UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

FERNANDA CRISTINA DE CAMPOS

Efeito do *Bacillus thuringiensis* na dieta (degradabilidade ruminal e digestibilidade aparente) e no desempenho de ovinos

Piracicaba
2014

FERNANDA CRISTINA DE CAMPOS

Efeito do *Bacillus thuringiensis* na dieta (degradabilidade ruminal e digestibilidade aparente) e no desempenho de ovinos

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

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Helder Louvandini

Piracicaba

2014

AUTORIZO A 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

Campos, Fernanda Cristina de

Efeito do *Bacillus thuringiensis* na dieta (degradabilidade ruminal e digestibilidade aparente) e no desempenho de ovinos / Fernanda Cristina de Campos; orientador Helder Louvandini. - - Piracicaba, 2014.
92 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Esporos bacterianos 2. Helmintologia veterinária 3. Nutrição animal 4. Rúmen I. Título

CDU 615.284 : 591.53

Dedico este trabalho aos meus pais, Cantídio Natal e Maria Marcolina, pelo amor, educação, incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar a vida, saúde e as oportunidades que me trouxeram até aqui e me permitiram seguir este caminho!

Agradeço a minha amada família: meus pais Cantídio Natal e Maria Marcolina, irmãos Felipe e Flávia, tia Maria das Graças, avó Iracema, cunhados Renata e Claudinei e minha linda sobrinha Ana Alice pelas conversas, sorrisos, desabafos e todo incentivo que sempre me deram. Amo vocês!

Agradeço ao meu querido marido Felipe pelo companheirismo, apoio, incentivo e, principalmente, compreensão nos momentos necessários. Te amo!

Agradeço ao Prof. Helder Louvandini pela oportunidade, confiança, paciência e, principalmente, pelo tempo despendido às explicações, discussões e inúmeros ensinamentos. Deixo explicita minha admiração e respeito por seu trabalho como professor e orientador!

Agradeço ao Prof. Adibe Luiz Abdalla por me inserir no “mundo da pesquisa” e por ter me chamado após anos para participar novamente da equipe, proporcionando a oportunidade de realização do mestrado. Agradeço de coração!

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Nutrição Animal Maria Regina S. R. Peçanha, Lécio Aparecido Castilho e Joaquim Everaldo M. Santos pela constante atenção, auxílio na execução do trabalho, ensinamentos e, principalmente pela amizade!

Agradeço aos amigos Adibe Luiz Abdalla Filho, Juliano Issakowicz e Vitor Guerrini, pela ajuda diária com os animais. Também à Aline Campeche, Carina Nazato, Patrícia Louvandini, Alessandra Romero, Patrícia Pimentel, Tiago Paim e Paulo Tavares Lima pelo auxílio nas análises indispensáveis ao trabalho. Sem vocês tudo seria mais difícil!

Agradeço a todos os amigos pós-graduandos, Aline Campeche, Patrícia Pimentel, Patrícia Louvandini, Carina Nazato, Érika Canova, Ana Claudia Issakowicz, Andressa Natel, Alessandra Romero, Yosra Soltan, Alinne Schumann, Emiliana Romagnol, Samy Cavalcante, Suzana, Adibe Luiz Abdalla Filho, Paulo Tavares Lima, Juliano Issakowicz, Dinesh Dhanasekaran, Tiago Paim, Bernardo Berenchtein, Ronaldo Lucas, Amr Morsy e Hani Elzaiat pela ajuda oferecida sempre que necessário e pelas horas de alegrias que passamos juntos!

Agradeço ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e à Coordenação do Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências, pela oportunidade e infraestrutura oferecidas para realização do trabalho de mestrado.

Agradeço a todos os funcionários da Biblioteca do CENA, principalmente à Marília, pelo apoio e auxílio constante desde o primeiro contato.

Agradeço aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências, Neuda, Daiane, Fábio e Sônia, pelo auxílio e atenção dispensados.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), principalmente à pesquisadora e Prof[a]. Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes, pelo fornecimento dos esporos dos *Bacillus thuringiensis*, essencial para o desenvolvimento deste estudo.

À todos, muito obrigada!

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein | 1879 - 1955

RESUMO

CAMPOS, F. C. **Efeito do *Bacillus thuringiensis* na dieta (degradabilidade ruminal e digestibilidade aparente) e no desempenho de ovinos**. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Com este estudo, objetivou-se avaliar o efeito de estirpes de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) na degradabilidade e digestibilidade da dieta, emissão de gases, microbiota ruminal, parâmetros sanguíneos e desempenho de ovinos. O estudo foi dividido em 2 experimentos: ensaio *in vitro* de produção de gases para a avaliação de 6 diferentes estirpes de *Bt* (907, 1192, 2036, 2493, 2496 e S1185) e ensaio *in vivo* com a estirpe selecionada 2036 para investigação de possíveis interferências na digestão e saúde dos animais. A simulação do ambiente ruminal foi realizada em garrafas de vidro incubadas a 39 ^{o}C por 24 h. O delineamento foi o inteiramente casualizado com 7 tratamentos (Sem *Bt* (controle), *Bt* 907, *Bt* 1192, *Bt* 2036, *Bt* 2493, *Bt* 2496 e *Bt* S1185) com 4 repetições em duplicata. O processo fermentativo foi avaliado pelos resultados de matéria seca degradada (MSD), matéria orgânica degradada (MOD), produção líquida de gases totais, produção líquida de metano e eficiência da conversão de metano. Produtos da fermentação (pH, nitrogênio amoniacal (N-NH_3) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)) e micro-organismos ruminais (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, fungos anaeróbicos, arqueas metanogênicas e protozoários) também foram estudados. Apenas a estirpe *Bt* 907 reduziu a MSD e MOD em relação ao controle, com manutenção da população de *F. succinogenes*, pois as demais estirpes reduziram a população desta bactéria. No ensaio *in vivo* 20 cordeiros Santa Inês com 3 meses de idade e 18 ± 3,5 kg PV foram utilizados e divididos em 2 grupos: 10 animais tratados com 2,5x10^6 esporos de *Bt* 2036 por kg PV/d e 10 animais não tratados (controle). Estes foram alojados em baias individuais em delineamento inteiramente casualizado e receberam dieta composta de feno de capim Tifton-85 (*Cynodon* spp.) *ad libitum* e 300 g/animal/d de concentrado, que foi ajustado de acordo com as exigências de crescimento. O período experimental *in vivo* teve duração de 63 dias, dos quais 53 compreendeu o teste de desempenho dos animais, com aferição do consumo 3 vezes na semana e pesagem quinzenal, e os 10 dias subsequentes destinou-se aos ensaios de digestibilidade aparente, balanço de nitrogênio, síntese de proteína microbiana e emissão de metano entérico. Durante todo o experimento, coletas se sangue foram realizadas quinzenalmente a fim de avaliar os parâmetros hematológicos (hemácias, hemoglobina, hematócrito e leucócitos) e bioquímicos (glicose, proteínas totais, albumina, aspartato aminotransferase, ureia e creatinina) dos animais para o diagnóstico de possível intoxicação. Características da fermentação ruminal também foram investigadas em 3 momentos (início, meio e fim do experimento) sobre as variáveis pH, N-NH_3, AGCC, abundância relativa das espécies *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, populações de arqueas metanogênicas, fungos anaeróbicos e contagem de protozoários, por meio de coletas de líquido ruminal. Não houve influência da estirpe sobre as variáveis estudadas. Conclui-se que na avaliação *in vitro* apenas a estirpe *Bt* 907 reduziu a MSD e MOD com manutenção da população *F. succinogenes* e no experimento *in vivo* a inclusão de esporos de *Bt* 2036 na dieta não afetou de forma negativa o desempenho e nem a saúde dos ovinos.

Palavras-chave: Balanço de nitrogênio. Esporos bacterianos. Exames bioquímicos. Fermentação ruminal. Metano. Microbiota ruminal. Proteína microbiana.

ABSTRACT

CAMPOS, F. C. **Effect of *Bacillus thuringiensis* in the diet (ruminal degradability and apparent digestibility) and performance of sheep**. 2014. 92 f. Dissertação (mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

The objective of present study was to evaluate the effect of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) strains on degradability and digestibility of the diet, gas production, ruminal fermentation, blood parameters and performance in sheep. The study was divided into 2 experiments: *in vitro* gas production to evaluate six different *Bt* strains (907, 1192, 2036, 2493, 2496 and S1185) and *in vivo* assay with the selected strain (*Bt* 2036) to investigate possible interference in digestion and health of animals. The rumen simulation was performed in glass bottles incubated at 39 °C for 24 h. A completely randomized design with 7 treatments (No *Bt* (control), *Bt* 907, *Bt* 1192, *Bt* 2036, *Bt* 2493, *Bt* 2496 and *Bt* S1185) was used, with 4 replications in duplicate. The fermentation process was evaluated using dry matter degradability (DMD), organic matter degradability (OMD), net gas production, methane output and conversion efficiency. Fermentation products (pH, ammonia nitrogen ($N\text{-}NH_3$), short chain fatty acids (SCFA)) and ruminal microorganisms (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, anaerobic fungi, methanogenic archaea and protozoa) were also studied. Only strain *Bt* 907 reduced DMD and OMD in relation to the control and *F. succinogenes* populations were maintained, whereas other strains of this bacterium population were reduced. An *in vivo* assay using 20 Santa Ines lambs at 3 months of age and 18 ± 3.5 kg BW was carried out. These animals were divided into 2 groups: 10 animals treated with $2.5x10^6$ spores of *Bt* 2036 per kg BW/d and 10 untreated animals (control). These were housed in individual pens in a completely randomized design and were fed a diet of Tifton-85 (*Cynodon* spp.) hay *ad libitum* and 300 g/animal/d of concentrate, which was adjusted according to animal growth. The *in vivo* experimental period lasted 63 days, of which 53 included the performance test of the animals, with measurement of feed consumption three times a week and fortnightly weighing. The final 10 days was devoted to tests of digestibility, nitrogen balance, microbial protein synthesis and enteric methane emission. Throughout the experiment, blood was collected fortnightly to assess hematological parameters (erythrocytes, hemoglobin, packed cell volume and leukocytes) and biochemical profiles such as (Glucose, total protein, albumin, aspartate aminotransferase, urea and creatinine) for the diagnosis of possible intoxication. Ruminal fermentation characteristics were investigated at three times (Initial, middle and end of the experiment) using pH, $N\text{-}NH_3$, SCFA, microorganism population size (such as *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, methanogenic archaea, anaerobic fungi and protozoa) through ruminal fluid collections. There was no influence of *Bt* 2036 on ruminal fermentation characteristics. It is concluded that, for the *in vitro* evaluation, only strain *Bt* 907 reduced DMD and OMD, with *F. succinogenes* population being maintained and for the *in vivo* studies, the inclusion of *Bt* 2036 spores in the diet did not negatively affect health and performance of lambs.

Keywords: Bacterial spores. Biochemical tests. Methane. Microbial protein. Nitrogen balance. Ruminal fermentation. Ruminal microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Microscopia de contraste de fase da colônia de *Bt* (A); Microscopia eletrônica do bacilo esporulado (B) mostrando o endósporo (b1) e inclusões cristalinas (b2); Cristais bipiramidais (C); Cristal cubóide (D).....26

Figura 2.2 - Representação da estrutura tridimensional da δ-endotoxina Cry3A com base na estrutura de Li, Carroll e Ellar (1991). O domínio I (azul) está envolvido na inserção na membrana e formação de poros, os domínios II (verde) e III (laranja) estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor. O domínio III é também responsável pela estabilidade da proteína.....28

Figura 3.1 - Variação na Abundância Relativa das populações de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, fungos anaeróbicos e arqueas metanogênicas após 24 h de incubação com base no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde ΔΔCt é a variação de "Ciclos limites", normalizada com população de *Bacteria* geral do rúmen 52

Figura 4.1 - Câmaras respirométricas. (A) Área externa da câmara; (B) Área interna da câmara...67

Figura 4.2 - Cabresto com 3 pontos de fixação: boca, ganacha e pescoço (A); Cangas coletoras de amostras confeccionadas em PVC (B).....69

Figura 4.3 - Variação na Abundância Relativa das populações de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, fungos anaeróbicos e arqueas metanogênicas após 24 h de incubação com base no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde ΔΔCt é a variação de "Ciclos limites", normalizada com população de *Bacteria* geral do rúmen.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Composição bromatológica da dieta base LANA-CENA/USP.....45

Tabela 3.2 - *Primers* gênero e espécie específicos para quantificação de bactérias ruminais através da técnica de qPCR.....47

Tabela 3.3 - Matéria seca degradada (MSD g/kg) e matéria orgânica degradada (MOD g/kg) das diferentes estirpes de *Bt* na fermentação ruminal *in vitro*.....49

Tabela 3.4 - Produção líquida de gases totais (PGT mL/g MS), produção líquida de metano (PCH_4 mL/g MS) e eficiência da conversão do metano ($ECCH_4$ %) das diferentes estirpes de *Bt* na fermentação ruminal *in vitro*.....50

Tabela 3.5 - Variáveis da fermentação ruminal *in vitro* e número de protozoários após 24 h de incubação em resposta à adição de diferentes estirpes de *B. thuringiensis*.....51

Tabela 4.1 - Composição bromatológica do volumoso e concentrado da dieta.....62

Tabela 4.2 - *Primers* gênero e espécie específicos para quantificação de bactérias ruminais através da técnica de qPCR.....66

Tabela 4.3 - Descrição do gradiente de fase móvel utilizado.....71

Tabela 4.4 - Parâmetros hematológicos de ovinos tratados e não tratados com esporos de *B. thuringiensis* durante o período experimental.....75

Tabela 4.5 - Parâmetros bioquímicos de ovinos tratados e não tratados com esporos de *B. thuringiensis* durante o período experimental.....76

Tabela 4.6 - Valores de pH, nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), relação Acetato:Propionato (A:P) e do número de protozoários (PTZ) presentes no líquido ruminal de cordeiros tratados e não tratados com esporos de *Bt* 2036.....77

Tabela 4.7 - Emissão de metano (CH_4) dos animais tratados e não tratados com esporos de *B. thuringiensis* avaliados pelas técnicas das câmaras respirométricas e do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF_6).....78

Tabela 4.8 - Consumo voluntário de matéria seca (CMS), peso vivo (PV), ganho em peso diário (GPD) e conversão alimentar (CA) dos animais tratados e não tratados com *Bt* 2036.....79

Tabela 4.9 - Consumo e coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes da dieta pelos animais tratados e não tratados com *Bt* 2036 durante o ensaio de digestibilidade aparente.....80

Tabela 4.10 - Derivados de purinas excretados na urina (DP) e absorção de nitrogênio microbiano (NM) por ovinos tratados e não tratados com *B. thuringiensis* 2036.....81

Tabela 4.11 - Balanço de nitrogênio (N) de ovinos alimentados e não alimentados com *B. thuringiensis*.....81

LISTA DE ABRAVIATURAS

A:P	Acetato:Propionato
A:P:B	Acetato:Propionato:Butirato
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
Alb	Albumina
AST	Aspartato Aminotransferase
Bt	*Bacillus thuringiensis*
CA	Conversão Alimentar
CDA	Coeficientes de Digestibilidade Aparente
Cel	Celulose
CENA	Centro de Energia Nuclear na Agricultura
CH_4	Metano
CMS	Consumo de Matéria Seca
CO_2	Dióxido de Carbônico
Cre	Creatinina
Cry	Crystal
DA	Digestibilidade Aparente
DMD	Dry matter degradability
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAr	Ácido Desoxirribonucleico ribossômico
DP	Derivados de Purina
$ECCH_4$	Eficiência da Conversão de Metano
EDTA	Ácido Etilenodiamina Tetra-Acético
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
Gli	Glicose
GPD	Ganho em Peso Diário
GPT	Ganho em Peso Total
H_2	Gás Hidrogênio
Hb	Hemoglobina
Hem	Hemácias
Hemi	Hemicelulose
Ht	Hematócrito
LANA	Laboratório de Nutrição Animal

Leu	Leucócitos
Lig	Lignina
MM	Matéria Mineral
MO	Matéria Orgânica
MOD	Matéria Orgânica Degradada
MS	Matéria Seca
MSD	Matéria Seca Degradada
N	Nitrogênio
NH_3	Amônia
NM	Nitrogênio Microbiano
$N\text{-}NH_3$	Nitrogênio Amoniacal / Ammonia Nitrogen
OMD	Organic Matter Degradability
PB	Proteína Bruta
PCH_4	Produção Líquida de Metano
PGT	Produção Líquida de Gases Totais
PM	Proteína Microbiana
PT	Proteínas Totais
PV	Peso Vivo
PVC	Policloreto de Polivinilia
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction in real time
SCFA	Short Chain Fatty Acids
SF_6	Hexafluoreto de Enxofre
Ure	Ureia
USP	Universidade de São Paulo
VIP	Vegetative Insecticidal Proteins

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
1.1 Objetivos.....22

2 REVISÃO DE LITERATURA.....23
2.1 Ovinocultura no Brasil 23
2.2 Verminoses em ovinos 24
2.3 Uso do *Bacillus thuringiensis* no controle de verminoses.....25
2.4 Fisiologia do digestório dos ruminantes.....29
2.4.1 Fermentação ruminal 29
2.4.1.1 Síntese de amônia e proteína microbiana 30
2.4.1.2 Relação ácidos graxos de cadeia curta e metano.....30
2.4.1.3 Produção de gases *in vitro*.....*31*
2.4.2 Digestibilidade aparente 32
2.5 *Bacillus thuringiensis* na dieta de ruminantes 32
Referências 34

3 DEGRADABILIDADE *IN VITRO* E PRODUÇÃO DE GASES SOB INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis*.....40
3.1 Introdução.....42
3.2 Materiais e Métodos 43
3.2.1 Origem e preparação dos esporos de *Bacillus thuringiensis* 43
3.2.2 Local e animais.....43
3.2.3 Preparação dos inóculos e das estirpes experimentais.....44
3.2.4 Ensaio *in vitro* de produção de gases.....45
3.2.5 Características da fermentação e da degradação ruminal.....46
3.2.6 Quantificação da microbiota ruminal 47
3.2.7 Análise estatística 48
3. 3 Resultados.....49
3.4 Discussão.....52
3.5 Conclusão 55
Referências 55

4 PARÂMETROS SANGUÍNEOS E RUMINAIS, EMISSÃO DE METANO, DIGESTIBILIDADE APARENTE E DESEMPENHO DE OVINOS TRATADOS COM *Bacillus thuringiensis* 58
4.1 Introdução 60
4.2 Materiais e Métodos 61
4.2.1 Esporos de *Bacillus thuringiensis* 61
4.2.2 Local e animais 61
4.2.3 Manejo e tratamentos 62
4.2.4 Amostras de sangue 63
4.2.4.1 Parâmetros hematológicos 63
4.2.4.2 Parâmetros bioquímicos séricos 64
4.2.5 Características da fermentação ruminal 64
4.2.5.1 Quantificação da microbiota ruminal 65
4.2.6 Avaliação da emissão de metano entérico 67
4.2.6.1 Câmaras respirométricas 67
4.2.6.2 Gás traçador hexafluoreto de enxofre 68
4.2.7 Avaliação de desempenho 69
4.2.8 Ensaio de digestibilidade aparente 70
4.2.9 Ensaio de síntese de proteína microbiana 70
4.2.10 Ensaio do balanço de nitrogênio 73
4.2.11 Análise estatística 74
4.3 Resultados 74
4.3.1 Parâmetros sanguíneos 75
4.3.2 Características da fermentação ruminal 76
4.3.3 Estado nutricional dos animais 79
4.4 Discussão 82
4.4.1 Parâmetros sanguíneos. 82
4.4.2 Características da fermentação ruminal 84
4.4.3 Estado nutricional dos animais 86
4.5 Conclusão 87
Referências 88

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil é uma atividade com grande potencial de produção de carne, leite, pele e lã. Um dos entraves desta criação é a resistência anti-helmíntica da maioria das espécies envolvidas em infecções parasitárias, fato que afeta não apenas a criação no Brasil, mas em qualquer lugar onde esta atividade é relevante.

Esta situação deu origem à necessidade de investigação por métodos alternativos para controle destas endoparasitoses. Dentre várias alternativas estudadas atualmente o uso de algumas espécies de *Bacillus* ssp., em especial *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), tem sido relatadas em trabalhos *in vitro* como sendo tóxicas para larvas e adultos de nematoides gastrintestinais de ruminantes (KOTZE et al., 2005; HU et al., 2010; BALOYI; LAING; YOBO, 2012).

A ação de *Bt* está relacionada à produção de um esporângio, durante a fase de esporulação, que contém inclusões proteicas cristalinas (δ-endotoxinas ou proteínas Cry) tóxicas a um grande número de insetos (SOBERÓN; GILL; BRAVO, 2009). Esses cristais, depois de ingeridos pelo parasita, são solubilizados pelo pH alcalino do trato intestinal liberando fragmentos que se ligam a receptores específicos das células epiteliais do intestino médio, resultando na lise das células pela formação de poros e ocasionando a morte do parasita (O'GRADY; AKHURST; KOTZE, 2007).

Embora alguns estudos *in vivo* com a inclusão de estirpes de *Bt* na dieta de ruminantes tenham encontrado efeitos promissores, devido à sua inocuidade ao mamífero e ação anti-helmíntica, poucos relatos da interferência deste bacilo na microbiota ruminal, na degradabilidade da dieta e nos produtos da fermentação ruminal são descritos. Também, informações sobre possíveis quadros de intoxicação, devido à presença das proteínas Cry, assim como possível interferência nos processos metabólicos, nutricionais e de saúde dos animais são quase inexistentes. Desta forma, buscou-se no presente estudo avaliar o efeito de estirpes de *Bt* na degradabilidade e digestibilidade da dieta, emissão de gases, microbiota ruminal, parâmetros sanguíneos e desempenho de ovinos.

1.1 Objetivos

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar os efeitos dos esporos das estirpes 907, 1192, 2036, 2493, 2496 e S1185 de *B. thuringiensis* no ensaio *in vitro* de produção de gases por meio da avaliação das seguintes variáveis:

- Degradabilidade da matéria seca e orgânica;
- Produção líquida de gases totais;
- Produção líquida de metano;
- Fermentação microbiana ruminal, como: pH, concentrações de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC);
- População microbiana ruminal, como: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, fungos anaeróbicos, arqueas metanogênicas e protozoários.

Esporos da estirpe selecionada no ensaio *in vitro* (*Bt* 2036) foram fornecidos na dieta dos ovinos a fim de avaliar possível toxicidade, interferência nos processos fermentativos do rúmen, digestibilidade e desempenho de ovinos por meio da investigação das seguintes variáveis:

- Parâmetros hematológicos, como: contagem de hemácias e leucócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito;
- Parâmetros bioquímicos, como: concentrações séricas de glicose, proteínas totais, albumina, aspartato aminotransferase, ureia e creatinina;
- Fermentação microbiana ruminal, como: pH, $N\text{-}NH_3$ e AGCC;
- População microbiana ruminal, como: *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, fungos anaeróbicos, arqueas metanogênicas e protozoários;
- Emissão de metano entérico por duas técnicas: câmaras respirométricas e gás traçador hexafluoreto de enxofre;
- Teste de desempenho;
- Digestibilidade aparente;
- Síntese de proteína microbiana;
- Balanço de nitrogênio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovinocultura no Brasil

Os ovinos foram uma das primeiras espécies a ser domesticada pelo homem com a finalidade de produção (lã, leite e carne), sendo até hoje de grande importância para a sustentação da população humana em todo o mundo.

No Brasil, o efetivo de ovinos apurado em 2012 pelo IBGE foi de 16,789 milhões de cabeças. A maior concentração do rebanho está no nordeste do País com 55,5 %, com destaque para a Bahia (16,8 %) e Ceará (12,3 %). No Sul do País detém 30 % da criação de ovinos, sendo que 24,4 % do efetivo nacional estão no Rio Grande do Sul (IBGE, 2012).

Dentre as raças criadas na Região Sul encontram-se as lanadas onde, adaptadas ao clima subtropical, se obtém os produtos como lã e carne. Já na Região Nordeste os ovinos mais rústicos adaptados ao clima tropical são os deslanados, e fornecem a produção de carne e peles (IBGE, 2005). Estados como São Paulo, Paraná e a Região Centro-Oeste também se destacam pelo crescimento da criação ovina (VIANA, 2008).

Para o sistema agroindustrial da ovinocultura mundial, em termos de valor de mercado, a carne é o produto de maior significância atualmente, ao contrário do passado, quando a lã era o produto mais rentável (SÓRIO, 2010). Cada brasileiro consome em média 0,7 kg de carne ovina por ano, colocando este alimento na 5ª posição entre as carnes mais tradicionais. Mesmo sendo o consumo considerado muito baixo, ao comparar-se com o consumo anual do brasileiro de carne bovina (37,4 kg), suína (14,1 kg) e de aves (43,9 kg), o rebanho ovino das regiões sul e nordeste vêm se mostrando insuficiente para suprir o mercado interno brasileiro, abrindo espaço para aumento contínuo das importações, principalmente do Uruguai (BRASIL, 2013). Embora tenha potencial para produzir carne de melhor qualidade do que a importada, de 2000 a 2008 o valor das importações brasileiras de carne ovina passou de 12 milhões de dólares para 23 milhões de dólares (SÓRIO, 2010).

Neste cenário, a ovinocultura brasileira encontra-se em expansão, mas com muitos desafios a serem enfrentados. Um deles refere-se ao manejo de criação e às condições climáticas do nosso país, que exercem grande influência em um dos principais problemas na criação de ovinos, as infecções parasitárias (AMARANTE, 2008), que vem sendo agravada pelo crescente quadro de resistência dos nematoides aos medicamentos anti-helmínticos tradicionais (FERREIRA et al., 2013).

2.2 Verminoses em ovinos

Um dos principais entraves no desenvolvimento dessa criação são as verminoses, que acometem ovinos em qualquer idade e sexo, causando grandes prejuízos na produtividade do rebanho devido ao baixo desempenho, perda em peso, redução da fertilidade e mortalidade dos animais (PERRY; RANDOLPH, 1999).

Espécies de nematódeos como *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides spp.*, *Cooperia curticei* e *Oesophagostomum colubianum* possuem maior prevalência e intensidade de infecção e são considerados os helmintos de maior impacto econômico na exploração de pequenos ruminantes (AMARANTE et al., 2004), mas as duas espécies predominantes em regiões de clima tropical e subtropical, como o Brasil, são o *H. contortus* e o *T. colubriformis*, sendo a primeira a principal espécie parasitária em ovinos (ROCHA et al., 2008). A infecção ocorre quando o animal ingere larvas infectantes (L3) presentes na pastagem. A contaminação do ambiente ocorre pelos próprios animais infectados que liberam, junto às fezes, os ovos férteis dos parasitas que irão eclodir e se desenvolver até L3, período esse que leva em torno de 7 dias.

O tratamento frequente e o uso indiscriminado e repetitivo dos anti-helmínticos em rebanhos ovinos tem sido a principal medida de controle das verminoses gastrintestinais, no entanto têm como consequência a seleção de populações de vermes resistentes aos diferentes grupos químicos utilizados (AMARANTE et al., 1992). Em 2003, em revisão publicada pela FAO, a resistência a anti-helmínticos em ovinos foi considerada amplamente disseminada, constituindo um sério obstáculo para o controle efetivo das infecções por helmintos.

Os quimioterápicos mais utilizados no tratamento das verminoses em pequenos ruminantes são os benzimidazóis, as avermectinas, os imidazotiazóis e as salicilanilicidas (COLES, 2005). Almeida et al. (2010) determinaram o nível de resistência de *H. contortus* e *T. colubriformis*, isolados de ovinos criados em Botucatu e Pratânia, aos grupos de anti-helmínticos levamisol, albendazol, ivermectina, moxidectina, closantel e triclorfom, quando concluíram que os isolados de *H. contortus* e *T. colubriformis* mostraram resistência múltipla a todos os grupos de anti-helmínticos testados.

Somente o uso das drogas anti-helmínticas tem se mostrado insuficiente para o controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos, tornando necessária a exploração de novas soluções para um controle mais sustentável. Hoste e Torres-Acosta (2011) postularam em sua revisão que a solução para o controle das infecções parasitárias baseiam-se em 3 princípios de ação; o primeiro é limitar o contato entre o ovino e as larvas infectantes no campo através de

métodos de manejo de pastagens; o segundo é melhorar a resposta do hospedeiro às infecções baseando na seleção genética de raças mais resistentes e/ou manipulando a nutrição dos animais; o terceiro princípio visa o controle das infecções parasitárias com base em produtos anti-helmínticos não convencionais, que possuem a capacidade afetar negativamente a biologia do parasita ou até eliminá-lo. Dentre os vários produtos anti-helmínticos não convencionais estudados (taninos, minerais e óleos essenciais), apresenta-se também o uso dos esporos do *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) como uma nova alternativa a ser testada, devido ao seu efeito nematicida contra pragas urbanas e agrícolas (BRAVO et al., 2011).

A integração das diferentes ferramentas de controle parece ser um pré-requisito para o manejo sustentável das infecções gastrintestinais por nematoides de ovinos (HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011), por isso, é notável o crescente interesse na busca de novos métodos alternativos para reduzir a dependência nos tratamentos convencionais.

2.3 Uso do *Bacillus thuringiensis* no controle de verminoses

B. thuringiensis é uma bactéria gram positiva encontrada em quase todo tipo de ambiente da biosfera, constituindo a maioria da microbiota do solo (LAMBERT; PEFEROEN, 1992). Desenvolve-se em condições aeróbicas e, sob certas restrições, como na ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, entra em processo de esporulação durante a fase estacionária (YAMAMOT; DEAN, 2000) onde produz um endósporo com inclusões cristalinas paraesporais constituídas por proteínas C*rystal* (Cry) também conhecidas por δ-endotoxinas (Figura 2.1), que são tóxicas para uma vasta gama de insetos (O'GRADY; AKHURST; KOTZE, 2007; SOBERÓN; GILL; BRAVO, 2009) e ainda esta presente nos atuais transgênicos comerciais e biopesticidas (CAROZZI et al., 1991).

Estes cristais podem representar mais de 25 % do peso seco da célula mãe (AGAISSE; LERECLUS, 1995) e cada cristal pode ser formado por uma ou mais proteínas Cry, que são codificadas pelos genes Cry localizados em plasmídios (LERECLUS; DELÉCLUSE; LECADET, 1993; COSTA, 2009). Atualmente, existem 428 proteínas Cry descritas, que estão classificadas em 55 classes Cry. As toxinas Cry têm sido classificadas de acordo com sua homologia na sequência de aminoácidos, na qual a denominação “Cry” apresenta 4 ranques hierárquicos de números e letras (maiúsculas e minúsculas), como por exemplo, Cry3Aa2 (PINTO et al., 2009).

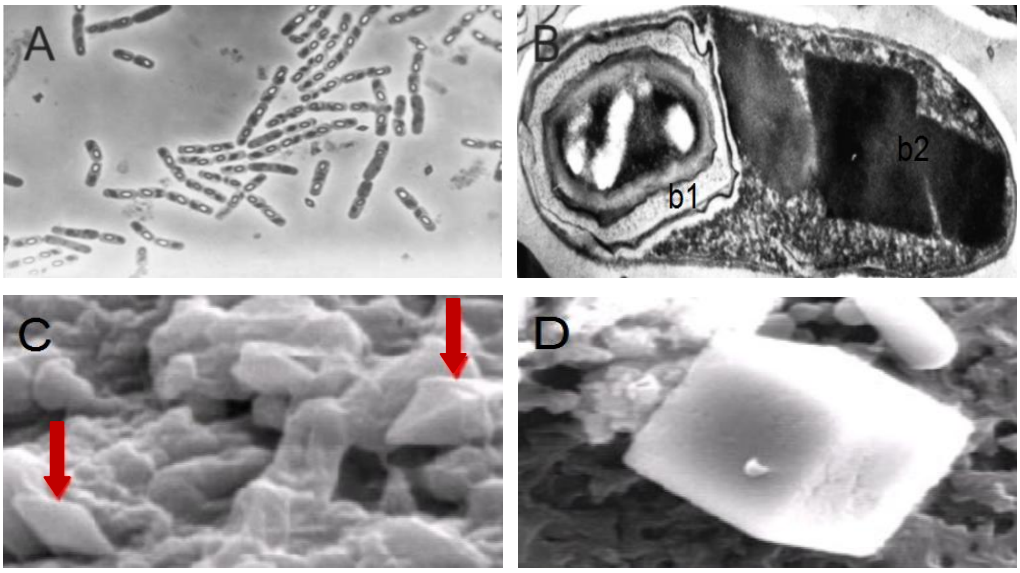

Figura 2.1 – Microscopia de contraste de fase da colônia de *Bt* (A); Microscopia eletrônica do bacilo esporulado (B) mostrando o endósporo (b1) e inclusões cristalinas (b2); Cristais bipiramidais (C); Cristal cubóide (D). Adaptado de Lima (2010) e Valicente; Souza (2004)

Embora a maior parte dos estudos sobre a entopatogenicidade dos *Bt* esteja nas proteínas Cry, diversas estirpes de *Bt* vêm sendo isoladas no mundo inteiro na busca de isolados mais efetivos. Diversas linhagens de *Bt* produzem em adição às endotoxinas, uma série de outras toxinas que podem ou não participar da ação entomopatogênica, tais como as proteínas *Cytolytic* (Cyt), δ-endotoxinas encontradas principalmente em isolados de *Bt* ativos contra dípteros (MAAGD et al., 2003), e as proteínas *Vegetative Insecticidal Proteins* (VIP) que dividem-se em VIP 1 e VIP 2, ativos para algumas espécies de Coleópteros (ESPINASSE et al., 2003), e VIP 3 que é ativa contra um amplo espectro de insetos Lepidópteros (YU et al., 1997). Outros fatores de virulência, como as β- exotoxinas, α-exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases, lecitinases e fosfolipases, foram identificados em alguns isolados de *Bt* (GUTTMANN; ELLAR, 2000; MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001), entretanto a exata contribuição de cada fator na virulência das bactérias é desconhecida.

Descrito pela primeira vez por Berliner em 1911, em homenagem à província de Thuringia na Alemanha, o *Bt* já tinha sido isolado em 1901 pelo biólogo S. Ishiwata como o agente causal da "sotto-disease". Em 1908, Iwabuchi o denominou como *Bacillus sotto Ishiwata*, que posteriormente foi considerado nome inválido (POLANCZYK; ALVES, 2003). Tem sido estudada na Europa para controle de Lepidópteros desde a década de 30 por apresentar grande toxicidade aos invertebrados sem apresentar efeitos adversos para as espécies aquáticas e terrestres (WEI et al., 2003).

Foi de interesse dos Estados Unidos na década de 50 quando o controle de Lepidópteros de hortaliças e frutas de alto valor comercial passou a ser necessário (LAMBERT; PEFEROEN, 1992; BEEGLE; YAMAMOTO, 1992). Em 1998 o *Bt* representou em 90 % a 95 % do mercado mundial de bioinseticidas por apresentar alta especificidade contra insetos das ordens Lepitdoptera, Coleoptera e Diptera (VALADARES-INGLIS; SHILER; SOUZA, 1998) e, após o cultivo de plantas transgênicas, em 2005, 24 % do algodão cultivado no mundo expressava uma proteína Cry de *Bt* (JAMES, 2008). Atualmente tornou-se o inseticida biológico mais bem sucedido, representando aproximadamente 2 % do mercado total de inseticidas (BRAVO et al., 2011), sendo suas principais utilizações o controle de pragas agrícolas e o controle de vetores de doenças humanas.

O efeito nematicida do *Bt* inicia-se quando um parasito suscetível ingere os esporos com as inclusões cristalinas. Estes cristais são pró-toxinas, com massa molecular variando de 130 a 140 kDa, que, ao serem solubilizados em pH alcalino e pelas proteases do trato intestinal do hospedeiro, convertem-se em polipeptídeos de 55 a 65 kDa que são tóxicos (MAAGD et al., 2003) e possuem a capacidade de ligar-se à receptores específicos das células epiteliais do intestino médio da larva, resultando no desequilíbrio iônico e osmótico, formação de poros, lise celular e morte do parasita (O'GRADY; AKHURST; KOTZE, 2007; BRAR et al., 2007).

A estrutura tridimensional das formas ativas das toxinas Cry1 (GROCHULSKI et al., 1995), Cry2 e Cry3 (LI; CARROLL; ELLAR, 1991), quando analisadas em cristalografia de raio X, mostraram-se muito similares, cada uma apresentando 3 domínios. O domínio I, N-terminal, consiste em 7 α-hélices e participa na inserção da membrana intestinal e formação do poro. O domínio II, ou β-prisma, apresenta 3 folhas dobradas simétricas, formando as β-folha. O domínio III C-terminal consiste em duas β-folha antiparalelas. Estes 2 domínios estão envolvidos no reconhecimento dos receptores e ligação, além do domínio III também ter sido associado à formação de poros (MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001) (Figura 2.2).

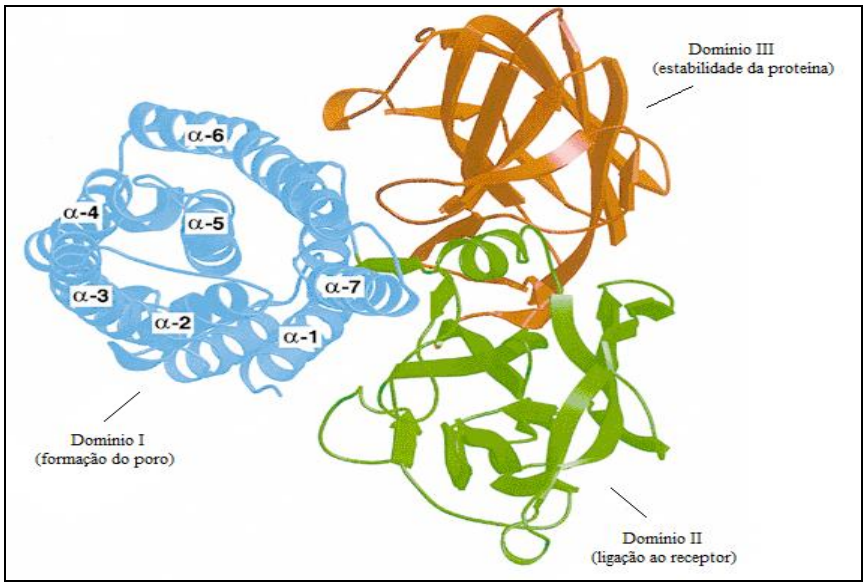

Figura 2.2 - Representação da estrutura tridimensional da δ-endotoxina Cry3A com base na estrutura de Li, Carroll e Ellar (1991). O domínio I (azul) está envolvido na inserção na membrana e formação de poros, os domínios II (verde) e III (laranja) estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor. O domínio III é também responsável pela estabilidade da proteína

Anteriormente utilizada apenas para controle de pragas, a ação da toxicidade das proteínas Cry, produzidas por *Bt*, vem sendo demonstrada para uma vasta variedade de organismos, como os nematoides (CAPELLO et al., 2006) e protozoários (KONECKA et al., 2007). Algumas δ-endotoxinas de *Bt* já foram descritas com especificidade aos nematoides e são agrupadas nas classes 5, 6, 12, 13 e 21 sendo caracterizadas pelas proteínas Cry5, Cry6, Cry12, Cry13 e Cry21, respectivamente (PINTO et al., 2009). Estudos *in vitro* mostraram que a estirpe IB-16 de *Bt* possui 98 % de eficácia na morte de ovos e larvas de *H. contortus* (L´OPEZ-ARELLANO; FLORES-CRESPO; MENDOZA-DE-GIVES, 2002). Estirpes de *Bt* com genes Cry5A, Cry5B, Cry13 presentes mostraram-se altamente tóxicas para larvas e vermes adultos de parasitos gastrintestinais de ovinos como o *H. contortus*, *T. colubriformis* e *O. circumcincta* em testes *in vitro* (KOTZE et al., 2005). Esta maleabilidade em agir nas diversas fases da vida dos helmintos faz com que o uso do *Bt* seja muito vantajosa em comparação às abordagens quimioterapeuticas tradicionais. (SIEGEL, 2001).

Embora a abordagem do *Bt* para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes seja promissora, poucos relatos sobre a ação e interferência destes esporos, e proteínas Cry, no metabolismo dos animais foram relatados. Uma investigação torna-se necessária, a fim de comprovar sua inocuidade aos ovinos e indicar seu uso.

2.4 Fisiologia do digestório dos ruminantes

2.4.1 Fermentação ruminal

Os ruminantes possuem a capacidade peculiar em transformar alimentos fibrosos (celulose) em ácidos orgânicos, aminoácidos e vitaminas que estimulam o seu crescimento, reprodução e produção de carne, leite e lã (OLIVEIRA; ZANINE; SANTO, 2007). O desenvolvimento desta grande capacidade digestiva é mérito da relação simbiótica mutualística que estes animais possuem com micro-organismos ruminais capazes de utilizar a parede celular dos vegetais e nitrogênio não proteico como fonte de nutrientes.

A microbiota ruminal sobrevive em sinergismo e antagonismo e é constituída principalmente de bactérias (10^{10} - 10^{11} células/mL), protozoários (10^4 - 10^6 células/mL), fungos anaeróbios (10^3 - 10^5 zoósporos/mL), vírus bacteriófagos (10^8 - 10^9/mL) (KAMRA, 2005) e arqueas metanogênicas (BAKER, 1999). O animal hospedeiro (ruminante) não tem controle direto sobre o metabolismo destes em seu sistema digestório, mas são capazes de manter as condições ideais para promover o crescimento desta microbiota, favorecendo assim o processo fermentativo.

O rúmen fornece um ambiente favorável ao desenvolvimento contínuo da população microbiana pelos seguintes fatores: temperatura entre 38 a 42 ^oC (média de 39 ^oC), anaerobiose, pH variando entre 5,5 a 7,0 (média de 6,8), manutenção dos padrões de motilidade característicos do segmento ruminorreticular e presença de micro-organismos (LANA, 2005).

A fermentação em ruminantes é resultado da atividade física e microbiológica do rúmen, e tem como principais produtos finais a amônia (NH_3), proteína microbiana (PM), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), vitaminas do complexo B e vitamina K, e produtos não desejáveis para o animal e para a microbiota ruminal como o nitrato, gás hidrogênio (H_2), gás carbônico (CO_2) e metano (CH_4) (OWENS; GOETSCH, 1993).

2.4.1.1 Síntese de amônia e proteína microbiana

As sínteses de NH_3 e PM estão relacionadas aos mecanismos de reciclagem de nitrogênio. A ureia é a principal forma que os mamíferos excretam compostos nitrogenados pelos rins, mas, em ruminantes, esta pode ser secretada para dentro do rúmen, pelo transporte direto do sangue para o rúmen ou pela deglutição da saliva rica em ureia (ciclo da ureia), para ser rapidamente transformada em NH_3 pela ação da enzima urease, dando origem ao CO_2 e a NH_3 (ØRSKOV, 1992). Determinadas bactérias promovem a combinação de NH_3 com os esqueletos de carbono resultantes da degradação dos carboidratos, sintetizando aminoácidos que são utilizados na constituição de sua proteína e, que mais tarde, suprirá em 50 a 80 % da proteína absorvida pelo hospedeiro (VALADARES FILHO, 1995).

Geralmente, os alimentos fornecidos aos ruminantes possuem baixo teor de purinas, a maioria das quais é degradada no rúmen como resultado da fermentação (CHEN; GOMES, 1995). Desta forma, estima-se que os derivados de purina (DP) que podem ser encontrados nas excretas urinárias dos ruminantes estão diretamente relacionados à absorção de purinas microbianas no intestino (PUCHALA; KULASEK, 1992; PEREZ et al., 1996).

Os DP urinários compreendem a alantoína, o ácido úrico, a hipoxantina e a xantina, e sua excreção é diretamente proporcional à absorção de purinas (PUCHALA; KULASEK, 1992; MOORBY et al., 2006). Assim, podem fornecer uma estimativa quantitativa do fluxo de PM se a razão entre purina e proteína nos micro-organismos ruminais for assumida como constante (TAMMINGA; CHEN, 2000).

2.4.1.2 Relação ácidos graxos de cadeia curta e metano

Outro aspecto importante da fisiologia ruminal é a formação dos AGCC pelos micro-organismos ruminais, pois, sendo energéticos, suprem de 60 a 80 % da energia dietética dos ruminantes (FURLAN; MACARI; FARIA FILHO, 2011). Os principais AGCC encontrados no ambiente ruminal são os ácidos fórmico, acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, 2-metil-butírico, hexanóico e heptanóico, e são produzidos a partir de pequenas quantidades de compostos orgânicos, mediante o padrão microbiano específico. Sendo absorvidos continuamente no rúmen, os ácidos acético, propiônico e butírico são os AGCC predominantes, produzidos principalmente na fermentação de carboidratos como celulose, hemicelulose, pectina, amido e açúcares. O acetato é a principal fonte de energia

metabolizável para o ruminante, por ser o principal AGCC produzido no rúmen, enquanto que o propionato é o principal substrato gliconeogênico, importante para a manutenção dos níveis plasmáticos de glicose (BERGMAN, 1990).

A relação acetato:propionato (A:P) é principalmente influenciada pela relação volumoso:concentrado das dietas, sendo indicativo do valor nutricional destas (ANTUNES; RODRIGUEZ; SALIBA, 2011). O excesso de concentrado na dieta favorece a formação de ácido láctico favorecendo a queda do pH e inibição de micro-organismos importantes para a digestão das fibras, entretanto, dietas baseadas em níveis ótimos de concentrado favorecem a redução do H_2 pela formação de propionato, reduzindo assim a relação A:P. Em contrapartida, dietas baseadas em alimentos volumosos favorecem a produção de ácido acético, aumento da relação A:P e excesso de H_2 no rúmen (ANDRIGUETTO, 2002). Para o re-equilíbrio das condições de fermentação no rúmen, as arqueas metanogênicas utilizam o excesso de H_2 para redução de CO_2 transforma-os em CH_4, que será totalmente eliminado pelos processos de eructação e expiração, resultando em perdas energéticas que podem variar de 2 a 12 % da energia bruta consumida (JOHNSON; JOHNSON, 1995) e prejuízo econômico, uma vez que, parte da energia fornecida pelo alimento, acaba não sendo utilizada pelo animal e é desviada para o ambiente (REIS; MORAIS; SIQUEIRA, 2006).

Sendo assim, o conhecimento de como ocorre e quão eficiente é a degradação dos alimentos pelos micro-organismos ruminais é de extrema importância em estudos de nutrição para ruminantes. As técnicas *in vitro* são alternativas viáveis, pois são capazes de representar o processo de fermentação que ocorre no rúmen e estimam quantitativamente a taxa e o grau de degradação, similar aos resultados obtidos *in vivo*.

2.4.1.3 Produção de gases *in vitro*

A técnica *in vitro* de produção de gases baseia-se na degradação dos alimentos pelos micro-organismos ruminais tornando possível mensurar o desaparecimento de material no decorrer do tempo e visualizar a cinética fermentativa, uma vez que esta técnica também mede a formação de subprodutos da ação microbiana durante o processo de degradação (BUENO, 2002). Desta forma a degradabilidade do alimento é estimada por correlação entre a produção microbiana de gás e a matéria orgânica fermentada (BERCHIELLI; VEGA-GARCÍA; OLIVEIRA, 2011).

O ensaio é feito pela simulação do ambiente ruminal, utilizando alimentos moídos, meio anaeróbico e inóculo preparado a partir de uma mistura de micro-organismos ruminais (WILLIANS, 2000). O volume de gases produzidos pode ser aferido por predições do volume a partir de dados de pressão, com o uso de um transdutor (THEODOROU et al., 1994).

Embora a técnica *in vitro* de produção de gases seja representativa às condições reais do animal, está exclusivamente relacionada à fermentação que ocorre no rúmen e não à digestibilidade que ocorre em todo o trato gastrintestinal. Também, não considera as condições comportamentais do animal podendo, um alimento, apresentar ótimos resultados em relação à sua degradação pelos micro-organismos ruminais, mas não ser aceito pelos animais para o consumo. Sem dúvida alguma, a melhor forma de avaliar a introdução de um alimento na dieta do ruminante é pelo ensaio de desempenho animal.

2.4.2 Digestibilidade aparente

Após os processos fermentativos que ocorrem no rúmen, os nutrientes não degradados, como carboidratos, proteínas, gorduras e proteína microbiana, seguem para o abomaso e intestino delgado onde serão submetidos ao processo de digestão como nos animais não ruminantes.

Para avaliar estes parâmetros a metodologia descrita por Tilley e Terry (1963) ainda é utilizada para predição da digestibilidade *in vitro*, simulando a degradação ruminal por 48 h seguida por digestão com pepsina e ácido fraco (pH 2,0) por 48 h. Entretanto, metodologias *in vivo* são necessárias por serem consideradas mais confiáveis.

Os ensaios *in vivo* sobre digestibilidade normalmente referem-se à digestibilidade aparente de um alimento (BUENO, 2002), pois é verificada nas fezes a fração não digerida do alimento acrescida da porção metabólica representada principalmente pelas secreções endógenas, contaminação por micro-organismos e descamações do epitélio (BERCHIELLI; VEGA-GARCÍA; OLIVEIRA, 2011).

2.5 *Bacillus thuringiensis* na dieta de ruminantes

Relatos da interferência de estirpes de *Bt* no metabolismo de roedores pela adição na dieta são amplamente encontrados devido às extensas pesquisas na área de organismos

geneticamente modificados (BISHOP; JOHNSON; PERANI, 1999; OLIVEIRA-FILHO et al., 2009; LEMOS et al., 2013), entretanto, em ruminantes, estes dados são escassos devido à grande complexidade do seu sistema digestivo. Também, o conhecimento da viabilidade destas estirpes, esporos, células vegetativas ou toxinas purificadas até a chegada ao local desejado para sua ação nos endoparasitas é de extrema importância nesta área de estudo.

Hadley et al. (1987) estudaram a adição na dieta de ± 10^{12} esporos/d de preparações comerciais da variedade de *Bt* Kurstaki (substâncias teste D ou T) em ovinos mestiços (merino/rambouillet) por 5 meses e não encontraram anormalidades clínicas, no consumo ou ganho em peso, tampouco nos resultados hematológicos e bioquímicos. Na necropsia, amostras de fígado, baço, rim, coração, pulmão e todas as lesões de etiologia bacteriana foram coletadas para exame microbiológico, além do sangue arterial, colhido pouco antes do abate. Os autores constataram que todos os animais expostos aos bacilos apresentaram ausência de qualquer alteração patológica, sugerindo que o *Bt* estudado não interfere na saúde dos ovinos quando ingerido por via oral.

Em estudos de viabilidade do *Bt*, Adams e Hartman (1965) estudaram a inclusão de células vegetativas (estirpe ATCC 10792) e esporuladas (produto comercial) de *Bt* Berliner no rúmen de bovinos, pela abertura da fístula, demonstraram decréscimo de 90 % da viabilidade das células vegetativas após 4 h da inclusão, semelhante à taxa de células vegetativas de outras bactérias exógenas. A contagem e a viabilidade das células esporuladas permaneceram constantes após 24 h da inclusão, demonstrando incapacidade de germinação e proliferação, e resistência ao ambiente ruminal. Os autores sugerem que grande proporção dos esporos de *Bt* fornecido na dieta deve sobreviver à passagem do trato gastrintestinal.

Recentemente, Ahmed, Laing e Nsahlai (2013) relataram a redução de larvas L3 em culturas fecais de ovinos merinos alimentados por 7 dias com 10^6 esporos de *Bt* AB2/d por kg de peso vivo (PV), comprovando a resistência e viabilidade destes esporos após a passagem pelo trato gastrintestinal. No mesmo estudo, não houve redução na contagem de ovos por grama destes animais, sugerindo não interferência dos esporos na fertilidade de vermes adultos. López et al. (2006) relataram atividade biocida de *Bt* IB-16 com reduções de 73,8 % e 53,3 % em vermes adultos de *H. contortus* após 7 e 30 dias, respectivamente, após a adição por via oral de 0,5 mg/kg PV da toxina solúvel em água na dieta dos ovinos.

Para tornar viável o oferecimento de *Bt* aos animais infectados como método alternativo no controle de parasitas, mais estudos nesta área são necessários a fim de conhecer as reais interações entre *Bt* e metabolismo animal.

Referências

ADAMS, J. C.; HARTMAN, P. A. Longevity of *Bacillus thuringiensis* Berliner in the rumen. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 7, n. 2, p. 245-247, 1965.

AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 21, n. 177, p. 6027-6032, 1995.

AHMED, M. A.; LAING, M. D.; NSAHLAI, I. V. Studies on the ability of two isolates of Bacillus thuringiensis, an isolate of Clonostachys rosea f. rosea and a diatomaceous earth product to control gastrointestinal nematodes of sheep. **Biocontrol Science and Technology**. New York, v. 23, n. 9, p. 1067-1082, 2013.

ALMEIDA, F. A. et al. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 59, n. 4, p. 622-625, 2010.

AMARANTE, A. F. T. et al. Efeito da administração de Oxfendazol, Ivermectina e Levamisole sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 29, p. 31-38, 1992.

AMARANTE, A. F. T. et al. Resistance of Santa Ines, Sulffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, p. 91-105, 2004.

AMARANTE, A. F. T. Fatores que afetam a resistência dos ovinos à verminose. In: VERÍSSIMO, C. J. **Alternativas de controle da verminose em pequenos ruminantes**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 2008. p. 15-21.

ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Nutrição animal**. As bases e os fundamentos da nutrição animal. São Paulo: Nobel, 2002. v. 1.

ANTUNES, R. C. et al. Metabolismo dos carboidratos não estruturais. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 239-260.

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

BEEGLE, C. C. YAMAMOTO. T. History of *Bacillus thuringiensis Berliner* research and development. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 124, p. 587-616, 1992.

BALOYI, M. A.; LAING, M. D.; YOBO, K. S. Use of mixed cultures of biocontrol agents to control sheep nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 184, n. 2-4, p. 367-370, 2012.

BERCHIELLI. T. T.; VEGA-GARCIA, A.; OLIVEIRA, S. G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. In: BERCHIELLI. T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G**. Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 415-436.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, p. 567-590, 1990.

BISHOP, A. H.; JOHNSON, C.; PERANI, M. The safety of Bacillus thuringiensis to mammals investigated by oral and subcutaneous dosage. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 15, p. 375-380, 1999.

BRAR, S. K. et al. *Bacillus thuringiensis* proteases: production and role in growth, sporulation and synergism. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 773-790, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Animal**. Mercado interno. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno>. Acesso em: 10 set. 2013.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, p. 423-431, 2011.

BUENO, I. C. S. **Cinética digestiva e síntese microbiana ruminal em ovinos alimentados com fenos de três qualidades distintas**. 2002. 97 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

CAPPELLO, M. et al. A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hook worm parasite *Ancylostoma ceylanicum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 103, p. 15154-15159, 2006.

CAROZZI, N. B. et al. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, n. 11, p. 3057-3061, 1991.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives** – an overview of the technical details. Aberdeen, UK: Rowett Research Institute, International Feed Resources Unit, 1995. 21 p. (Occasional Publication, 1992).

COSTA, J. R. V. **Predição *in vitro* da atividade tóxica de isolados de B*acillus thuringiensis* berliner e efeito sinergístico no controle de larvas de *Aedes aegypti* (l.) (diptera: culicidae)**. 2009. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

COLES G. C. Anthelmintic resistance - Looking to the future: a perspective. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 78, p. 99-108, 2005.

ESPINASSE, S. et al. Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of Bacillus thuringiensis. **Current Microbiology**, New York, v. 47, n. 6, p. 501-507, 2003.

FAO. **Resistencia a los antiparasitarios**: estado actual con énfasis en América Latina. Rome, 2003. 51 p.

FERREIRA, L. E. et al. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental Parasitology**, New York, v. 134, n. 3, p. 327-332, 2013.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. Anatomia e fisiologia do trato gastrintestinal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 1-25.

GROCHULSKI, P. et al. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin – crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 254, p. 447–464, 1995.

GUTTMANN, D. M.; ELLAR, D. J. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the Bacillus cereus complex for a selection of known and putative B. thu-ringiensis vitulence factors. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 188, p. 7-13, 2000.

HADLEY, W. M. et al. Five-month oral (diet) toxicity/infectivity study of *Bacillus thuringiensis* insecticides in sheep. **Fundamental and Applied Toxicology**, Orlando, v. 8, n. 2, p. 236–242, 1987.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, n. 1-2, p. 144-154, 2011.

HU, Y. et al. Discovery of a highly synergistic anthelmintic combination that shows mutual hypersusceptibility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 107, p. 5955–5960, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 1-38, 2005. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2005> Acesso em: 03 ago. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 40, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2012/default.shtm> Acesso em: 13 jan. 2014.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops**: 2008. Ithaca, NY: ISAAA, 2008. (ISAAA Briefs, 39).

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

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, Bangalore, v. 89, p. 124-134, 2005.

KONECKA, E. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 94, p. 56–63, 2007.

KOTZE, A. C. et al. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, p. 1013–1022, 2005.

LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*: facts and mysteries about a successful biopesticide. **Bioscience**, Washington, DC, v. 42, p. 112-122, 1992.

LEMOS, J. J. M. et al. Effect of sub-lethal doses of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai* and deltamethrin with regard to fertility and organ toxicity in pregnant albino rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Jena, v. 65, n. 5, p. 489-495, 2013.

LANA, R. P. **Nutrição e alimentação animal** (mitos e realidades). 1. ed. Viçosa: UFV, 2005, 343 p.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, M.; LECADET, M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. et al. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide**: theory and practice. Chichester, NY: John Wiley & Sons, 1993. p. 37-69.

LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, London, v. 353, p. 815–821, 1991.

LIMA, G. M. S. Proteínas bioinseticidas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 7, p. 119-137, 2010.

LOPEZ-ARELLANO, M. E. et al. *In vitro* lethal activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against Haemonchus eggs and infective larvae. **International Journal of Nematology**, New Delhi, v. 12, p. 66–72, 2002.

LÓPEZ, M. E. et al. Use of *Bacillus thuringiensis* toxin as an alternative method of control against *Haemonchus contortus*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1081, p. 347–354, 2006. doi: 10.1196/annals.1373.049.

MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.

MAAGD, R. A. et al. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bactéria. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 37, p. 409-433, 2003.

MOORBY, J. M. et al. Increased concentration of water-soluble carbohydrate in perennial ryegrass (Lolium perenne L.). Evaluation in dairy cows in early lactation. **Grass and Forage Science,** Oxford, v. 61, p. 52-59, 2006.

O'GRADY, J.; AKHURST, R. J.; KOTZE, A. C. The requirement for early exposure of Haemonchus contortus larvae to Bacillus thuringiensis for effective inhibition of larval development**. Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 150, n. 1-2, p. 97-103, 2007.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTO, E. M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista Eletrônica de Veterinária**, Madrid, v. 8, n. 6, p. 1-12, 2007.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. et al.Toxicity Assessment and Clearance of Brazilian Microbial Pest Control Agents in Mice. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 83, n. 4, p.570-574, 2009.

ØRSKOV, E. R. **Protein nutrition in ruminant**. 2. ed. New York, NY: Academic Press, 1992.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. Long Grove: Waveland Press, 1993. p. 145-171.

PEREZ, J. F. et al. Determination of rumen microbial-nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using 15N and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenal. **British Journal Nutrition**, Cambridge, v. 75, p. 699-709, 1996.

PERRY B. D.; RANDOLPH T. F. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 84, p. 145-168, 1999.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia**, Montevidéu, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

PINTO, L. M. N. et al. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia. Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, v. 11, n. 38, p. 24-31, 2009. Edição especial: ecotoxicologia de *Bacillus thuringiensis*.

PUCHALA, R.; KULASEK, G. W. Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and excretion of purine derivatives. **Canadian Journal of Animal Science**, Albany, v. 72, n. 4, p. 821-830, 1992.

REIS, R. A.; MORAIS, J. A. S.; SIQUEIRA, G. R. Aditivos alternativos para a alimentação de ruminantes. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL - CLANA, 2., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Colégio Latino-Americano de Nutrição Animal, 2006.

ROCHA, R. A. et al. Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 75, n. 2-3, p. 135-143, 2008.

SIEGEL, J. P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 77, p. 13–21, 2001.

SOBERÓN M.; GILL S. S.; BRAVO A. Signaling versus punching hole: how do Bacillus thuringiensis toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, p. 1337–1349, 2009.

SÓRIO, A. **Breve panorama do sistema agroindustrial da ovinocultura**. Sobral, CE: Agência de Notícias de Caprinos e Ovinos, 2010. Disponível em: <http://anco.cnpc.embrapa.br/artigos.php?sequencia=49>. Acesso em: 23 ago.2013

TAMMINGA, S.; CHEN, X.B. Animal-based techniques for the estimation of protein value. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; OMED, H. M. (Ed.). **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap. 11, p. 215-232.

THEODOROU, M. K. et al. A simple gás production method using a pressure transducter to determine the fermentation kinetics of rumintant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 185-197, 1994.

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

VALADARES FILHO, S. C. Eficiência da síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína bruta, em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS DE RUMINANTES, 1995, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 1995. p. 355-388.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; SOUZA, M. T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1998. v. 1, p. 201-230.

VALICENTE, F. H.; SOUZA, I. R. P. Cultivo e preparo de Bacillus thuringiensis para macroscopia eletronica de varredura. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25.; SIMPOSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, SPODOPTERA FRUGIPERDA, 1., 2004, Cuiabá, MT. **Da agricultura familiar ao agronegócio**: tecnologia, competitividade e sustentabilidade; resumos expandidos. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo; Empaer ABMS, 2004.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Porto Alegre, v. 4, n. 12, 9 p. 2008.

WEI, J. Z. et al. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**,Washington, DC, v. 100, p. 2760-2765, 2003.

WILLIAMS, B. A. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; AXFORD, R. F. E.; OMED, H. M. (Ed.). **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Wallingford: CAB Publishing, 2000. cap. 10, p. 189-214.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: CHARLES, J.-F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria**: from laboratory to field. Dordrecht, NE: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 81–100.

YU, C. G. et al. The Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein VIP3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, n. 2, p. 532-536, 1997.

3 DEGRADABILIDADE *IN VITRO* E PRODUÇÃO DE GASES SOB INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis*

Resumo: O efeito da adição de esporos de 6 diferentes estirpes de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (907, 1192, 2036, 2493, 2496 e S1185) na degradabilidade *in vitro* e na produção de gases foi investigado. A simulação do ambiente ruminal foi realizada em garrafas de vidro contendo 5,7 x 10^6 esporos das diferentes estirpes de *Bt*, incubadas a 39 ^oC por 24 h. O delineamento foi o inteiramente casualizado com 7 tratamentos: controle sem *Bt* e as estirpes já mencionadas em 4 repetições (inóculos) em duplicata. O processo fermentativo foi avaliado pelos valores de matéria seca degradada (MSD), matéria orgânica degradada (MOD), produção líquida de gases totais (PGT), produção líquida de metano (PCH_4), eficiência da conversão de metano ($ECCH_4$), pH e pelas concentrações de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) e de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). As populações de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, fungos anaeróbicos e arqueas metanogênicas foram quantificadas por *Quantitative Polymerase Chain Reaction* em tempo real (qPCR), enquanto que os protozoários foram contados em microscópio de luz. A estirpe *Bt* 907 levou a diminuição da MSD e MOD em relação ao controle, sem interferir na população de *F. succinogenes*, enquanto as demais estirpes (*Bt* 1192, 2036, 2493, 2496 e S1185) reduziram a população desta bactéria em relação ao controle. Com exceção da estirpe 907, os *Bt* 1192, 2036, 2493, 2496 e S1185 não interferiam na degradabilidade do alimento, na produção de gases e nos processos fermentativos analisados pela técnica *in vitro* de produção de gases.

Palavras-chave: Esporos bacterianos. Fermentação ruminal. Metano.

Abstract: Six different *B. thuringiensis* strains (907, 1192, 2036, 2493, 2496 and S1185) were used to evaluate *in vitro* gas production using a semi-automatic gas production system. Rumen simulation was performed in glass bottles containing $5.7x10^6$ spores of different strains of *Bt*, incubated at 39 °C for 24 h. The design was completely randomized with seven treatments: control without *Bt* strains already mentioned in four replications (inoculum) in duplicate. The fermentation process was evaluated by the dry matter degradability (DMD), organic matter degradability (OMD), net gas production, methane output, conversion efficiency, pH, ammonia nitrogen and short chain fatty acids. Ruminal microorganisms (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, anaerobic fungi, methanogenic archaea and protozoa) were quantified by qPCR in real time, while protozoa were counted under a light microscope. The use of the *Bt* 907 strain resulted in a decrease of DMD and OMD compared to the control without interfering with the population of *F. succinogenes*, while other strains (*Bt* 1192, 2036, 2493, 2496 and S1185) reduced the bacterium population. Except for strain *Bt* 907, other strains of *Bt* (1192, 2036, 2493, 2496 and S1185) did not interfere in the degradability of the diets, gas production and ruminal fermentation.

Keywords: Bacterial spores. Methane. Ruminal fermentation.

3.1 Introdução

Em um mundo onde os produtores de ovinos estão enfrentando problemas crescentes devido à rápida propagação da resistência à anti-helmínticos, a batalha contra os parasitas gastrintestinais destes ruminantes tornou-se uma tarefa difícil. Como método alternativo de controle, *Bt* mostrou-se eficaz com efeito nematicida nas fases de vida livre e adulta de diversas espécies de endoparasitas (KOTZE, 2005). O mecanismo utilizado neste processo foi avaliado por Wei et al. (2003) como sendo o mesmo mecanismo envolvido no controle de insetos. Após a ingestão dos cristais tóxicos, presente nos esporos do bacilo, ocorre a ligação destes em sítios altamente específicos no revestimento intestinal do parasita, formando poros celulares e a morte por inanição.

Experimentos *in vivo* com fornecimento de estirpes de *Bt* para os ovinos são pouco relatados devido à alta complexidade do sistema digestório dos ruminantes. A capacidade peculiar que estes animais possuem em transformar alimentos fibrosos em compostos orgânicos, aminoácidos e vitaminas para suas funções vitais, é mérito da relação simbiótica interespecífica que possuem com os micro-organismos presentes em seu rúmen. A introdução de uma nova estirpe bacteriana nesta população ruminal em equilíbrio pode afetar a harmonia existente e repercutir em danos aos micro-organismos e, consequentemente ao estado nutricional do hospedeiro.

Técnicas *in vitro* são alternativas viáveis por representar determinada condição de forma similar ao processo *in vivo*. A técnica *in vitro* de produção de gases permite, pela simulação *in vitro* do ambiente ruminal, medir o desaparecimento de material no decorrer do tempo, pela quantificação dos resíduos após a incubação, e observar a cinética de fermentação, uma vez que mensura a formação de gases da ação microbiana, como os AGCC, gás carbônico (CO_2), metano (CH_4) e produção de massa microbiana, tornando-se uma ótima ferramenta para analisar o incremento de substâncias não naturais do ambiente ruminal.

Sendo assim, utilizou-se a técnica *in vitro* de produção de gases para avaliar o efeito das estirpes 907, 1192, 2036, 2493, 2496 e S1185 de *Bt* na degradabilidade da dieta, produção de gases, possível toxicidade à população microbiana do rúmen e no processo fermentativo pelos micro-organismos ruminais.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Origem e preparação dos esporos de *Bacillus thuringiensis*

Foram utilizados esporos de 6 diferentes estirpes de *Bt* (907, 1192, 2036, 2493, 2496 e S1185) pertencentes ao Banco de Germoplasma de Bacillus Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN. Inicialmente as estirpes foram isoladas a partir de amostras de solo e água (MONNERAT; SILVA; SILVA-WERNECK, 2001) e cultivadas em meio NYSM (YOUSTEN, 1984) em incubador rotativo a 2.000 rpm, 28 ^{o}C, durante 48 a 72 h (até completa esporulação). Em seguida foram observadas em microscópio de contraste de fases a fresco, para observação da forma dos esporos e dos cristais. O material foi liofilizado e conservado em geladeira até o momento do uso.

Para o ensaio, foram adicionados 5,7 x 10^6 esporos diluídos em 100 µL de água destilada em cada unidade experimental com volume de 160 mL.

Esta concentração foi proporcional ao recomendado pelo grupo CENARGEN para experimentação *in vivo*, de 10^8 esporos para um animal de 40 kg. O volume (em litros) do retículo-rúmen de um animal de 40 kg foi calculado de acordo com a equação 1 desenvolvida por Blunnell e Gillingham (1985) (apud NRC, 2007, p. 8).

$$\text{Rúmen (L)} = (0{,}77 * PV^{0{,}57}) - 3{,}49 \qquad (1)$$

Onde:
PV = peso vivo (kg)

3.2.2 Local e animais

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brasil. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo n° 2013-23) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Como doadores de inóculo foram utilizados 4 ovinos Santa Inês (60 ± 2,5 kg PV), adultos, machos, castrados, providos de cânula permanente no rúmen, mantidos em pastagem mista de capins braquiária (*Urochloa decumbens*), elefante (*Pennisetum purpureum*) e aruana (*Panicum maximum* Jacq. cv. Aruana), com 500 g/animal/d de suplementação concentrada (70 % milho e 30 % farelo de soja), com acesso livre à mistura mineral e água potável.

3.2.3 Preparação dos inóculos e das estirpes experimentais

Frações líquida e sólida do líquido ruminal foram colhidas separadamente de cada animal antes da refeição matinal, permanecendo aquecidos em recipientes térmicos (39 ^{o}C) em condições anaeróbicas. A fração líquida foi obtida usando uma sonda de aço inoxidável (2,5 mm diâmetro) anexados a uma seringa de 60 mL enquanto que a parte sólida foi obtida com o auxílio de uma pinça de cabo longo. No laboratório, volumes semelhantes (50:50) de ambas as frações foram misturadas em liquidificador contendo CO_2 em seu interior, durante 10 s. A mistura foi filtrada em 3 camadas de tecido de algodão (fralda) e mantidas em banho-maria (39 ^{o}C), sob ambiente enriquecido de CO_2, até o momento da inoculação.

Cada estirpe de *Bt* foi incubada em 4 inóculos, sendo que cada inóculo foi preparado pela mistura do conteúdo ruminal de 2 animais. Sete garrafas foram preparadas para cada inóculo (dieta base sem *Bt* (controle), dieta base + *Bt* 907, dieta base + *Bt* 1192, dieta base + *Bt* 2036, dieta base + *Bt* 2493, dieta base + *Bt* 2496 e dieta base + *Bt* S1185), representando os tratamentos. O mesmo procedimento foi utilizado para as garrafas em branco (sem dieta base e sem *Bt*), que foram utilizadas para cálculo de correção dos valores de PGT, e para o padrão interno, composto de feno de capim Tifton-85 (*Cynodon* spp.). A dieta base foi preparada pela mistura de 30 % de concentrado, a base de milho e farelo de soja, e 70 % de feno de capim Tifton-85 (*Cynodon* spp.) moídos em moinho de faca com peneira de 1 mm. Os ingredientes da dieta foram analisados quimicamente para quantificação dos teores de matéria seca (MS), matéria mineral, matéria orgânica, proteína bruta e fibra em detergente ácido (FDA) de acordo com a AOAC (1995), fibra em detergente neutro (FDN) segundo Mertens (2002) e lignina (Lig) segundo Robertson e Van Soest (1981). O procedimento para determinação de FDN, FDA e Lig foi de forma sequencial e os resultados bromatológicos encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Composição bromatológica da dieta base LANA-CENA/USP

Componentes	MS[1]	MO	PB	FDN	FDA	Lig	MM
Feno Tifton	935,77[2]	912,73	142,02	696,08	438,23	97,83	87,27
Concentrado	893,69	961,23	171,83	502,90	62,25	6,06	38,77

[1]MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; Lig: lignina; MM: matéria mineral.
[2]Todos os valores estão expressos em g/kg MS.

3.2.4 Ensaio *in vitro* de produção de gases

O ensaio *in vitro* de produção de gases (THEODOROU et al., 1994) foi adaptado a um sistema semi-automático (BUENO et al., 2005; LONGO et al., 2006). Em garrafas de vidro de 160 mL foi adicionado 0,5 g de substrato (dieta base) em saquinhos de determinação de fibra (F57 ANKOM), 50 mL de solução nutritiva contendo macronutrientes, micronutrientes e tamponantes (meio tamponado Menke) mantida em saturação de CO_2, 25 mL de inóculo e 100 µL da solução de esporos previamente preparados, deixando um espaço para o acúmulo de gás de 85 mL (*headspace*). As garrafas foram fechadas imediatamente com rolhas de borracha (Bellco Glass Inc., Vineland, NY, USA), agitadas manualmente e incubadas a 39 ^{o}C em estufa de ar forçado (Marconi MA35, Piracicaba, SP, Brasil) por 24 h. A pressão das garrafas foi medida utilizando um transdutor de pressão e registrador de dados (Pressdata 800, LANA/CENA-USP/Piracicaba-SP) em intervalos regulares de 4, 8, 12 e 24 h. A quantidade de gases produzidos foi estimada de acordo Bueno et al., 2005 com adaptações do LANA através da equação 2:

$$\text{Volume de gases (mL)} = (0{,}0112 * (\text{pressão medida (psi)})^2) + (7{,}3358 * (\text{pressão medida (psi)})) \quad (2)$$

Para a determinação de CH_4, 2,5 mL foram amostrados das garrafas em cada tempo de medição utilizando uma seringa de 5 mL e armazenados num tubo a vácuo de 12 mL. Após cada amostragem de gás as garrafas foram ventiladas, agitadas manualmente e devolvidas à estufa. A concentração de CH_4 foi determinada usando cromatógrafo de fase gasosa (Shimadzu GC-2014) equipado com coluna Shincarbon ST 100/120 micro empacotada (1.5875 mm x 1.0 mm x 1 m) por meio de uma curva de calibração com padrão de metano

(99 %). O gás de arraste utilizado foi o hélio a um fluxo de 10 mL/min. As temperaturas da coluna, injetor e detector de ionização de chama foram 60 ºC, 200 ºC e 240 ºC, respectivamente. A concentração de CH_4 foi determinada de acordo com Longo et al. (2006) pela equação 3:

$$CH_4\ (mL) = (\text{volume total de gases (mL)} + \text{“headspace” (85 mL)}) * \text{concentração de } CH_4\ (mL/mL) \quad (3)$$

Os valores de PGT e PCH_4 foram calculados em relação à MS e expressos em mL/g MS. A $ECCH_4$ em relação ao volume de PGT foi obtida por uma regra de três, considerando o PGT como sendo 100 %.

3.2.5 Características da fermentação e da degradação ruminal

Terminado a última coleta de CH_4 (após 24 h) as garrafas foram abertas e os saquinhos foram retirados e tratados com solução FDN (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991), sem α-amilase, a 90 ^{o}C por 1 h. Em seguida foram feitas 4 lavagens com água destilada a 90 ^{o}C, seguido por 5 min em acetona, para eliminar qualquer resíduo da solução. Após 24 h em estufa a 105 ^{o}C foi determinado o valor da MSD e o valor da MOD foi determinado após 4 h em forno mufla a 400 ^{o}C.

O conteúdo líquido restante das garrafas foi amostrado para caracterização do perfil da fermentação e da microbiota ruminal, após a medição do pH em peagâmetro digital (Tecnal® modelo TEC-2). Os valores líquidos da liberação de $N\text{-}NH_3$ foram analisados pelo método micro-Kjeldahlj (AOAC, 1995) por destilação a vapor com solução de tetraborato de sódio (5 %), coletado em solução de ácido bórico e determinado por titulação com solução de ácido sulfúrico (0,01 N). Os AGCC foram separados e quantificados por meio da técnica de cromatografia gasosa, de acordo com Nocek, Hart e Polan (1987); Palmiquist e Conrad (1971), com modificações na programação da temperatura da coluna (temperatura inicial de 115 °C, mantido por 3,20 min, 123 °C mantido por 1,25 min e 126 °C mantido por 5,00 min). Após centrifugação do fluído ruminal (11.000 rpm por 30 min a 4 ^{o}C), foram coletados 800 µL do sobrenadante e adicionado 100 µL de ácido 2-etil-butírico (padrão interno) e 200 µL de ácido fórmico P.A. Da mesma maneira, foi preparada a solução de padrão externo contendo concentrações conhecidas de cada AGCC (ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico,

isovalérico e valérico) para calibração do integrador. Um microlitro das amostras foi injetado em cromatógrafo a gás Shimadzu 2014 acoplado a um detector de Ionização de Chama (FID), com uma coluna GP 10 % SP-1200/1 H_3PO_4 80/100 Chromosorb WAW.

3.2.6 Quantificação da microbiota ruminal

Para a contagem microscópica do número de protozoários, 2 mL do conteúdo restante das garrafinhas foram misturados a 2 mL de solução salina *Methylgreen* Formalina de acordo com o procedimento descrito por Dehority et al. (1983).

Em colaboração ao LANA, a quantificação da abundância relativa de *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, fungos gerais anaeróbicos e arqueas metanogênicas presentes nas amostras de líquido ruminal do ensaio foi avaliada por meio da técnica de qPCR no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, localizado no CENA/USP. Para isso, o conteúdo coletado foi estocado a -80 ^{o}C até o momento de sua utilização. A extração do DNA total das amostras foi realizada utilizando o kit comercial PowerLyzer^{TM} PowerSoil (MoBIO), partindo de um volume de 1,8 mL da amostra, de acordo com as instruções do fabricante.

As análises de qPCR foram realizadas utilizando pares de iniciadores (*primers*) específicos (Tabela 3.2) como descrito por Denman e McSweeney (2006); Denman, Tomkins e McSweeney (2007).

Tabela 3.2 - *Primers* gênero e espécie específicos para quantificação de bactérias ruminais através da técnica de qPCR

Populações	**Sequência dos *Primers* (5' a 3')**[1]
Bactérias totais	F, CGGCAACGAGCGCAACCC
	R, CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC
Ruminococcus Flavefaciens	F, CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG
	R, CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC
Fibrobacter succinogenes	F, GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA
	R, CGCCTGCCCCTGAACTATC
Arqueas metanogênicas	F, TTCGGTGGATCDCARAGRGC
	R, GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC
Fungos totais	F, GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC
	R, CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT

[1]F = Foward; R = Reverso.

A amplificação do DNA foi realizada no equipamento *StepOnePlus*^{TM} *Real-Time PCR System* (Life Technologies) em solução contendo 5 µL do kit *SYBER Green ROX* (Invitrogen), 2,5 pmol de cada *primer*, 1 µL do DNA pré-amplificado e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: uma pré-incubação a 95 ^{o}C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 ^{o}C por 15 s, 60 ^{o}C por 30 s e 72 ^{o}C por 30 s, com coleta de dados de fluorescência e ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95 ^{o}C por 15 s, 60 ^{o}C por 1 min e 95 ^{o}C por 15 s. Em todas as reações foram incluídos controle negativo, usando água como molde em vez de DNA. Para cada amostra feitas triplicatas (réplicas técnicas).

Como normalizador foi utilizado o gene 16S DNAr de *Bacteria*. A abundância relativa dos micro-organismos *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, fungos e arqueas metanogênicas foi calculado por meio do método de ΔΔCt (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) de acordo com a equação 4:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(controle)} - \Delta Ct_{(tratamento)} \quad (4)$$

Onde:

ΔCt = diferença entre $Ct_{(gene\ alvo)} - Ct_{(gene\ normalizador)}$

3.2.7 Análise estatística

O delineamento deste experimento foi o inteiramente casualizado com 7 tratamentos e 4 repetições (inóculos) em duplicata.

As fontes de variação foram controladas pela análise de variância, usando o procedimento GLM (General Linear Models) do programa computacional SAS versão 9.2 (SAS Institute Inc., Cary NC, EUA) e as comparações das médias foram feitas por PDIFF. O nível de probabilidade para aceitação ou rejeição no teste de hipótese foi de 5 %.

3. 3 Resultados

O tratamento *Bt* 907 apresentou redução de 7,32 % na MSD e 8,00 % na MOD em relação ao controle, apresentando diferenças significativas (P < 0,05) enquanto os demais tratamentos não diferiram entre si para estas variáveis (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Matéria seca degradada (MSD g/kg) e matéria orgânica degradada (MOD g/kg) das diferentes estirpes de *Bt* na fermentação ruminal *in vitro*

Tratamento	**Variáveis**	
	MSD	**MOD**
Sem *Bt*	601,35[b]	576,61[b]
907	557,15[a]	530,46[a]
1192	574,57[ab]	548,44[ab]
2036	568,16[ab]	541,19[ab]
2493	578,5[ab]	552,30[ab]
2496	573,69[ab]	547,50[ab]
S1185	581,28[ab]	556,46[ab]
EPM	13,70	14,08

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si (P < 0,05); EPM = erro padrão da média.

Os resultados dos tratamentos para as variáveis PGT, PCH_4 e $ECCH_4$ estão apresentados da Tabela 3.4. A PGT não apresentou diferenças entre os tratamentos (P > 0,05). Valores da PCH_4 dos tratamentos *Bt* 2036 e *Bt* 2493 diferiram entre si com decréscimo de 20,5 % para a estirpe de *Bt* 2036, entretanto nenhum grupo tratado com *Bt* diferiu do grupo controle para esta variável.

Em relação aos valores de $ECCH_4$, as estirpes *Bt* 2036 e *Bt* S1185 foram mais eficientes com redução de 1,11 % e 1,31 %, respectivamente, em comparação à estirpe *Bt* 2493 (P < 0,05). Também, nenhuma das estirpes estudadas diferiu estatisticamente do tratamento sem *Bt*.

Tabela 3.4 - Produção líquida de gases totais (PGT mL/g MS), produção líquida de metano (PCH_4 mL/g MS) e eficiência da conversão do metano ($ECCH_4$ %) das diferentes estirpes de *Bt* na fermentação ruminal *in vitro*

Tratamento	**Variáveis**		
	PGT	**PCH_4**	**$ECCH_4$**
Sem *Bt*	102,54	5,70 [ab]	5,54 [ab]
907	95,95	4,84[ab]	5,00 [ab]
1192	99,99	5,59 [ab]	5,40 [ab]
2036	97,16	4,73[a]	4,72[a]
2493	101,11	5,95[b]	5,83[b]
2496	96,66	5,08 [ab]	5,24 [ab]
S1185	104,50	4,84 [ab]	4,52[a]
EPM	3,25	0,42	0,31

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$); EPM = erro padrão da média.

Em relação aos AGCC (Tabela 3.5), apenas a estirpe *Bt* 2493 apresentou concentração superior do ácido isovalérico em relação à estirpe *Bt* 2036, não havendo diferenças significativas entre os demais tratamentos. Os valores da relação acetato:propionato (A:P), maior indicativa do aproveitamento da dieta, apresentaram-se entre 3,05 e 3,28, não diferindo entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Pelos dados de contagem de protozoários apresentados na Tabela 3.5, observa-se que não houve diferenças entre as estirpes avaliadas e o grupo controle ($P > 0,05$). Verifica-se apenas redução do número de protozoários da estirpe *Bt* 2496 em relação às estirpes *Bt* 1192 e *Bt* 2493.

Tabela 3.5 – Variáveis da fermentação ruminal *in vitro* e número de protozoários após 24 h de incubação em resposta à adição de diferentes estirpes de *B. thuringiensis*

Variáveis	Tratamentos							EPM
	Sem *Bt*	**907**	**1192**	**2036**	**2493**	**2496**	**S1185**	
pH	6,89	6,90	6,90	6,90	6,88	6,91	6,89	0,01
N-NH_3 (mg/100mL)	40,26	40,16	38,46	40,90	40,37	40,48	38,16	1,14
AGCC (mmol/L)								
Acetato	45,53	47,17	46,51	46,84	47,26	46,67	47,42	0,96
Propionato	14,95	14,63	14,47	14,42	15,1	14,54	15,3	0,33
Isobutirato	0,69	0,70	0,69	0,68	0,72	0,69	0,71	0,01
Butirato	10,69	10,66	10,46	10,48	10,93	10,46	11,21	0,22
Isovalerato	$1,99^{ab}$	$2,02^{ab}$	$1,99^{ab}$	$1,95^{a}$	$2,06^{b}$	$1,98^{ab}$	$2,04^{ab}$	0,04
Valerato	0,87	0,88	0,86	0,88	0,90	0,86	0,86	0,02
Total	74,72	76,06	74,98	75,25	76,97	75,2	77,54	0,41
Relação A:P	3,05	3,25	3,24	3,28	3,14	3,22	3,12	0,06
PTZ (10^5/mL)	$5,23^{ab}$	$5,11^{ab}$	$5,64^{a}$	$5,36^{ab}$	$5,64^{a}$	$4,63^{b}$	$5,44^{ab}$	0,29

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$); N-NH_3 = nitrogênio amoniacal; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; Relação A:P = acetato:propionato; PTZ = protozoários; EPM = erro padrão da média.

Na Figura 3.1 estão apresentadas as abundâncias relativas da comunidade microbiana ruminal estudada neste ensaio *in vitro*.

As estirpes de *Bt* 1192, 2036, 2493, 2496 e S1185 reduziram em 0,31, 0,52, 0,37, 0,28 e 0,28 vezes, respectivamente, a população de *F. succinogenes* em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$) enquanto a estirpe *Bt* 907 foi a única que não diferiu do controle, apresentando abundância relativa igual a 0,87. Já a população de *R. flavefaciens* não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, embora as estirpes de *Bt* 1192, 2036, 2493, 2496 e S1185 tenham apresentado aumento em relação ao tratamento controle.

As populações de fungos anaeróbicos e arqueas metanogênicas não apresentam diferenças estatísticas entre os tratamentos com e sem *Bt* e, por isso, não sofreram interferência das estirpes estudadas.

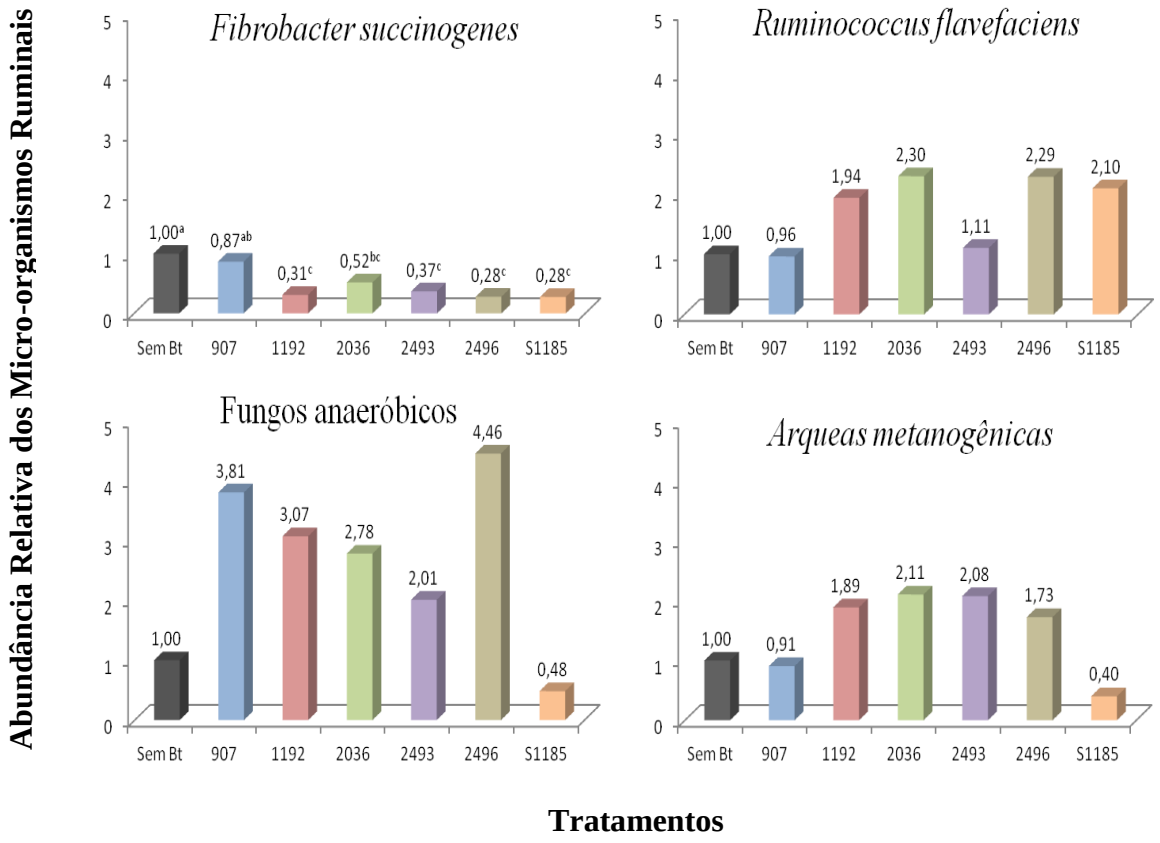

Figura 3.1 – Variação na Abundância Relativa das populações de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, fungos anaeróbicos e arqueas metanogênicas após 24 h de incubação com base no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde ΔΔCt é a variação de "Ciclos limites", normalizada com população de *Bacteria* geral do rúmen

3.4 Discussão

Os valores de MSD e MOD do tratamento *Bt* 907 foram menores em relação ao tratamento controle. Fatores que decrescem a digestibilidade de um alimento estão relacionados à extensão de lignificação da dieta (VAN SOEST, 1994) ou a interferências na microbiota ruminal. Uma vez que todos os tratamentos receberam a mesma dieta base (70 % volumoso e 30 % concentrado) exclui-se a possibilidade de intervenção do alimento nesta situação.

Grande número de espécies de micro-organismos pode ser encontrado no rúmen (KRAUSE; RUSSELL, 1996) e os principais grupos são os fermentadores de carboidratos estruturais, carboidratos não estruturais, pectinas, os proteolíticos, facultativos e as arqueas metanogênicas (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2011). A estirpe *Bt* 907 foi a única que manteve a população de *F. succinogenes* em relação ao controle sem favorecer o

desenvolvimento da *R. flavefaciens*, talvez este fato possa explicar a ação negativa desta estirpe na degradabilidade do substrato.

Roger et al. (1990) demonstraram que a adesão de *R. flavefaciens* é instantânea e pode ser comprometida com a remoção de cátions bivalentes (Mg^{+2} e Ca^{+2}), presença de derivados de celulose (metilcelulose e hidroxietilcelulose) e cistina no ambiente ruminal. *F. succinogenes* teve a maior porcentagem de células aderidas à celulose após 25 min de contato e esta fixação foi sensibilizada por altas e baixas temperaturas, altas concentrações (5 %) de glicose e celobiose, hidroxietilcelulose (0,1 %), lasalocida, monensina, potencial redox, pH, ausência de cátions monovalentes e a presença de um inibidor de ATPase de membrana. Dentre os mecanismos envolvidos na adesão de *R. flavefaciens* a interação entre o glicocálix e os cátions bivalentes, ligações hidrofóbicas e enzimáticas foram questionadas, já *F. succinogenes* demonstrou que suas funções metabólicas celulares, proteínas e/ou celulases produzidas por ela podem desempenhar papel no processo de fixação à celulose.

É possível que as proteínas tóxicas de *Bt* 907 possam ter interferido nos processos de adesão das populações de *R. flavefaciens*, *F.* succinogenes e outras populações de celulolíticas (como fungos e protozoários) sem apresentar ação letal à estes micro-organismos, explicando assim a contínua presença destas populações em relação ao controle e o decréscimo da digestibilidade da MS e MO, processo que merece ser melhor avaliado em trabalhos futuros.

Outra indicativa da possível intervenção das toxinas presentes nos esporos de *Bt* 1192, 2036, 2493, 2496 e S1185 está na redução da população de *F. succinogenes* destes tratamentos em relação ao controle. Uma vez que as condições de crescimento destes micro-organismos estavam disponíveis, ou seja, pH entre 6,0 e 7,0, disponibilidades de NH_3, ácidos graxos de cadeia ramificada (ác. valérico, ác. isovalérico, ác. 2-metil-butírico e ác. isobutírico) e ácidos fenólicos (ác. fenilacético e ác. 3-fenilpropiônico) (YOKOYAMA; JOHNSON, 1993), acredita-se ter havido ação letal das toxinas presentes nestas estirpes ou, como foi discutido anteriormente, intervenção das toxinas na adesão ao substrato, ao ponto de causar a morte por “inanição” de *F. succinogenes*.

É importante ressaltar que as estirpes de *Bt* 1192, 2036, 2493, 2496 e S1185 prejudicaram somente a população de *F. succinogenes*. Os valores de MSD e MOD destes tratamentos não sofreram prejuízos em relação ao controle, sugerindo compensação de outros micro-organismos celulolíticos na degradação do substrato. Uma das espécies beneficiadas pode ter sido a *R. flavefaciens* que, embora os tratamentos não terem apresentado diferenças significativas, apresentou aumento da população de *R. flavefaciens* com a diminuição da população de *F. succinogenes* nos mesmos tratamentos com as estirpes *Bt* 1192, 2036, 2493,

2496 e S1185. Outra população que também pode ter aproveitado desta situação são a de fungos anaeróbicos devido a sua capacidade fibrolítica elevada (LEE; HA; CHENG, 2000).

Com exceção dos valores de MSD, MOD e da abundância relativa da população de *F. succinogenes*, os demais parâmetros analisados não sofreram interferências dos *Bt* estudados em relação ao grupo controle, entretanto, algumas variáveis apresentaram diferenças significativas entre os próprios bacilos.

Houve diminuição de 17,9 % da população de protozoários do tratamento *Bt* 2496 em relação aos tratamentos *Bt* 1192 e *Bt* 2493. É provável que as proteínas tóxicas presente nos esporos de *Bt* 2496 tenham interferido no crescimento dos protozoários, ao passo que nos tratamentos com as estirpes *Bt* 1192 e *Bt* 2493 esta população tenha se beneficiado. Sabe-se que os protozoários, apesar de poderem digerir a celulose, utilizam açúcares e amido como principal fonte de energia, que são assimilados rapidamente e estocados na forma de amilopectina ou amido protozoário (WILLIAMS, 1986). Se a quantidade e/ou qualidade das toxinas presentes nos esporos testados forem inócuas aos protozoários, é muito provável que estes bacilos tenham tornado-se alimento desta população.

Valores de PGT não foram influenciados pelas estirpes de *Bt* e o valor encontrado para o tratamento controle de 102,54 mL/g MS foi semelhante ao encontrado por Abdalla et al. (2012) de 118 mL/g MS nas mesmas condições experimentais, demonstrando coerência da técnica utilizada. As estirpes de *Bt* 2036 e *Bt* S1185 apresentaram maior $ECCH_4$ em relação à estirpe *Bt* 2493, entretanto, apenas os *Bt* 2036 e *Bt* 2493 diferiram em relação aos valores de PCH_4, com decréscimo de 20,5 % para 2036.

Arqueas metanogênicas são as responsáveis pela produção anaeróbica de CH_4 no ambiente ruminal e, de acordo com a presença e disponibilidade dos substratos no rúmen, os mecanismos para a produção de CH_4 podem ser (5, 6 e 7) (PFEFFER, 1979):

$$\text{Acetato ou metanol} \rightarrow CH_4 + CO_2 \quad (5)$$

$$CO_2 + 4\ H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O \quad (6)$$

$$\text{Ácido fórmico} + 3\ H_2 \rightarrow CH_4 + 2\ H_2O \quad (7)$$

Como a abundância relativa da população de metanogênicas não foi diferente para os tratamentos *Bt* 2036 e *Bt* 2493 é provável que a disponibilidade destes substratos no ambiente ruminal tenha sido e, por isso, repercutido na PCH_4 destes tratamentos. Acetato, CO_2 e ácido fórmico são alguns dos produtos finais da fermentação de bactérias amilolíticas (ANTUNES;

RODRIGUEZ; SALIBA, 2011) e uma alta fermentação de aminoácidos podem favorecer o acúmulo do ácido graxo isovalerato (VARGAS et al., 2001). Maiores (5,95 g/kg MS) e menores (4,73 g/kg MS) valores de PCH_4 para os tratamentos *Bt* 2036 e *Bt* 2493, respectivamente, corroboram as concentrações do ácido graxo isovalerato de 1,95 mmol/L para *Bt* 2036 e 2,06 para *Bt* 2493, confirmando possível associação entre estas variáveis. As concentrações dos demais AGCC (acetato, propionato, isobutirato, butirato e valerato) não apresentaram diferenças entre os tratamentos e não foram influenciados pelas estirpes de *Bt*.

3.5 Conclusão

Com exceção da estirpe *Bt* 907, as demais estirpes de *B. thuringiensis* (1192, 2036, 2493, 2496 e S1185), nas concentrações avaliadas, não interferiram na degradabilidade do alimento pela microbiota ruminal, tampouco nos produtos da fermentação após 24 h de incubação pela técnica *in vitro* de produção de gases.

Referências

ABDALLA, A. L. et al. *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, p. 953-964, 2012.

ANTUNES, R. C.; RODRIGUEZ, N. M.; SALIBA, E. O. S. Metabolismo dos carboidratos não estruturais. In: BERCHIELLI. T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 239-260.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. cap. 5, p. 115-160.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTIS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 16. ed. Arlington: AOAC Iternacional, 1995. v. 1, p. 1-30.

BLUNNELL, F. L.; GILLINGHAM, M. P. Foraging behavior: dynamics of dining out. In: HUDSON, R. J.; WHITE, R. G. (Ed.). **Bioenergetics of wild herbivores**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985. chap., p. 53-79.

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

DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; MCLAREN, J. B. Occurrence of the rumen ciliate *Oligoisotricha bubali* in domestic cattle (*Bos taurus*). **Applied and Environmental Microbiology,** Baltimore, v. 45, p. 1394–1397, 1983.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rúmen. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 572–582, 2006.

DENMAN, S. E.; TOMKINS, N. W.; McSWEENEY, C. S. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 313-322, 2007.

KOTZE, A. C. et al. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 35, p. 1013–1022, 2005.

KRAUSE, D. O.; RUSSELL, J. B. How many ruminal bacteria are there? **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 79, n. 8, p. 1467-1475, 1996.

LEE, S. S.; HA, J. K.; CHENG, K. J. Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 88, n. 3-4, p. 201-217, 2000.

LONGO, C. et al. The influence of head space and inoculums dilition on vitro ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1223, p. 62-65, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 ($^{-\Delta\Delta Ct}$) method. **Methods**, Orlando, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

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

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero Bacillus**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 65 p. (Documentos, 60).

NOCEK, J. E.; HART, S. P.; POLAN, C. E. Rumen ammonia concentrations as influenced by storage time, freezing and thawing, acid preservative, and method of ammonia determination. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 70, p. 601-607, 1987.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrition requirements of small ruminates**: sheep, goats, cervids and world camelids. Washington, DC: The National Academy of Science Press, 2007.

PALMQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acid in lactating dairy cowns fed high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 54, p. 1025-1033, 1971.

PFEFFER, J. T. Anaerobic digestion processes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION, 1., 1979, London. **Proceedings…** London: Applied Science Puclishers, 1979.

ROBERTSON, J. B.; VAN SOEST, P. J. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: JAMES, W. P. T.; THEANDER, O. (Eds), **The analysis of dietary fiber in food**. New York, NY: Marcel Dekker, 1981. chap. 9, p. 123-158.

ROGER, V. et al. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria ruminococcus flavefaciens and fibrobacter succinogenes subsp. succinogenes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 56, n. 10, p. 3081-3087, 1990.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**. Versão 9.2. Cary, NC, 2009.

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

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

VARGAS, L. H. et al. Influência de Rumensin®, óleo de soja e níveis de concentrado sobre o consumo e os parâmetros fermentativos ruminais em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia,** Viçosa, v. 30, p. 1650-1658, 2001.

WEI, J. Z. et al. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 100, n. 5, p. 2760-2765, 2003.

WILLIAMS, A. G. Rumen holotrich ciliate protozoa. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 50, p. 25-49, 1986.

YOKOYAMA, M. T.; JOHNSON, K. A. Microbiologia del rumen e intestine. In: CHURCH, D. C. **El ruminant fisiología digestive y nutrición**. Zaragoza, ES: Editorial Acribia, 1993. cap. 7, p. 137-158.

4 PARÂMETROS SANGUÍNEOS E RUMINAIS, EMISSÃO DE METANO, DIGESTIBILIDADE APARENTE E DESEMPENHO DE OVINOS TRATADOS COM *Bacillus thuringiensis*

Resumo: Parâmetros sanguíneos e ruminais, emissão de CH_4 entérico, desempenho e DA de ovinos que receberam esporos de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) na dieta. Foram utilizados 20 cordeiros Santa Inês (machos e fêmeas) com idade média de 3 meses e peso vivo (PV) médio de 18 ± 3,5 kg mantidos em baias individuais em delineamento inteiramente casualizado e divididos em 2 grupos com 10 repetições: animais tratados com $2,5x10^6$ esporos/kg PV/d e animais não tratados (controle). Todos os animais receberam dieta composta de feno de capim Tifton-85 (*Cynodon* spp.) *ad libitum* e 300 g/animal/d de concentrado que foi ajustado de acordo com as exigências de crescimento. O desempenho dos animais foi observado por 53 dias com aferição do consumo de alimento 3 vezes na semana e pesagem dos animais quinzenalmente. Coletas de sangue também foram feitas a cada 15 dias, a fim de avaliar os parâmetros hematológicos (hemácias (Hem), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e leucócitos (Leu)) e bioquímicos (glicose (Gli), proteínas totais (PT), albumina (Alb), aspartato aminotransferase (AST), ureia (Ure) e creatinina (Cre)) dos animais. A fermentação ruminal foi investigada em 3 momentos (início, meio e fim do experimento) sob as variáveis pH, nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), abundância relativa das espécies *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, populações de fungos anaeróbicos, arqueas metanogênicas por *Quantitative Polymerase Chain Reaction* em tempo real (qPCR) e contagem de protozoários. Ao final do teste de desempenho dos animais, foram selecionados 18 animais (9 controle e 9 tratados) para o ensaio de digestibilidade, que foram alocados em gaiolas de ensaio metabólico para estudo de digestibilidade aparente (DA), balanço de nitrogênio (N) e síntese de proteína microbiana (PM) dos animais. Neste mesmo período, os animais revezaram entre as gaiolas de ensaio metabólico e câmaras respirométricas para coleta de gás metano (CH_4). Paralelamente a estes ensaios, 10 machos (5 controle e 5 tratados) foram utilizados para coleta de CH_4 pela técnica do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF_6). Após as coletas de CH_4, por ambas as técnicas, as amostras foram quantificadas em cromatografia gasosa. Não houve influência da estirpe sobre as variáveis estudadas neste experimento. A inclusão diária de $2,5x10^6$ esporos/kg PV do *Bt* 2036 na dieta dos ruminantes não repercutiu em alterações hematológicas ou possível quadro de intoxicação dos animais, tampouco houve prejuízo nos produtos da fermentação e interferência na microbiota ruminal e no desempenho dos ovinos.

Palavras-chave: Balanço de nitrogênio. Esporos bacterianos. Exames bioquímicos. Microbiota ruminal. Proteína microbiana.

Abstract: Blood and ruminal parameters, enteric methane emission, performance and apparent digestibility were studied in sheep receiving spores of *B. thuringiensis* in the diet. Twenty Santa Inês (male and female) lambs with a mean age of 3 months, and body weight (BW) of 18 ± 3.5 kg were maintained in individual stalls in a completely randomized design. They were divided into two groups with 10 repetitions: animals treated with $2.5x10^6$ spores/kg BW/d and untreated animals (control). All animals received a diet consisting of Tifton-85 (*Cynodon* spp.) hay *ad libitum* and 300 g/animal/day of concentrate which was adjusted according to growth requirements. The performance of the animals was observed for 53 days with measurement of feed intake three times per week and lambs were weighed fortnightly. Blood samples were taken every 15 days to evaluate the hematological (erythrocytes, hemoglobin, packed cell volume and leukocytes) and biochemical (glucose, total protein, albumin, aspartate aminotransferase, urea and creatinine) parameters of animals. Rumen fermentation was investigated in three stages (initial, middle and end of the experiment) using different parameters such as pH, ammonia N, short chain fatty acids, and populations of *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, anaerobic fungi, methanogenic archaea, (estimated by using qPCR) and protozoa. At the end of the experiment, 18 lambs (9 control and 9 treated) were selected for a digestibility trial, were placed in metabolic cages to estimate apparent digestibility, nitrogen balance and microbial protein synthesis of animals. During same period, the animals alternated between metabolic cages and respiration chambers to collect methane gas (CH_4). Ten male (5 control and 5 treated) lambs were used to collect CH4 using the hexafluoride tracer technique. Collected samples were quantified in gas chromatography. The present study indicates that, there was no influence of *Bt* 2036 strain on overall parameters. The daily addition of $2.5x10^6$ spores/kg BW of *Bt* 2036 in the ruminant diet not reflect in any negative effects on hematological traits or poisoning of animals nor was there interference of fermentation products in ruminal microorganisms and performance of lambs.

Keywords: Bacterial spores. Biochemical tests. Microbial protein. Nitrogen balance. Ruminal microbiota.

4.1 Introdução

Devido à crescente necessidade por métodos alternativos contra parasitas gastrintestinais de ruminantes, *B. thuringiensis* ganhou destaque por apresentar atividade nematicida contra vermes de vida livre e adulta, cujos resultados têm sido relatados em trabalhos *in vitro*. Sua ação está relacionada à presença de cristais tóxicos (δ-endotoxinas ou proteínas *crystals* (Cry)), formados no momento de sua esporulação, que se ligam em sítios específicos no intestino dos endoparasitas, causando lise celular e morte dos mesmos.

Estudos do fornecimento de milho "BT" (JUBERG et al., 2009), farelo de algodão "BT" (DRYZGA et al., 2007) ou estirpes de *Bt* (GRISOLIA et al., 2009; MANCEBO et al., 2011) na alimentação de roedores por tempo vêm sendo desenvolvido devido à preocupação do consumo de alimentos transgênicos por humanos que, na maioria das vezes, tem mostrado resultados promissores pela inocuidade à estes mamíferos. Entretanto, em ruminantes, dados do fornecimento de *Bt* na alimentação são escasso, devido à grande complexidade do seu sistema digestivo.

O rúmen fornece um ambiente favorável ao desenvolvimento contínuo da população microbiana, que é responsável pela degradação dos alimentos fibrosos. A fermentação ruminal tem como principais produtos finais a amônia (NH_3), PM, AGCC e vitaminas, que serão utilizadas pelos animais, e nitrato, gás hidrogênio (H_2), gás carbônico (CO_2) e CH_4, que são eliminados (OWENS; GOETSCH, 1993). Após o processo fermentativo os nutrientes não degradados (carboidratos, proteínas, gorduras e proteína microbiana) seguem para o abomaso e intestino delgado onde serão submetidos ao processo de digestão como nos animais não ruminantes.

O comportamento de um novo micro-organismo neste ambiente e a ação das toxinas Cry é desconhecido, podendo resultar em sérios danos à fermentação ruminal e, consequentemente, no estado nutricional do animal. Também, o risco de toxicidade e/ou infecção nos animais não pode ser descartado, uma vez que o *Bt* não faz parte da flora natural destes animais. Nesse sentido, buscou-se avaliar o efeito de *Bt* 2036 na dieta de ovinos sob os parâmetros sanguíneos, processo fermentativo do rúmen, população microbiana ruminal, produção de CH_4 entérico, síntese de PM, balanço de N, DA e desempenho.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Esporos de *Bacillus thuringiensis*

A estirpe 3026 de *Bt* foi selecionada para o ensaio *in vivo* após investigação prévia em ensaio de produção de gases *in vitro*.

Estes esporos foram fornecidos pelo Banco de Germoplasma de Bacillus Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN e, após recebimento, foram mantidos refrigerados (4 ^{o}C) até o momento do uso.

O processo de purificação e esporulação da estirpe consiste em isolar amostras de solo e água (MONNERAT et al., 2001), cultivar em meio NYSM em incubador rotativo (2.000 rpm, 28 ^{o}C, por 48 a 72 h) até completa esporulação (YOUSTEN, 1984). Em seguida, estes esporos são observados em relação à sua forma e presença de cristais em microscópio de contraste de fase.

4.2.2 Local e animais

O estudo foi realizado nas instalações do Laboratório de Nutrição Animal (LANA) no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brasil. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo n° 2013-23) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Foram utilizados 20 cordeiros da raça Santa Inês (10 machos não castrados e 10 fêmeas) criados desde o nascimento confinados, livre de infecções parasitárias, com idade média de 3 meses e PV médio de 18 ± 3,5 kg. Para avaliação do desempenho e características sanguíneas os ovinos foram alojados em baias individuais cobertas (1,0 m x 1,5 m), providas de cocho, bebedouro e piso emborrachado durante 53 dias. Após este período, 18 animais selecionados (9 machos e 9 fêmeas) foram transferidos em gaiolas para estudo de metabolismo durante os 10 dias subsequentes, com a finalidade de realizar estudos de DA, síntese de PM e emissão de CH_4 entérico.

Exames de ovos por grama segundo da técnica de Gordon e Whitlock modificada (UENO; GONÇALVES, 1994) foram realizados quinzenalmente para verificação de possíveis infecções parasitárias. Durante o período experimental todos os animais mostraram-se livres de doenças ao longo do experimento.

4.2.3 Manejo e tratamentos

Os animais foram divididos, de acordo com seu PV, em 2 grupos de 10 animais cada (5 machos e 5 fêmeas), sendo que um grupo recebeu o tratamento com o esporo de *Bt* 2036 e o outro não (controle).

A dieta foi composta de feno de capim Tifton-85 (*Cynodon* spp.) *ad libitum* e 300 g/animal/d de concentrado (60 % de milho, 35 % de farelo de soja e 5 % de mistura mineral e vitaminas), que foi ajustado até 700 g/animal/d de acordo com o crescimento dos animais, conforme exigências preconizadas pela NRC (2007).

A dieta foi fornecida aos animais em duas porções, 8 e 16 h, sendo o concentrado fornecido anteriormente ao feno, para garantir total ingestão do mesmo. A análise bromatológica da dieta, como matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e fibra em detergente ácido (FDA) foram realizadas de acordo com AOAC (1995). A fibra em detergente neutro (FDN) foi realizada segundo a metodologia de Mertens (2002), e a lignina (Lig), celulose (Cel) e hemicelulose (Hemi) segundo Robertson e Van Soest (1981) como mostra a Tabela 4.1. As determinações de FDN, FDA e Lig foram realizadas de forma sequencial.

Tabela 4.1 - Composição bromatológica do volumoso e concentrado da dieta

Dieta	**Componetes**[1]								
	MS	**MO**	**PB**	**FDN**	**FDA**	**Lig**	**Cel**	**Hemi**	**MM**
Feno Tifton	902,20[2]	928,60	62,98	785,43	406,51	91,52	314,99	378,92	71,40
Concentrado	918,99	956,55	248,00	389,85	69,05	4,89	64,16	320,80	43,45

[1]MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; Lig: lignina; Cel: celulose; Hemi: hemicelulose; MM: matéria mineral.
[2]Todos os valores estão expressos em g/kg MS.

Após o período de adaptação da dieta (15 dias), o grupo tratado passou a receber diariamente por via oral a dose de 2,5 x 10^6 esporos/kg de PV misturados em 4 g de concentrado, antes da refeição matinal. Esta concentração foi proporcional ao recomendado pelo grupo CENARGEN para experimentação *in vivo*, de 10^8 esporos/d para um animal de 40 kg de PV médio. O grupo controle recebeu os 4 g de concentrado, assim como o grupo tratado, sem a adição dos esporos de *Bt* - ambos os grupos foram tratados com as mesmas condições alimentares e de manejo durante o experimento.

4.2.4 Amostras de sangue

Amostras de sangue foram colhidas quinzenalmente a partir da veia jugular de cada animal durante todo o período experimental. O sangue foi coletado pela manhã, antes do fornecimento do alimento, em 2 tubos a vácuo de 8 mL, um contendo ácido etilenodiamina tetra-ácido (EDTA) como anticoagulante e o outro sem anticoagulante. Todas as amostras foram colocadas em recipientes de isopor com gelo imediatamente após a coleta.

Amostras de sangue (EDTA) foram utilizadas para a determinação dos parâmetros hematológicos, enquanto que as amostras de sangue sem o anticoagulante foram colocadas em geladeira por aproximadamente 12 h para total coagulação. Após este período, os coágulos foram retirados e o restante centrifugado (3.000 rpm durante 10 min a 4 ^{o}C) para a extração do soro sanguíneo. Este soro foi armazenado em freezer a -20 ^{o}C até o momento da realização dos testes bioquímicos.

4.2.4.1 Parâmetros hematológicos

As análises hematológicas foram realizadas no mesmo dia da coleta de sangue. A determinação do Ht foi realizada segundo Coles (1984) pelo método do micro-hematócrito onde o sangue é centrifugado em microcentrífuga (10.000 rpm durante 5 min) em tubos capilares e seus valores são determinados por comparação em escala de leitura própria. Os valores de Hb foram investigados segundo a metodologia colorimétrica da Cianometahemoglobina (THRALL, 2006).

A contagem de Hem foi realizada pelo método do hemocitômetro pela utilização de uma câmara de Neubauer melhorada e microscópio de luz em aumento de 40 vezes. As amostras foram diluídas 400 vezes com solução de cloreto de sódio 0,9 % (soro fisiológico) e contadas em duplicata (COLES, 1984; HEPLER, 1966). Os Leu também foram contados pelo mesmo método, entretanto, as amostras de sangue foram diluídas 10 vezes em solução corante a base de Violeta de Genciana e posteriormente contadas em microscópio de luz sob aumento de 100 vezes (COLES, 1984; HEPLER, 1966).

4.2.4.2 Parâmetros bioquímicos séricos

Concentrações séricas de Gli, PT, Alb, AST, Ure e Cre foram determinadas por kits colorimétricos comerciais Labtest®, seguindo as instruções de uso recomendadas pelo fornecedor.

4.2.5 Características da fermentação ruminal

Amostras do líquido ruminal foram obtidas no 2º, 31º e 63º dia (início, meio e fim) do período experimental para caracterizar o ambiente ruminal. Estas foram coletadas após 3 h do fornecimento do alimento, com auxílio de uma sonda de aço inoxidável (2,5 mm de diâmetro) anexados a uma seringa de 60 mL, e medidas em peagâmetro digital (Tecnal® modelo TEC-2). O volume coletado foi filtrado em gaze e amostrado para análises de N-NH_3, AGCC e protozoários. Com exceção da amostra tomada para a contagem de protozoários, todas foram congeladas a -20 ºC para as posteriores análises.

Somente na última coleta (63º dia) foi tomada alíquota para análise de qPCR. Logo após a medição do pH, aproximadamente 5 mL do fluído ruminal foi armazenado em recipiente de vidro estéril e congelado a -80 ºC, até o momento do ensaio.

Os valores de N-NH_3 foram analisados pelo método micro-Kjeldahlj (AOAC, 1995) por destilação a vapor com solução de tetraborato de sódio (5 %), coletado em solução de ácido bórico e determinado por titulação com solução de ácido sulfúrico (0,01 N).

Os AGCC foram separados e quantificados por meio da técnica de cromatografia gasosa, de acordo com Nocek, Hart e Polan (1987); Palmiquist e Conrad (1971), com modificações na programação da temperatura da coluna (temperatura inicial de 115°C,

mantido por 3,20 min, 123 °C mantido por 1,25 min e 126 °C mantido por 5,00 min). Após centrifugação do fluído ruminal (11.000 rpm por 30 min a 4 ^{o}C), foram coletados 800 µL do sobrenadante e adicionado 100 µL de ácido 2-etil-butírico (padrão interno) e 200 µL de ácido fórmico P.A. Da mesma maneira, foi preparada a solução de padrão externo contendo concentrações conhecidas de cada AGCC (ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico) para calibração do integrador. Um microlitro desta amostra foi injetado em cromatógrafo a gás Shimadzu 2014 acoplado a um detector de Ionização de Chama (FID), com uma coluna GP 10 % SP-1200/1 H_3PO_4 80/100 Chromosorb WAW.

4.2.5.1 Quantificação da microbiota ruminal

Para a contagem microscópica do número de protozoários, 2 mL do conteúdo restante das garrafinhas foram misturados a 4 mL de solução salina *Methylgreen* Formalina de acordo com o procedimento descrito por Dehority et al. (1983).

Em colaboração ao LANA, a quantificação da abundância relativa de *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, fungos gerais anaeróbicos e arqueas metanogênicas presentes nas amostras de líquido ruminal do ensaio foi avaliada por meio da técnica de qPCR no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, localizado no CENA/USP. Para isso, o conteúdo coletado foi estocado a -80 ^{o}C até o momento de sua utilização. A extração do DNA total das amostras foi realizada utilizando o kit comercial PowerLyzer^{TM} PowerSoil (MoBIO), partindo de um volume de 1,8 mL da amostra, de acordo com as instruções do fabricante. As análises de qPCR foram realizadas utilizando pares de iniciadores (*primers*) específicos (Tabela 4.2) como descrito por Denman e McSweeney (2006); Denman, Tomkins e McSweeney (2007).

Tabela 4.2 - *Primers* gênero e espécie específicos para quantificação de bactérias ruminais através da técnica de qPCR

Populações	**Sequência dos *Primers* (5' a 3')**[1]
Bactérias totais	F, CGGCAACGAGCGCAACCC
	R, CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC
Ruminococcus Flavefaciens	F, CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG
	R, CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC
Fibrobacter succinogenes	F, GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA
	R, CGCCTGCCCCTGAACTATC
Arqueas metanogênicas	F, TTCGGTGGATCDCARAGRGC
	R, GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC
Fungos totais	F, GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC
	R, CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT

[1]F = Foward; R = Reverso.

A amplificação do DNA foi realizada no equipamento *StepOnePlus*^{TM} *Real-Time PCR System* (Life Technologies) em solução contendo 5 µL do kit *SYBER Green ROX (*Invitrogen), 2,5 pmol de cada *primer*, 1 µL do DNA pré-amplificado e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram: uma pré-incubação a 95 ^{o}C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 ^{o}C por 15 s, 60 ^{o}C por 30 s e 72 ^{o}C por 30 s, com coleta de dados de fluorescência e ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95 ^{o}C por 15 s, 60 ^{o}C por 1 min e 95 ^{o}C por 15 s. Em todas as reações foram incluídos controle negativo, usando água como molde em vez de DNA. Para cada amostra feitas triplicatas (réplicas técnicas).

Como normalizador foi utilizado o gene 16S DNAr de *Bacteria*. A abundância relativa dos micro-organismos *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, fungos e arqueas metanogênicas foi calculado por meio do método de ΔΔCt (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) de acordo com a equação 8:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(controle)} - \Delta Ct_{(tratamento)} \quad (8)$$

Onde:

ΔCt = diferença entre $Ct_{(gene\ alvo)} - Ct_{(gene\ normalizador)}$

4.2.6 Avaliação da emissão de metano entérico

4.2.6.1 Câmaras respirométricas

Foram selecionados 18 animais (9 do grupo tratado e 9 do grupo controle) para permanecer por 46 h em câmaras respirométricas (Figura 4.1) desenvolvidas no LANA-CENA/USP, como descrito em Abdalla et al. (2012), para controle do consumo e coleta de CH_4 emitido.

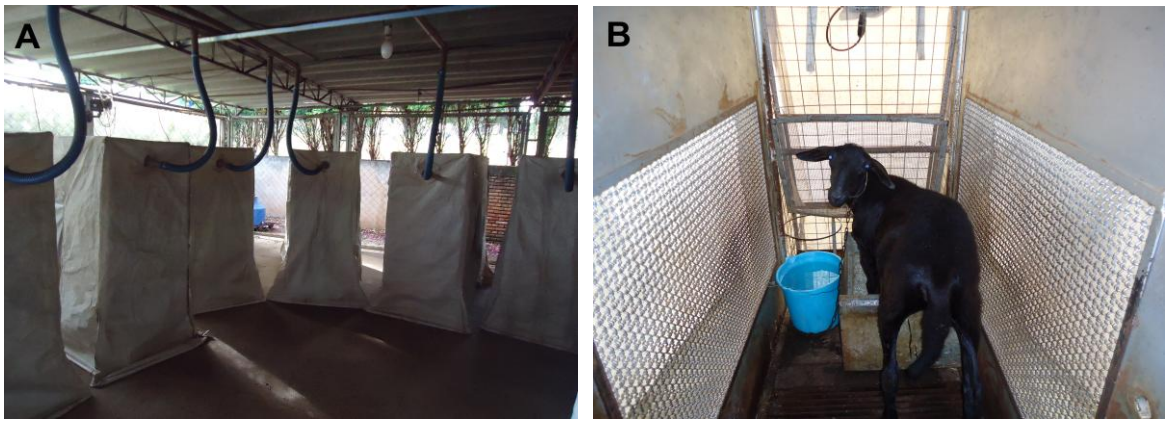

Figura 4.1 – Câmaras respirométricas. (A) Área externa da câmara; (B) Área interna da câmara

Gaiolas para o ensaio de metabolismo, comumente encontrados em laboratórios de nutrição animal, foram adaptadas. Cada gaiola teve suas laterais cobertas, com exceção da parte inferior, com folhas de polietileno de 0,3 mm de espessura. Orifícios de 5 cm de diâmetro foram deixados na parte dianteira e traseira da câmara para circulação de ar. Uma bomba de escape foi ligado ao orifício traseiro da câmara a fim de remover o ar anterior a um fluxo de 133 L/min (medido por um anemômetro-CE Instrutherm AD-250, São Paulo, Brasil). O ar de saída foi amostrado em balão de 5 L (revestido com película de alumínio), a 100 mL/min usando uma bomba peristáltica. Temperatura (27 ± 3 ^{o}C) e umidade (76 ± 4,5 %) foram medidas em intervalos regulares (2 h) e um ventilador foi colocado no interior da câmara para manter o ar em circulação e os níveis de CO_2 confortáveis para o animal. Após 23 h de coleta, 10 mL da amostra de gás foram coletas dos balões e armazenadas em tubos a vácuo e enviadas ao laboratório para determinação da concentração de CH_4 por cromatografia gasosa (Shimadzu GC-2014, detector FID à 240 ^{o}C e coluna Shincarbon a 60 ^{o}C) utilizando como padrão o gás metano 99 %.

As amostras da dieta oferecida e das sobras foram secas em estufa (60 ºC) e moídas em moinho tipo Wiley providos de peneiras com crivo de 1 mm para posterior análise de MS (AOAC, 1995). O consumo de matéria seca (CMS) para cada animal foi obtido pela diferença entre a quantidade de MS do alimento fornecido e a quantidade de MS das sobras. A produção de CH_4 foi expressa g/d e em L/d/kg MS consumida.

4.2.6.2 Gás traçador hexafluoreto de enxofre

Neste ensaio, que ocorreu paralelamente ao ensaio de DA, 10 ovinos machos (5 do grupo tratado e 5 do grupo controle) foram utilizados. A metodologia utilizada para determinação da emissão de CH_4 foi a do gás traçador SF_6, descrita originalmente por Johnson et al. (1994) para bovinos, adaptada para o Brasil por Primavesi et al. (2004) e, posteriormente modificada para o uso na espécie ovina, por Lima et al. (2010). As cápsulas de permeação utilizadas neste experimento receberam carga de SF_6 e foram mantidas em banho-maria a 39 °C, pesadas semanalmente durante período de 6 semanas, para que se calculasse a taxa de emissão de SF_6 das mesmas. Ao término deste período, foram introduzidas no rúmen dos animais por meio de sonda esofágica.

Os cabrestos foram confeccionados seguindo o modelo utilizado por Primavesi et al. (2004), com 3 pontos de fixação (boca, ganacha e inserção do pescoço). As cangas utilizadas para coletar amostras foram confeccionadas em Policloreto de Polivinilia (PVC), seguindo modelo descrito por Lassey et al. (1997), com volume de aproximadamente 2,5 L, afixadas na parte traseira das gaiolas metabólicas (Figura 4.2). Utilizou-se uma canga “branco” posicionada no topo das gaiolas com o objetivo de coletar amostra do ambiente. As cangas dos animais e a canga “branco” foram substituídas a cada 24 h, e em seguida levadas ao o laboratório para ser feita a determinação de SF_6 e CH_4, por meio de cromatografia gasosa (Shimadzu GC-2010, detectores de captura de elétrons (ECD) e de ionização de chama (FID), coluna megabore 0,53mm, 30 m, 25,0 µm, HP-MolSiv) utilizando padrões de 20 ppm para o CH_4 e de 50, 100 e 1000 ppt para o SF_6.

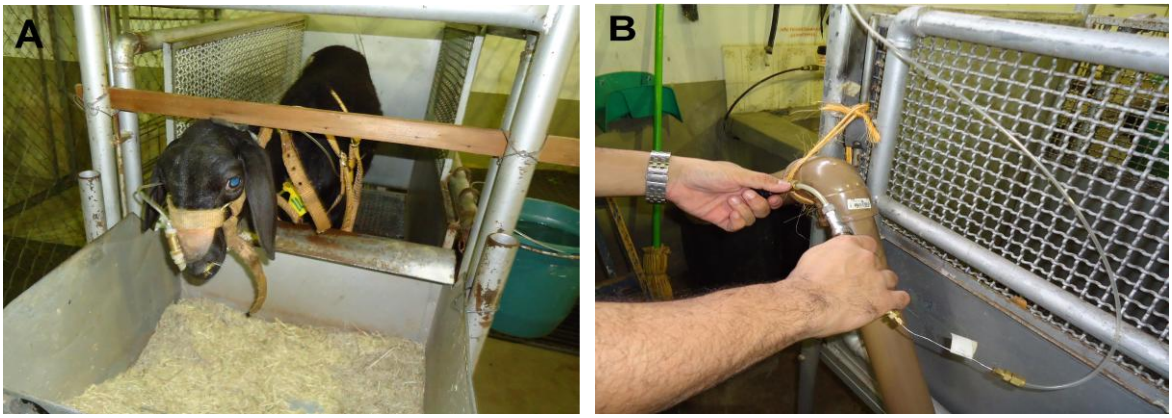

Figura 4.2 - Cabresto com 3 pontos de fixação: boca, ganacha e pescoço (A); Cangas coletoras de amostras confeccionadas em PVC (B)

As amostras da dieta oferecida e das sobras foram secas em estufa (60 ºC) e moídas em moinho tipo Wiley providos de peneiras com crivo de 1 mm para posterior análise de MS (AOAC, 1995). O CMS para cada animal foi obtido pela diferença entre a quantidade de MS do alimento fornecido e a quantidade de MS das sobras. A produção de CH_4 foi expressa g/d e em L/d/kg MS consumida.

4.2.7 Avaliação de desempenho

A pesagem da dieta oferecida foi feita diariamente, 3 vezes na semana (segunda, quarta e sexta) realizou-se a pesagem das sobras. Amostras destas foram enviadas ao laboratório para realizar a análise de MS segundo a AOAC (1995). O CMS em g/d para cada animal foi obtido pela diferença entre a quantidade de MS do alimento fornecido e a quantidade de MS das sobras por dia. Valores de CMS em g/kg $PV^{0,75}$/d também foi averiguado sendo calculado pela divisão do CMS (g/d) pelo PV metabólico. Outra variável de CMS foi calculada pela porcentagem de PV.

Para o cálculo do ganho em peso total (GPT) os animais foram pesados no início do período experimental (dia 0) e ao término do experimento (dia 53). Este valor foi dividido por 53, número de dias do ensaio de desempenho, e chegou-se ao valor do ganho em peso diário (GPD). O PV metabólico foi calculado elevando-se a média de PV dos animais, durante o período experimental, por 0,75 e este dado foi utilizado para o cálculo do CMS.

O dado de conversão alimentar (CA) foi obtido pela equação 9:

$$CA = CMS\ (g) / GPD\ (g) \qquad (9)$$

4.2.8 Ensaio de digestibilidade aparente

Foram selecionados 18 animais (9 do grupo tratado e 9 do grupo controle, totalizando 5 machos e 4 fêmeas em cada tratamento) para o ensaio de DA. Todos foram alojados em gaiolas metabólicas por 10 dias, sendo 3 dias para adaptação e 7 dias para controle do consumo de alimentos (oferecido e sobras) e excreção de fezes de cada animal.

As coletas de sobras e fezes foram realizadas diariamente antes da refeição matinal. Estas foram pesadas e amostradas 10 %, para a realização de um *pool* no final do 7º dia. Alíquota da dieta ofertada foi montada individualmente de acordo com o consumo de cada animal neste período.

Amostras do oferecido e dos *pools* de sobras e de fezes foram secas em estufa (60ºC) e moídas em moinho tipo Wiley providos de peneiras com crivo de 1 mm. Posteriormente foram analisadas quimicamente para quantificação dos teores de MS, MM, PB e FDA segundo a AOAC (1995), FDN segundo as metodologias de Mertens (2002), e Lig, Cel e Hemi segundo Robertson e Van Soest (1981). As determinações de FDN, FDA e Lig foram realizadas sequencialmente.

A DA de cada unidade dietética dos alimentos foram determinados conforme a equação 10:

Digestibilidade aparente de X = (Consumo de X – Excreção de X) / Consumo de X (10)

Sendo:
X = unidade dietética avaliada.

4.2.9 Ensaio de síntese de proteína microbiana

Para a estimativa do suprimento diário de proteína microbiana foi utilizada a análise dos DP na urina por cromatografia líquida de alta eficiência baseado no trabalho de Balcells, Guada e Peirb (1992), IAEA (1997), Shingfield e Offer (1999), Czauderna e Kowalczyk (2000) e George et al. (2006), com modificações.

Amostras do *pool* de urina coletados em gaiolas de ensaio de metabolismo, como descrito acima, foram descongeladas até temperatura ambiente, homogeneizadas em banho ultrassônico por 15 s e 5 mL destas foram centrifugadas (2.000 rpm durante 20 min a 4 ^{o}C).

Amostrou-se 2 mL da fração sobrenadante e, em outro recipiente, adicionou-se 0,25 mL de solução de oxipurinol (500 a 1500 µM) e 2,75 mL de solução de fosfato monobásico de amônio 0,0025 M (fase móvel A) junto a amostra. Após homogeneização em vórtex, aproximadamente 1 mL destas amostras foram filtradas em filtro Millex® 13 mm (FTFE - 0,22 µm), com auxílio de seringa de 5 mL, e transferidas em vials, que em seguida foram lacrados e armazenados em freezer (-20 ^{o}C) até o momento de sua quantificação.

Um cromatógrafo da marca Agilent modelo 1100, com bomba quaternária, injetor automático de amostras, detector de arranjo de fotodiodos, coluna Zorbax C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm e presença de termostato foi utilizado. A eluição foi realizada por gradiente, utilizando como sistema de fase móvel uma solução de fosfato monobásico de amônio 0,0025 M (fase móvel A) e uma solução fosfato monobásico de amônio 0,0025 M:metanol, 95:5, v;v (fase móvel B), com vazão de 1,0 a 1,2 ml.min^{-1} e temperatura constante da coluna a 23ºC. Na Tabela 4.3 são apresentados os dados da programação do gradiente para eluição dos derivados de purina.

Tabela 4.3 - Descrição do gradiente de fase móvel utilizado

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)	Fluxo (mL.min^{-1})
0	100	0	1,00
3,0	60	40	1,00
3,5	60	40	1,00
11,5	20	80	1,15
14,0	20	80	1,15
15,3	0	100	1,15
15,4	0	100	1,20
30,8	0	100	1,20
31,0	100	0	1,00
53,0	100	0	1,00

O volume de amostra injetado foi igual a 20 µL. A solução padrão utilizada para a construção da curva analítica (padrão externo) foi preparada a partir de concentrações conhecidas (500 a 1500 µM) dos compostos estudados (alantoína, creatinina, ácido úrico, hipoxantina, xantina) e do oxipurinol. Assim como Balcells et al. (1992), adotou-se o uso de um padrão interno, mas diferente do autor, que utilizou o composto alopurinol, foi adotado a solução de oxipurinol (500 a 1500 µM).

Foram monitorados os comprimentos de onda 225, 254, 267, 284 nm para a quantificação dos compostos alantoína e creatinina, hipoxantina e oxipurinol, xantina e ácido úrico, respectivamente.

O cálculo para estimar o NM absorvido no intestino delgado foi realizado segundo IAEA (2003) pela equação 11:

NM = (MDP * teor de N purinas) / (proporção N purina: N microbiano * digestibilidade das purinas microbianas * 1000) (11)

Onde:

NM = nitrogênio microbiano fornecido ao intestino delgado (g N/d)

MDP = metabólitos derivados de purina absorvidos (mmol/d/kg^{0,75})

O teor de N purinas é assumido como 70 (mg N/mmol) assim como a proporção N purina:N total dos micro-organismos ruminais é assumida como 11,6:100, ou seja, 0,116. O valor significativo da digestibilidade dos ácidos nucleicos microbianos é assumido como sendo 0,83.

O valor de MDP é dado pela seguinte fórmula 12:

MDP = (área do metabólito * concentração do oxipurinol no padrão * FD) / ((FC * área do oxipurinol no padrão) * volume da urina (mL)) (12)

Onde:

MDP = concentração do metabólito derivado de purina (µM/L);

FD = fator de diluição;

FC = fator de correção dos metabólitos de purina.

A concentração do oxipurinol no padrão na fórmula MDP é igual a 50, da mesma forma que se adotou o valor fixo de 2,5 para o FD, corrigindo a diluição da amostra de urina pela adição do oxipurinol (padrão interno) e da solução tampão durante o preparo da amostra. O FC dos metabólitos é calculado utilizando valores médios de injeções replicatas de padrão, conforme a equação 13:

FC = (área do metabólito no padrão * área do oxipurinol no padrão) / (concentração do metabólito no padrão * concentração do oxipurinol no padrão) (13)

4.2.10 Ensaio do balanço de nitrogênio

Junto ao ensaio de DA foram controladas as excreções urinárias. No momento da coleta de sobras e fezes, a urina total foi colhida em baldes previamente acidificados com 10 mL de ácido sulfúrico (10 %) e medida em proveta graduada, sendo amostrados 10 % do valor total para formar o *pool* do período. Estas amostras foram mantidas a -20 ^{o}C desde a coleta até o momento das posteriores análises.

Nas amostras do alimento oferecido e dos *pools* de fezes e urina foi determinado o teor de N-total pelo método micro-Kjeldahl (AOAC, 1995). O N-total das amostras foi determinado por destilação a vapor com solução de hidróxido de sódio (12 N), coletado em solução de ácido bórico e determinado por titulação com solução de ácido sulfúrico (0,05 N).

O balanço de nitrogênio foi calculado pela equação 14:

$$N_{retido} = (N_{ingerido}) - (N_{excretado}) \quad (14)$$

Onde:

N_{retido}, $N_{ingerido}$, $N_{excretado}$ representam, respectivamente, as quantidades médias diárias de N absorvido pelo animal, ingerido da dieta oferecida e pela contribuição do N microbiano, excretados nas fezes e na urina.

4.2.11 Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 5 repetições para a avaliação da emissão de CH_4 entérico pela técnica do SF_6; 9 repetições para a avaliação de CH_4 pela técnica das câmaras respirométricas, ensaio de DA, balanço de N e síntese de PM. No desempenho foram utilizadas 10 repetições, bem como para os parâmetros hematológicos e bioquímicos, e para variáveis investigadas no líquido ruminal. As análises estatísticas foram feita com uso do programa computacional SAS versão 9.2 (SAS Institute Inc., Cary NC, EUA) com nível de probabilidade para aceitação ou rejeição no teste de hipótese de 5 %.

As fontes de variação (tratamentos e sexos) foram testadas pela análise de variância, usando o PROC GLM. Para medidas tomadas através do tempo como parâmetros hematológicos (Hem, Hb, Ht e Leu), bioquímicos (Gli, PT, Alb, AST, Ure e Cre) e da fermentação ruminal (pH, N-NH_3 e AGCC) foi utilizado PROC MIXED. Os dados de SF_6 e câmaras respirométricas foram ajustados e submetidos à análise de correlação linear de Pearson utilizando o PROC CORR.

4. 3 Resultados

Não foi verificado efeito do sexo (macho e fêmea) em relação às variáveis estudadas, por este motivo somente foram apresentados e discutidos os dados referentes aos tratamentos com *Bt*. Para as variáveis tomadas através do tempo como os parâmetros sanguíneos (Hem, Hb, Ht, Leu, Gli, PT, Alb, AST, Ure e Cre) e do fluído ruminal (pH, N-NH_3 e AGCC), optou-se em apresentar a média das coletas realizadas durante o período experimental, uma vez que os dados oscilaram dentro dos valores padrões normais segundo Meyer e Harvey (2004) para as variáveis sanguíneas, Lana (2005) para pH, Van Soest (1994) para N-NH_3 e Gentil et al. (2011) para as concentrações de AGCC.

4.3.1 Parâmetros sanguíneos

As médias dos tratamentos para as variáveis Hem, Hb, Ht e Leu durante o período experimental estão apresentadas na Tabela 4.4. Estes parâmetros não diferiram entre os tratamentos (P > 0,05) e apresentaram-se dentro dos valores de normalidade estabelecidos por Meyer e Harvey (2004).

Tabela 4.4 - Parâmetros hematológicos de ovinos tratados e não tratados com esporos de *B. thuringiensis* durante o período experimental

Variáveis	Tratamentos		EPM	Ref.
	Sem *Bt*	*Bt* 2036		
Hem ($x10^6$/µL)	15,6	14,8	0,41	8 - 16
Hb (g/dL)	11,5	11,1	0,20	8 - 16
Ht (%)	33,7	33,0	0,55	24 - 50
Leu ($x10^3$/µL)	12,0	10,8	0,71	4 - 12

Hem = hemácias; Hb = hemoglobina; Ht = hematócrito; Leu = leucócitos; EPM = erro padrão da média; Ref. = valores de referência segundo Meyer e Harvey (2004).

Os valores bioquímicos séricos também não diferiam (P > 0,05) entre os grupos tratados e não tratados com *Bt* 2036 (Tabela 4.5) e foram comparados com os valores de referência estabelecidos por Meyer e Harvey (2004). A concentração de PT do grupo controle apresentou valor de 5,90 g/dL, estando próximo ao limite inferior normal de 6,0. As concentrações de Cre também apresentaram abaixo dos parâmetros de normalidade com valores de 0,79 mg/dL para o tratamento sem *Bt* e 1,13 mg/dL para o tratamento *Bt* 2036. As concentrações de Gli, Alb AST e Ure permaneceram dentro dos valores da normalidade.

Tabela 4.5 - Parâmetros bioquímicos de ovinos tratados e não tratados com esporos de *B. thuringiensis* durante o período experimental

Variáveis	Tratamentos		EPM	Ref.
	Sem *Bt*	*Bt* 2036		
Gli (mg/dL)	64,1	64,6	1,54	50 - 80
PT (g/dL)	5,9	6,0	0,13	6,0 - 7,9
Alb (g/dL)	2,8	2,9	0,08	2,4 - 3,0
AST (U/L)	89,5	94,2	2,61	60 - 280
Ure (mg/dL)	33,3	33,4	1,78	17,1 - 42,8
Cre (mg/dL)	0,8	1,1	0,15	1,2 - 1,9

Gli = glicose; PT = proteínas totais; Alb = albumina; AST = aspartato aminotransferase; Ure = ureia; Cre = creatinina; EPM = erro padrão da média; Ref. = valores de referência segundo Meyer e Harvey (2004).

4.3.2 Características da fermentação ruminal

As variáveis analisadas para caracterizar a fermentação ruminal dos animais do experimento estão apresentadas na Tabela 4.6.

Os valores médios de pH das coletas foram de 6,65 e 6,68 para os tratamentos controle e *Bt* 2036, respectivamente. Para o N-NH_3, o valor médio foi de 19,72 para o grupo controle e 19,12 para o grupo tratado com *Bt* 2036. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para estas variáveis.

A proporção molar dos AGCC e valores da relação acetato:propionato (A:P) também não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. Os valores da contagem de protozoários foram de $29{,}81 \times 10^5$ para o tratamento sem *Bt* e $28{,}87 \times 10^5$ para o tratamento *Bt* 2036 por mL de líquido ruminal, não diferindo entre si ($P > 0{,}05$).

Tabela 4.6 – Valores de pH, nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), relação Acetato:Propionato (A:P) e do número de protozoários (PTZ) presentes no líquido ruminal de cordeiros tratados e não tratados com esporos de *Bt* 2036

Variáveis	**Tratamentos**		**EPM**
	Sem *Bt*	***Bt* 2036**	
pH	6,65	6,68	0,01
$N\text{-}NH_3$ (mg/100 mL)	19,72	19,12	0,10
AGCC (%)			
Acetato	66,47	66,32	0,03
Propionato	18,54	18,49	0,01
Isobutirato	0,59	0,66	0,01
Butirato	11,34	11,77	0,07
Isovalerato	2,46	2,15	0,05
Valerato	0,61	0,62	0,002
Relação A:P	3,79	3,70	0,02
PTZ ($x10^5$/mL)	29,81	28,87	0,15

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$); EPM = erro padrão da média.

A emissão de CH_4 obtidos pela técnica das câmaras respirométricas apresentaram valores de 12,41 e 13,76 g/d e 21,34 e 17,51 g/kg MS para os animais controle e tratados com *Bt* 2036, respectivamente. Já os valores encontrados pela técnica do SF_6 foram de 21,98 g/d e 24,17 g/kg MS para o tratamento controle e 24,72 g/d e 23,02 g/kg MS para o tratamento *Bt* 2036. Os tratamentos não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) em ambas às técnicas utilizadas (Tabela 4.7). Também foi observada alta e significativa correlação positiva ($R = 0,74$; $P = 0,01$) entre as duas técnicas utilizadas.

Embora as populações de *F. succinogenes, R. flavefaciens*, fungos anaeróbicos e arqueas metanogênicas do tratamento *Bt* 2036 tenham aumentado em relação ao controle, estes tratamentos não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) para estas variáveis (Figura 4.3), demonstrando não interferência da estirpe *Bt* 2036 nestes resultados.

Tabela 4.7 – Emissão de metano (CH_4) dos animais tratados e não tratados com esporos de *B. thuringiensis* avaliados pelas técnicas das câmaras respirométricas e do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF_6)

CH_4	Tratamentos		EPM
	Sem *Bt*	***Bt* 2036**	
Câmaras respirométricas			
g/d	12,41	13,76	0,23
g/kg MS	21,34	17,51	0,64
SF_6			
g/d	21,98	24,72	0,61
g/kg MS	24,17	23,02	0,26

EPM = erro padrão da média.

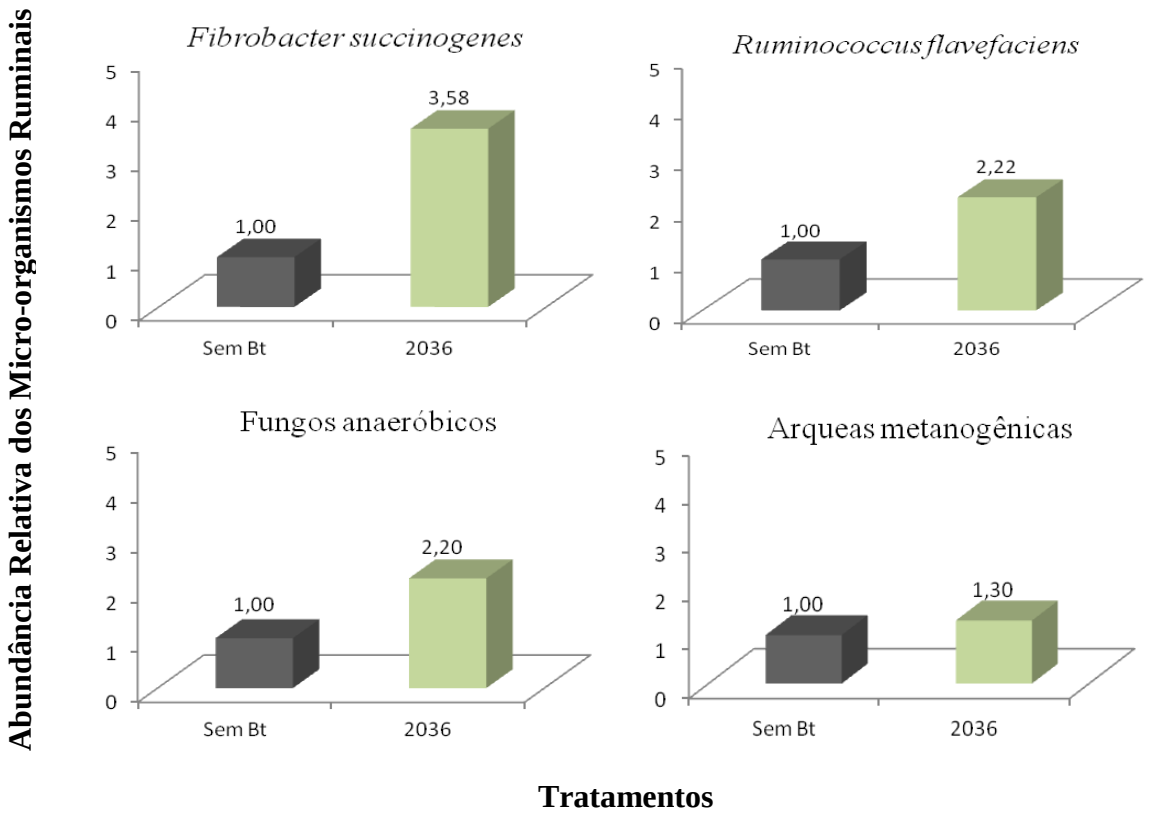

Figura 4.3 – Variação na Abundância Relativa das populações de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, fungos anaeróbicos e arqueas metanogênicas após 24 h de incubação com base no método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ onde ΔΔCt é a variação de "Ciclos limites", normalizada com população de *Bacteria* geral do rúmen

4.3.3 Estado nutricional dos animais

As variáveis investigadas para o teste de desempenho dos animais não apresentaram diferenças (P > 0,05) entre os tratamentos controle e *Bt* 2036 e são apresentados na Tabela 4.8. As proporções consumidas de volumoso e concentrado foram de 50:50 para todos os animais do experimento neste período.

Valores de CA dos ovinos foram de 5,07 e 4,95 g CMS/ g GPD entre os animais do experimento. Ovinos não tratados e tratados com *Bt* 2036 consumiram em média 748,64 e 735,86 g MS/d e apresentaram GPD de 143,61 e 154,09 g, respectivamente. O GPT foi de 7,61 kg para os animais controle e 8,18 kg para os animais tratados com *Bt* 2036.

Tabela 4.8 – Consumo voluntário de matéria seca (CMS), peso vivo (PV), ganho em peso diário (GPD) e conversão alimentar (CA) dos animais tratados e não tratados com *Bt* 2036

Variáveis	**Tratamentos**		**EPM**
	Sem *Bt*	***Bt* 2036**	
CMS			
g MS/d	748,64	735,86	27,91
g/kg $PV^{0,75}$/d	65,95	63,59	1,28
% PV	3,97	3,82	0,09
PV (kg)			
Inicial	17,67	18,06	0,57
Final	25,28	26,22	0,86
Total	7,61	8,17	0,49
GPD (g/d)	143,61	154,09	9,21
CA (g CMS/ g GPD)	5,07	4,95	0,59

EPM = erro padrão da média.

Os consumos de nutrientes durante o ensaio de DA, assim como os CDA das frações MS, MO, PB, FDN, FDA, Lig, Cel, Hemi e MM do alimento fornecido aos animais do experimento não apresentaram diferenças (P > 0,05) entre os grupos tratados e não tratados com *Bt* 2036 (Tabela 4.9). Com o crescimento dos animais neste período os mesmos passaram a consumir maiores quantidades de concentrado, modificando a relação volumoso:concentrado da dieta para 40:60 para ambos os tratamentos.

Tabela 4.9 – Consumo e coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes da dieta pelos animais tratados e não tratados com *Bt* 2036 durante o ensaio de digestibilidade aparente

Variáveis	**Tratamentos**		**EPM**
	Sem *Bt*	***Bt* 2036**	
	Matéria seca		
Consumo (g/d)	847,43	916,40	44,40
CDA (%)	71,53	70,71	1,38
	Matéria orgânica		
Consumo (g/d)	808,68	873,93	42,17
CDA (%)	73,42	72,56	1,32
	Proteína bruta		
Consumo (g/d)	169,01	186,84	6,44
CDA (%)	68,66	67,86	2,75
	Fibra em detergente neutro		
Consumo (g/d)	562,69	609,81	37,30
CDA (%)	68,04	68,37	1,49
	Fibra em detergente ácido		
Consumo (g/d)	205,61	221,48	14,12
CDA (%)	58,52	57,92	2,02
	Lignina		
Consumo (g/d)	44,22	51,02	3,17
CDA (%)	24,47	25,85	6,05
	Celulose		
Consumo (g/d)	161,39	170,46	13,22
CDA (%)	67,14	66,27	1,69
	Hemicelulose		
Consumo (g/d)	357,08	388,32	24,36
CDA (%)	74,72	75,62	1,57
	Matéria Mineral		
Consumo (g/d)	38,74	42,47	2,35
CDA (%)	35,05	34,82	3,56

EPM = erro padrão da média.

Valores de DP excretados na urina e NM absorvidas pelos ovinos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com e sem *Bt* 2036 (Tabela 4.10). Para os DP excretados na urina foram encontrados valores de 6,22 e 7,42 mmol/d para os tratamentos controle e *Bt* 2036, respectivamente. A contribuição de NM aos animais do experimento foi de 2,88 g/d para o grupo controle e 2,99 g/d para o grupo *Bt* 2036.

Tabela 4.10 – Derivados de purinas excretados na urina (DP) e absorção de nitrogênio microbiano (NM) por ovinos tratados e não tratados com *B. thuringiensis* 2036

Variáveis	**Tratamentos**		**EPM**
	Sem *Bt*	***Bt* 2036**	
DP excretados			
mmol/d	6,22	7,42	0,20
NM absorvidos			
g/d	2,88	2,99	0,02

EPM = erro padrão da média.

O ensaio de balanço de N, utilizado para quantificar o metabolismo proteico dos ruminantes, apresentou valores de N retido de 19,01 g/d e 18,09 g/d para animais controle e animais tratados com *Bt* 2036, respectivamente. Valores de N retido, N consumido (N dieta + N microbiano) e N excretados (N fezes + N urina) não diferiram entre os tratamentos e estão apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Balanço de nitrogênio (N) de ovinos alimentados e não alimentados com *B. thuringiensis*

Quantidades (g/d)	**Tratamentos**		**EPM**
	Sem *Bt*	***Bt* 2036**	
N consumido			
N dieta	29,99	30,42	0,41
N microbiano	2,88	2,99	0,02
N excretado			
N fezes	7,29	8,33	0,49
N urina	6,57	6,99	0,28
N retido	19,01	18,09	0,15

EPM = erro padrão da média.

4. 4 Discussão

4.4.1 Parâmetros sanguíneos

A avaliação dos parâmetros hematológicos é de suma importância para verificar os elementos celulares do sangue quanto ao número e sua morfologia. Inúmeras doenças relacionadas aos elementos sanguíneos e aos órgãos hematopoiéticos podem ser detectadas com esta avaliação. No presente estudo, as variáveis sanguíneas investigadas foram úteis no acompanhamento do estado de saúde dos animais em relação ao surgimento de possível anemia, infecções, reações alérgicas e, principalmente, quadros de intoxicação, uma vez que foram alimentados com esporos bacterianos contendo toxinas.

A série vermelha do sangue foi estudada pelo número de Hem, medição do Ht e teor de Hb. Estas variáveis não diferiram entre os tratamentos e apresentaram-se dentro valores de referência demonstrando que o tratamento de *Bt* na dose e período avaliados não afetou as hemácias. A destruição das Hem, menor produção destas ou perda de sangue decorrente de hemorragia pode levar ao quadro de anemia responsável por sinais clínicos geralmente relacionados à menor oxigenação dos tecidos ou aos mecanismos compensatórios a ela associados (TVEDTEN, 2010), afetando o desempenho produtivo dos animais.

Também não foi observado sinais de apatia, febre ou diminuição do apetite que pudesse ser atribuído a algum processo infeccioso, inflamatório, alérgico ou de intoxicação. Os valores de Leu encontrados de $12{,}0x10^3/\mu L$ e $10{,}8x10^3/\mu L$ para os animais controle e tratados com *Bt* 2036, respectivamente, apresentaram-se dentro dos valores normais de 4 a $12x10^3/\mu L$, sugerindo que os bacilos não interferiram também nestas células.

Em relação aos exames bioquímicos, basicamente deram suporte à investigação das funções hepática e renal dos animais durante o período experimental. Concentrações constantes de Gli no sangue são necessárias a todos os mamíferos por ser a principal fonte de energia dos tecidos e a única fonte de energia para o cérebro. Em ovinos, esta concentração deve estar em torno de 50 a 60 mg/dL e sua regulação esta intimamente relacionada aos processos de gliconeogênese que ocorre no fígado (VALADARES FILHO; PINA, 2011). A insuficiência hepática pode acometer em hipoglicemia, pela menor atividade de gliconeogênese nos hepatócitos, ou hiperglicemia, pela menor absorção de Gli pelo fígado (LASSEN, 2006). As concentrações séricas de Gli dos animais controle e tratados foram, respectivamente, 64,1 e 64,6 mg/dL, estando dentro dos valores de normalidade.

Os valores de PT séricos foram similares entre ou tratamentos (P > 0,05), entretanto, os animais controle apresentaram-se próximo ao limite inferior de 6,0 g/dL. A concentração de PT no sangue representa a somatória de todas as proteínas presentes no sangue, principalmente os grupos Alb e globulinas (LASSEN, 2006). Como os valores de Alb dos animais controle apresentam-se dentro dos padrões de normalidade (2,8 g/dL) é possível que outros teores proteicos, como as globulinas, estejam interferindo na PT destes animais. No entanto não se caracteriza quadro de hipoproteinemia, conforme verificado pela retenção de nitrogênio e ganho em peso de 143,61 g/d dos ovinos, indicando anabolismo proteico.

Dentre as proteínas séricas, a Alb é a mais abundante com significativa participação no transporte de ácidos graxos livres, ácidos biliares, bilirrubina, cálcio, hormônios e medicamentos (BARROS, 2010). Sintetizada no fígado, é indicativa de doença hepática, renal, desnutrição, perda de sangue quando encontrada em baixas concentrações séricas e desidratação quando encontrada em altas concentrações séricas (HOFFMAN; SOLTER, 2008). Os valores de Alb sérica de ambos os tratamentos apresentam-se dentro dos valores de normalidade, mais uma vez indicando higidez dos ovinos e corroborando com os dados de desempenho.

Outras variáveis indicativas de lesão hepática, que apresentaram valores normais para ambos os tratamentos, são as concentrações séricas de AST e Ure. Lesões subletais ou necrose dos hepatócitos podem aumentar os níveis de AST, enzima produzida principalmente no fígado (HOFFMAN; SOLTER, 2008), e diminuir os níveis de Ure, que é sintetizada nos hepatócitos a partir da NH_3 (TENNANT; CENTER, 2008). Também, a Ure pode ser indicativa de comprometimento renal quando em altas concentrações séricas devido à baixa filtração glomerular (BRAUN; LEFEBVRE, 2008).

Já a produção de Cre é diária e constante, não sendo influenciada por fatores extra-renais como acontece com a Ure, tonando-se mais específica para diagnóstico de disfunção renal (KERR, 2003). Ela é formada a partir da condensação e desidratação espontânea da Cre muscular sendo eliminada proporcionalmente à massa muscular do indivíduo, idade e sexo (FETTMAN; REBAR, 2006). Também, a maioria das dietas pode causar diminuição do teor sérico de Cre porque os nutrientes absorvidos induzem um aumento pós-prandial na taxa de filtração glomerular que decresce após a alimentação (STOCKHAM; SCOTT, 2011). Uma vez que não houve diferenças (P > 0,05) entre os tratamentos para esta variável, os esporos de *Bt* 2036 não influenciaram no decréscimo dos valores de Cre sérica. Provavelmente os baixos valores encontrados (≤ 1,1 mg/dL) estejam relacionados com a pouca idade dos animais

(± 4,5 meses) e, consequentemente, pela massa muscular menor em relação aos adultos que seriam os animais de referência para determinar os valores normais. Níveis baixos de Cre normalmente não são motivos de preocupação.

4.4.2 Características da fermentação ruminal

Considerando a importância da fermentação microbiana do rúmen para a nutrição dos ruminantes, a adição de um novo micro-organismo portador de toxinas neste ambiente torna necessária a investigação do comportamento da microbiota ruminal, nos processos fermentativos e nos produtos desta fermentação.

Os valores de pH encontrados para os tratamentos controle e *Bt* 2036 foram de 6,65 e 6,68, respectivamente. Estes valores encontram-se dentro dos valores de normalidade citados por Lana (2005), entre 5,0 e 7,0, e beneficiam a proliferação das bactérias celulolíticas ruminais, como as *F. succinogenes* e *R. flavefaciens*, cujas condições ótimas de crescimento ocorrem em pH entre 6,3 e 7,0 (ØRSKOV, 1992).

Embora as populações de *F. succinogenes* e *R. flavefaciens*, na presença de *Bt* 2036, tenham apresentado valores de 3,58 e 2,22 vezes, respectivamente, em relação ao controle, não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$). No experimento *in vitro* utilizando os mesmos esporos de *Bt* 2036 no ambiente ruminal por 24 h de incubação, a população de *F. succinogenes* apresentou decréscimo de 0,52 vezes em relação ao controle ($P < 0,05$), enquanto a população de *R. flavefaciens* permaneceu constante, não diferindo entre os tratamentos. Estes dados demonstram que mesmo em condições ótimas de fermentação, como foi apresentado em ambos os ensaios, o processo fermentativo num ambiente ruminal estático (*in vitro*) ou dinâmico (*in vivo*) pode repercutir de forma diferenciada na disponibilidade dos subtratos à comunidade microbiana, resultando em prejuízos e/ou benefícios no crescimento das diversas espécies de micro-organismos ruminais, havendo necessidade de ter cautela da extrapolação dos resultados *in vitro* para *in vivo*.

No experimento *in vivo* é possível que a ingestão de alimento e o fluxo da digesta para o abomaso tenham diminuído a concentração dos esporos no ambiente ruminal ao ponto de não comprometer a população de *F. succinogenes*, o que não ocorreu no sistema *in vitro*, uma vez que os esporos do *Bt* permaneceram no rúmen artificial. Populações de fungos, metanogênicas e protozoários apresentaram o mesmo comportamento em ambos os ensaios (*in vitro e in vivo*), não sendo influenciadas pelo *Bt* 2036.

Os AGCC contribuem com cerca de 70 a 80 % dos requerimentos totais de energia para os ruminantes (BERGMAN, 1990) e sua concentração no rúmen é dependente das características dos componentes das dietas e, consequentemente, dos micro-organismos ruminais que irão se beneficiar (VAN HOUTERT, 1993).

Em estudo com ovinos Santa Inês alimentados com dieta 50:50 (feno coastcross:concentrado), Gentil et al. (2011) encontraram proporções molares de acetato:propionato:butirato (A:P:B) de 70,5:8.8:6,5 e relação A:P de 8,7. Situações mais favoráveis foram encontradas no presente estudo com valores de A:P:B de 66,5:18,5:11,3 e 66,3:18,5:11,8 para os tratamentos controle e *Bt* 2036, respectivamente, e relação A:P de 3,79 para o grupo controle e 3,70 para o grupo tratado com *Bt* 2036. Valores baixos da relação A:P são esperados, pois indicam menor proliferação de micro-organismos produtores de H_2 com maior produção de propionato e butirato e, consequentemente, menor produção de gás CH_4 (LONGO, 2007), resultando em menor perda de energia pelo animal.

A emissão de CH_4 foi semelhante para os ovinos tratados com e sem *Bt*, estando dentro da faixa de 11,23 g CH_4/d a 38,9 g CH_4/d preconizada para a espécie (UNFCCC, 2013). Observa-se ainda que houve alta correlação positiva (R = 0,74; P = 0,01) entre as duas técnicas avaliadas. Na com SF_6 os valores médios de emissão de CH_4 nos 2 tratamentos foi de 23,35 g/d, com valores 1,78 vezes maior do que os determinados na técnica das câmaras respirométricas que foi de 13,08 g/d. Tal fato deve-se ao menor CMS observado pelos animais alojados nas câmaras (787 g MS/d) comparadas aos mesmos animais alocados nas gaiolas de ensaio de metabolismo (1.020 g MS/d) durante as mensurações.

Trabalhos que correlacionem às duas técnicas são escassos, entretanto Pinares-Patiño et al. (2008), em estudo com ovinos da raça Romney (40 kg/PV) alimentados com feno de alfafa, verificaram níveis de emissão de 17,8 g de CH_4/d por meio da técnica das câmaras respirométricas e 24,7 g de CH_4/d pela técnica do SF_6, com os maiores valores de emissão de CH_4 para a técnica do SF_6 conforme encontrados no presente estudo.

Em situação alimentar (60 % feno Tifton-85 e 40 % concentrado), peso (27 kg de PV) e raça (Santa Inês) dos animais bastante similares ao deste estudo, El-Zaiat (2013) encontrou emissão de 19,7 g de CH_4/d utilizando a técnica das câmaras respirométricas, ou seja, 5 g a mais dos valores aqui determinados (13,08 g de CH_4/d). Variações bem maiores nos dados obtidos com a técnica com SF_6 aqui descritos (21,98 CH_4 g/d) foi verificada em relação aqueles determinados por Moreira et al. (2013) de 10,5 g CH_4/d e Lima et al. (2014) de 11,66 g CH_4/d tendo em vista as diferenças nutricionais impostas aos ovinos que é determinante nesta avaliação.

4.4.3 Estado nutricional dos animais

Após a caracterização das variáveis sanguíneas e da fermentação ruminal sob a influência dos esporos de *Bt* 2036, dados associados ao processo digestivo dos ruminantes são de extrema importância para a investigação de possível comprometimento do seu desempenho.

Os animais controle consumiram em média 3,97 % do seu PV enquanto os animais tratados com *Bt* 2036 consumiram em média 3,82 % do seu PV, durante o teste de desempenho. Ambos os tratamentos apresentaram consumos satisfatórios e dentro das expectativas propostas pelo NRC (2007) de 3,91 % do PV para animais de 20 kg e 3,51 % do PV para animais de 30 kg para ganho em peso de 150 g/d e 200 g/d. Valores de GPD encontrados para os animais sem *Bt* e com *Bt* foram, respectivamente, de 143,61 g/d e 154,09 g/d apresentando valores de CA de 5,07 para o grupo controle e 4,95 para o grupo tratado. Estes dados indicam claramente que os ovinos foram bem alimentados e mantiveram estado de higidez durante todo o período experimental, sem a interferência dos esporos de *Bt*.

Os CMS do ensaio de DA foram, respectivamente, 847,43 e 916,40 g/d para os animais controle (25,28 kg de PV) e tratados com *Bt* (26,22 kg de PV). Estes dados também se apresentaram dentro dos valores ideais de 780 g MS/d para animais de 20 kg e 1.050 g MS/d para animais de 30 kg para ganho de 150 g/d e 200 g/d (NRC, 2007). Consumos das frações dos alimentos, assim como os CDA, de ambos os tratamentos apresentaram resultados satisfatórios, indicando ausência da intervenção dos bacilos 2036 na DA da dieta.

O metabolismo proteico dos ruminantes é bastante complexo e a determinação do balanço de compostos nitrogenados, ou seja, N consumido menos o N excretado, sob condições controladas, fornece quantificação do metabolismo proteico e demonstra especificamente se o organismo está perdendo ou ganhando proteína (ANDRIGUETO et al., 2002). A NH_3 presente no rúmen é originária da degradação da proteína verdadeira da dieta, do N não proteico da dieta, do N reciclado para o rúmen na forma de ureia e da degradação das células microbianas mortas no rúmen (BOER; MURPHY; KENNELLY, 1987). Concentrações de N-NH_3 de 19,72 mg/100 mL para o grupo controle e 19,12 mg/100 mL para o grupo *Bt* 2036 estão acima dos valores apresentados por Van Soest (1994) de 10 mg/100 mL, que seria a concentração mínima necessária para permitir adequada fermentação microbiana no rúmen.

Aferir a contribuição do processo fermentativo do rúmen no aporte de proteína para o ruminante torna-se importante. Neste sentido as bases púricas absorvidas no intestino dos ruminantes são provenientes, principalmente, das células microbianas do rúmen havendo relação dos DP encontrados nas excretas urinárias com as concentrações de NM absorvidos pelo animal (PUCHALA; KULASEK, 1992; PEREZ et al., 1996).

Estando de acordo com todos os resultados até o momento discutidos não houve diferença nas variáveis DP, NM e N retido entre os ovinos controle e os que receberam *Bt* 2036. Na literatura, verificou-se variações dos valores de DP e NM conforme o trabalho realizado por Bueno, Cabral Filho e Abdalla (2010), que apresentaram valores de DP urinários de 6,34 mmol/d e NM de 5,1 g/d. Tais variações referem-se à idade dos animais e qualidade da dieta consumida.

Em relação ao N retido, Zeoula et al. (2006), em estudo com ovinos sem raça definida (38,5 kg de PV), encontraram valores de 14,77 g de N/d e 14,66 g de N/d respectivamente em dietas com 14 % de PB e teores de 54 % e 58 % de proteína degradada no rúmen. El-Zaiat (2013) encontrou retenção de 6,41 g/d de N em seu experimento com ovinos Santa Inês consumindo dieta com 13,5 % de PB. Os animais tratados e não tratados com *Bt* 2036, que consumiram dieta com aproximadamente 17 % de PB, apresentaram retenção de N superior aos apresentados na literatura citada, representando maior ganho proteico e consequentemente, maior ganho em peso pelos ovinos.

4.5 Conclusão

A inclusão diária de $2{,}5 \times 10^6$ esporos/kg PV do *Bt* 2036 na dieta dos ruminantes não repercutiu em alterações hematológicas ou possível quadro de intoxicação dos animais, tampouco houve prejuízo nos processos fermentativos do rúmen, na emissão de CH_4 entérico, na microbiota ruminal, na digestibilidade da dieta e no desempenho dos ovinos.

Referências

ABDALLA, A. L. et al. *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 44, p. 953-964, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTIS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 16. ed. Arlington: AOAC Iternacional, 1995. v. 1, p. 1-30.

BALCELLS, J.; GUADA, J. A.; PEIRB, J. M. Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 515, p. 153-151, 1992.

BARROS, C. S. L. Fígado, vias biliares e pâncreas exócrino. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2010. p. 183-290.

BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 10, p. 567-590, 1990.

BOER, G.; MURPHY, J. J.; KENNELLY, J. J. Mobile nylon bag for estimating availability of rumen undegradable protein. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 70, p. 977-982, 1987.

BRAUN, J. P.; LEFEBVRE, H. P. Kidney function and damage. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, M. L. B. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 485-528.

BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S. L. S.; ABDALLA, A. L. rumen microbial growth in sheep fed three distinct quality hay. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Yucatán, v. 12, p. 239-246, 2010.

CZAUDERNA, M.; KOWALCZYK, J. Quantification of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in ovine urine by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 744, p. 129-138, 2000.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. p. 15-86.

DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; MCLAREN, J. B. Occurrence of the rumen ciliate *Oligoisotricha bubali* in domestic cattle (*Bos taurus*). **Applied and Environmental Microbiology,** Baltimore, v. 45, p. 1394–1397, 1983.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rúmen. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 572–582, 2006.

DENMAN, S. E.; TOMKINS, N. W.; McSWEENEY, C. S. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 62, p. 313-322, 2007.

DRYZGA, M. D. et al. Evaluation of the safety and nutritional equivalence of a genetically modified cottonseed meal in a 90-day dietary toxicity study in rats. **Food and Chemical Toxicology**, London, v.45, n. 10, p. 1994-2004, 2007.

EL-ZAIAT, H. M. M. **Efeito da inclusão de nitrato na dieta sobre a fermentação ruminal, a emissão de metano entérico eo desempenho de ovinos**. 2013. 125 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Agronimia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

FETTMAN, M. J.; REBAR, A. Avaliação laboratorial da função renal. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 285-310.

GENTIL, R. S. et al. Metabolismo de nutrientes em ovinos alimentados com casca de soja em substituição ao feno de coastcross. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 12, p. 2835-2843, 2011.

GEORGE. S. K. et al. Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 832, p. 134-137, 2006.

GRISOLIA, C. K. et al. Acute toxicity and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*strains on fish and mouse bone marrow. **Ecotoxicology**, London, v. 18, p. 22-26, 2009.

HEPLER, O. F. **Manual of clinical laboratory methods**. Springfield, IL: Charles C. Thomas, 1966.

HOFFMAN, W. E.; SOLTER, P. F. Diagnostic enzymology of domestic animals. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, M. L. B. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 351-378.

IAEA. **Estimation of rumen microbial protein production from purine derivatives in urine**. Vienna, 1997. 48 p. (IAEA-TECDOC, 945).

IAEA. **The technique for the estimation of microbial N supply in ruminants from purine derivation in urina**. Training Package. Version 1.0. Vienna: FAO/IAEA, 2003. 1 CD-ROM.

JOHNSON, K. et al. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF6 tracer technique. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 28, p. 359-362, 1994.

JUBERG, D. R. et al. Acute and repeated dose (28 day) mouse oral toxicology studies with Cry34Ab1 and Cry35Ab1 Bt proteins used in coleopteran resistant DAS-59122-7 corn. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Orlando, v. 54, n. 2, p. 154-163, 2009.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária**: bioquímica clínica e hematologia. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. 241 p.

LANA, R. P. **Nutrição e alimentação animal** (mitos e realidades). 1. ed. Viçosa: UFV, 2005. 343 p.

LASSEY, K. R. et al. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 31, n. 18, p. 2905-2914, 1997.

LASSEN, E. D. Avaliação laboratorial do fígado. In: THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 335-343.

LIMA, P. M. T. et al. Adaptations of the methane determination SF6 tracer technique from bovine to sheep in Brazil. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS - WBC, 26., 2010, Santiago, Chile. **Proceedings…** Santiago, Chile, 2010.

LIMA, P. M. T. et al. Methane emission of Santa Inês sheep fed cottonseed by-products containing different levels of gossypol. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 46, p. 285–288, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(^{-\Delta\Delta Ct})$ method. **Methods**, Orlando, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

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

MANCEBO, A. et al. Acute oral, pulmonary and intravenous toxicity/pathogenicity testing of a new formulation of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* SH-14 in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Orlando, v. 59, p. 184-190, 2011.

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

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine**: interpretation and diagnosis. 3. ed. Philadelphia, PA: W. B. Saunders, 2004.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero Bacillus**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 65 p. (Documentos, 60).

MOREIRA, G. D. et al. Tropical tanniniferous legumes used as an option to mitigate sheep enteric methane emission. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 45, p. 879-882, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrition requirements of small ruminates**: sheep, goats, cervids and world camelids. Washington, DC: The National Academy of Science Press, 2007.

NOCEK, J. E.; HART, S. P.; POLAN, C. E. Rumen ammonia concentrations as influenced by storage time, freezing and thawing, acid preservative, and method of ammonia determination. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 70, p. 601-607, 1987.

ØRSKOV, E. R. **Protein nutrition in ruminant**. 2. ed. New York, NY: Academic Press, 1992.

OWENS, F. N., GOETSCH, A. L. Fermentacion ruminal. In: CHURCH, D. C. **El ruminant Fisiología digestive y nutrición**. Zaragoza, ES: Editorial Acribia, 1993. cap. 8, p. 159-190.

PALMQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acid in lactating dairy cowns fed high fat diets. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 54, p. 1025-1033, 1971.

PEREZ, J. F. et al. Determination of rumen microbial-nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using 15N and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenal. **British Journal Nutrition**, Cambridge, v. 75, p. 699-709, 1996.

PINARES-PATIÑO, C. S. et al. Measurement of methane emission from sheep by the sulphur hexafluoride tracer technique and by the calorimetric chamber: Failure and success. **Animal**, Cambridge, v. 2, n. 1, p. 141-148, 2008.

PUCHALA, R.; KULASEK, G. W. Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and excretion of purine derivatives. **Canadian Journal of Animal Science**, Albany, v. 72, n. 4, p. 821-830, 1992.

PRIMAVESI, O. et al. **Técnica do gás traçador SF6 para medição de campo do metano ruminal em bovinos**: Adaptações para o Brasil. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2004. 76 p. (Documentos, 39).

ROBERTSON, J. B.; VAN SOEST, P. J. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: JAMES, W. P. T.; THEANDER, O. (Ed.). **The analysis of dietary fiber in food**. New York, NY: Marcel Dekker, 1981. chap. 9, p. 123-158.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**. Versão 9.1. Cary, NC, 2009.

SHINGFIELD. K. J.; OFFER, N. W. Simultaneous determination of purine metabolites, creatinine and pseudouridine in ruminant urine by reversed-phase high- performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 723, p. 81-94, 1999.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

TENNANT, B. C.; CENTER, S. A. Hepatic function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, M. L. B. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 379-412.

THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 3-22.

TVEDTEN, H. Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: WEIS, D. J.; WARDRO, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. London: Wiley-Blackwell, 2010.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 3. ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1994. 166 p.

UNITED NATIONS FRAMEWORK CONVENTION ON CLIMATE CHANGE - UNFCCC. **Synthesis and assessment report on the greenhouse gas inventories submitted in 2013**. Bonn, Germany, 2013. Disponível em: <http://unfccc.int/resource/webdocs/sai/2013.pdf> Acesso em: 13 fev 2014.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI. T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**, 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 151-182.

VAN HOUTERT, M. F. J. The production and metabolism of volatile fatty acids ruminants fed roughages: A review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 43, p. 189-225, 1993.

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

ZEOULA, L. M. et al. Digestibilidade e balanço de nitrogênio de rações com diferentes teores de proteína degradável no rúmen e milho moído como fonte de amido em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 2179-2186, 2006.