$ e em 24 h (d e e, respectivamente) sob efeito dos tratamentos* baseado na variação no número de “Cycles Threshold” ($\Delta\Delta$ Ct), normalizado pela população de bactérias totais, entre as leguminosas e o controle. *CYN = Cynodon x cynodon (controle); STA = *Stylobium aterrimum* L, STD = *Stylobium deeringianum*; LEU = *Leucaena leucocephala*, MIC = *Mimosa caesalpiniaefolia*)

A população de metanogênicas também sofreu redução em $t_{1/2}$, mas somente em LEU e STA (Figura 5.1c). Comparado com CYN, a população de metanogênicas foi reduzida em 0,86 vez quando LEU foi utilizada e 2,00 vezes com STA. Em contrapartida, a incubação de MIC e STD causou aumento da abundância relativa da população de metanogênicas em 2,5 e 0,5 vezes, respectivamente. Após 24 h, somente MIC apresentou aumento de população de metanogênicas, ao contrário das outras leguminosas que diminuíram em 0,21 a 0,42 vez a população original (Figura 5.1d).

5.4. Resultados do DGGE

Os pares de “primers” 348aF e 915aR utilizados no primeiro PCR resultaram em boa amplificação dos fragmentos de 16S rDNA das populações de metanogênicas que resultaram em bandas com tamanho aproximado de 550 bp (“base pair”). Após corte das bandas e extração do DNA do gel de agarose, a re-ampliação utilizando os “primers” 357F-GC e 691R pelo segundo PCR resultaram em bandas com aproximadamente 200-250 bp. O gel na Figura 5.2 e 5.3 ilustram a separação por DGGE da comunidade metanogênica dos produtos finais do “nested” PCR após no $t_{1/2}$ e 24 h, respectivamente.

Os resultados obtidos na análise de “cluster” dos tratamentos não apresentaram similaridades em relação aos tratamentos em $t_{1/2}$ e 24 h. Os índices de diversidade H, S e E não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) em $t_{1/2}$ e 24 h, sugerindo que a diversidade de metanogênicas foi preservada em qualquer tratamento (Tabela 5.1).

Table 5.1 - Índices de diversidade Shannon-Weiner Index (H), número total de bandas (S) e Evenness (E) calculados em relação à comunidade metanogênica sob ação das leguminosas: *Stylobium aterrimum* L (STA), *Stylobium deeringianum* (STD), *Leucaena leucocephala* (LEU), *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Cynodon x cynodon* (CYN) após $t_{1/2}$ e 24 h.

	Branco	CYN	STA	STD	LEU	MIC	dpm1	P
Shannon-Weiner (H)								
$t_{1/2}$	1,96	1,88	1,77	1,93	1,93	1,77	0,088	ns
24 h	1,70	1,56	1,78	1,73	1,72	1,73	0,139	ns
Total de bandas (S)								
$t_{1/2}$	14,36	14,63	13,52	15,50	14,63	13,37	1,11	ns
24 h	9,70	9,50	10,75	9,75	10,63	11,00	0,88	ns
Evenness (E)								
$t_{1/2}$ h	0,75	0,70	0,68	0,70	0,72	0,69	0,024	ns
24 h	0,75	0,70	0,76	0,77	0,74	0,73	0,053	ns

dpm = desvio padrão da média (n = 4); P significância do modelo, sendo ns = não significante.

Entretanto, observou-se que o índice de Shannon-Weiner Index em $t_{1/2}$ apresentou valor em STA e MIC (média = 1,77) levemente inferior que em LEU e STD (média = 1,93) e em CYN (1,88). S variou entre 13,4 (média de STA e MIC) e 15,5 em STD, enquanto LEU e o controle CYN apresentaram valor intermediário de 14,6.

Comparando a distribuição de bandas entre os tratamentos (plantas taníferas) e o controle CYN (linha 23) em $t_{1/2}$ (Figura 5.2), observou que em MIC as bandas 3, 4, 8 e 12 foram bastante reduzidas ou desapareceram, porém ficou evidente a presença novas bandas, como 5a, 5b e 10a. Nesta leguminosa observa-se que as bandas 11 e 13, já existentes em CYN, se tornaram mais fortes que todas as outras plantas, porém somente em uma das réplicas (linha 4).

Em STD, as bandas 3, 4, 5, 10, 11 e 13 tornam-se menos intensas que o

padrão e as bandas 8 e 12 desapareceram, enquanto que surgiram as bandas 4b e 5a. As bandas 4 e 7 diminuíram a intensidade em MIC e STD, mas não em LEU e STA. Em LEU e STA as bandas 1, 2, 3 e 4 apresentaram-se sempre fortes, porém, as bandas 10 e 11 tornaram-se fracas ou desapareceram. Em geral, a banda 5b foi visível em todos os tratamentos, apresentando-se mais forte em MIC. A banda 13 teve grande redução de intensidade com o uso das leguminosas, com exceção de MIC (linha 4) e STA (linha 15), mas em apenas umas das replicas. Em geral, as banda 1, 2, 6 e 9 foram estáveis em qualquer tratamento.

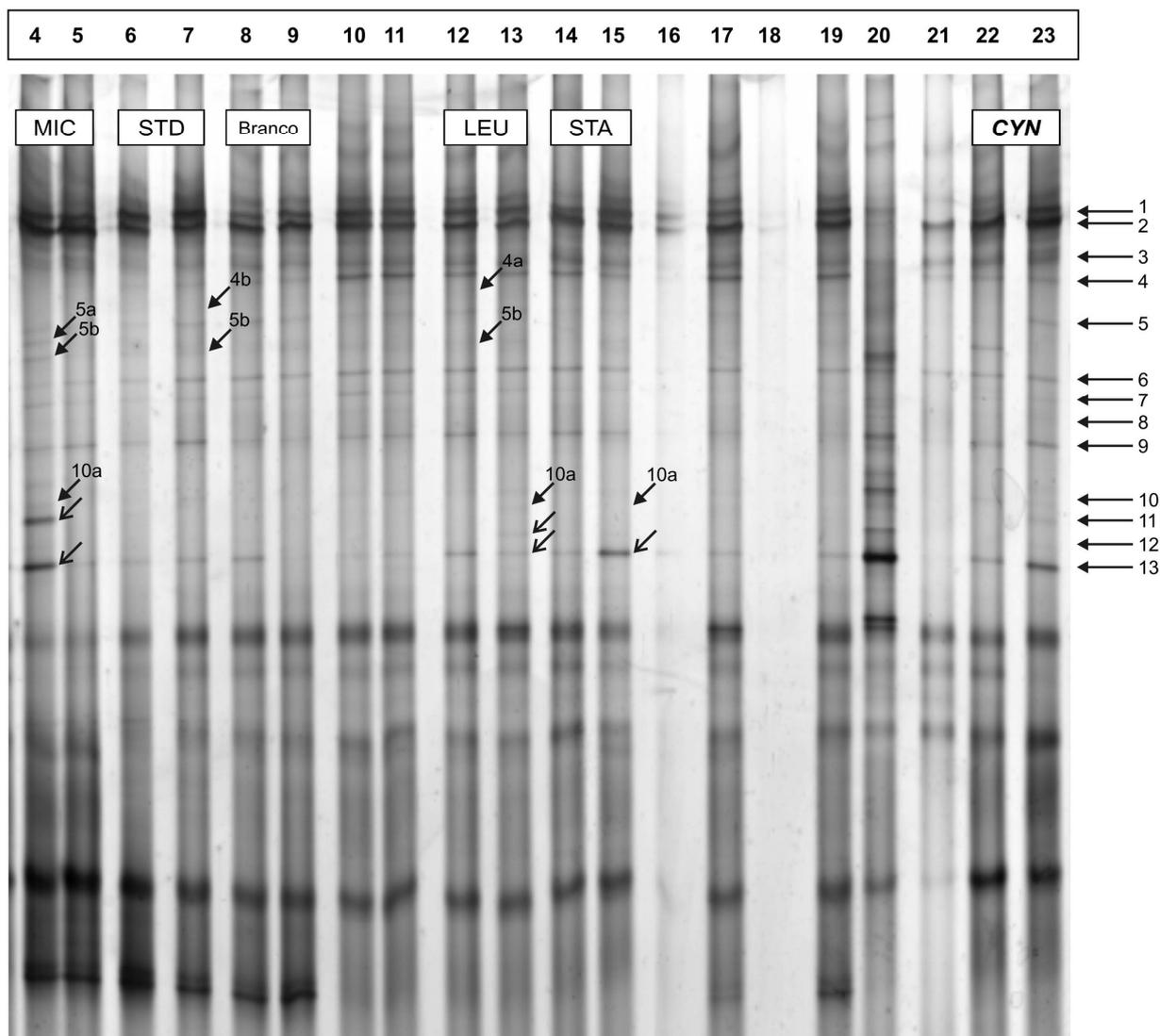


Figura 5.2 - Análise em DGGE de fragmentos de 16S rDNA após amplificação em “nested” PCR com primers para metanogênica. O DNA original (“template”) foi obtido no tempo $t_{1/2}$ da incubação *in vitro* em duas corridas utilizando inóculo de ovinos e testando cinco plantas (CYN = *Cynodon x cynodon* (controle); STA = *Stylobium aterrimum* L, STD = *Stylobium deeringianum*; LEU = *Leucaena leucocephala*, MIC = *Mimosa caesalpiniaefolia*. (As linhas não identificadas não se referem a este ensaio)

Algumas diferenças puderam ser observadas entre as seringas (réplicas) e as incubações (corridas) no mesmo tratamento. A banda 13 em LEU (linha 12) teve maior intensidade que na réplica da mesma corrida (linha 13). Foi também observado que a banda 11 em LEU foi muito mais intensa na segunda corrida (gel não apresentado), enfraquecendo ou desaparecendo na corrida 1 (Figura 5.1, linhas 12 e 13). LEU também apresentou na segunda corrida uma banda nova (11a)

bastante intensa, não identificada nas outras linhas. O mesmo ocorreu com STA em relação à banda 13, a qual se apresentou bastante intensa em uma réplica (linha 15), mas na outra (linha 14) sua intensidade foi reduzida. Christophersen et al. (2004) também obtiveram alta variação entre espécies, entre tratamento e dentro de um mesmo grupo utilizando DGGE. As razões das diferenças entre as réplicas e corridas não são claras, porém, isto explica ausência de similaridade na análise de “cluster” em relação aos tratamentos.

Na Figura 5.3, são apresentados os resultados de DGGE após 24 h de incubação, sendo que as linhas 2, 4, 6, 8 e 12, referem-se à primeira corrida, e as linhas 3, 5, 7, 9 e 11, a segunda corrida. Neste horário, todas as leguminosas apresentaram uma nova banda, 5a, porém em MIC esta banda teve maior intensidade. Além desta nova banda, verifica-se que em STA e STD aparecem as bandas 3a e 3b, enquanto que em LEU apenas é identificada a 3a e em MIC, a 3b.

Algumas bandas, embora presentes em CYN, aumentaram visivelmente sua intensidade, como a banda 7 em todas as leguminosas e a banda 3 em STD. As bandas 9, 10 e 11 enfraqueceram ou desaparecendo em todos os tratamentos, com exceção de STA na corrida 1 (linha 4), especialmente a banda 11. A banda 12 esteve presente em todas as plantas, porém com menor intensidade que o controle, com exceção novamente de STA na primeira corrida (linha 4) e de STD (linha 6). Em geral, as bandas 1, 2, 3, 5, 6 e 8 estiveram presentes em todas as plantas com intensidade similar ao controle.

Da mesma forma que em $t_{1/2}$, observou-se diferença entre as corridas e entre as réplicas, cujas causas não foram esclarecidas. Como exemplo, a banda 4, que na segunda corrida (linhas ímpares) se apresenta mais forte que nas linhas correspondentes a primeira corrida (linhas pares).

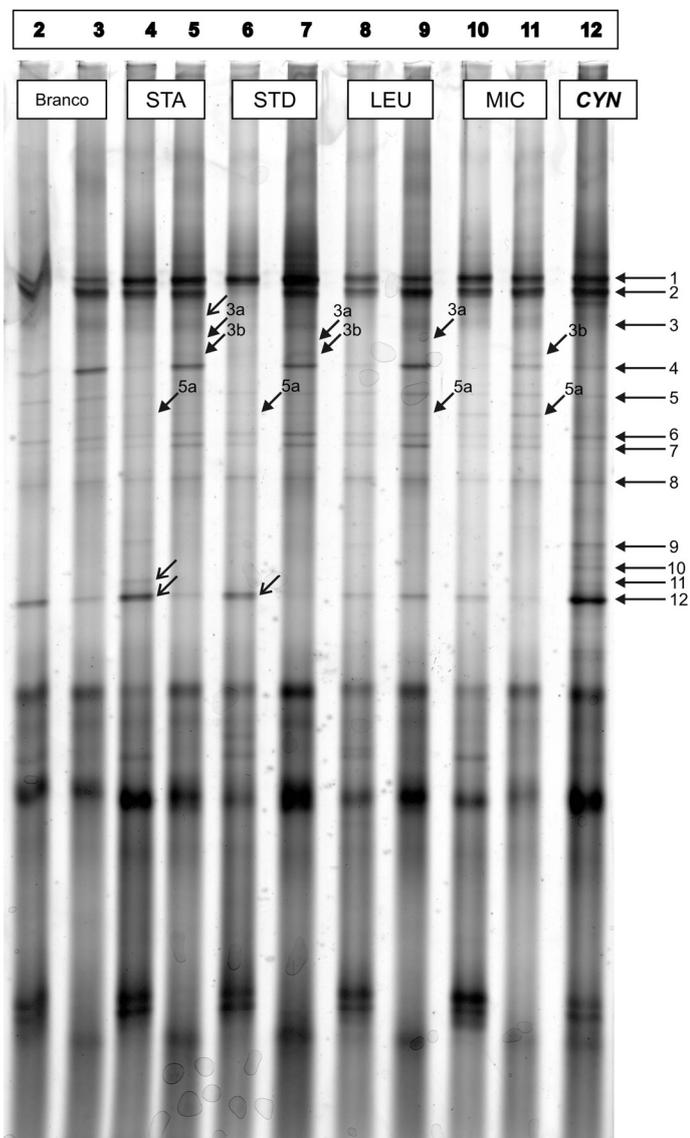


Figura 5.3 - Análise em DGGE de fragmentos de 16S rDNA após amplificação em “nested” PCR com “primers” para metanogênica. O DNA original (“template”) foi obtido após 24 h de incubação *in vitro* em duas corridas utilizando inóculo de ovinos e testando cinco plantas (CYN = *Cynodon x cynodon* (controle); STA = *Stylobium aterrimum* L, STD = *Stylobium deeringianum*; LEU = *Leucaena leucocephala*, MIC = *Mimosa caesalpiniaefolia*

5.5. Discussão

A redução de população de bactérias celulolíticas com plantas taníferas foi observada por vários autores (Varel e Jung, 1986; Bae et al., 1993, Nelson et al., 1997; McSweeney et al., 2001a, Guimarães-Beelen et al., 2006a, 2006b). Esta redução pode ser um reflexo (i) da dificuldade de adesão dos microrganismos à superfície da planta pela ação do tanino (Varel e Jung, 1986; Leinmüller and Menke, 1990; McAllister et al., 1994; Bento et al., 2005), (ii) da ação do tanino formando complexos com nutrientes diminuindo a possibilidade de digestão deste no rúmen e/ou (iii) inibindo o crescimento microbiano através da complexação direta com microrganismo (Singleton, 1981; Nelson et al., 1997) ou (iv) por ação bacteriostática complexando as enzimas microbianas como a endoglucanases (Makkar et al., 1993; Bae et al., 1993; Guimarães-Beelen et al., 2006a). Em quaisquer destas ações estão envolvidas as características físicas e químicas da plantas, a quantidade, o tipo, o tamanho e localização do tanino na planta e as características morfológicas e fisiológicas do microrganismo (McAllister et al., 1994).

No presente trabalho, LEU e STA apresentaram alta degradabilidade aparente e verdadeira da matéria seca (ADMS e VDMS, respectivamente), da proteína bruta (DPB) e da fibra em detergente neutro (DFDN) e alta produção de massa microbiana (MM) (Tabela 4.1 e 4.2) o que descarta a segunda hipótese. Todas as outras hipóteses levantadas são possíveis, porém não podem ser provadas ou descartadas somente com os dados deste estudo.

Alguns dos estudos citados observaram que *F. succinogenes* foi a principal espécie afetada com a ação do tanino entre vários outros microrganismos celulolíticos (Singleton, 1981; Nelson et al. 1997; McSweeney et al., 2001a), porém

os motivos ainda são pouco definidos. Assim, não é espantoso que no presente estudo *F. succinogenes* tenha sido tão fortemente atingida com o uso dessas plantas taniníferas.

McSweeney et al. (2001b) observaram que o grupo de microorganismos proteolítico estudado (*Bacteroides-Porphyromonas-Provotella*) não sofreu alteração com o uso de 30 % *C. callothyrsus* em comparação com o controle, mas diminuiu com a adição de PEG, enquanto que *F. succinogenes* e *Ruminococci spp* sofreram grande redução. Os autores explicam que o tanino, ao inibir o crescimento das bactérias celulolíticas, pode promover a diminuição da dominância destas e favorecer as bactérias proteolíticas.

É suposto que neste estudo a maior MM apresentada por LEU e também em STA (Tabela 4.2) seja explicada em parte por um possível aumento de certas populações de microorganismos, privilegiadas com a redução da população de *F. succinogenes* por ação do tanino devido à menor competição. Esta hipótese é sustentada pela maior produção de propionato (C3) (24,3 %mmol) e menor produção de CH₄/g MS verdadeiramente degradada (18,2 mL/g VDMS) em LEU que em outras plantas (em média 20,7 %mmol e 30,5 mL/g VDMS, respectivamente) (Tabela 4.1 e 4.3). Este resultado sugere transferência da rota de produção de metano para produção de propionato como sumidouro de hidrogênio e alteração do perfil microbiológico ruminal causado por diferente grupo de microorganismos.

Em MIC e STD, ao contrário de LEU e STA, houve baixa redução de *F. succinogenes* em $t_{1/2}$ e também baixa degradabilidade da MS e de FDN (Tabela 4.1). A baixa degradabilidade sugere uma dificuldade de acesso dos microorganismos aos nutrientes e também menor exposição do tanino.

A redução de *F. succinogenes* em MIC, representada pelo valor negativo de

$\Delta\Delta\text{CT}$ foi muito maior em 24 h do que em $t_{1/2}$, indicando que a concentração desta bactéria foi mais afetada em 24 h que em $t_{1/2}$ ao contrário das outras leguminosas, lembrando que o $t_{1/2}$ em MIC é de 47 h, e que, portanto, eventos em 24 h em MIC ocorreram antes de $t_{1/2}$.

Uma possível explicação para alta redução de *F. succinogenes* em MIC é que até 24 h, à medida que MIC foi sendo degradada e o tanino liberado no meio, houve maior complexação deste com *F. succinogenes* ou com suas enzimas, diminuindo direta ou indiretamente sua população. Como consequência, houve menor competição por nutriente e menor dominância desta população, permitindo que outras bactérias se desenvolvessem resultando em maior massa microbiana em 24 h que em $t_{1/2}$. Entre 24 h e $t_{1/2}$ (47 h) pode ter ocorrido redução da ação do tanino no rúmen e consequentemente recuperação da população de *F. succinogenes*. Esta explicação é sustentada pelo maior crescimento e eficiência microbiana de MIC em 24 h do que em $t_{1/2}$ apresentada no Capítulo 4, Tabela 4.3.

Em STD a baixa redução da população de *F. succinogenes* em $t_{1/2}$ e também em 24 h pode ser devida à menor complexação do tanino sobre esta população ou aos nutrientes devido à menor exposição do tanino no meio, retardando o efeito negativo sobre as celulolíticas em STD.

Este efeito redutor sobre *F. succinogenes* permaneceu em STD até 24 h, porém não em STA e LEU onde houve recuperação desta população. No caso de LEU, observando o efeito da adição de PEG (Tabela 3.2), houve redução do incremento de gás entre 8 h (tempo próximo ao $t_{1/2}$ de LEU) e 24 h de 22,80 para 9,75%, respectivamente, sugerindo diminuição da ação do tanino entre esses horários. Assim, é suposto que a menor ação do tanino em LEU em 24 h tenha influenciado positivamente a população de *F. succinogenes*.

O mesmo não ocorreu em STA, cujo incremento de gás com PEG não sofreu alteração entre esses horários, porém houve melhoria da taxa fraccional de fermentação entre 8 (tempo próximo ao $t_{1/2}$ de STA) e 24 h com e sem PEG. Desta forma, é suposto que o aumento da degradabilidade e disponibilidade de nutrientes para os microorganismos em STA em 24 h tenham contribuído para a recuperação de *F. succinogenes*.

A população de metanogênicas em $t_{1/2}$ apresentou diferentes resultados entre as leguminosas. LEU e STA apresentaram os maiores decréscimos na população de metanogênicas e de *F. succinogenes*, o que sugere uma relação de interdependência entre ambas. Entretanto, *F. succinogenes* não produz H₂, mas formato (Rychlik e May, 2000) e também não possui relação sintrófica com metanogênicas, ou seja, esta celulolítica não é afetada diretamente pela presença de metanogênicas como *Ruminococcus albus* e *R. flavefaciens*, pois sua enzima hidrogenase não é sensível à tensão de hidrogênio (Moss, 1993; Reilly, 1998).

F. succinogenes é uma das bactérias que utilizam fumarato como aceptor de elétrons para produção de propionato, conhecidas como redutoras de fumarato (Asanuma et al., 1999). Essas bactérias competem com as metanogênicas por H₂ e formato como doadores de elétrons. Desta forma, era esperado aumento da população de metanogênicas com o decréscimo de *F. succinogenes* devido à menor competição por hidrogênio. Embora, *F. succinogens* seja bastante representativa entre as bactérias celulolíticas ruminais (Lin et al., 1997), esta espécie parece possuir baixa competitividade com outros organismos como mostrou estudos de co-cultura desta com celulolíticas do gênero *Ruminococci spp* e fungus (Fondevila et al., 1996; Satoshi et al., 2007 Rychlik e May, 2000; Joblin et al., 2002).

No presente trabalho, é suposto que outras bactérias redutoras de fumarato

(*Selenomonas ruminantium* ssp. *ruminantium*, *Selenomonas ruminantium* ssp. *lactilytica*, *Veillonella parvula* e *Wollinella succinogenes*), que não *F. succinogenes* tenham competido com as metanogênicas por H e formato em LEU e STA.

O maior decréscimo de metanogênicas observado em STA em comparação a LEU foi provavelmente devido à redução de protozoários que possa ter ocorrido mais em STA que em outras leguminosas, o que levou a redução de metanogênicas associadas a estes microorganismos por aderência ou endossimbiose (Moss, 1993; Tokura et al., 1999).

As populações de metanogênicas em $t_{1/2}$ sofreram aumento em STD e, principalmente, em MIC em relação ao controle CYN (Figura 5.1c), lembrando que nestas plantas a redução de *F. succinogenes* foi menor que em LEU e STA. A alta produção de metano em MIC em mL/g VDMS em $t_{1/2}$ ou em 24 h (Tabela 4.1) são coerentes com o incremento da população de metanogênicas nestes dois horários.

Após 24 h, houve ligeiramente maior eficiência microbiana e maior produção de massa microbiana em MIC, porém a menor concentração de N amoniacal, de iso-butilato e iso-valerato indicam menor proteólise (Tabela 4.2 e 4.3). Assim, o aumento de massa microbiana observada em MIC em 24 h deve estar relacionado aos organismos metanogênicos e não a proteolíticos. Em $t_{1/2}$, ou seja, após 24 h para esta leguminosa, a diminuição de *F. succinogenes* (Figura 5.1b) e o aumento da atividade proteolítica, como mostraram o aumento da produção de N amoniacal, iso-butilato e iso-valerato e o aumento na produção de ácidos graxos totais (Tabela 4.2 e 4.3), sugerem diminuição da ação do tanino e alterações na fermentação ruminal em $t_{1/2}$. Entretanto, essas alterações não foram suficientes para desviar o H no meio para a produção de propionato ao invés de metano e/ou reduzir a população de metanogênicas, como sugere a não alteração de C2:C3.

Estudos preliminares utilizando a técnica de DGGE demonstraram grandes diferenças entre as populações, os tratamentos e dentro dos grupos de tratamentos, sugerindo que a diversidade das metanogênicas é influenciada pela dieta, taxa de passagem da dieta e o nicho que ocupam em relação a protozoários (Christophersen et al., 2004). Embora os índices de diversidade estudados, sugeriram que não houve alteração na diversidade da comunidade metanogênica com o uso dessas leguminosas, a diferente distribuição de bandas entre os tratamentos sugere que a estrutura dessa comunidade foi afetada.

O surgimento de novas bandas ocorreu em todos os tratamentos, o que sugere o maior desenvolvimento de algumas populações de metanogênicas, inibidas na dieta controle. Pode ser suposto que organismos representados na banda 7 e principalmente da banda 4, tenham sido mais afetados em MIC e em STD devido à menor qualidade e maior efeito dos taninos observado nestas plantas (Tabela 3.2 e 3.3). É possível que alguns gêneros, espécies ou linhagens de metanogênicas possam ter sido prejudicados direta ou indiretamente pela ação do tanino.

Uma linhagem de *Methanobrevibacter*, muito semelhante a *M. ruminantium*, foi reportada como dependente de coenzima M, além utilizar somente H e CO₂ para seu crescimento, enquanto que outra não necessita de coenzima M e pode alternativamente usar formato (Miller et al., 1986). Este exemplo sugere a hipótese de inibição de alguma enzima específica de metanogênicas presentes nas leguminosas estudadas, como bactérias dependentes da coenzima M. Como nem todas metanogênicas utilizam formato como precursor preferencial, a maior concentração de formato e menor de H pode ter prejudicado as populações que não conseguem utilizar formato para seu crescimento.

MIC apresentou alta intensidade nas novas bandas (5a, 5b, 10a) e aumento

na intensidade das bandas já existentes (8, 9, 10, 11 e 13), além de manutenção nas bandas restantes. Isto corrobora com o aumento da população de metanogênicas medida em qPCR com esta leguminosa em $t_{1/2}$. Da mesma forma em STD, onde também foi verificado aumento da população de metanogênicas, era esperado maior número de bandas e/ou maior intensidade. Entretanto, isto não ficou evidente na análise de DGGE.

A estabilidade das bandas 1, 2, 6 e 9 em todas as leguminosas, indica a presença de organismos metanogênicos possivelmente resistentes ou tolerantes aos diferentes tipos e quantidades de taninos estudados independente da qualidade da planta utilizada. Algumas bactérias celulolíticas (Brooker et al., 1994; Nelson et al., 1998), proteolíticas (McSweeney et al., 1999) e fungos (Joblin, et al., 2002) apresentam tolerância ao tanino, porém poucos estudos sobre resistência de metanogênicas aos taninos foram realizados.

Baseando-se nos resultados dos produtos da fermentação e do qPCR, pode-se inferir algumas razões das mudanças ocorridas na distribuição das espécies de metanogênicas presentes em cada tratamento.

As bactérias redutoras de fumarato competem com as metanogênicas por formato e H como doadores de elétrons, sendo que em situação de maior concentração de formato, estas bactérias são mais favorecidas do que as metanogênicas (Asanuma et al. 1999). Estes autores concluíram que a adição de fumarato em dietas de ruminantes reduz a metanogênese e aumenta a produção de propionato. Se a hipótese de que bactérias redutoras de fumarato foram beneficiadas no tratamento com STA e principalmente com LEU for verdadeira, pode-se supor que as metanogênicas, de forma geral, foram prejudicadas pela competição, sendo as metanogênicas que dependem de formato, como a

Methanobrevibacter smithii (Rea et al., 2007), as mais afetadas. A menor relação C2:C3, a menor proporção de C3 e a menor eficiência de produção de metano sustentam esta hipótese em LEU, mas não em STA.

Em STA foi sugerido (item 4.4.3; 4.4.4 e 4.4.5) ter ocorrido maior inibição de protozoários que nas outras leguminosas devido à menor concentração de n-butirato e de metano e maior acetato (Tabela 4.1 e 4.3). Ungerfeld et al., (2004) sugeriu existir alta proporção de *Mm. mobile* no total de Archaea em fluido de rúmen com ausência ou baixa concentração de protozoários. Assim, se realmente houve menor concentração de protozoários em STA, pode-se sugerir que com esta planta a população de *Mm. mobile* tenha sido beneficiada.

Após 24 h, o perfil de distribuição de bandas em CYN praticamente não se alterou. Nas leguminosas houve poucas alterações em relação à $t_{1/2}$. Houve aparecimento de uma banda em $t_{1/2}$ na posição 5b em todas as leguminosas. O mesmo ocorreu após 24 h, com o aparecimento da banda 5a que se repete em todas leguminosas. Isto sugere que as metanogênicas relacionadas a estas bandas podem estar relacionadas à característica presente nas leguminosas, como por exemplo, a alta concentração de proteína, ou a um efeito adaptativo dos microorganismos ruminais em função do tanino como sugeriu Mlambo et al. (2007)

Da mesma forma que em $t_{1/2}$, MIC apresentou além de surgimento de bandas, aumento na intensidade das bandas novas e das já presentes (5a). Isto pode ser indicativo do aumento da população de metanogênicas verificado em qPCR. A banda 4 em MIC, foi menos intensa nas duas corridas (linha 10 e 11), ao contrário das outras leguminosas que apresentaram alta intensidade desta banda na segunda corrida. Embora pertença a outro gel, comparando a banda na quarta posição (banda 4) em $t_{1/2}$ em MIC, observa-se que esta banda foi também bastante afetada.

Isto sugere um efeito direto desta planta taninífera sobre as metanogênicas presentes nesta banda. As bandas que permaneceram com aplicação dos tratamentos até 24 h indicam a presença de possíveis metanogênicas resistentes ou tolerantes ao tanino.

Como sugestão para trabalhos futuros, as bandas de interesse, dos resultados de DGGE, deveriam ser cortadas e a seqüência do gene extraído, clonada para estudo de filogenia e identificação dos organismos envolvidos.

5.6. Conclusão

A utilização de plantas taniníferas afetou negativamente a população de *Fibrobacter succinogenes* independente da concentração e tipo de tanino.

As metanogênicas foram afetadas diferentemente em função da planta, sendo que a melhor qualidade nutricional (LEU) ou a baixa concentração de tanino condensado (STA) foram fatores responsáveis pelo decréscimo nesta população.. Em contrapartida, a alta concentração de tanino condensado associado à baixa qualidade da planta pode levar ao aumento da população de metanogênicas.

A diversidade da comunidade metanogênica não foi alterada com uso de plantas taniníferas, mas sim a composição e estrutura. Este efeito é suposto ser devido a mecanismos de adaptação de algumas populações ou de dominância de certas populações sobre outras.

6. Considerações finais

O uso de plantas taniníferas tropicais para redução da emissão de metano entérico se mostra viável, desde que sejam utilizadas plantas de melhor qualidade e/ou com baixa concentração de taninos.

No estudo da comunidade metanogênica, o surgimento de novas bandas e desaparecimento de outras, sugeriu mecanismos de adaptação da microbiota. Parece haver no rúmen de ovinos populações de metanogênicas mais sensíveis a ação dos taninos, outras mais tolerantes ou resistentes ou aquelas se beneficiam de alguma forma com a presença de taninos no rúmen.

Mecanismos adaptativos no rúmen parecem ter sido estabelecidos quando na presença de plantas taniníferas, tanto diretamente com o desaparecimento ou surgimento de certas populações, como por ação indireta devido às alterações de rotas metabólicas e de partição da energia degradada.

Referências

- ABDALLA, A. L. et al. Methane emission, protozoa and Methanogens counts in sheep fed coconut oil or a Brazilian tannin-rich plant (*Mimosa caesalpineaeifolia*). **Microbial Ecology in Health and Disease**, Oslo, v. 19, n. 1, p. 33, P-1.2, 2007. Abstracts Conference on Gastrointestinal Function, 2007, apresentado em Chicago.
- ANNISON, E. F. Some observation on volatile fatty acids in the sheep's rumen. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 57, p. 400-405, 1954.
- ASANUMA N.; IWAMOTO M.; HINO T. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 82, n. 4, p. 780-787, 1999.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. p.4/1-4/30.
- ATTWOOD, G. T. et al. Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 1796-1804, 1998.
- BAE, H. D.; MCALLISTER T. A.; YANKE, J. et al. Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 59, p. 2132-2138, 1993.
- BARRY, T. N. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 3. Rates of body and wool growth. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 54, p. 211-217, 1985.
- BENTLEY, O. G. et al. Cellulolytic-factor activity of certain short-chain fatty acids for rumen microorganisms *in vitro*, **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 57, n. 3, p. 389-400, 1955.
- BENTLEY, O. G.; JOHNSON, R. R.; MOXON, A. L. Factors influencing cellulose digestion by rumen microorganisms *in vitro*. **Federation Proceedings**, Washington, v. 13, p. 182, 1954.
- BENTO, M. H. L.; MAKKAR, H. P. S.; ACAMOVIC, T. Effect of mimosa tannin and pectin on microbial protein synthesis and gas production during *in vitro* fermentation

of ^{15}N -labelled maize shoots. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 365-377, 2005.

BLÜMMEL, M.; ORSKOV, E. R. Comparison of *in vitro* gas production and nylon-bag degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 40, p. 109-119, 1993.

BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. In vitro gas production: a technique revisited. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 77, p. 24-34, 1997.

BONSI, M. L. K.; OSUJI, P. O. The effect of feeding cottonseed cake, sesbania or leucaena with crushed maize as supplement to teff straw. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 51, n. 1/3, p. 173-181, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura Abastecimento. **Emissão de metano proveniente da pecuária**. Brasília: MAA; Embrapa Meio Ambiente, 2002. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/clima/comunic_old/pecuar.htm#Index>. Acesso em: 24 maio 2005.

BRASIL Ministério da Ciência e Tecnologia. **Primeiro Inventário Brasileiro de Emissões Antrópicas de Gases de Efeito Estufa** - Relatórios de Referência, Metano na Pecuária, Brasília: MAA; Embrapa Meio Ambiente, 2006. 77p. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/21442.html>> Acesso em: 03 abr. 2007.

BRASIL Ministério da Ciência e Tecnologia. Plano Plurianual de Governo (PPA), **Programa de Mudanças Climáticas** – resultados obtidos em 2004. Projeto: Influência do manejo da produção animal sobre a emissão de metano em bovinos de corte. Brasília: MAA; Embrapa Meio Ambiente, 2007. 44p. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/upd_blob/12921.pdf> Acesso em: 03 abr 2007.

BROOKER, J. D. et al. *Streptococcus caprinus* sp. nov, a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 18, p. 313-318, 1994.

BRYANT, P. M.; ROBINSON, I. M. Studies on the nitrogen requirements of some ruminal cellulolytic bacteria. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 9, p. 96-103, 1961.

BRYANT, P. M.; ROBINSON, I. M.; CHU, H. Observations on the nutrition of *Bacteroides succinogenes*---a ruminal cellulolytic bacterium. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 42, p. 1831-1847, 1959.

BRYANT, M. P.; DOETSCH, R. N. Factors necessary for growth of *Bacteroides succinogenes* in the volatile acid fraction of rumen fluid. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 38, p. 340- 350, 1955.

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

CALLAWAY, T. R. et al. Malate content of forage varieties commonly fed to cattle. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 80, p. 1651-1665, 1997.

CARULLA, J. E.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A.; HESS, H. D. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v 56, p. 961-970, 2005.

CHRISTOPHERSEN, C. T.; WRIGHT, A.-D. G.; VERCOE, P. E. Examining diversity of free-living methanogens and those associated with protozoa in the rumen. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Amsterdam, v. 13, p. 51-54, 2004. Supplement 1.

CLARK, H.; KLEIN, C.; NEWTON, P. **Potential management practices and technologies to reduce nitrous oxide, methane and carbon dioxide emissions from New Zealand Agriculture**. Ngaherehere, NZ: Ministry of Agriculture and Forestry, 2001. Disponível em: <<http://www.maf.govt.nz/mafnet/rural-nz/sustainable-resource-use/climate/green-house-gas-migration/ghg-mitigation.htm>>. Acesso em: 30 maio 2005.

CHURCH, D. C. **The ruminant animal, digestive physiology and nutrition**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1993. 641 p.

DENMAN, E. S.; McSWEENEY, C. Quantitative (real-time) PCR. In: MAKKAR, H. P. S. e McSWEENEY, C. S. (Eds.), **Methods in gut microbial ecology for ruminants**, Holanda, IAEA, 2005. Cap. 3.2, p. 105-115.

D'MELLO, J. P. F. Anti-nutritional substances in legume seeds. In: D'MELLO, J. P. F.; DEVENDRA, C. **Tropical in animal nutrition**. Wallingford: CAB International, 1995. cap. 6, p. 136-171.

DOHME, F. et al. The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 187-192, 1999.

EL-SHAZLY, K. Degradation of protein in the rumen of the sheep. 1. some volatile acids, including branched-chain isomers found in vivo. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 51, p. 640-647, 1952.

ESCHENLAUER, S. C. P. et al. Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation, and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 4925-4931, 2002.

FIELD, J. et al. Continuous anaerobic treatment of autoxidized bark extracts in laboratory scale columns. **Biotechnology and Bioengineering**, Nova York, v. 37, n. 3, p. 247-255, 1991.

FISHER, S. G.; LERMANN, L. S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, Cambridge, 16, p. 191-200, 1979.

FONDEVILA, M.; DEHORITY, B. A. Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola* and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 74, p. 678-684, 1996.

FRANCE, J. et al. A model to interpret gas accumulation profiles with *in vitro* degradation of ruminant feeds. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 163, p. 99-111, 1993.

GENGIZ, A.T.; NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J. Incorporation of ¹⁵N ammonia by cellulolytic ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* bl2, *Ruminococcus flavefaciens* SY3, and *ruminococcus albus* 17. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, n. 6, p. 2819- 2822, 2001.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.; BECKER, K. Tannins in tropical browses: effects on *in vitro* microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 3581-3588, 2000a.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Effects of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 84, p. 73-83, 2000b.

GRINGS, E.; BLÜMMEL, M.; SÜDEKUM, K.-H Methodological considerations in using gas production techniques for estimating ruminal microbial efficiencies for silage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 527-545, 2005.

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M. et al. Influence of condensed tannins from Brazilian semi-arid legumes on ruminal degradability, microbial colonization and ruminal enzymatic activity in Saanen goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 61, p. 35-44, 2006a.

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M. et al. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 5, p. 910-917, 2006b.

GUPTA, R.; CHAUDHARY, U. B.; CHAUHAN, T. R. Effect of protein supplementation and defaunation on the growth rate of young buffalo heifers. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 63, p. 179-183, 1993.

HAMDI, M.; GARCIA, J. L. Anaerobic digestion of olive mill wastewaters after detoxification by prior culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, Oxford, v.

28, n. 3, p. 155-159, 1993.

HERVÁS, G. et al. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 109, n. 1-4, p. 65-78, 2003.

HESS, H. D. et al. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 54, p. 703-713, 2003.

HILLMAN, K.; LLOYD, D.; WILLIAMS, A. G. Interactions between the methanogen. *Methanosarcina barkeri*. and rumen holotrich ciliate protozoa. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 3, p. 49-53, 1988.

HOBSON, P. N. Physiological characteristics of rumen microbes and relation to diet and fermentation patterns. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 31, n. 2, p. 135-139, 1972.

HOOVER, W. H., LIPARI, J. J. Pure and mixed continuous culture of two rumen anaerobes. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 54, p.1662-1668, 1971.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York. Academic Press, 1966. 533 p.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC. **Impacts, adaptations and mitigation of climate change**: Scientific-technical analysis 1995. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 878 p. Disponível em: <<http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/gl/invs1.htm>> Acesso em: 07 jul. 2002.

ITABASHI, H.; KOBAYASHI, T.; MATSUMOTO, M. The effects of rumen ciliate protozoa on energy metabolism and some constituents in rumen fluid and blood plasma of goats. **Japanese Journal of Zootechnical Science**, Tokyo, v. 55, p. 248-255, 1984.

JOBLIN, K. N. et al. Degradation of fresh ryegrass by methanogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence or absence of *Fibrobacter succinogenes*.

Current Microbiology, New York, v. 45, p. 46-53, 2002.

JOHNSON, D. E.; WARDS, G. M. Estimates of animal methane emissions. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 42, p. 133-141, 1996.

JONES, R.J. et al. An approach to screening potential pasture species for condensed tannin activity. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 269-277, 2000.

KAITHO, R. J. et al. Utilization of browse supplements with varying tannin levels by Ethiopian Ming sheep. 1. Intake, digestibility and live weight changes. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 39, p. 145-159, 1998.

KEYSER, M. et al. PCR-based DGGE fingerprinting and identification of methanogens detected in three different types of UASB granules. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 77-84, 2006.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 204, p. 301-366, 2001.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Editora UFSM, 2002. 140 p.

KRAUSE, D. O. et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, p. 663-693, 2003.

KREUZER, M.; KIRCHGESSNER, M. H.; MULLER, L. Effect of defaunation on the loss of energy in wethers fed different quantities of cellulose and normal or steamflaked maize starch. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 16, p. 233-241, 1986.

KUMAR, R.; D'MELLO, J. P. F. Anti-nutritional factors in forage legumes. In: D'MELLO, J.P.F. E DEVENDRA, C. (Eds.). **Tropical Legumes in Animal Nutrition**. Cambridge: CAB International, 1995. p. 95-133

KURIHARA, M. et al. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 81, p. 227-234, 1999.

LEINMÜLLER, E.; MENKE, K.-H. Tannine in Futtermitteln für Wiederkäuer I. Chemische Eigenschaften und Reaktionen mit Makromolekülen. **Übersichten Tierernährung**, Hohenheim, v. 18, p. 91-114, 1990.

LENG, R. A. Quantitative ruminant nutrition—a green science. **Australian journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 44, p. 363-380, 1993.

LIN, C.; RASKIN, L.; STAHL, D.A. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 22, p. 281-294, 1997.

LING, J. R.; ARMSTEAD, I. P. The *in vitro* uptake and metabolism of peptides and amino acids by five species of rumen bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 78, p. 116-124, 1995.

LIU, J. X.; SUSENBETH, A.; SUEDEKUM, K. -H. *In vitro* gas production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 80, n. 2, p.517-524, 2002.

LONGO, C. et al. Methane production from tannin rich plants incubated *in vitro*. In: British Society of Animal Science Meeting, 2006, York. **Proceedings of the British Society of Animal Science**. York : British Society of Animal Science, 2006.

LOVETT, D. et al. Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 84, p. 135-146, 2003.

MACKIE, R.I.; McSWEENEY, C.S.; KLIEVE, A.V. Microbial ecology of the ovine rumen. In: FREER, M.; DOVE, H. **Sheep nutrition**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. cap. 4, p. 71-94.

MAKKAR, H. P. S. *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing

phytochemicals, **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, n.1, p. 291-302, 2005

MAKKAR, H. P. S. **Quantification of tannins in tree foliage**. Vienna: FAO; IAEA, 2000. (Laboratory Manual).

MAKKAR, H. P. S.; BLUMMEL, M.; BECKER, K. *In vitro* rumen apparent and true digestibilities of tannin rich forages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 67, p.245-251, 1997.

MAKKAR, H. P. S., BECKER, K. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 63, p. 211-228, 1996.

MAKKAR, H. P. S., BLÜMMEL, M.; BECKER, K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidone and polyethylene glycol with tannins and their implications in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. **British Journal of Nutrition**, v. 73, p. 897-913, 1995a.

MAKKAR, H.P.S.; BLUMMEL M.; BECKER, K. *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of taninins in the rumen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 69, p. 481-493, 1995b.

MAKKAR, H. P. S.; BOROWY, N. K.; BECKER, K. Some problems in fiber determination of a tannin rich forage *Acacia saligna* leaves and their implications *in vivo* studies. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v.55, p.67-76, 1995c.

MAKKAR, H. P. S. et al. Gravimetric determination of tannins and their correlation with chemical and protein precipitation methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 61, p. 161-165, 1993.

MARGEN, D. E. et al. Energy and protein values of four forages, including a comparison between tropical and temperate species. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 28, p. 729-739, 1988.

MARTIN, S. A. et al. Effects of DL-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed a high-concentrate diet. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 77, p.

1008-1015, 1995.

MAYNARD, L. A. et al. **Nutrição animal**. 3. ed. São Paulo: Freitas Bastos, 1984. 726 p.

McALLISTER, T. A. et al. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 72, p. 3004-3018, 1994.

McALLISTER, T. A. et al. Characterization of condensed tannins purified from legume forages: chromophore production, protein precipitation, and inhibitory effects on cellulose digestion. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 9, p. 2049-2067, 2005.

McDONALD, P. et al. **Animal nutrition**. 5. ed. Zaragoza: Acribia, 1995. 576 p.

McDOWELL, L. R.; VALLE, G. Major minerals in forages. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; OMED, H. M. Editors, Forage Evaluation in Ruminant Nutrition, CAB International, Wallingford, UK (2000), pp. 373–397.

McMAHON, L. R. et al. Effect of sainfoin on *in vitro* digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 79, n. 2, p. f203-212, 1999.

McNEIL, D. M. et al. Condensed tannins in the genus *Leucaena* and their nutritional significance for ruminants. In: SHELTON, H. M. et al. (Ed.). **Leucaena** – Adaptation, quality an farming system. Canberra: ACIAR, 1998. p. 205-214. (ACIAR Proceedings, 86).

McSWEENEY, C. S. et al. Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 3075-3083, 1999.

McSWEENEY, C. S. et al. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 78-88, 2001a.

McSWEENEY, C. S. et al. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, p. 83-93, 2001b.

MENKE, K .H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis *in vitro* gas production using rumen fluid. **Animal Research and Development**, Tübingen, v. 28, p. 7-55, 1988.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MEYER, C. G. et al. Direct sequencing of variable *HLA* gene segments after *in vitro* amplification and allele separation by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Immunology Methods**, Amsterdam, v. 142, p. 251-256, 1991.

MILER, T. L. et al. Characteristics of methanogens isolated from bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 51, n. 1, p. 201-202, 1986.

MIN, B.R. et al. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam, v. 106, p. 3-19, 2003.

MIURA, H.; HORIGUCHI, M.; MATSUMOTO, T. Nutritional interdependence among rumen bacteria, *Bacteroides amylophilus*, *Megasphaera elsdenii*, and *Ruminococcus albus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 40, n. 2, p. 294-300, 1980.

MLAMBO, V. et al. The effectiveness of adapted rumen fluid *versus* PEG to ferment tannin-containing substrates *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.136, p. 128-136, 2007.

MOSS, R. A. **Methane**: Global warming and production by animals. Canterbury: Chalcombe Publications, 1993. 105 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of sheep**. 6. ed. Washington: National Academy Press, 1985. 112 p.

NELSON, K. E. et al. Chemical and biological assays to evaluate bacterial inhibition by tannins. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, p. 1175-1194, 1997.

NELSON, K.E. et al. Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin-tolerant bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 3824–3830, 1998.

NIEZEN, J. H. et al. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v. 125, p. 281-289, 1995.

NOFTSGER, S. M. et al. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) on microbial growth in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 86, p. 2629-2636, 2003.

O'HARA, P.; FRENEY, J.; ULYATT, M. Abatement of agricultural non-carbon dioxide greenhouse gas emissions: A study of research requirements. Ngaherehere, NZ: Ministry of Agriculture and Forestry, 2003. Disponível em: <<http://www.maf.govt.nz/mafnet/rural-nz/sustainable-resource-use/climate/abatement-of-agricultural-greenhouse-gas-emissions/httoc.htm>> Acesso em: 30 maio 2005.

ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 92, p. 449-453, 1979.

OSBORNE, N. J. T.; McNEIL, D. M. Characterization of *Leucaena* condensed tannins by size and protein precipitation capacity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, p. 1113-1119, 2001.

ØVREAS, L. et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelenvannet, as determined by denaturing gradient fragments coding for 16S RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore v.63, n.9, p3367-3393, 1997

PATTERSON, J. A.; KUNG JR, L.. Metabolism of D,L-methionine and methionine

analogs by rumen microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 71, p. 3292-3301, 1988.

PEREZ-MALDONADO, R. A.; NORTON, B. W. The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.76, p. 515-533, 1996.

PRIMAVESI, O. et al. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 277-283, 2004.

PUCHALA, R. et al. The effect of condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 83, p. 182-186, 2005.

REA, S. et al. *Methanobrevibacter millerae* sp. nov. and *Methanobrevibacter olleyae* sp. nov., methanogens from the ovine and bovine that can utilize formate for growth. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 450-456, 2007.

REED, J. D. et al. Fodder tree and straw diets for sheep: intake, growth, digestibility and the effects of phenolics on nitrogen utilization. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 30, p. 39-50, 1990.

REILLY, P. E. B. **Rumen biochemistry**. Brisbane: The University of Queensland, 1998. Disponível em: <http://www.vet.ed.ac.uk/clive/cal/RUMENCAL/vetcal.html>. Acesso em: 30 maio 2007.

RYCHLIK, J. L.; MAY, T. The effect of a methanogen, *Methanobrevibacter smithii* on the growth rate, organic acid production, and specific ATP activity of three predominant ruminal cellulolytic bacteria. **Current Microbiology**, Nova York, v. 40, p.176–180, 2000.

ROBERTSON, J. B., VAN SOEST, P. J. The detergent system of analysis. In: JAMES, W. P. T.; THEANDER, O. (Ed.). **The analyses of dietary fibre in food**. New York: Marcel Dekker, 1981. cap. 9, p. 123-158, 1981.

SALAWU, M. B.; ACAMOVIC, T.; STEWART, C. S.; HOVELL, F. D. D.; MCKAY, I. Assessment of the nutritive value of *Calliandra calothyrsus*: in sacco degradation and *in vitro* gas production in the presence of Quebracho tannins with or without Browse Plus. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 69, p. 219-232, 1997.

SAS INSTITUTE. **The SAS system for windows**. Release 8.01. Cary, 2001.

SATOSHI, K. E, YABUKI, H.; KOBAYASHI, Y. Validation and application of real-time polymerase chain reaction assays for representative rumen bacteria. **Animal Science Journal**, Taikoku, ,v. 78, n. 2, p. 135–141, 2007

SCHOFIELD, P. Gas production methods. In: D'MELLO, J. P. F. **Farm animal metabolism and nutrition**. Wallingford: CABI Publishing, 2000. cap. 10, p. 209-232.

SHARP, M. et al. Widespread bacterial populations at glacier beds and their relationship to rock weathering and carbon cycling. **Geology**, Boulder, v. 27, p. 107-110, 1998.

SHINKAI, T.; KOBAYASHI, Y. Localization of ruminal cellulolytic bacteria on the plant fibrous materials determined by a newly developed fluorescent in situ hybridization protocol. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, n. 5, p. 1646-1652, 2007.

SHI, Y.; WEIMER, P. J. Competition for cellobiose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, n. 2, p. 743-748, 1996.

SINGLETON, V. L. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plants origin common in food. **Advances in Food Research**, New York, v. 27, p. 149-242, 1981.

SLYTER, L. L.; WEAVER, J. M. Growth factor requirements of ruminal cellulolytic bacteria isolated from microbial populations supplied diets with or

without rapidly fermentable carbohydrate. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 22, n. 5, p. 930-932, 1971.

SUGANO, A. et al. Succession of methanogenic archaea in rice straw incorporated into a Japanese rice field: estimation by PCR-DGGE and sequence analyses. **Archaea**, Victoria, v. 1, p. 391-397, 2005.

SULTAN, S.; KATIYAR, D. S.; SINGH, S. Effect of maturity on chemical composition, sugar contents, leaf to stem ratio and *in vitro* dry matter digestibility of various sorghum cultivars at different stages of maturity. **Indian Journal of Animal Sciences**, Nova Deli, v. 73, n. 5, p. 541-544, 2003.

TOKURA, M. et al. Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. **Current Microbiology**, New York, v. 39, p. 123–128, 1999.

ULYATT, M. J. et al. Methane emission from dairy cows and wether sheep fed subtropical grass-dominant pastures in midsummer in New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 45, n. 4, p. 227-234, 2002.

UNGERFELD, E. M. et al. Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 520-526, 2004.

UNITED NATION FRAMEWORK CONVENTION ON CLIMATE CHANGE – UNFCCC. Bonn, 1997. Disponível em: <http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php> Acesso em: 03 abr. 2007.

U.S. Environmental Protection Agency. **Ruminant livestock**. Washington: EPA, 2004. Disponível em: <<http://www.epa.gov/rlep/sustain.htm>> Acesso em: 30 maio 2005.

U.S. Environmental Protection Agency. **Global greenhouse gases**. Washington: EPA, 2006a. Disponível em: <<http://www.epa.gov/climatechange/emissions/globalghg.html>>. Acesso em: 03 abr. 2007.

U.S. Environmental Protection Agency. **International analyses**. Washington: EPA, 2006b. Disponível em: <<http://www.epa.gov/methane/intlanalyses.html>>. 03 abr. 2007.

VAREL, V. H.; JUNG, H. G. Influence of forage phenolics on ruminal fibrolytic bacteria and *in vitro* fiber degradation. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 52, p. 275-280, 1986.

VITTI, D. M. S. S. et al. Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. **Animal Feed Science and Technology**, v.119, n.3-4, 4/4, p.345-361. 2005a.

VITTI, D. M. S. S. et al. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. **Animal Feed Science and Technology**, v.122, p.123-133. 2005b.

VOGELS, G. D.; HOPPE, W. F.; STUMM, C. K. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 40, p. 608–612, 1980.

WAGHORN, G. C. TAVENDALE, M. H.; WOODFIELD, D. R. Methanogenesis from forages fed to sheep. **Proceedings of New Zealand Grassland Association**, Palmerston North, v. 64, p. 167-171, 2002.

WAGHORN, G. C. et al. Forages with condensed tannins – their management and nutritive value for ruminants. **Proceedings of New Zealand Grassland Association**, Palmerston North, v. 60, p. 89-98, 1998.

WAGHORN, G. C. et al. Nutritive value of *Lotus corniculatus* L. containing low and medium concentration of condensed tannins for sheep. **Proceedings of New Zealand Society of Animal Production**, Palmerston North, v. 47, p. 25-30, 1987.

WALLACE, R. J.; ONODERA, R.; COTTA, M. A. D. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: HOBSON, P. N. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London: Elsevier Applied Science, 1997.

WANG, Y. X. et al. The effect of condensed tannins in lotus-corniculatus on plasma metabolism of methionine, cystine and inorganic sulfate by sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 72, p. 923-935, 1994.

WATANABE, A. et al. DGGE method for analyzing 16S DNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.

232, p. 153-163, 2004.

WELLS J. E.; RUSSELL, J. B. The effect of growth and starvation on the lysis of the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, n. 4, p. 1342-1346, 1996.

WHITELAW, F. G. et al. Methane formation in faunated and ciliate-free cattle and its relationship with rumen volatile fatty acid proportions, **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 52, p. 261-275, 1984.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L.. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WOODWARD, S. L. et al. Does feeding Sulla (*Hedysarum coronarium*) reduce methane emissions from dairy cows. In: CONFERENCE OF THE NEW ZEALAND SOCIETY OF ANIMAL PRODUCTION, 62., 2002, Canterbury, NZ. **Proceedings of New Zealand Society of Animal Production**, Canterbury: Lincoln University, 2002. p. 227-230.

WOODWARD, S. L. et al. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. In: CONFERENCE OF THE NEW ZEALAND SOCIETY OF ANIMAL PRODUCTION, 61., 2001, Canterbury, NZ. **Proceedings of New Zealand Society of Animal Production**, Canterbury: Lincoln University, 2001. p. 23-26.

WOODWARD, S. L. et al. Effect of *Lotus corniculatus* and condensed tannins on milk yield and milk composition of dairy cows. **Proceedings of New Zealand Society of Animal Production**, Palmerston North, v. 59, p. 152-155, 1999.

WRIGHT, A.-D. G. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in Western Australia. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 1263-1270, 2004.

YU, Z.; FORSTER, R. J. Quantitative (real-time) PCR. In: MAKKAR, H. P. S. e

McSWEENEY, C. S. (Eds.), **Methods in gut microbial ecology for ruminants**,
Holanda, IAEA, 2005. Cap. 3.1, p. 81-104.