

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LIZBETH LOURDES COLLAZOS PAUCAR

**Quantificação de metano entérico e metabolismo ruminal de bovinos
alimentados com enzimas fibrolíticas e amilolíticas**

Pirassununga
2017

LIZBETH LOURDES COLLAZOS PAUCAR

**Quantificação de metano entérico e metabolismo ruminal de bovinos
alimentados com enzimas fibrolíticas e amilolíticas**

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração:
Qualidade e Produtividade Animal

Orientador:
Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues

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

C697q COLLAZOS PAUCAR, LIZBETH LOURDES
Quantificação de metano entérico e metabolismo
ruminal de bovinos alimentados com enzimas
fibrolíticas e amilolíticas. / LIZBETH LOURDES
COLLAZOS PAUCAR; orientador Prof. Dr. PAULO
HENRIQUE MAZZA RODRIGUES. -- Pirassununga, 2017.
81 f.

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

1. Enzimas fibrolíticas. 2. Metano entérico. 3.
Fermentação ruminal. 4. Consumo. 5. Digestibilidade.



Universidade de São Paulo

Janus

ATA DE DEFESA

Aluno: 74131 - 8704483 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Lizbeth Lourdes Collazos Paucar no Programa: Zootecnia, do(a) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

Aos 20 dias do mês de abril de 2017, no(a) Casa Atividades Culturais SL 2 realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Lizbeth Lourdes Collazos Paucar, apresentada para a obtenção do título de Doutora intitulada:

"Quantificação de metano entérico e metabolismo ruminal de bovinos alimentados com enzimas fibrolíticas e amilolíticas"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Paulo Henrique Mazza Rodrigues	Presidente	FNVZ - USP	<u>Aprovada</u>
Raul Franzolin Neto	Titular	FZEA - USP	<u>Aprovada</u>
Messias Alves da Trindade Neto	Titular	FNVZ - USP	<u>Aprovada</u>
Milton Honorio Nuñez Berrocal	Titular	UNAS - Externo	<u>Aprovada</u>
Giovana Tommaso	Suplente	FZEA - USP	<u>Aprovada</u>

Resultado Final: Aprovada

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Erica Cristina Mello Ferraz , levo a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhoras(as), Pirassununga, aos 20 dias do mês de abril de 2017.


Raul Franzolin Neto


Messias Alves da Trindade Neto


Milton Honorio Nuñez Berrocal


Giovana Tommaso


Paulo Henrique Mazza Rodrigues
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 26/04/2017 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutora em Ciências obtido no Programa Zootecnia - Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal.


Presidente da Comissão de Pós-Graduação
Profa. Dr.ª Rosemary Ap. de Carvalho
Presidente da Comissão de
Pós-Graduação
FZEA/USP

DEDICATORIA

A DEUS pela saúde, força e coragem que me guiaram ao longo da minha vida.

À minha mãe Simeona, meu exemplo de vida, por todos os ensinamentos, pelo amor, apesar da distância, sempre esteve comigo; para você dedico este trabalho mamãezinha.

Aos meus irmãos, por todo amor e incentivo em todas as etapas de minha vida.

Ao meu pai Ceferino (*in memoriam*), que levou uma parte de mim quando se foi. Pai a sua ausência sempre me causa tristeza, mas com sua lembrança, sinto que é um exemplo de pai, pelos melhores momentos, por todo os ensinamentos, obrigada pelo apoio de minhas escolhas. O senhor sempre estará presente em minha vida. Te amo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em todos os momentos, protegendo-me e guiando-me, durante todo este período da minha vida.

À minha família pelo carinho, amor, confiança, compreensão de minhas escolhas e mesmo de longe vocês acompanharam passo a passo mais uma etapa da minha vida, pelos melhores momentos, pelas melhores lembranças, pela melhor educação, obrigada pela paciência e pelo apoio ao longo desses anos de estudo longe de casa. Amo vocês!!

Ao Prof. Dr. PAULO HENRIQUE MAZZA RODRIGUES, pela amizade, orientação, paciência, confiança e dedicação com a qual me acompanhou no desenvolvimento deste trabalho e principalmente pelo grande profissional exemplar que você é, que faz de você uma pessoa maravilhosa. Sou muito grata e honrada por ter tido a oportunidade de trabalhar e aprender com colegas do Laboratório de Nutrição de Ruminantes.

À Prof. Dra. Karen Beauchemin pela oportunidade concedida em desenvolver meu experimento e trabalhar na sua equipe. Pela qualidade de profissional que você é fica minha eterna gratidão e muito obrigada, durante o estágio no Agriculture and Agri-Food Canada Research Centre, na cidade de Lethbridge - Alberta/Canada.

A Universidade de São Paulo e à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Professor Júlio César de Carvalho Balieiro pela orientação acadêmica, confiança, por sempre me atender com facilidade. Muito obrigada.

Aos professores da FZEA pelos ensinamentos durante as aulas, e todos os outros que tive o prazer de conhecer na FZEA.

Ao Professor Ives Cláudio da Silva Bueno pela oportunidade de participar do Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE) em sua disciplina.

À Professora Giovana Tommaso pela paciência e confiança em mim, por sempre me atender com facilidade. Muito obrigada.

Aos colegas dos Laboratórios de Cromatografia, Bioquímica e Bromatologia do VNP (FMVZ/USP), Ari, Gilson, Renata, Simi, Ana Flavia agradeço o aprendizado e auxílio na realização das análises laboratoriais.

Aos colegas do grupo de pesquisa - Laboratório Nutrição de Ruminantes, Maria Fernanda, Flavio Perna, Ricardo Nogueira, Eduardo Cassiano, Diana Zapata, Roberta Carvalho, Laura Solórzano, Italo Zoin. Muito obrigada por todos os momentos compartilhados.

À Dra. Paula Meyer pela confiança, amizade, paciência por sempre me atender com facilidade e por todas as conversas. Muito obrigada.

À Dra. Lucia Holtshausen do laboratório de Nutrição de Ruminantes – AAFC. A qual com muita paciência me apoio no desenvolvimento do experimento e A. Furtado, D. Vedres pelos análises.

A meus amigos de Seção de Cooperação Internacional FZEA principalmente Clélia pela confiança, amizade, paciência por sempre me atender com facilidade. Muito obrigada.

Ao pessoal da Biblioteca FZEA principalmente Girlei, Vanessa e Patrícia.

Aos amigos Veronica, Jorge, Gilda, Diana, Victor, Lerner, Lia, Gerardo, José, Connie, Gabi, Caroline, Jamile, Girlei, Pedro Neto, Adriana, Karina, Lourdes, Abmael, Estella, Wilma, Irma, Rosani, Rosiane, Jaime, Willy, Milthon, Yeni, Miguel, Medardo, Cristina, Viviane, Glória, Débora, Renan, Silmar, Gonçalo.

Às alunos de iniciação científica Jorge Toloza, Renata, Flavia, pela ajuda durante a coleta e análise do experimento.

Ao senhor Gilmar Edson pelo carinho e cuidado com os animais, e pelos bons momentos compartilhados.

Aos amigos Paul Bahamondes, Wala, Chen, Catalina, Gabriel Ribeiro, José Barbieri, Héctor Cárcamo, Jessie, Martin, Jhony, Daniela, Dessiré pela amizade construída durante a minha estadia no Canada.

À PRONABEC pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa

À empresa ALLTECH®, pelo fornecimento do produto testado.

As 05 vaquinhas pela participação no experimento, deixo meu sincero respeito.

Enfim, a todos que não foram citados, mas que participaram direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

COLLAZOS, P. L. **Quantificação de metano entérico e metabolismo ruminal de bovinos alimentados com enzimas fibrolíticas e amilolíticas.** 2017. 81 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2017.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de enzimas sobre a ingestão de matéria seca, digestibilidade dos nutrientes, comportamento alimentar, produção de CH₄ entérico e os parâmetros fermentativos, além da produção de metano nas fezes de bovinos, utilizando biodigestores. O experimento foi conduzido na Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP, Brasil. Foram utilizadas cinco vacas, com peso médio de 923,04 ± 86,76 kg, canuladas no rúmen, distribuídas em cinco tratamentos utilizando delineamento experimental em quadrado latino 5x5: 1) **Controle**: dieta sem adição de enzimas; 2) **Amilase**: dieta com 7,5 g de amilase/animal/dia (Amaize, ALLTECH); 3) **Xilanase**: dieta com 15 g de xilanase/animal/dia (Fibrozyme, ALLTECH); 4) **Celulase + protease**: dieta com 7,5 g celulase + protease/animal/dia (Allzyme VegPro PO, ALLTECH); 5) **Pool**: dieta com 30 g de mistura de enzimas (amilase, xilanase e celulase + protease)/animal/dia. Cada período experimental consistiu de 21 dias (os primeiros 15 dias foram utilizados para adaptação da dieta e os últimos 5 dias para a coleta de dados). Nos dias 10 e 20, foi avaliada a digestibilidade utilizando o marcador de óxido crômico e coleta de fezes. No dia 17, foi avaliada o comportamento ingestivo por 24 horas, através de monitoramento visual a cada 5 minutos. No dia 19, foi mensurado o pH ruminal a cada 10 minutos, utilizando-se probes de mensuração contínua. Para quantificar os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), metano, concentração de N-NH₃ e protozoários, coletou-se conteúdo ruminal antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matinal. A técnica de fermentação consistiu na incubação de conteúdo de rúmen líquido e sólido em frascos em banho-maria 39 °C durante 30 minutos. Na subsequente medição da produção de metano usou-se cromatografia gasosa. Nos dias 20 e 21, foi avaliada a dinâmica ruminal. Os dados foram analisados pelo programa SAS, através do procedimento PROC MIXED. O modelo, o efeito de tratamento como fator fixo e os efeitos de animal e período como fatores aleatórios, considerado nível de significância de 5%. A adição de enzimas não mostrou diferença significativa em relação ao consumo de matéria seca (CMS), digestibilidade, comportamento ingestivo, produção de CH₄, N-NH₃, protozoários ou dinâmica ruminal. A associação de enzimas (tratamento Pool) aumentou a produção de acético, propiônico e AGCC totais em relação à dieta controle. As variáveis pH mínimo, médio e máximo, tempo de pH abaixo de 5,8, 6,0, 6,2 e 6,5, assim como área de pH abaixo de

5,8, 6,0, 6,2 e 6,5 não diferiram significativamente entre os tratamentos. Não foram verificadas diferenças para a produção de biogás ou teores sólidos do efluente. Concluiu-se que a utilização destes aditivos, nas proporções usadas, não afetou as variáveis de CMS, digestibilidade, comportamento ingestivo, produção de CH₄, pH, protozoários, N-NH₃ ou dinâmica ruminal. A associação de enzimas apresentou melhora na produção de AGCC ruminal sem aumentar a emissão de CH₄.

Palavras-chave: Enzimas, consumo, metano, fermentação ruminal.

ABSTRACT

COLLAZOS, P. L. **Quantification of enteric methane and ruminal metabolism of cattle fed with fibrolytic and amylolytic enzymes.** 2017. 81 f. Phd. Thesis - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2017.

The objective of this study was to evaluate the effect of enzymes on dry matter intake, nutrient digestibility, feeding behavior, production of enteric CH₄ and fermentative parameters, as well as the production of methane in bovine feces using digester. The experiment was conducted at the University of São Paulo, Pirassununga/SP, Brazil. Five cows were used, with a mean weight of 923.04 ± 86.76 kg, cannulated in the rumen, distributed in five treatments using 5x5 Latin square experimental design: 1) Control: diet without addition of enzymes; 2) Amylase: diet with 7.5 g of amylase/animal.day(Amaize,Alltech); 3) Xylanase: diet with 15 g of xylanase/animal.day(Fibrozyme, Alltech); 4) Cellulase + protease: diet with 7.5 g of cellulase + protease/animal.day (Allzyme VegPro PO, Alltech); 5) Pool: diet with 30 g of enzymes pool (amylase, xylanase and cellulase + protease)/animal.day. Each experimental period consisted of 21 days (first 15 days were used for diet adaptation and the last 5 days for data collection). On days 10th and 20th, digestibility was evaluated using the chromic oxide marker and fecal collection. On the 17th day, ingestive behavior was evaluated for 24 hours, through visual monitoring every 5 minutes. On day 19th, ruminal pH was measured every 10 minutes, using a continuous measurement device. In order to quantify short-chain fatty acids (SCFA), methane, concentration of NH₃-N and protozoa, rumen contents were sampled prior to and 3, 6, 9 and 12 hours after morning feeding. The fermentation technique consisted of incubation of liquid and solid rumen contents in bottles in a water bath 39 °C for 30 minutes. Subsequent measurement of methane production using gas chromatography On days 20th and 21th, ruminal dynamic was evaluated by emptying this organ. Data were analyzed using SAS, through the PROC MIXED procedure. The model included the effect of treatment as fixed factor, animal and period effects as random factors, considered level of significance of 5%. The addition of enzymes showed no significant difference in relation to dry matter intake (DMI), digestibility, ingestive behavior, CH₄ production, NH₃-N, protozoa or ruminal dynamics parameters. The association of enzymes (pool treatment) increased acetic, propionic and total SCFA production in relation to the control diet. Not significant differences were observed for the pH variables, as minimum, average and maximum pH, as well as time and area which pH was below to 5.8, 6.0, 6.2 and 6.5. No differences were verified for biogas production or solid effluent contents. It is concluded that these additives, in the proportions used, did not affect the variables of DMI, digestibility, ingestive behavior, CH₄ production, pH, protozoa, NH₃-N or ruminal dynamic. The association of the enzymes showed improvement in the production of rumen SCFA without increasing the CH₄ emission.

Key words: Enzymes, intake, methane, ruminal fermentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Biodigestores e respectivos gasômetros (vista frontal).....	41
Figura 2 - Atividades do tempo médio (%) de cada tratamento em bovinos alimentados com dietas adicionadas de enzimas.	51
Figura 3 - Tempo de consumo acumulado (% do dia) de cada tratamento no decorrer de 24 horas em bovinos alimentados com enzimas.....	53
Figura 4- Produção relativa (controle considerando 100%) dos produtos da fermentação (mol/kg/dia) para os diferentes tratamentos.	58
Figura 5 - pH (média de 5 observações) mensurado durante 24 h em bovinos alimentados com enzimas. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporção de nutrientes e análise química das dietas experimentais	29
Tabela 2 - Características dos substratos utilizados nos biodigestores.	39
Tabela 3 - Efeito da adição de enzimas na dieta sobre o consumo de matéria seca.....	45
Tabela 4 - Efeito da adição de enzimas na dieta sobre o consumo, digestibilidade e excreção dos nutrientes.....	47
Tabela 5 - Efeito da adição de enzimas na dieta sobre o comportamento ingestivo.	50
Tabela 6 - Taxas de ingestão, ruminação e mastigação em bovinos alimentados com enzimas	52
Tabela 7 - Efeito da adição de enzimas sobre a dinâmica ruminal na alimentação de bovinos.	54
Tabela 8 - Efeito da adição de enzimas na dieta sobre a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), metano (CH ₄) e a perda de energia relativa (PER).	56
Tabela 9 - Efeito da adição de enzimas na dieta de bovinos sobre a produção de N-NH ₃	59
Tabela 10 – Efeito de enzimas na alimentação de bovinos sobre as variáveis de pH ruminal medidas continuamente durante 24 h.	60
Tabela 11 - Efeito da adição de enzimas na dieta de bovinos sobre a contagem total e diferencial de protozoários.	62
Tabela 12 – Resultados de pH para afluentes e efluentes em biodigestores abastecidos com fezes de bovinos alimentados com enzimas.	63
Tabela 13 - Sólidos totais e voláteis destruídos em biodigestores abastecidos com fezes de bovinos alimentadas com enzimas.	64
Tabela 14 - Rendimento e concentração de biogás e metano em digestores abastecidos com fezes de bovinos alimentados com enzimas.	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta

CH₄ – Metano

PER – Perda de energia relativa

CMS – Consumo de Matéria Seca

CO₂ – Dióxido de carbono

EE – Extrato etéreo

EPM – Erro padrão da média

FDA – Fibra em detergente ácido

FDN – Fibra em detergente neutro

Fr. – Frasco

g – gramas

h – horas

H₂ – Hidrogênio

kg – quilogramas

L – litros

m – metros

mg – miligramas

mg/mL – miligrama por mililitro

min – minutos

mL – mililitros

mM – miliMol

MS – Matéria seca

N-NH₃ – Nitrogênio amoniacal

P – Fósforo

Ca – Cálcio

PB – Proteína bruta

Prod. – Produção

T₀ – Tempo zero, branco

T₃₀ – Tempo 30 minutos, incubado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Caracterização das emissões de gases	17
2.2	Ambiente e fermentação ruminal.....	18
2.3	Estratégias nutricionais para diminuição da perda energética através do metano	19
2.4	Estratégias de mitigação de metano e recuperação de nutrientes dos dejetos.....	20
2.5	Metodologias para estimar a produção de metano em ruminantes	21
2.6	Uso de enzimas exógenas no metabolismo ruminal	23
	HIPÓTESE E OBJETIVO	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Local experimental e bioética	28
3.2	Manejo e alimentação dos animais	28
3.3	Delineamento experimental e tratamentos	30
3.4	Características avaliadas de consumo, digestibilidade e comportamento ingestivo	30
3.5	Características avaliadas da fermentação ruminal.....	33
3.6	Características avaliadas da biodigestão anaeróbia das fezes.	39
3.7	Análises estatísticas	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1	Consumo, Digestibilidade e comportamento ingestivo.....	45
4.2	Quantificação de metano e características fermentativas	54
4.3	Produção de metano através da biodigestão anaeróbia	63
5	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas são identificadas como problema mundial das últimas décadas, sendo a emissão de gases de efeito estufa uma das principais causas. A busca por métodos acurados, simples e rápidos para mensurar a produção de metano e outros produtos da fermentação ruminal, que visem à redução na emissão de gases do efeito estufa (GEE), tem sido prioridade de estudos. A agropecuária é uma das atividades que contribui com a emissão de GEE no mundo, principalmente, com a emissão de CH_4 de origem entérica. Esta emissão se dá através do processo de fermentação ruminal, que é o resultado da intensa atividade da microbiota presente no rúmen, degradando os componentes da dieta (celulose, hemicelulose, pectina, amido, etc.) em compostos tais como: ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Apesar das concentrações de CH_4 e N_2O na atmosfera serem menores que de CO_2 , a importância das mensurações de seus fluxos de emissão é devido a esses gases apresentarem potencial de aquecimento global de 23 e 296 vezes maiores em relação ao CO_2 , respectivamente (SNYDER et al., 2008). É sabido que o CH_4 que é um subproduto da digestão dos carboidratos e o H_2 é removido pelos microrganismos ruminais, transformando-se em CH_4 , gera perdas energéticas ao animal, variando entre 2 a 12% da energia bruta total consumida (JOHNSON & JOHNSON, 1995). À medida que um ruminante adulto pode produzir até 17 litros de metano por hora (RUSSELL, 2002) e que este gás não pode ser metabolizado pelo animal, nem pela microbiota ruminal, perde-se a maior parte para o meio ambiente por expiração ou eructação (MOSS, 2000). O principal efeito dos aditivos é manipular a fermentação ruminal, aumentando a formação de propiônico e diminuindo a formação de metano. Com o objetivo de aumentar a eficiência de utilização dos alimentos pelos ruminantes e a utilização de produtos biotecnológicos que modificam os parâmetros de fermentação ruminal, destaca-se a suplementação com enzimas exógenas. Estas enzimas tem objetivo aumentar a eficiência do processo fermentativo, favorecendo a degradação dos polissacarídeos estruturais, aumentando a taxa de degradação da fibra e promovendo melhoria no desempenho produtivo, possivelmente em razão de seus efeitos nos processos digestivos, da degradação da parede celular, da manutenção de níveis adequados de amônia no rúmen e da estabilização do pH ruminal (DOREAU et al., 2010). O uso de aditivos enzimáticos exógenos degradantes de fibras para ruminantes foi analisado inicialmente na década de 1960, como revisto por Beauchemin & Rode (1996). As ações das enzimas exógenas podem variar

de fontes animais, vegetais ou microbianas, sendo que a maioria é obtida pela fermentação de microrganismos, em maior parte os fungos do gênero *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicilium*. Os fungos são mais utilizados para esta fermentação, pelo fato de produzirem maior quantidade de enzimas, com maior estabilidade e menor custo.

Dentre os produtos biotecnológicos modificadores dos parâmetros de fermentação ruminal, destaca-se a suplementação com enzimas, extraídas de fungos ou bactérias, que em atuação conjunta com as enzimas produzidas pelos microrganismos ruminais, aumentam a eficiência do processo fermentativo. As enzimas são proteínas de alta complexidade molecular que, sob condições específicas de umidade, temperatura e pH, atuam sobre substratos específicos, agindo como catalisadores, acelerando e possibilitando uma reação (BEAUCHEMIN et al., 1999), podendo ser utilizadas como suplemento na dieta, melhorando a digestibilidade da parede celular da planta e a eficiência do aproveitamento da alimentação (TRICARICO et al., 2008).

A manipulação da fermentação ruminal tem sido estudada nas últimas décadas e várias estratégias têm sido aplicadas, tais como a inclusão de enzimas exógenas como aditivos alimentares para ruminantes que tem recebido maior prioridade pelo seu potencial no aumento da degradabilidade das fibras e na melhoria do desempenho animal (BEAUCHEMIN et al., 2007; 2003; ROJO et al., 2015; ELLIS et al., 2012). As enzimas fibrolíticas demonstraram melhorar a digestão das frações das fibras e fermentação ruminal, funcionando sinergicamente com as enzimas microbianas do rúmen (ALSERSY, H et al., 2015).

Várias estratégias vêm sendo aplicadas para tentar reduzir a produção de metano entérico, tal qual a inclusão de enzimas exógenas como aditivos na alimentação de ruminantes que vem recebendo grande importância, pois tende a aumentar a digestibilidade dos alimentos e melhorar o desempenho animal (BEAUCHEMIN et al., 2007). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de enzimas na alimentação de ruminantes como estratégia nutricional visando à mitigação do CH₄ entérico, determinada pela técnica *ex situ*, e demais parâmetros do metabolismo ruminal e digestivo, bem como a emissão de GEE nas fezes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Caracterização das emissões de gases

Na produção animal, a preocupação do nutricionista é obter a melhor eficiência alimentar, a melhor relação entre ganho de peso e consumo de matéria seca, resultando em alta produtividade. Essa busca, a diminuição de perda energética por eructação de gases, como o metano entérico e dióxido de carbono, é importante, uma vez que o animal pode perder de 2 a 12% da energia do alimento ingerido apenas eructando esses gases (JOHNSON et al., 1993). É sabido que há três principais fontes de metano emitido no globo terrestre, são elas: naturais (pântanos, oceanos e populações de cupins), ligadas à geração de energia e dejetos (queima de gás, carvão, lagoas) e à atividade agropecuária (arrozais e rebanhos). A pecuária mundial é responsável por cerca de 32% da emissão de metano antropogênico (PERDOK & NEWBOLD, 2009).

Papel importante do hospedeiro ruminante é manter as condições ruminais, para assegurar que o metabolismo dos microrganismos se mantenha ativo para fermentar os nutrientes da dieta (VALADARES FILHO, 2006). A produção de metano no rúmen é realizada pelas arqueas metanogênicas e está relacionada a concentração de hidrogênio e gás carbônico (CHAUCHEYRAS et al., 1995). Durante a fermentação ruminal, os carboidratos são convertidos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), sendo a formação destes ácidos acompanhada pela produção de hidrogênio, podendo gerar metano. A produção de metano nada mais é do que uma forma de remoção dos íons hidrogênio do rúmen. A emissão de metano depende da quantidade de alimento ingerido e da qualidade da dieta e digestibilidade proporcionam maior consumo com menor emissão de metano entérico por unidade de alimento ingerido, do que dietas de baixa qualidade (PRIMAVESI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007). Algumas práticas, tais como o uso de aditivos alimentares, redução na idade de abate, manejo adequado das pastagens, melhoramento genético de forrageiras, uso de vacinas e adoção de manejo intensivo e dos sistemas integrados lavoura-pecuária (PEDREIRA & PRIMAVESI 2009; BERNDT, 2009), possuem grande potencial de mitigação dos GEE. A temperatura ambiental também pode afetar a produção de gases, tanto indiretamente pela interferência na composição química das plantas, como de forma direta, alterando o comportamento ingestivo do animal e as características da digestão (MOSS, 2000). Precusores do propionato, como fumarato ou malato, reduzem a formação de metano, agindo como alternativa para a captação de hidrogênio (NEWBOLD et al., 2002).

2.2 Ambiente e fermentação ruminal

No rúmen há populações de bactérias, protozoários e fungos, envolvendo atividades integradas entre diferentes espécies, com a etapa final realizada pelas arqueas metanogênicas (McALLISTER et al., 1996). A composição e a quantidade da dieta, assim como a ingestão de matéria seca (MS), tem impacto sobre o padrão de fermentação ruminal, podendo alterar a taxa de crescimento destes microrganismos. Diferentes substratos determinarão a comunidade de microrganismos que os fermentarão, alterando a proporção molar entre os AGCC (VALADARES FILHO, 2006). De forma geral, em dietas à base de forragens, as proporções entre os AGCC no rúmen se mantêm em torno de 65:25:10 moles de acetato, propionato e butirato, respectivamente, enquanto que para dietas com maior proporção de concentrado se encontram ao redor de 50:40:10 moles (CARVALHO et al., 2003).

No ambiente ruminal, os microrganismos estão distribuídos no líquido ruminal, aderidos à fração sólida da digesta ou ligados à parede ruminal. O processo de fermentação é dependente das interrelações na microbiota ruminal (YOKOYAMA & JOHNSON, 1993).

As bactérias se encontram agrupadas em função do substrato que fermentam e podem ser classificadas em fermentadoras de carboidratos estruturais, não-estruturais, proteolíticas e lipolíticas (RUSSELL, 2002). Bactérias celulolíticas tem a habilidade bioquímica de produzir a celulase, enzima que pode hidrolisar a celulose e outros carboidratos. Exemplos de bactérias celulolíticas são: *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Clostridium* e *Cillobacterium cellulosolvens*. Os protozoários são importantes na fermentação ruminal e se caracterizam por serem microrganismos anaeróbios, unicelulares, com tamanho variando de 20 a 200 μm (DEHORITY, 1993). Sua população varia de acordo com o tipo de substrato e sua concentração se encontra entre 10^4 a 10^6 protozoários/mL de conteúdo ruminal e pode representar de 40 a 60% do total da biomassa ruminal (ARCURI & CARNEIRO, 2006). Segundo Nogueira Filho et al. (2001), o tempo decorrido após a alimentação, o consumo alimentar, a produção de saliva, a taxa de fermentação e a concentração de seus produtos finais (RUSSELL & RYCHLIK, 2001) são fatores relacionados ao número de protozoários no rúmen.

2.3 Estratégias nutricionais para diminuição da perda energética através do metano

A manipulação do metabolismo ruminal, através da qualidade de alimento fornecido, constitui-se em importante fator que afeta a taxa de emissão de metano entérico (JOHNSON & JOHNSON, 1995). Porém, a manipulação dietética-nutricional dos parâmetros de fermentação ruminal se torna uma estratégia direta de maior potencial em termos de simplicidade e efetividade (BONILLA & LEMUS, 2012). Os ruminantes são dependentes de produtos da fermentação, como os AGCC e, com o intuito de minimizar as perdas energéticas da dieta por metanogênese, diversas estratégias nutricionais são estudadas. Russell (2002) relatou que entre as características de uma fermentação ideal está a baixa produção de metano, visando ótima eficiência alimentar, maior produtividade e consumo baixo de matéria seca. Entretanto, Johnson et al. (1993) detectaram associação negativa entre emissão de metano e energia digestível, quando expressa em porcentagem da energia bruta ingerida. Nkrumah et al. (2006) relataram que novilhos com baixa conversão alimentar e, portanto, mais eficientes, produziram menos metano do que novilhos menos eficientes. Isto posto, torna-se claro o objetivo de vários pesquisadores de possuir maior entendimento e controle sobre o metabolismo ruminal (SCHELLING, 1984), assim como estudar estratégias para diminuição da produção de metano. Diversos métodos foram desenvolvidos com o objetivo de se quantificar a emissão de metano por ruminantes, sob diferentes condições (MURRAY et al., 1976; FRANCE et al., 1993; JOHNSON et al., 1994). Tem sido objeto de estudo por nutricionistas a busca por estratégias para aumentar a eficiência do rúmen, atenuando a produção de metano, sem causar impacto negativo sobre a produtividade animal (McALLISTER et al., 1996). Altas proporções de amido nas dietas diminuem a produção de CH₄ por unidade de matéria orgânica fermentável no rúmen, devido ao aumento da produção de propionato. O metabolismo ruminal pode ser alterado de forma direta ou indireta para melhorar a digestibilidade do alimento fornecido (VARGA & KOLVER, 1997), sendo que a ação de aditivos alimentares, sobre o metabolismo ruminal, modulam determinadas vias metabólicas dos microrganismos ruminais, agindo como modificadores de fermentação ruminal (CHALUPA, 1977).

2.4 Estratégias de mitigação de metano e recuperação de nutrientes dos dejetos

Parte do alimento ingerido pelos bovinos não é totalmente aproveitada e acaba sendo descartada, em função da não digestão dos nutrientes. O alimento não aproveitado pelo animal é descartado na forma de dejetos, tornando-se o principal resíduo do sistema de produção de bovinos. Esses dejetos são compostos orgânicos ricos em macro e micronutrientes, possuem alto teor energético (CASTRILLÓN et al., 2002). Na bovinocultura leiteira, Van Horn et al. (1994) observaram que do total da energia ingerida pelas vacas, 33% é perdida através dos dejetos.

Uma vaca produtora de leite, com idade média de 24 meses e produzindo 15 kg de leite, produz aproximadamente 45 kg de dejetos por dia. Já, uma vaca de corte produz aproximadamente 28 kg de dejetos por dia e em média, ambas produzem no mínimo 13 L de urina por dia (FUENTES YAGUE, 1992).

Van Horn et al. (1994) realizaram estimativas da produção de dejetos por vacas holandesas com 635 kg de peso corporal e estimaram uma dejeção anual de 22.805 kg de dejetos totais. Morse et al. (1992) estimaram que vacas leiteiras excretam por dia (fezes + urina) 54 g de P, 168 g de K, 119 g de Ca, 55 g de Na e 46 g de Mg.

Os dejetos orgânicos estocados nos currais de confinamento podem produzir de 7 a 27% das emissões totais de CH₄ relacionadas aos ruminantes (KREUZER & HINDRICHSEN, 2006). Entretanto, segundo Santos & Lucas Júnior (2004), todo processo de produção gera resíduo e todo resíduo armazena alguma energia. Os sistemas de produção podem reverter esse resíduo em energia, baratear seu custo de produção e funcionar de forma energeticamente equilibrada. Sistemas sustentáveis de produção animal buscam o máximo de rendimento com o mínimo de desperdício, com o objetivo de reduzir os impactos ambientais e melhorar a eficiência. Uma alternativa para minimizar os impactos causados pela grande geração de resíduos alimentares são os processos biológicos de reciclagem de nutrientes. Estes processos utilizam os resíduos provenientes da produção animal como matéria prima para a geração de subprodutos de valor agregado, tornando a atividade técnica e economicamente viável.

A biogásificação é um processo de reciclagem de nutrientes, no qual ocorre uma complexa interação de microrganismos, que degradam os diversos componentes orgânicos, até a forma final de biogás e biofertilizante. O biodigestor é uma câmara de fermentação fechada, que proporciona condições para que a biodigestão anaeróbia ocorra de maneira

eficiente. O uso de biodigestores nos sistemas de produção animal é visto como ferramenta importante, pois eles promovem o tratamento do resíduo e retornam parte da energia, que seria perdida, de volta ao sistema produtivo, através da queima do gás e recuperação dos nutrientes contidos nos dejetos (SILVA et al., 2005). No processo de biodigestão anaeróbia o pH é um fator importante, sendo a faixa ótima para a digestão anaeróbia valores de pH entre 6,0 e 8,0 (BATISTA, 1981). O biogás é formado por metano, dióxido de carbono e nitrogênio, obtido a partir da fermentação anaeróbia dos dejetos. O metano é o principal componente do biogás e, segundo Castrillón (2002), o potencial energético do biogás ocorre em função da quantidade deste gás.

O metano representa de 60 a 80% da composição da mistura de gases (BEDUSCHI et al., 1985). O potencial de produção de biogás dos dejetos varia conforme as diferentes espécies animais, dependendo do material orgânico do substrato, do tipo de tratamento e da temperatura. A produção diária de biogás, encontrada por Nogueira et al. (2013), a partir de dejetos de bovinos de corte confinados, foi de 0,056 m³, com teor médio de 79,6% de metano, resultando em um potencial de produção diário de metano de 0,043 m³ por quilograma de dejetos *in natura*. Em outro estudo, Hardoin et al. (2003) afirmaram que em confinamento de 100 vacas, biodigestor pode produzir um volume diário de 118 m³ de biogás/dia, volume este suficiente para atender com energia elétrica a demanda da ordenhadeira, do resfriador de leite, do triturador, do desintegrador, do misturador de ração e da bomba de água.

2.5 Metodologias para estimar a produção de metano em ruminantes

A produção animal sustentável tem sido preocupação na busca por estratégias para reduzir as emissões de gases de efeito estufa, vem sendo notável o crescimento da produção brasileira de carne bovina, em termos quantitativos e qualitativos. Desta forma, surge a oportunidade de pesquisas e desenvolvimento de novas técnicas mais acuradas, simples e rápidas, para mensurar a produção de metano entérico e outros parâmetros da fermentação ruminal, visando à diminuição na emissão de GEE.

Técnicas estão sendo estudadas desde a década de 50 e as câmaras calorimétricas os primeiros sistemas descritos na literatura com esta finalidade de mensurar a produção de metano. A utilização desta técnica foi primordial para coletar os primeiros dados de emissão de metano entérico, assim como para determinar perdas por incremento calórico. Estas

informações foram utilizadas para se estabelecerem equações que geraram as tabelas de exigências de energia líquida para gestação, ganho de peso e lactação (NRC, 2001). A vantagem da técnica calorimétrica é a acurácia; em contrapartida, é dispendiosa e requer treinamento do animal para adequação às condições de restrição de movimento (JOHNSON & JOHNSON, 1995).

A técnica *in vitro* é mais prática e rápida em relação às técnicas *in vivo*, sendo utilizada frequentemente por pesquisadores para a determinação da digestibilidade da MS e mensuração da produção de gases pela fermentação ruminal, em que uma amostra do conteúdo ruminal simula em frascos de vidro as condições da fermentação no rúmen. Porém, é impossível mimetizar em um frasco a complexidade do conteúdo ruminal, sendo que a dieta a qual o animal é submetido pode afetar os resultados (CHERNEY & SICILIANO; 1993).

A técnica do gás traçador, para determinação de metano ruminal, foi criada e desenvolvida na Washington State University, Estados Unidos (JOHNSON & JOHNSON, 1995), e adaptada no Brasil por PRIMAVESI et al. (2004). Esta técnica consiste em pequena cápsula, na forma de tubo metálico, contendo o gás hexafluoreto de enxofre (SF_6), que é inserida no rúmen do animal. Um cabresto é colocado na cabeça do animal, conectado a uma canga de tubos de PVC. Os gases diluídos que saem da boca e das narinas do animal misturados ao ar ambiente são captados por essa canga e, posteriormente, aferidos no período de 24 horas, através de coletas diárias (WESTBETRG et al., 1998), sendo o metano e o SF_6 quantificados por cromatografia gasosa (ABDALLA et al., 2008; RIVERA et al., 2010). Esta técnica não necessita de animais confinados, pois estes podem se deslocar para as áreas de pastagens, facilitando, desta forma, o manejo e a adaptação dos animais. Cabe mencionar que esta técnica mensura apenas o metano eructado, não sendo possível quantificarem-se os AGCC, o que prejudica a compreensão do processo global da fermentação ruminal.

A técnica *ex-situ* (micro-rúmen) de mensuração de metano vem sendo desenvolvida no Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no *Campus* USP Fernando Costa, em Pirassununga/SP, Brasil, com o objetivo de mensurar os produtos da fermentação ruminal (CH_4 e AGCC). O princípio desta técnica consiste em deixar as amostras de conteúdo ruminal dentro dos frascos de vidro de 50 mL (micro-rúmen) incubados em banho-maria, simulando as condições predominantes no rúmen (presença de microrganismos, anaerobiose, temperatura de 39°C, saliva natural do próprio animal, pH fisiológico) durante 30 minutos. Finalmente,

após o bloqueio da fermentação, as quantificações dos produtos finais da fermentação ruminal (CH₄, AGCC) são realizadas e as perdas energéticas do metano são expressas em relação aos demais produtos da fermentação ruminal (RODRIGUES et al., 2012).

A vantagem desta técnica é a possibilidade de quantificação dos produtos finais da fermentação ruminal, sendo possível relacionar as perdas energéticas de produção de CH₄ em relação à energia total produzida. Também permite avaliar o perfil fermentativo do ruminante durante o dia, através de coletas em diferentes tempos de amostragens do conteúdo ruminal.

2.6 Uso de enzimas exógenas no metabolismo ruminal

Entre a utilização de produtos biotecnológicos que modificam os parâmetros de fermentação ruminal, destaca-se a suplementação com enzimas, que são extraídas de fungos ou bactérias, que, em atuação conjunta com as enzimas produzidas pelos microrganismos ruminais, visam aumentar a eficiência do processo fermentativo. As enzimas são proteínas de alta complexidade molecular que, sob condições específicas de umidade, temperatura e pH, atuam sobre os substratos específicos, agindo como catalisadores, acelerando e possibilitando uma reação (BEAUCHEMIN et al., 1999). Dessa forma, a degradação dos polissacarídeos estruturais é favorecida e se aumenta a taxa de degradação da fibra, promovendo uma melhoria no desempenho produtivo em razão de seus efeitos nos processos digestivos, da degradação da parede celular, da manutenção de níveis adequados de amônia no rúmen e da estabilização do pH ruminal (DOREAU et al., 2010). Segundo Avallaneda-Cevallos et al. (2004) relataram que a adição de enzimas fibrolíticas em dieta à base de forragem para cordeiros foi eficiente em aumentar a degradação ruminal da fibra em detergente ácido (FDA) e a digestibilidade da hemicelulose. Isso pode ocorrer devido a efeitos sinérgicos entre enzimas exógenas adicionadas na dieta e microrganismos ruminais, já que a enzima altera a estrutura do alimento e o torna mais vulnerável à ação microbiana (BEAUCHEMIN et al., 2004; EUN & BEAUCHEMIN, 2007).

O efeito positivo das enzimas nas dietas depende de sua estabilidade no alimento e no rúmen, de sua capacidade em quebrar os polissacarídeos da parede celular da forragem e da habilidade dos animais em utilizar os produtos oriundos destas reações (BHAT, 2000). De acordo com Campestrini et al. (2005), as funções que as enzimas apresentam são: melhorar na

conversão e na eficiência da digestão, facilitando a quebra das paredes celulares das forragens, e aumentando a produção de carne ou leite.

Tipos de enzimas

O aproveitamento de alimentos fibrosos pelos ruminantes está relacionado com a síntese e secreção de enzimas pelos microrganismos do rúmen, acelerando, assim, a fermentação destes compostos presentes na dieta através da utilização de enzimas exógenas, como a celulase e xilanase. Com o objetivo de aumentar a eficiência de utilização dos alimentos pelos ruminantes, as enzimas exógenas, em atuação conjunta com as enzimas produzidas pelos microrganismos ruminais, potencializam a degradação dos polissacarídeos estruturais, aumentam a taxa de degradação da fibra e incrementam a taxa de digestão da celulose e hemicelulose no rúmen (DEHORITY & TIRABASSO, 1998).

As enzimas amilolíticas promovem a hidrólise do amido em açúcares redutores, as amilases podem ser divididas em: 1) α -amilase, que rompe as ligações no interior do substrato, 2) β -amilase, que hidrolisa unidades das extremidades não redutoras do substrato e 3) glucoamilase, qual libera unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato (MORAES, 2004). Por meio da ação hidrolítica, a amilase aumenta a disponibilidade de produtos resultantes da hidrólise do amido no rúmen, como os oligossacarídeos, alterando o processo de fermentação pelo fornecimento de substratos mais hidrolisáveis pelos microrganismos, aumentando a degradação do amido no rúmen (TRICARICO et al., 2008).

Fungos do gênero *Aspergillus* são considerados importantes produtores da enzima xilanase, utilizada na indústria de alimentos para animais. Esse gênero é encontrado no ambiente, sendo cosmopolita, caracterizado pelo seu rápido crescimento e alta capacidade de utilizar diversos substratos. A eficácia dessas enzimas é parcialmente devida à hidrólise melhorada da fibra, aumentando sua digestibilidade (DE HAAN et al., 2007). Os fungos são capazes de colonizar fragmentos de plantas, penetrando na cutícula e na parede celular de tecidos lignificados, como nas fibras presentes no rúmen, produzindo grandes quantidades de celulase e xilanase, que apresentam atividade celulolítica (KOZLOSKI et al., 2002).

A estabilidade da enzima no rúmen pode ser natural ou artificialmente induzida pela glicolisação enzimática, que envolve a ligação covalente de monossacarídeos a cadeias específicas de aminoácidos nas enzimas. A formulação dos complexos enzimáticos comerciais é padronizada em função de sua capacidade em degradar a celulose. Estes produtos constituem compostos multienzimáticos, que desempenham diferentes atividades hidrolíticas (MORGAVI et al., 2000). Diferentes pesquisas têm mostrado que a adição de altos níveis de enzimas para todas as dietas podem produzir respostas menos desejáveis do que níveis baixos. Lewis et al. (1999) relataram que vacas em nível médio (2,5 mL/kg da MS) de suplementação enzimática produziram mais leite do que vacas em baixo (1,25 mL/kg da MS) ou alto (5,0 mL/kg da MS) nível de inclusão.

Beauchemin et al. (2000) relataram que nível alto (3,67 L de enzima/tonelada da MS) foi menos eficaz do que nível baixo (1,22 L de enzima/tonelada da MS). Dawson & Tricario (2008) ressaltaram a necessidade de determinar o nível ideal de aplicação para cada preparação enzimática.

Métodos de fornecimento de enzimas para alimentação de ruminantes

A adição das enzimas nas dietas é fator importante para sua ação em ruminantes (YANG et al., 2000). O período ótimo para os efeitos da enzima se concentra nas primeiras 6 a 12 h do processo de digestão (DAWSON & TRICARIO, 1998). No entanto, a ação ocorre antes da colonização bacteriana ao substrato da alimentação. Newbold (2002) relatou que as enzimas devem funcionar dentro de algumas horas após a alimentação, antes de serem degradadas pela atividade proteolítica dos microrganismos do rúmen. A adição de enzimas exógenas nos alimentos aumenta a ligação da enzima com o substrato, o que aumenta a resistência das enzimas à proteólise e prolonga o seu tempo de residência no interior do rúmen. Estudos sugerem que a administração de enzimas diretamente no alimento seria mais eficaz do que quando administradas no rúmen (McALLISTER et al., 1999). Aplicar enzimas exógenas na forma líquida em alimentos, antes do consumo, pode ter efeito positivo sobre o desempenho animal (RODE et al., 1999; YANG et al., 2000). Os alimentos secos possuem teor de umidade ideal à atuação enzimática e, em alimentos úmidos, a dose necessária é mais elevada (BEAUCHEMIN & RODE, 1996). Fisiologicamente, existem diferentes formas de ação das enzimas exógenas e esses efeitos podem ser simples, como a liberação de carboidratos solúveis, ou complexos, como a remoção de íons de barreiras estruturais. Martins

et al. (2006) estudaram o efeito da suplementação com 12 g de enzimas fibrolíticas (Fibrozyme – ALLTECH), compostas por celulase e xilanase, e encontraram efeito significativo na digestibilidade de 31,49 a 39,20%, na ausência ou com aditivo, avaliando silagem de milho e feno de Tifton 85 cortado aos 90 dias em dietas compostas por 70% de volumoso.

Fornecendo dieta concentrada suplementada com enzimas para bovinos em terminação, Beauchemin et al. (1997) mostraram aumento de 11% na conversão alimentar, resultando em aumento de 6% em ganho de peso e diminuição de 5% na ingestão de alimento. A suplementação enzimática se torna uma alternativa para se obter melhor aproveitamento do alimento.

HIPÓTESE E OBJETIVO

- A hipótese do presente trabalho é que a eficiência de utilização dos alimentos pelos ruminantes, utilizando diferentes tipos de enzimas exógenas, é aumentada, melhorando a digestibilidade dos alimentos e promovendo a redução da produção de CH₄.

Objetivo:

- Avaliar o uso de enzimas na alimentação de ruminantes como estratégia nutricional visando à mitigação do CH₄ entérico, determinado pela técnica *ex-situ*, e avaliar demais parâmetros do metabolismo ruminal e digestivo, bem como emissão de GEE nas fezes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local experimental e bioética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso dos Animais da Universidade de São Paulo, sob o protocolo nº 9296281113, e o experimento realizado no Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade da Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), *Campus* da USP Fernando Costa, em Pirassununga/SP, nas instalações do Laboratório de Nutrição de Ruminantes.

3.2 Manejo e alimentação dos animais

Foram utilizadas cinco vacas holandesas não gestantes e não lactantes, com peso vivo de $923,04 \pm 86,76$ kg e portadoras de cânula ruminal. Os animais foram pesados no primeiro e no último dia de cada período experimental e mantidos em instalação coberta, em baias individuais com cochos de cimento e bebedouros automáticos comuns a cada dois animais, bem como camas de areia que proporcionaram maior conforto e bem-estar.

As dietas foram oferecidas *ad libitum*, duas vezes ao dia, às 8h00 da manhã e às 16h00 da tarde, na forma de ração completa, na qual as diferentes enzimas eram bem misturadas às dietas nos cochos. Alimento foram disponibilizadas aos animais na proporção 30% de volumoso e 70% de concentrado.

A fonte de volumoso utilizada foi a silagem de milho e o concentrado consistiu-se de milho em grão moído, farelo de soja, ureia, sal comum, calcário e suplemento mineral. As proporções dos diversos ingredientes nas dietas experimentais e a composição química das mesmas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Proporção de nutrientes e análise química das dietas experimentais

Ingrediente (%MS)	Dieta basal
Silagem de milho	30,00
Milho em grão moído	61,67
Farelo de soja	5,14
Ureia	0,88
Sal comum	0,44
Calcário	0,09
Suplemento mineral ¹	1,77
Análise química	
Matéria seca (%)	76,48
PB (% MS)	13,24
PDR ² (% PB)	65,10
PNDR ² (% PB)	34,90
FDN (% MS)	26,98
FDNe ² (% MS)	22,60
FDA (% MS)	14,13
CNE ² (% MS)	46,10
Amido ² (% MS)	39,30
MM (% MS)	4,56
Ca (% MS)	0,48
P (% MS)	0,34
EE (% MS)	3,16
NDT ² (% MS)	67,30
EL _i ² (Mcal/dia)	1,55

¹Suplemento mineral e vitamínico, quantidade por kg de produto: 200 g de cálcio, 60 g de fósforo, 20 g de enxofre, 20 g de magnésio, 70 g de sódio, 15 mg de cobalto, 700 mg de cobre, 700 mg de ferro, 40 mg de iodo, 1.600 mg de manganês, 19 mg de selênio, 2.500 mg de zinco, 200.000 UI de vitamina A, 50.000 UI de vitamina D3, 1.500 UI de vitamina E; ²Estimado segundo o programa *Spartan Dairy Ration Evaluator/Balancer*, versão 3.0.3.

3.3 Delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi dividido em cinco períodos, onde cada período teve duração de 21 dias, sendo 15 dias de adaptação às dietas e os seis últimos dias destinados à coleta de dados. A partir do dia 16 até o dia 21 foram coletados os dados de consumo de matéria seca (CMS). Entre 10 ao 20 foram feitas coletas de dados de digestibilidade por meio do marcador de óxido crômico, constituído por duas fases, sendo os cinco primeiros dias para adaptação ao marcador e os cinco últimos para coleta de dejetos, no dia 17 foi avaliado o comportamento ingestivo. O 19 dia foi destinado à coleta de conteúdo ruminal para determinação dos parâmetros da fermentação ruminal (pH, N-NH₃, protozoários, CH₄, AGCC e PER). A dinâmica ruminal foi avaliada nos 20 e 21 dias pela técnica de esvaziamento ruminal.

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 5x5, utilizando-se como unidade experimental o animal dentro de cada período. O experimento contou com 25 unidades experimentais, sendo: 5 animais, 5 tratamentos e 5 períodos. Os animais foram distribuídos em uma das cinco dietas experimentais (isoenergéticas e isoproteicas), que diferiram de acordo com as enzimas utilizadas, conforme descrição:

- 1) **Controle**: dieta sem adição de enzimas;
- 2) **Amilase**: dieta com 7,5 g de amilase/animal/dia (Amaize[®], ALLTECH);
- 3) **Xilanase**: dieta com 15 g de xilanase/animal/dia (Fibrozyme[®], ALLTECH);
- 4) **Celulase + Protease**: dieta com 7,5 g celulase + protease/animal/dia (Allzyme VegPro PO[®], ALLTECH);
- 5) **Pool**: dieta com 30 g de mistura de enzimas (3,75 g de amilase, 7,5 g de xilanase e 3,75 g de celulase + protease)/animal/dia.

3.4 Características avaliadas de consumo, digestibilidade e comportamento ingestivo

Consumo de matéria seca

O CMS foi avaliado nos últimos 6 dias de cada período experimental, pela diferença entre alimento fornecido em um dia e a sobra de alimento, coletada e pesada na manhã seguinte ao fornecimento, corrigida pela porcentagem de matéria seca (MS) da dieta. Com a

obtenção do peso das sobras do dia anterior, procurou-se manter a quantidade de sobras na proporção de 5 a 10% do ofertado. Nos mesmos dias, juntamente com o CMS, foram amostrados os alimentos utilizados nas dietas. Para análise química das amostras de alimento oferecido, foi retirada uma alíquota de 200 g, a qual foi acondicionada em embalagem plástica, identificada e armazenada em freezer a -20 °C até o momento das análises químicas.

Digestibilidade dos nutrientes

A digestibilidade aparente total da MS da dieta e suas frações (PB, EE, CNF, MO, FDN, FDA e EB) foram determinadas através do marcador óxido crômico, segundo BATEMAN (1970). Foram administrados, via cânula ruminal, 15 g/vaca/dia do marcador, por meio de envelopes confeccionados em papel absorvente. O ensaio foi constituído por duas fases (Figura 2), sendo a primeira para adaptação ao marcador e a segunda para coleta de fezes. Para determinação da composição das fezes, foi retirada uma alíquota de 200 g por animal, duas vezes ao dia. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos, identificadas de acordo com o animal e com o período de coleta e mantidas em freezer a -20 °C para posterior determinação da concentração de óxido crômico, segundo Conceição et al. (2007), bem como de sua composição química.

Ao final do período experimental, as amostras dos alimentos e das fezes foram analisadas para determinação dos teores de matéria seca (MS), obtidos por meio de secagem a 55 °C durante 72 horas. Depois de secas, as amostras foram moídas em moinho willey, com peneiras de 1 mm, e armazenadas em frascos até o momento da análise do alimento e das fezes. As amostras foram analisadas para obtenção da MS segundo AOAC (2006; método 930,15), matéria mineral - MM (AOAC, 2006; método 942,05), conteúdo de nitrogênio pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 2006; método 920,87), extrato etéreo - EE (AOAC, 1990; método 920,85), cálcio - Ca (AOAC, 1995; método 968,08) e fósforo - P (AOAC, 1990; método 965,17).

Fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram analisadas segundo VAN SOEST (1991). A análise de lignina foi realizada sobre os resíduos de FDA, utilizando-se o método de ácido sulfúrico direto (ROBERTSON & VAN SOEST, 1981).

Comportamento ingestivo

O comportamento ingestivo foi realizado no 17º dia, por 24 horas, iniciando-se às 8h00 da manhã e terminando às 8h00 da manhã do dia seguinte, por meio de monitoramento visual. Os animais foram observados a cada cinco minutos, sendo avaliados os seguintes parâmetros: comendo (C), bebendo (B), ruminando (R) e ócio (O), conforme metodologia descrita por Maekawa et al. (2002). Os resultados referentes aos dados de comportamento ingestivo foram obtidos utilizando-se equações, nas quais a soma de todos os eventos comendo representa o número diário de eventos comendo (NEC; eventos/dia). As demais atividades, como o número de eventos bebendo (NEB), ruminando (NER) e ócio (NEO) foram calculadas da mesma forma. O número diário de eventos mastigando foi obtido pela somatória do número de eventos comendo e ruminando. O tempo total comendo (TTC; min/dia) foi definido como a soma de todas as atividades comendo. O tempo médio comendo por evento (TCE; min/evento) foi obtido pelo TTC dividido pelo número de eventos comendo. Foram realizados os tempos totais de ruminação, bebendo, ócio e os tempos médios de ruminação, bebendo e ócio por evento. O tempo total de mastigação (TTM; min/dia) foi calculado pela soma do TTC e do TTR. O número diário de eventos de mastigação (NEM; eventos/dia) foi obtido pela soma do NEC e do NER, enquanto o tempo médio de mastigação por evento (TME; min/evento) foi calculado pela razão entre TTM e NEM.

A taxa de ingestão (kg/evento) foi determinada como sendo a razão entre o consumo médio de MS e o NEC. A taxa de ingestão de FDN (kg/evento) foi determinada como sendo a razão entre o consumo médio de FDN e o NEC. A taxa de ingestão de MS ou FDN (min/kg) foi determinada pela razão entre TTC e as quantidades médias de MS ou FDN ingeridas. As taxas de ingestão de MS ou FDN (kg/min) foram calculadas pela razão entre as quantidades médias de MS ou FDN ingeridas e o TTC. Os mesmos cálculos foram realizados para as taxas de ruminação de MS ou FDN (min/kg) e mastigação de MS ou FDN (min/kg).

3.5 Características avaliadas da fermentação ruminal

Dinâmica Ruminal

A dinâmica ruminal foi avaliada nos dias 20° e 21° de cada período experimental, utilizando-se a técnica de esvaziamento ruminal, antes da alimentação matinal e 3 horas após a alimentação da manhã, o conteúdo do rúmen foi removido manualmente via cânula ruminal de acordo com Chilbroste et al. (2000) e colocado em baldes. A separação entre líquidos e sólidos foi realizada pela filtragem da porção líquida através de uma peneira. Em seguida, os materiais líquido e sólido foram pesados separadamente, sendo coletada uma alíquota de 5% do conteúdo sólido de cada animal para mensuração do teor de matéria seca do conteúdo ruminal; imediatamente depois de disso, o conteúdo ruminal foi devolvido de volta no rúmen. As amostras foram secas a 55 °C durante 72 h e, por meio da massa de cada amostra, foi calculada a MS do conteúdo ruminal. Com os valores de conteúdo ruminal e CMS foi calculada a variável Taxa de desaparecimento da massa sólida, que foi expressa em %/h e em kg/h.

- Taxa de desaparecimento da massa sólida (%/h):

$$\text{Taxa de desaparecimento (\%/h)} = 100 \times \frac{\text{Consumo de MS (kg/d)}}{\text{Massa sólida (kg)}} / 24$$

- Taxa de desaparecimento da massa sólida (kg/h):

$$\text{Taxa de desaparecimento (kg/h)} = \text{Massa sólida} \times \frac{\text{Taxa de desaparecimento (\%/h)}}{100}$$

Técnica de fermentação ruminal (micro-rúmen)

O princípio desta técnica consiste em deixar as amostras de conteúdo de rúmen dentro de frascos (micro-rúmen) incubados em banho-maria (39 °C), simulando as condições predominantes do rúmen (presença de microrganismos, ambiente anaeróbico, temperatura de 39 °C, saliva e pH fisiológico do rúmen).

No 19° dia, o conteúdo ruminal foi coletado das vacas individualmente, antes da refeição matutina e 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação da manhã. Neste dia, os animais foram alimentados uma vez no período da manhã e outra vez após a coleta feita com 12 horas

de intervalo da primeira refeição. Foram retirados aproximadamente 300 mL de conteúdo líquido com uma sonda acoplada a uma bomba de vácuo e 300 g de conteúdo sólido manualmente em cada tempo de amostragem, a partir de três pontos diferentes, através da cânula ruminal. As duas frações foram misturadas em proporções iguais (50% de fase líquida e 50% de fase sólida) e homogeneizadas antes de se determinar os produtos da fermentação ruminal (AGCC, CH₄ e N-NH₃) com a técnica da fermentação ruminal *ex situ*, de acordo com Rodrigues et al. (2013).

Procedimento da técnica de fermentação ruminal

Foram preparados quatro frascos por animal, sendo que dois frascos foram usados para a incubação (T₃₀) e dois deles foram utilizados como branco (T₀). Uma alíquota de 30 mL do conteúdo ruminal composto e homogeneizado foi adicionado através de um funil em cada um dos quatro frascos de tipo penicilina de 50 mL de capacidade. Após a alocação do conteúdo dentro dos frascos, estes foram tampados imediatamente com rolha de borracha e seladas com vedação de alumínio, com a ajuda de um alicate de recrave, e identificados com lacre. Em seguida, os frascos foram lavados com CO₂, por meio de agulhas para entrada e saída para garantir um ambiente anaeróbico e incubados a 39 °C durante 30 minutos. As fermentações foram inativadas por autoclave durante 15 minutos.

Medição de volume e concentração do gás metano

A mensuração do volume do gás total produzido pelas amostras, nos frascos incubados (T₃₀) e não incubadas (T₀) foi feita utilizando-se um transdutor de pressão (Datalogger Universal[®] - modelo Logger AG5000) conectado a uma seringa com agulha e a uma válvula de três saídas do transdutor. O volume de gás foi obtido pela soma entre o volume obtido no transdutor mais (“head space”). A determinação da concentração de CH₄ foi realizada por cromatografia gasosa (Trace 1300, Thermo Fisher Scientific[®], Rodano, Milão, Itália), injetando 0,5 mL do gás de cada frasco, de acordo com Kaminski et al. (2003), em um ambiente de temperatura controlada (25 °C).

Cálculo de volume de líquido e concentração de AGCC

O volume do líquido ruminal dentro dos frascos incubadas (T_{30}) e não incubadas (T_0) foi calculado pela diferença entre peso do frasco da amostra após secagem num forno com circulação forçada de ar a 105 °C durante 24 horas e o peso do líquido antes do forno. O teor de sólidos dos frascos foi obtido pela diferença de peso entre o frasco contendo a amostra após secagem no forno e o peso do frasco vazio (antes do enchimento com amostra de conteúdo ruminal). Para análise de AGCC, foi retirado 2,0 mL do conteúdo ruminal de cada frasco. Esta fração líquida foi colocada em tubos de ensaio e centrifugada a 2000 rpm durante 20 minutos. Em seguida, 2,0 mL do sobrenadante foram acondicionado em tubo de ensaio contendo 0,4 mL de ácido fórmico PA e congelou-se a -20 °C até o momento da análise, de acordo com Erwin et al. (1961). Os AGCC foram quantificados por cromatografia gasosa (Focus GC, Thermo Scientific®, Rodano Milão, Itália), utilizando coluna de vidro com 1,22 m de comprimento e 0,63 cm de diâmetro interno, empacotada com fase estacionária 80/120 Carbowax B-DA/4% (Supelco, Sigma -Aldrich®, St. Louis, MO, USA).

Cálculos da produção de CH₄ e AGCC

A quantificação da produção de CH₄ foi obtida pela multiplicação entre o volume total do gás (mL) e a concentração de CH₄ na fase gasosa (mmol/mL), obtida no frasco incubado (T_{30}) e, em seguida, o resultado foi subtraído do valor produzido no frasco não incubado (T_0). A quantificação individual de AGCC foi obtida por meio da multiplicação do volume de líquido (mL) pela concentração de AGCC (mmol/mL), obtida no frasco incubado (T_{30}), e este valor foi subtraído do frasco não incubado (T_0). Dessa forma, a produção de CH₄ e AGCC foram determinadas utilizando-se da seguinte equação:

$$\text{Prod. CH}_4 = (\text{Conc. CH}_4 \times \text{Volume gás total}) T_{30} - (\text{Conc. CH}_4 \times \text{Volume gás total}) T_0$$

Na qual:

Prod. CH₄ = Produção de metano no momento entre a injeção do líquido ruminal no frasco até a inativação;

Conc. CH₄ = Concentração de CH₄ (mmol/mL);

Volume gás total: Volume de gás total obtido pela soma entre o volume obtido no transdutor mais o volume do *headspace* do frasco (mL);

T_{30} = Tempo de 30 min de incubação;

T_0 = Tempo de 0 min de incubação (frasco branco).

Prod. AGCC = (Conc. AGCC x Vol. Liq. Total) T_{30} - (Conc. AGCC x Vol. Liq. Total) T_0

Na qual:

Prod. AGCC = Produção de AGCC no momento entre a injeção do líquido ruminal no frasco e inativação;

Conc. AGCC = Concentração de AGCC (mmol/mL);

Vol. Liq. Total: volume líquido no frasco obtido por diferença de peso entre antes e depois da estufa (mL);

T_{30} = Tempo de 30 min de incubação;

T_0 = Tempo de 0 min de incubação (frasco branco).

Em seguida, as produções de CH_4 e AGCC foram expressas com base no conteúdo sólido incubado nos frascos (gramas ou quilogramas).

Cálculo da perda de energia relativa

Após a quantificação dos produtos da fermentação (CH_4 ou AGCC) sobre a amostra contida em cada frasco, cada produto foi multiplicado pelo seu calor de combustão, a fim de se expressar a produção de metano em porcentagem da energia da fermentação produzida. Assim, a perda de energia relativa (PER) equivale à razão entre a energia contida no metano produzido e a somatória da energia contida em todos os produtos da fermentação quantificados (CH_4 e AGCC), expressa em porcentagem. Para isso, foram utilizados os seguintes dados da literatura científica, assumindo: acético, propiônico, butírico, CH_4 e CO_2 , de 0,015, 0,021, 0,025, 0,055 e 0,0 MJ/g ou 0,88, 1,54, 2,20, 0,88 e 0,0 MJ/mol, respectivamente. A perda de energia relativa foi calculada usando a fórmula (RODRIGUES et al., 2012):

Logo:

$$PER = \left(\frac{\text{Energia do CH}_4}{\text{Energia do CH}_4 + C_2 + C_3 + C_4} \right)$$

Na qual:

PER = Perda de energia relativa (%);

CH₄ = Metano (MJ/g ou MJ/mol);

C₂ = Ácido acético (MJ/g ou MJ/mol);

C₃ = Ácido propiônico (MJ/g ou MJ/mol);

C₄ = Ácido butírico (MJ/g ou MJ/mol).

Concentração de nitrogênio amoniacal

No 19 dia de cada período experimental, foram coletados conteúdo ruminal antes da refeição matutina e 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação da manhã para determinação da concentração de N-NH₃. Uma alíquota de 2 mL da amostra de cada frasco foi centrifugada e colocada em tubo de ensaio contendo 1,0 mL de solução de ácido sulfúrico 1N e os tubos foram imediatamente armazenados em freezer até que se fizesse análise por colorimetria, de acordo com o método descrito por Kulasek (1972) e adaptado por Foldager (1977). O balanço foi obtido subtraindo-se a concentração de N-NH₃ dos frascos incubados (T₃₀), pela concentração dos frascos não incubados (T₀). Com este procedimento é possível avaliar se o balanço da produção de amônia no rúmen é positivo ou negativo. Esta informação foi expressa em termos de alterações na concentração (mg/dL) por hora.

Logo:

$$\text{Balanço de N-NH}_3 \text{ (mg/dL/h)} = (\text{Conc. 30 min (mg/dL)} - \text{Conc. 0 min (mg/dL)}) \times 2$$

Onde 2 é o coeficiente utilizado para transformar dados de 30 min em 60 minutos (ou 1 hora).

Mensuração de pH ruminal

O pH ruminal foi mensurado no 19 dia de cada período experimental, em intervalos de 10 minutos, durante 24 horas, utilizando-se probes de mensuração contínua (Penner et al., 2006). O sistema foi desenvolvido utilizando-se *data logger* de pH (Model T7-1 LRCpH,

Dascor, Escondido, CA, USA), uma bateria alcalina de 9 Volts e um cabo para conexão no computador. Este material foi abrigado em uma cápsula de PVC resistente à água. O eletrodo de pH (Modelo S655CDHT, Dascor, Escondido, CA, USA) foi coberto por uma proteção de 38 mm de diâmetro com quatro furos de 25 mm, que foram desenvolvidos para permitir a passagem de partículas e do líquido enquanto protege o eletrodo de entrar em contato direto com o epitélio ruminal. Dois pesos de 900 g foram acoplados ao eletrodo a fim de manter a probe no saco ventral do rúmen. Cada eletrodo foi calibrado usando padrões de pH 4,0 e 7,0 antes e após a colocação das probes no rúmen. A obtenção dos valores de pH ruminal permite o cálculo das variáveis: pH médio, pH mínimo, pH máximo, área sob a curva e duração do tempo em que o pH permaneceu abaixo de 5,8, 6,0, 6,2 e 6,5.

Contagem de protozoários

A contagem total e diferencial de protozoários do rúmen foi realizada no 19 dia de cada período experimental. O conteúdo ruminal foi coletado de 5 animais manualmente a partir de 3 pontos diferentes, via cânula ruminal, e cada amostra coletada (10 mL de conteúdo ruminal) antes, 3, 6, 9 e 12 horas após a alimentação matinal foi armazenada em 125 frascos contendo 20 mL de formaldeído a 18,5% (v/v). Para posterior realização da contagem total e diferencial dos protozoários, foi utilizado 1 mL da amostra diluída com formol e foram adicionadas 2 gotas de verde brilhante a 2%, deixando repousar por 4 horas. Em seguida, foram adicionados 9 mL de glicerol a 30% e a mistura foi homogeneizada, tornando-se a amostra do líquido ruminal diluída 30 vezes. Para as contagens diferenciais dos protozoários, foi utilizada uma câmara de contagem “Sedgwick-Rafter” composta por retículo de 0,5 mm x 0,5 mm de área, com subdivisões de 25 quadrículos, acoplada na ocular de um microscópio (Olympus, modelo CH₂), conforme técnica descrita por Dehority (1993). Com a câmara acoplada ao microscópio, foram contados 100 campos ópticos através do retículo, com aumento de 100 vezes, sendo utilizado o fator de correção “16” multiplicado pelo valor médio da contagem dos campos. Por este método, diferenciou-se os gêneros: *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium* e a sub família *Diplodinae* (*Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium* e *Polyplastron*) contidos no rúmen.

3.6 Características avaliadas da biodigestão anaeróbia das fezes.

Ensaio de biodigestão

Foram coletados pools representativos de fezes de cada animal, alimentados com diferentes dietas, em cada período. Os tratamentos foram determinados com base nas fezes de vacas que receberam dietas diferentes. Os substratos (água + fezes + inóculo) foram preparados, a fim de conter 5% de ST, onde 10% dos ST proveniente do inóculo. O inóculo adveio de biodigestores contínuos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp - *Campus* de Jaboticabal - SP. Cada biodigestor foi abastecido com seu respectivo substrato, com uma carga única de 1,8 kg de substrato (Tabela 2).

Para o ensaio de biodigestão anaeróbia das fezes foram utilizados 25 biodigestores do tipo batelada, os quais foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 5 repetições. Os biodigestores do tipo batelada foram constituídos por três cilindros retos de PVC com diâmetros de 7,5, 10 e 15 cm, acoplados sobre um cap de PVC com capacidade operacional de 2 litros de substrato em fermentação cada. Os cilindros de 10 e 15 cm foram inseridos um no interior do outro, de tal forma que o espaço existente entre a parede externa do cilindro interior e a parede interna do cilindro exterior comportasse um volume de água (“selo de água”), atingindo profundidade de 50 cm. O cilindro de diâmetro intermediário teve as extremidades vedadas, conservando-se apenas uma abertura para descarga do biogás, e emborcado no selo de água, para propiciar condições anaeróbias e armazenar o gás produzido.

Tabela 2 - Características dos substratos utilizados nos biodigestores.

Variáveis	Tratamentos					EPM	Probab ³
	Controle	Amilase	Xilanase	C + P	Pool		
ST (%)	4,1040	4,0020	4,3840	4,1240	4,2440	0,0810	NS
SV (%)	3,7180	3,5920	3,9360	3,6060	3,7640	0,0762	NS
PB (% de ST)	13,27	12,62	13,14	13,21	12,70	0,2499	NS
MO (% de ST)	89,56	89,59	89,55	88,92	88,24	0,2682	NS
EE (% de ST)	2,50	2,21	2,01	2,38	1,89	0,1032	NS
FDN (% de ST)	38,66	38,74	35,00	34,69	35,35	0,8425	NS
FDA (% de ST)	27,21	25,24	26,14	26,24	24,50	0,5599	NS
Lignina (% de ST)	10,49	10,32	10,23	9,45	9,95	0,2499	NS
EB (kcal/kg ST)	4279	4269	4205	4251	4119	28,521	NS

ST = sólidos totais; SV = sólidos voláteis; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; ¹C + P = Celulase + protease; ²EPM = Erro padrão da média; ³Probab = Probabilidade; NS = Não significativo.

Depois de abastecidos, os biodigestores foram acondicionados em uma câmara climática com temperatura controlada entre 30 a 38 °C. A temperatura ambiente foi monitorada diariamente por meio de termômetro digital °C, antes de cada leitura do biogás. O ensaio de biodigestão anaeróbia teve duração total de 206 dias, iniciado em 12/08/2015 e finalizado em 05/03/2016, tempo este suficiente para que ocorresse a paralização na produção de biogás, indicando completa fermentação de todo material presente no biodigestor.

Composição dos substratos

Amostras dos substratos, pré e pós digestão anaeróbia, foram analisadas para determinação dos teores de matéria seca (MS), obtidos por meio de secagem a 55 °C (forno de ar forçado) durante 48 horas. Depois de secas, as amostras foram moídas em moinho willey, com peneiras de 1 mm, para obtenção da MS, segundo AOAC (2006), em estufa de ar forçado a 105 °C, durante 4 horas, seguido de pesagem a frio (método 930.15); O conteúdo de nitrogênio foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl e foi multiplicado por 6,25 para determinar conteúdo proteico (AOAC, 2006; método 920,87). Já o extrato etéreo foi determinado de acordo com a Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, 1995), utilizando-se éter de petróleo leve no aparelho Soxhlet (método 920.39).

A fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA) foram analisadas segundo VAN SOEST (1991), sendo que a análise de lignina foi realizada sobre os resíduos de FDA, utilizando-se o método de ácido sulfúrico direto (ROBERTSON & VAN SOEST, 1981).

Determinação do pH

Foram avaliadas as amostras do afluente e efluente, no início e final do experimento, com a utilização do pHmetro, de modo a se obter o valor exato do pH de cada solução.

Teores de ST e SV

Os teores de ST e SV das amostras coletadas do afluente e efluente durante o processo de biodigestão anaeróbia foram determinados de acordo com a metodologia descrita por APHA (2012).

Análise de biogás e metano

A mensuração do volume de biogás foi realizada após a leitura do deslocamento vertical do gasômetro (Figura 1), que foi medido em centímetros e os valores foram multiplicados pela área transversal interna dos gasômetros e corrigidos para as condições de 1 atm e 20 °C, obtendo-se o volume de biogás acumulado (m³), segundo o modelo proposto por Lucas Junior (1994). Após cada leitura, os gasômetros foram zerados utilizando-se o registro de descarga do biogás.

Figura 1 - Biodigestores e respectivos gasômetros (vista frontal).



Arquivo pessoal

Amostras de biogás foram colhidas em cada medição do volume de biogás, utilizando-se uma seringa ligada ao registro de gás em cima do gasômetro. Primeiramente, os frascos de tipo penicilina de 50 mL de capacidade foram identificados, lacrados com rolha de borracha e lacre de alumínio e recravados com um alicate de recrave acoplado a uma válvula de 3 vias. Posteriormente, a amostra foi utilizada para lavagem dos frascos, o biogás foi injetado nos frascos por uma das vias e era expulso por outra, garantindo a eliminação de todo ar presente no frasco, por três vezes. Após a lavagem, 50 mL de biogás foram injetados nos frascos para análise de composição do biogás.

A composição do metano foi analisada para toda amostra de biogás nos frascos. De cada amostra, foram recolhidos 2 ml de biogás a partir dos frascos com seringa Gas-Tight e

injetados num cromatógrafo (Trace 1300, Thermo Fisher Scientific®, Rodano, Milão, Itália), de acordo com Kaminski et al. (2003), em um ambiente de temperatura controlada (25 °C).

O cromatógrafo foi calibrado com gás padrão contendo 3,1% de metano, 3,1% de dióxido de carbono e 0,49% de óxido nítrico, diluído em atmosfera de ar. Utilizou-se como gás de referência padrão contendo 50% de metano e 50% de dióxido de carbono (mol/mol) e 10% de N₂O em balanço com He (mol/mol).

O volume de metano foi calculado pela multiplicação do volume de biogás pela concentração de metano. Os potenciais de produção de metano foram calculados por meio das produções de metano, dividindo-se os valores de produção pelas quantidades de substrato, ST e SV adicionada e reduzida nos biodigestores durante o processo de biodigestão anaeróbia.

3.7 Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento PROC MIXED do SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Inicialmente, os dados foram analisados em relação à presença de informações discrepantes (*outliers*), bem como foi verificada a normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk. A observação individual foi considerada atípica quando os desvios padrão em relação à média foram maiores que +3 ou menores que -3. Quando a suposição de normalidade não foi aceita, foi necessária a transformação logarítmica ou a raiz quadrada. O modelo incluiu o efeito de tratamento como fator fixo e os efeitos de animal e período como fatores aleatórios. Para os dados de CMS, digestibilidade, comportamento ingestivo, dinâmica ruminal e pH foi utilizado o seguinte modelo estatístico conforme a equação abaixo:

$$Y_{ijl} = \mu + T_i + P_j + A_l + e_{ijl}$$

Na qual:

Y_{ijl} = Observação referente ao Tratamento_i + Período_j + Animal_l;

μ = Média geral;

T_i = Efeito fixo de tratamento;

P_j = Efeito aleatório de período;

A_l = Efeito aleatório de animal;

e_{ijl} = Erro aleatório associado a cada observação.

Para as variáveis de CH₄, AGCC, balanço de N-NH₃ e contagem de protozoários, os dados foram analisados de acordo com o procedimento para modelos mistos (PROC MIXED) e o tempo foi a variável repetida. Entre as 24 diferentes estruturas de covariância testadas, o modelo utilizado foi escolhido com base no valor mais baixo do Critério de Informação Akaike Corrigido (AICC) (Wang e Goonewardene, 2004). No modelo, o efeito de tratamento, o tempo e interação tratamento * efeito de tempo foram considerados fixos e os efeitos de período e animal foram considerados aleatórios. Para a comparação média entre os tratamentos foi utilizado o teste PDIFF ao nível de 5% de significância. O modelo estatístico utilizado está descrito conforme a equação abaixo:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + P_j + A_k + e_{ijk} + T_l + (T_i \times T_l) + e_{ijklm}.$$

Na qual:

Y_{ijklm} = Variável de resposta dependente;

μ = Média geral;

T_i = Efeito fixo de tratamento;

P_j = Efeito aleatório de período;

A_k = Efeito aleatório de animal;

e_{ijk} = Erro aleatório associado às parcelas;

T_l = Efeito fixo de tempo;

$(T_i \times T_l)$ = Efeito fixo de interação;

e_{ijklm} = Erro aleatório associado a cada observação.

Os biodigestores foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com 25 unidades experimentais, sendo 5 tratamentos e 5 repetições. Através do programa Statistical Analysis System (versão 9.4 SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o procedimento de modelos mistos (PROC MIXED). O modelo incluiu o efeito de tratamento como fator fixo e foi utilizado o teste Pdiff ao nível de 5% de significância para separar os efeitos dos tratamentos.

O modelo estatístico utilizado está descrito conforme a equação abaixo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Em que,

Y_{ij} = Variável resposta dependente;

μ = Média geral;

T_i = Efeito fixo de tratamento;

e_{ij} = Erro residual.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Consumo, Digestibilidade e comportamento ingestivo

A adição das enzimas na dieta de bovinos (Tabela 3) não apresentou efeito significativo sobre o consumo de matéria seca. A ingestão média por animal foi de 14,41 kg de MS/dia, correspondendo a 1,54% do peso vivo (PV) e 85,25 g/kg de peso metabólico (PM).

Tabela 3 - Efeito da adição de enzimas na dieta sobre o consumo de matéria seca.

Variáveis	Tratamentos					EPM ²	Probab ³ .
	Controle	Amilase	Xilanase	C + P ¹	Pool		
CMS (kg/anim/dia)	14,66	14,27	14,01	14,35	14,77	0,409	NS
CPV (% PV)	1,56	1,53	1,50	1,55	1,58	0,039	NS
CPM (g/kg PV ^{0,75})	86,38	84,36	82,75	85,52	87,26	2,120	NS

CMS = Consumo de matéria seca; CPV = Consumo de matéria seca em relação ao peso vivo; CPM = Consumo de matéria seca por unidade de peso metabólico; ¹C + P = Celulase + protease; ²EPM = Erro padrão da média; ³Probab = Probabilidade; NS = Não significativo.

Da mesma forma, não foram observados efeitos das enzimas fibrolíticas sobre o consumo de nutrientes quando realizada avaliação em vacas alimentadas com 24% de silagem de milho, 15% de alfafa e 61% de concentrado (RODE et al., 1999). Diversos estudos não relataram qualquer efeito das enzimas sobre o consumo em vacas (YANG et al., 2000; SCHINGOETHE et al., 1999; FERRARETTO et al., 2011; ARRIOLA et al., 2011). Porém, alguns estudos mostraram aumento de consumo e produção de leite (LEWIS et al., 1999; KUNG et al., 2000). Em trabalho, Beauchemin et al. (2003) demonstraram aumento de 1,0 kg/dia no CMS com adição de enzimas na dieta de vacas leiteiras. O aumento no CMS com a adição de enzimas na dieta estaria relacionado ao incremento da taxa de passagem das partículas e menor tempo de retenção ruminal (YANG et al., 1999). Também foi demonstrado que a adição de enzima na dieta a partir de 1 a 2 g/kg aumentou a produção de leite de 23,7 kg/dia para 24,6 kg/dia e 25,6 kg/dia, respectivamente (YANG et al., 1998).

No presente experimento não houve efeito significativo das enzimas também no consumo de PB, FDN, FDA, EE, CNE, MO, EB e P (Tabela 4). Os animais ingeriram em média 1,93 kg de proteína bruta, 3,26 kg de fibra em detergente neutro, 2,05 kg de fibra em detergente ácido, 0,46 kg de extrato etéreo, 8,25 kg de carboidratos não estruturais, 13,90 kg de matéria orgânica, 0,05 kg de fósforo e 62,15 Mcal de energia bruta.

As diferentes enzimas exógenas utilizadas na dieta não afetaram a digestibilidade dos nutrientes (Tabela 4). Em média, a digestibilidade da matéria seca foi de 67,60%, proteína bruta de 69,40%, fibra em detergente neutro de 46,29%, fibra em detergente ácido de 42,33%, extrato etéreo de 77,49%, carboidratos não estruturais de 78,76%, matéria orgânica de 69,77% e energia bruta de 67,93%, com os nutrientes digestíveis totais iguais a 69,66%.

Não foram encontradas diferenças significativas sobre a excreção dos nutrientes (Tabela 4). Em média, a excreção da matéria seca foi de 4,70 kg, proteína bruta de 0,59 kg, fibra em detergente neutro de 1,74 kg, fibra em detergente ácido de 1,18 kg, extrato etéreo de 0,10 kg, carboidratos não estruturais de 1,74 kg, matéria orgânica de 4,18 kg, nitrogênio de 0,09 kg, fósforo de 0,04 kg e energia bruta de 19,86 Mcal.

Tabela 4 - Efeito da adição de enzimas na dieta sobre o consumo, digestibilidade e excreção dos nutrientes.

Variáveis	Tratamentos					EPM ²	Probab ³ .
	Controle	Amilase	Xilanase	C + P ¹	Pool		
Consumo							
CMS (kg/dia)	14,66	14,27	14,01	14,35	14,77	0,409	NS
CPB (kg/dia)	1,95	1,92	1,89	1,93	1,96	0,056	NS
CFDN (kg/dia)	3,29	3,25	3,19	3,27	3,32	0,096	NS
CFDA (kg/dia)	2,07	2,04	2,01	2,06	2,09	0,060	NS
CEE (kg/dia)	0,46	0,45	0,45	0,46	0,46	0,013	NS
CCNE (kg/dia)	8,32	8,19	8,09	8,26	8,38	0,241	NS
CMO (kg/dia)	14,02	13,82	13,62	13,90	14,13	0,408	NS
CP (kg/dia)	0,049	0,049	0,048	0,049	0,050	0,001	NS
CEB (Mcal/dia)	62,65	61,76	60,93	62,25	63,17	1,825	NS
Digestibilidade							
CDMS (%)	65,27	67,72	67,65	68,53	68,84	0,606	NS
CDPB (%)	65,58	69,44	67,92	74,02	70,04	1,294	NS
CDFDN (%)	39,24	43,02	47,17	51,41	50,59	1,746	NS
CDFDA (%)	35,05	41,98	42,23	44,00	48,39	1,853	NS
CDEE (%)	72,34	77,62	79,71	75,95	81,85	1,359	NS
CDCNE (%)	78,67	79,94	78,41	77,25	79,54	0,713	NS
CDMO (%)	67,37	69,72	69,65	70,63	71,48	0,576	NS
CDEB (%)	65,13	67,74	68,21	68,66	69,90	0,602	NS
NDT (%)	67,15	69,60	69,64	70,45	71,45	0,583	NS
Excreção							
ExMS (kg/dia)	5,06	4,67	4,57	4,60	4,59	0,139	NS
ExPB (kg/dia)	0,67	0,58	0,59	0,51	0,58	0,027	NS
ExFDN (kg/dia)	1,97	1,85	1,65	1,58	1,65	0,064	NS
ExFDA (kg/dia)	1,33	1,18	1,14	1,15	1,08	0,042	NS
ExEE (kg/dia)	0,125	0,106	0,092	0,113	0,082	0,007	NS
ExCNE (kg/dia)	1,76	1,64	1,74	1,87	1,70	0,074	NS
ExMO (kg/dia)	4,53	4,18	4,09	4,09	4,02	0,127	NS
ExN (kg/dia)	0,106	0,094	0,096	0,084	0,094	0,004	NS
ExP (kg/dia)	0,040	0,038	0,036	0,040	0,043	0,001	NS
ExEB (Mcal)	21,66	19,92	19,23	19,51	18,98	0,609	NS

¹C + P = Celulase + protease; ²EPM = Erro padrão da média; ³Probab = Probabilidade; NS = Não significativo; MS = matéria seca; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; EE = extrato etéreo; CNE = carboidrato não estruturais; MO = matéria orgânica; EB = energia bruta; NDT = Nutrientes digestíveis totais; N = nitrogênio; P = fósforo.

Algumas pesquisas têm mostrado que a suplementação da dieta com enzimas exógenas promove o aumento da atividade de celulase e xilanase no rúmen (HRISTOV et al., 2000). Eun & Beauchemin (2005) relataram que dietas contendo enzimas exógenas (1,25 mL/kg de MS) tiveram maior digestão e digestibilidade, melhorando o desempenho e o crescimento de novilhos. Geralmente, a mudança da dieta de forragem para concentrado aumenta o consumo e a digestibilidade. Isso se deve ao fato de o concentrado causar menor preenchimento ruminal e possuir menor lignificação. Assim, a taxa de passagem fica mais rápida e requer menor tempo de ruminação do que a forragem, permitindo maior produção de ácido propiônico, importante precursor gliconeogênico em ruminantes (CHENG et al., 1997). Beauchemin et al. (1999), avaliando dietas compostas de silagem de cevada em grão, verificaram aumento de 58,8 para 61,7% na digestibilidade da FDN com a adição de enzimas fibrolíticas exógenas. De acordo com Yang et al. (1999), as variações no modo de ação das enzimas podem ser atribuídas às diferenças na composição dos complexos enzimáticos comerciais, composição da dieta, tipo de alimento e ingestão da dieta. Essas diferenças na atividade da enzima exógena podem estar relacionadas com a forma ou os níveis de aplicação. Alguns autores demonstraram que a adição de enzimas exógenas na dieta pode afetar a degradação no início da incubação, porém poucas vezes afetam o grau de degradabilidade da forragem (COLOMBATTO et al., 2003). Os níveis de adição das enzimas exógenas têm sido indicados como as principais fontes de variabilidade nos resultados (BEAUCHEMIN et al., 2003; COLOMBATTO et al., 2003). Kung (2007), alimentando cordeiros com 4 g/animal/dia de uma mistura de enzimas, não encontrou nenhum efeito sobre o consumo ou a digestibilidade. Outro trabalho com cordeiros alimentados com enzimas fibrolíticas em dose de 3g/animal/dia não demonstrou efeito sobre o CMS (AVELLANNEDA et al., 2009). Giraldo et al. (2008) relataram não ter encontrado efeito sobre a digestibilidade quando a enzima foi administrada na dose de 12 g/animal/dia diretamente no rúmen de ovinos.

Carboidratos fibrosos e não fibrosos podem ter sua digestibilidade aumentada com a aplicação de enzimas exógenas em dietas de alto concentrado (BEAUCHEMIN et al., 1999). Hristov et al. (1998) relataram que as enzimas exógenas são utilizadas para catalisar as reações de degradação dos substratos, os quais são digeridos em seu componente químico e inativados por influência do pH baixo e da presença de pepsina no abomaso. As enzimas exógenas são resistentes às proteases microbianas e, mesmo após passarem pelo abomaso, podem permanecer ativas no intestino delgado (HRISTOV et al., 2000).

Há ampla variabilidade de resultados encontrados na literatura tais resultados podem ser explicados pela produção não padronizada de diferentes tipos de enzimas, variando a forma de incubação dos fungos, o tipo de substrato, as dosagens e o método de aplicação (BEAUCHEMIN et al., 2003).

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 5) para o comportamento ingestivo. Em relação às variáveis comendo, em média, os animais tiveram um total de 9,76 eventos/dia, tempo total de 158,8 min comendo/dia e gastaram, em média, 16,43 min comendo em cada evento. Para a atividade de ruminação foram observados, em média, 13,96 eventos/dia, com tempo total nesse parâmetro de 301,60 min e foram gastos, em média, 21,38 min ruminando em cada evento. A inclusão de enzimas não alterou as variáveis relacionadas com a mastigação; em média, os animais tiveram 23,72 eventos/dia, tempo total de mastigação de 460,40 min e gastaram, em média, 19,53 min mastigando em cada evento. Não houve efeito significativo entre os tratamentos sobre as variáveis bebendo; em média, tiveram 1,28 eventos/dia, com tempo total nesse parâmetro de 21,80 min e foram gastos 17,63 min bebendo em cada evento. Não houve efeito da inclusão de enzimas sobre as variáveis ócio; em média, tiveram 28,36 eventos/dia, os animais ficaram tempo total de 967,80 min em ócio e gastaram 34,40 min em ócio em cada evento.

Tabela 5 - Efeito da adição de enzimas na dieta sobre o comportamento ingestivo.

Variáveis	Tratamentos					EPM ²	Probab ³ .
	Controle	Amilase	Xilanase	C + P ¹	Pool		
Comendo							
Número de eventos	10,20	10,00	9,000	8,800	10,80	0,396	NS
Tempo total comendo (min)	172,0	143,0	161,0	150,0	168,0	5,614	NS
Tempo total comendo (%)	11,94	9,93	11,18	10,42	11,66	0,389	NS
Tempo médio comendo (min)	17,30	14,11	17,83	17,43	15,50	0,583	NS
Ruminando							
Número de eventos	13,00	14,60	13,80	15,00	13,40	0,674	NS
Tempo total ruminando (min)	297,0	317,0	288,0	307,0	299,0	13,51	NS
Tempo total ruminando (%)	20,62	22,01	20,00	21,32	20,76	0,938	NS
Tempo m. ruminando (min)	21,08	22,34	20,91	20,20	22,35	0,756	NS
Mastigando							
Número de eventos	23,20	24,60	22,80	23,80	24,20	0,855	NS
Tempo t. mastigando (min)	469,0	460,0	449,0	457,0	467,0	16,48	NS
Tempo total mastigando (%)	32,57	31,94	31,18	31,73	32,43	1,447	NS
Tempo m. mastigando (min)	20,63	18,95	19,73	19,11	19,22	0,467	NS
Bebendo							
Número de eventos	1,400	1,200	1,600	1,200	1,000	0,122	NS
Tempo total bebendo (min)	25,00	21,00	25,00	19,00	19,00	2,018	NS
Tempo total bebendo (%)	1,736	1,458	1,736	1,319	1,319	0,140	NS
Tempo médio bebendo (min)	19,00	18,00	18,16	16,00	17,00	1,843	NS
Ócio							
Número de eventos	28,20	28,80	30,40	28,60	25,80	0,499	NS
Tempo total em ócio (min)	981,0	969,0	970,0	967,0	952,0	18,37	NS
Tempo total em ócio (%)	68,12	67,29	67,36	67,15	66,11	1,276	NS
Tempo médio em ócio (min)	34,86	33,80	32,22	33,96	37,15	0,926	NS

¹C + P = Celulase + protease; ²EPM = Erro padrão da média; ³Probab. = Probabilidade; NS = Não significativo; Tempo m. ruminando (min) = Tempo médio ruminando (min); Tempo t. mastigando (min) = Tempo total mastigando (min); Tempo m. mastigando (min) = Tempo médio mastigando (min).

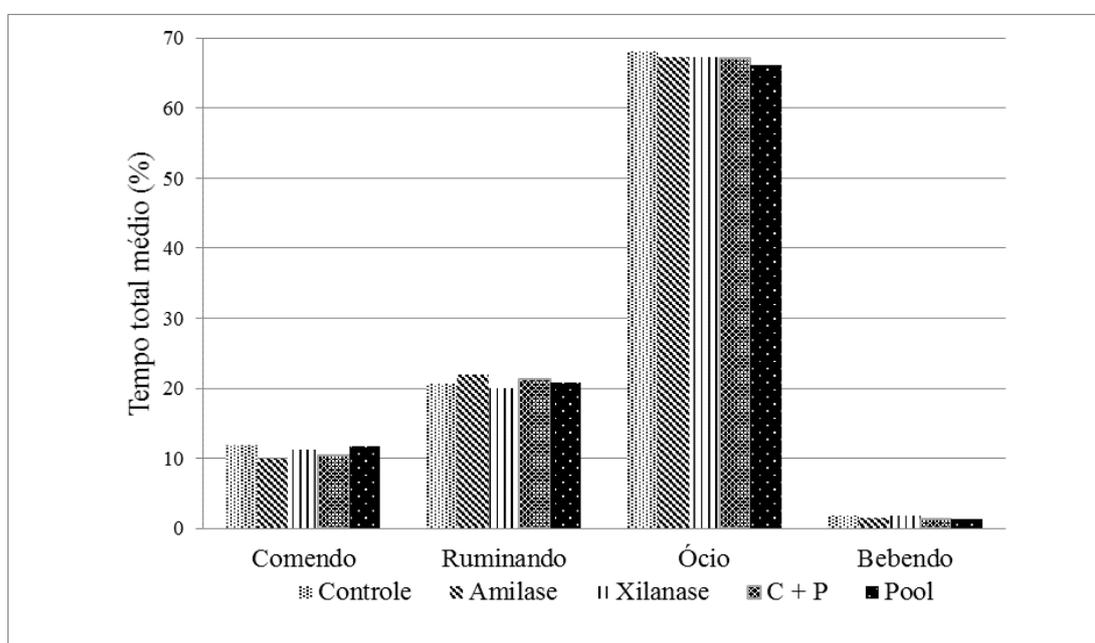
De acordo com Krause, Combs & Beauchemin (2002), quanto menor o tamanho das partículas da dieta, menor o tempo de mastigação e ruminação. Considerando essas informações e a maior proporção de concentrado utilizada neste estudo, o tempo total de ruminação foi de 20,94% do total do dia, valor próximo ao valor de 23,45% observado em bovinos confinados, segundo Yang et al. (2009). Esse valor ligeiramente inferior pode ser devido à maior digestibilidade da FDN e ao tempo total gasto nas atividades de ruminação.

Quanto maior a participação do teor de parede celular dos volumosos na dieta, maior será o tempo despendido com ruminação, pois este depende da qualidade do alimento (VAN SOEST, 1982). Maior ingestão de alimento diminui o tempo de retenção no rúmen,

reduzindo, por conseguinte, a quantidade de tempo disponível para a degradação da dieta (CLAUSSI et al., 2007).

Os animais apresentaram comportamento semelhante em todos os tratamentos, em relação ao tempo total das atividade no decorrer do dia. Os animais ficaram a maior parte do seu tempo em ócio, seguido pela atividade de ruminção e comendo (Figura 4). Não foram verificadas diferenças significativas entre tratamento, quanto ao tempo total comendo, ruminando, em ócio ou bebendo.

Figura 2 - Atividades do tempo médio (%) de cada tratamento em bovinos alimentados com dietas adicionadas de enzimas.



Não foi verificada diferença significativa entre tratamentos para a taxa de ingestão de matéria seca (Tabela 6). Em média, os animais ingeriram 0,094 kg de MS por minuto, gastaram 13,38 min para ingerir um quilograma de MS e ingeriram 1,61 kg de MS por evento. As enzimas não promoveram nenhuma alteração nas taxas de ingestão de FDN ($\text{kg}\cdot\text{min}^{-1}$), tempo gasto para ingerir 1 kg de FDN, bem como quantidade de FDN ingerido por evento.

A eficiência de ruminção para a MS e FDN estão representadas na Tabela 6 e não foram influenciadas ($P>0,05$) pelos níveis de enzimas. Em média, os animais demoraram 25,95 min para ruminar um quilograma de matéria seca, ruminaram 0,011 quilogramas de FDN por minuto, demoraram 115,54 min para ruminar um quilograma de FDN e ruminaram 0,248 kg de matéria seca por evento.

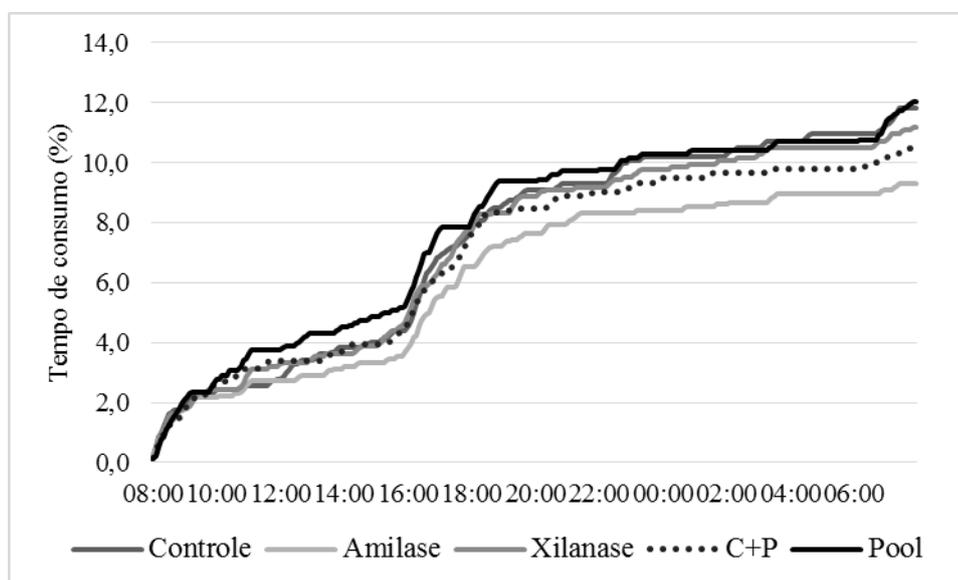
Tabela 6 - Taxas de ingestão, ruminação e mastigação em bovinos alimentados com enzimas

Variáveis	Tratamentos					EPM ²	Probab ³ .
	Controle	Amilase	Xilanase	C +P ¹	Pool		
Taxa de ingestão							
MS (kg min ⁻¹)	0,086	0,103	0,091	0,098	0,090	0,004	NS
MS (min kg ⁻¹)	12,98	13,52	14,05	13,33	13,03	1,413	NS
MS/E (kg)	1,606	1,566	1,662	1,664	1,539	0,079	NS
FDN (kg min ⁻¹)	0,019	0,023	0,020	0,022	0,020	0,001	NS
FDN (min kg ⁻¹)	57,82	57,82	62,60	59,33	58,06	1,842	NS
FDN/E (kg)	0,361	0,351	0,373	0,373	0,345	0,017	NS
Taxa de ruminação							
MS (kg min ⁻¹)	0,052	0,046	0,049	0,050	0,049	0,002	NS
MS (min kg ⁻¹)	26,93	25,99	26,61	25,46	24,74	1,079	NS
MS/E (kg)	0,259	0,232	0,246	0,252	0,249	0,010	NS
FDN (kg min ⁻¹)	0,011	0,010	0,011	0,011	0,011	0,001	NS
FDN (min kg ⁻¹)	119,9	115,7	118,5	113,4	110,2	4,821	NS
FDN/E (kg)	0,058	0,052	0,055	0,056	0,056	0,002	NS
Taxa de mastigação							
MS (kg min ⁻¹)	0,032	0,031	0,031	0,033	0,031	0,001	NS
MS (min kg ⁻¹)	37,99	39,52	40,66	38,80	37,77	1,356	NS
MS/E (kg)	0,161	0,159	0,155	0,141	0,159	0,007	NS
FDN (kg min ⁻¹)	0,007	0,007	0,006	0,007	0,007	0,001	NS
FDN (min kg ⁻¹)	169,2	176,0	181,1	172,8	168,3	6,060	NS
FDN/E (kg)	0,059	0,036	0,034	0,036	0,036	0,004	NS

¹C + P = Celulase + protease; ²EPM = Erro padrão da média; ³Probab. = Probabilidade; NS = Não significativo; MS = Matéria seca; FDN = Fibra em detergente neutro; MS/E: Matéria seca por evento; FDN/E: Fibra em detergente neutro por evento.

Não foi encontrada diferença significativa entre tratamentos para as variáveis de mastigação (Tabela 6). Os animais mastigaram, em média, 0,032 kg de MS min⁻¹, demoraram 38,95 min para mastigarem um quilograma de matéria seca, mastigaram 0,155 kg de matéria seca por evento. Mastigaram 0,007 kg de FDN por minuto, além de demorarem 173,48 min para mastigar um quilograma de FDN.

Figura 3 - Tempo de consumo acumulado (% do dia) de cada tratamento no decorrer de 24 horas em bovinos alimentados com enzimas.



No período das 8h00, quando é realizada a alimentação matutina, até por volta das 10h00, todos os animais estão comendo (Figura 5). Este mesmo comportamento se repete às 16h00, quando é realizada a alimentação vespertina, e todos os animais ficam comendo até por volta das 18h00. Assim, ficam claras algumas das atividades dos animais, como a ida ao cocho para se alimentar em horários coincidentes para todos os tratamentos.

Após a alimentação, a maioria dos animais fica em ócio das 10h00 até por volta das 12h00 e das 18h00 até às 19h00. No decorrer do dia, os animais ficam oscilando na maioria do tempo entre ócio e ruminação, alternando poucas idas repentinas ao cocho.

4.2 Quantificação de metano e características fermentativas

Dinâmica ruminal

A adição de enzimas na dieta de bovinos em diferentes proporções não apresentou diferença significativa sobre as variáveis de dinâmica ruminal (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito da adição de enzimas sobre a dinâmica ruminal na alimentação de bovinos.

Variáveis	Tratamentos						
	Controle	Amilase	Xilanase	C + P ⁴	Pool	EPM ⁵	Probab ⁶ .
CMS (kg/animal/dia) ¹	14,66	14,27	14,01	14,35	14,77	0,409	NS
MS do conteúdo ruminal (%)	12,22	11,98	12,88	12,44	13,16	0,22	NS
Massa líquida (kg)	53,56	52,33	51,11	53,45	51,04	1,92	NS
Massa líquida (% PV)	5,64	5,57	5,45	5,70	5,45	0,13	NS
Massa sólida (kg)	7,48	7,14	7,56	7,38	7,83	0,28	NS
Massa sólida (% PV)	0,78	0,76	0,80	0,79	0,83	0,02	NS
Massa total (kg)	61,04	59,48	58,67	60,83	58,87	2,16	NS
Massa total (% PV)	6,42	6,33	6,26	6,50	6,28	0,14	NS
Turnover sólido (%/dia)	206,1	203,2	187,5	196,6	194,2	4,65	NS
Taxa desaparec. sólido (%/h) ²	8,58	8,47	7,81	8,19	8,09	0,19	NS
Taxadesaparec. sólido (kg/h) ³	0,620	0,602	0,592	0,604	0,620	0,02	NS

¹CMS = Consumo de matéria seca; ²Taxa desaparec. sólido (%/h) = Taxa de desaparecimento de sólido (%/hora); ³Taxa desaparec. sólido = Taxa de desaparecimento de sólido (kg/hora); ⁴C + P = Celulase + protease; ⁵EPM = Erro padrão da média; ⁶Probab. = Probabilidade; NS = Não significativo.

A dinâmica ruminal é importante em modelos de nutrição de ruminantes, pois é um dos principais indicadores da relação entre o consumo do alimento e o desempenho animal. Estes parâmetros podem ser afetados pelas condições fisiológicas do animal, capacidade retículo-rúmen, porcentagem de renovação do rúmen, bem como pela composição da dieta (REYNOLDS et al., 2004).

Avaliando a dinâmica ruminal de vacas leiteiras em diferentes estágios de produção (de -72 dias pré-parto até 90 dias pós-parto), foram descritos valores de 6,1 a 11,4 kg de massa sólida e 44,3 a 66 kg de massa líquida (PARK et al., 2011).

Diferentes trabalhos mostraram que as enzimas exógenas melhoram o desempenho animal por reduzirem a viscosidade da digestão, melhorando a absorção pós-ruminal de nutrientes. Aumento da digestão de nutrientes pode estar associado à taxa de passagem a ao tamanho de partículas no rúmen (BEAUCHEMIN et al., 1998b). No entanto, os aditivos utilizados neste estudo não promoveram quaisquer alterações na dinâmica do rúmen.

Fermentação ruminal

Não houve efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre as variáveis de produção de metano (Tabela 8). A produção de metano, em média, foi de 28,25 g/kg/dia e a PER, em média, de 20,70%. Entretanto, adição de enzimas alterou a produção de ácido propiônico, acético e AGCC totais, quando comparados à dieta controle (Tabela 8).

O tratamento pool de enzimas, apresentou maior produção de ácido acético ($P < 0,05$), quando comparado aos demais tratamentos. Já, com relação à produção de ácido propiônico, o tratamento pool apresentou maiores concentrações ($P < 0,05$) quando comparado aos tratamentos controle e xilanase, e não diferiu ($P > 0,05$) das dietas que incluíram C+P e amilase. Os diferentes tratamentos não afetaram ($P > 0,05$) a produção de ácido butírico (Tabela 8).

A concentração de AGCC totais foi maior no tratamento pool de enzimas ($P < 0,05$) quando comparado aos tratamentos xilanase, controle e amilase.

A inclusão de enzimas não modificou as produções de metano (Tabela 8). Não foram verificadas alterações ($P > 0,05$) da perda energia relativa do metano em relação aos demais produtos da fermentação (Tabela 8).

Tabela 8 - Efeito da adição de enzimas na dieta sobre a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), metano (CH₄) e a perda de energia relativa (PER).

Variáveis	Tratamentos					EPM ²	Probabilidade		
	Controle	Amilase	Xilanase	C + P ¹	Pool		Trat.	Tempo	Interação ³
Acético									
0 min (mmol/L)	72,71	66,95	67,39	69,28	69,32	0,702	NS	NS	NS
30 min (mmol/L)	77,30	71,92	71,42	74,20	76,02	0,747	NS	NS	NS
Diferença (mmol/L)	4,58 ^{bc}	4,96 ^{bc}	4,03 ^c	5,52 ^{ab}	6,70 ^a	0,250	0,0033	NS	NS
Produção (mmol/g/h)	0,128 ^{bc}	0,146 ^{bc}	0,116 ^c	0,166 ^{ab}	0,196 ^a	0,007	0,0146	NS	NS
Produção (mol/kg/dia)	3,09 ^{bc}	3,50 ^{bc}	2,79 ^c	3,99 ^{ab}	4,70 ^a	0,178	0,0146	NS	NS
Produção (g/kg/dia)	185,6 ^{bc}	210,3 ^{bc}	167,9 ^c	239,4 ^{ab}	282,3 ^a	10,695	0,0146	NS	NS
EB (kcal/kg/dia) ⁴	647,8 ^{bc}	733,9 ^{bc}	586,0 ^c	835,6 ^{ab}	985,3 ^a	37,32	0,0146	NS	NS
Propiônico									
0 min (mmol/L)	20,70	18,64	19,44	18,36	18,73	0,428	NS	NS	NS
30 min (mmol/L)	22,29	20,57	21,12	20,38	21,06	0,451	NS	NS	NS
Diferença (mmol/L)	1,59	1,94	1,67	2,02	2,32	0,081	NS	NS	NS
Produção (mmol/g/h)	0,045 ^c	0,057 ^{abc}	0,049 ^{bc}	0,060 ^{ab}	0,068 ^a	0,002	0,0107	NS	NS
Produção (mol/kg/dia)	1,08 ^c	1,37 ^{abc}	1,18 ^{bc}	1,45 ^{ab}	1,64 ^a	0,058	0,0107	NS	NS
Produção (g/kg/dia)	79,71 ^c	101,8 ^{abc}	87,61 ^{bc}	106,9 ^{ab}	121,5 ^a	4,334	0,0107	NS	NS
EB (kcal/kg/dia) ⁴	396,90	507,30	436,30	532,60	605,00	21,585	NS	NS	NS
Butírico									
0 min (mmol/L)	11,62	10,24	10,14	10,82	10,39	0,271	NS	NS	NS
30 min (mmol/L)	13,03	11,66	11,29	12,21	12,00	0,298	NS	NS	NS
Diferença (mmol/L)	1,47	1,43	1,13	1,39	1,62	0,056	NS	NS	NS
Produção (mmol/g/h)	0,041	0,042	0,032	0,041	0,047	0,001	NS	NS	NS
Produção (mol/kg/dia)	0,99	1,01	0,79	0,99	1,14	0,038	NS	NS	NS
Produção (g/kg/dia)	87,6	89,2	69,7	87,3	100,4	3,386	NS	NS	NS
EB (kcal/kg/dia) ⁴	521,9	531,3	415,9	520,3	598,5	20,184	NS	NS	NS
AGCC total									
0 min (mmol/L)	105,03	95,83	96,99	98,46	98,44	1,298	NS	NS	NS
30 min (mmol/L)	112,63	104,16	103,84	107,39	109,08	1,379	NS	NS	NS
Diferença (mmol/L)	7,65 ^{bc}	8,33 ^{bc}	6,84 ^c	8,94 ^{ab}	10,64 ^a	0,350	0,0011	NS	NS
Produção (mmol/g/h)	0,215 ^{bc}	0,245 ^{bc}	0,199 ^c	0,267 ^{ab}	0,312 ^a	0,010	0,0020	NS	NS
Produção (mol/kg/dia)	5,17 ^{bc}	5,89 ^{bc}	4,77 ^c	6,43 ^{ab}	7,49 ^a	0,249	0,0020	NS	NS
Produção (g/kg/dia)	352,9 ^{bc}	401,3 ^{bc}	325,3 ^c	433,7 ^{ab}	504,2 ^a	16,45	0,0020	NS	NS
EB (kcal/kg/dia) ⁴	1566,8 ^b	1772,6 ^{ab}	1438,3 ^c	1888,6 ^{ab}	2188,8 ^a	69,525	0,0020	NS	NS
Metano									
0 min (mmol/Frasco)	0,022	0,022	0,022	0,023	0,023	0,0004	NS	0,0059	NS
30 min (mmol/Frasco)	0,093	0,085	0,082	0,089	0,096	0,0015	NS	0,0030	NS
Produção (mmol/Fras)	0,070	0,064	0,060	0,066	0,074	0,0014	NS	0,0110	NS
Produção (mmol/g/h)	0,074	0,072	0,067	0,074	0,080	0,0015	NS	0,0028	NS
Produção (mol/kg/dia)	1,78	1,73	1,60	1,79	1,93	0,0363	NS	0,0028	NS
Produção (g/kg/dia)	28,49	27,72	25,65	28,59	30,82	0,5819	NS	0,0028	NS
EB (kcal/kg/dia) ⁴	374,8	364,8	351,3	376,2	405,5	7,1230	NS	0,0028	NS
PER (%) ⁵	21,80	20,48	22,78	19,57	18,88	0,6628	NS	NS	NS

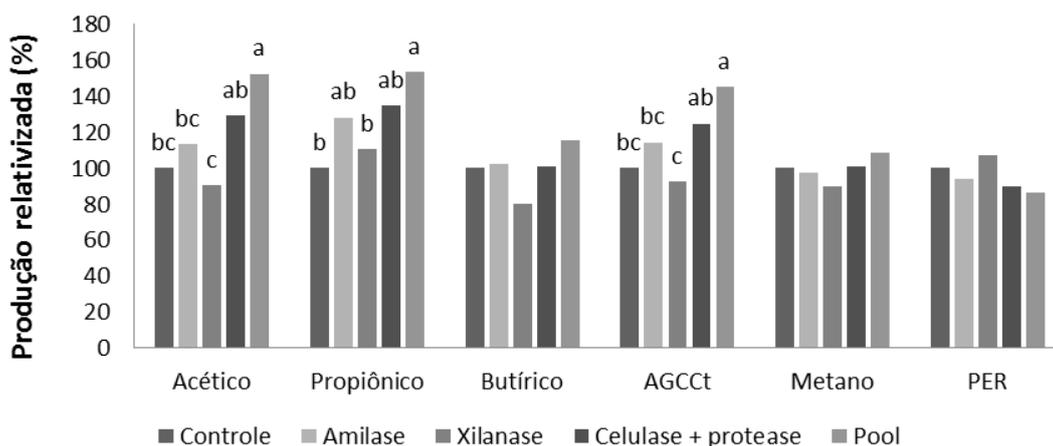
¹C + P = Celulase + protease; ²EPM = Erro padrão da média; ³Interação entre tratamento e tempo; ⁴EB = Energia Bruta; ⁵PER = Perda de energia relativa do metano em relação aos demais produtos da fermentação ruminal; abc = Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste Pediff ao nível de 5% de significância.

Não houve efeito da produção de metano devido ao aumento da fermentação ruminal como um todo, pois a produção de AGCC aumentou para acético, propiônico e para o total de AGCC. A adição de enzimas não resultou em efeito inibitório sobre as *arqueas* metanogênicas e as bactérias celulolíticas, comprovado pelo aumento dos produtos finais da fermentação ruminal. De acordo Murray et al. (1976), o único AGCC que faz contribuição para a síntese de glicose no ruminante é o ácido propiônico, um dos principais AGCC no rúmen, cuja produção é dependente da ingestão de energia digestível (YANG et al., 2002; CHEN et al., 1994). A adição de enzimas pode ter promovido a captura de H₂ do meio ruminal durante o processo fermentativo, em que o produto resultante é o ácido propiônico e AGCC totais. O aumento destes produtos sem reduzir a produção de metano, não resultou em melhor eficiência energética. Os resultados deste estudo indicam que os níveis da adição das enzimas foram eficientes em aumentar a disponibilidade de frações dos alimentos para a degradação e multiplicação dos microrganismos ruminais. Krause et al. (1998) reportaram que em condições nas quais a degradação da fibra não é completa, as enzimas adicionadas podem melhorar a degradação das fibras e mistura de enzimas pode ser ainda mais eficiente em degradá-las.

Dietas ricas em amido promovem aumentando da ação das bactérias amilolíticas ou proteolíticas, que são produtoras de ácido propiônico (CHURCH, 1988). Dietas com alto teor de concentrados promovem a maior produção de ácido propiônico, acidificando o meio, o que leva a uma redução do pH ruminal, que pode ser um efeito inibitório direto sobre a população de microrganismos celulolíticos e metanogênicos, os quais possuem pouca tolerância à diminuição do pH ruminal (VAN KESSEL, 1996).

Arriola et al. (2011) relataram aumento na concentração de AGCC total e diminuição da relação acético:propiônico no líquido ruminal de bovinos alimentados com enzimas fibrolíticas. Beauchemin et al. (1999) e Yang et al. (1999) não encontraram nenhum efeito de enzimas fibrolíticas sobre a fermentação ruminal. A maioria dos produtos enzimáticos fibrolíticos contém maior atividade de celulase e hemicelulase, mas os tipos específicos destas enzimas diferem dependendo da estirpe microbiana, dosagens, substrato de crescimento e das condições de cultura no processo de fermentação (BEAUCHEMIN & HOLTSHAUSEN, 2011); também variam com base na localização geográfica, na qualidade dos alimentos, composição alimentar e no processamento da ração ingerida (JOHNSON & JOHNSON, 1995).

Figura 4- Produção relativa (controle considerando 100%) dos produtos da fermentação (mol/kg/dia) para os diferentes tratamentos.



Houve diferenças significativas ($P < 0,05$) para a produção de AGCC totais em relação à dieta controle (Figura 4). O tratamento Pool melhorou a produção dos ácidos acético, propiônico e AGCC totais enquanto que os tratamentos amilase e C+P tiveram resultados intermediários. Isto pode ser devido a diferenças no modo de ação das enzimas utilizadas e à associação das enzimas (Pool), que pode ter estimulado a fermentação ruminal, aumentando a produção de AGCC totais.

Os resultados observados, referentes à produção de ácidos acético, propiônico e AGCC totais, estão de acordo com os estudos de Arriola et al. (2011), Giraldo et al. (2007) os quais adicionaram enzimas fibrolíticas na dieta de bovinos e observaram aumento na concentração de ácidos acético, propiônico e AGCC total. Giraldo et al. (2008) avaliaram o efeito de enzimas fibrolíticas na dieta de bovinos e observaram o uso dessas enzimas como causa de mudança na proporção de AGCC, que indica que o padrão de AGCC parece ser influenciado pelo tipo de dieta e preparações enzimáticas.

Janssen (2010) reporta que a concentração de H_2 no meio pode afetar a termodinâmica da fermentação ruminal e o nível do crescimento de *arqueas* metanogênicas no rúmen. O hidrogênio produzido pela comunidade microbiana está presente em duas formas, H_2 dissolvido e H_2 gasoso, sendo apenas o primeiro utilizado como substrato pelas arqueas metanogênicas (WANG et al., 2014). Entretanto, a fermentação oriunda de uma associação de

enzimas favorece a produção de ácido propiônico, o qual atua como um dissipador do hidrogênio e, assim, diminui a quantidade de H₂ disponível para a redução do CO₂ em CH₄ (JANSSEN, 2010). O processo metanogênico desempenha um papel importante na fermentação ruminal pela remoção de H₂, fornecendo um coletor de elétrons que diminuem a pressão parcial de H₂ (Russell, 2002).

Portanto, o uso de enzimas exógenas nas dietas de ruminantes tem o potencial de melhorar a capacidade dos animais em converter alimentos em substratos energéticos que podem ser usados para sintetizar leite e carne. Entretanto, esse direcionamento na utilização dos substratos energéticos não reduz a emissão de metano pelos ruminantes.

Concentração ruminal de nitrogênio amoniacal

A adição de enzimas na dieta de bovinos não causou diferenças significativas sobre as concentrações de N-NH₃ ruminal (Tabela 9). Em média, o nitrogênio ruminal nos frascos antes da incubação (T₀) foi de 14,83 mg/dL e após a incubação (T₃₀) foi de 16,63 mg/dL.

Tabela 9 - Efeito da adição de enzimas na dieta de bovinos sobre a produção de N-NH₃.

Variáveis	Tratamentos					EPM ²	Probabilidade		
	Controle	Amilase	Xilanase	C+P ¹	Pool		Trat.	Tempo	Interação ³
0 min (mg/dL)	14,16	14,76	15,20	14,75	15,30	0,483	NS	NS	NS
30 min (mg/dL)	16,11	16,62	17,13	16,42	16,86	0,525	NS	NS	NS
Balanço (mg/dL/h)	3,89	3,72	3,85	3,34	3,12	0,291	NS	NS	NS

¹C + P = Celulase + protease; ²EPM = Erro padrão da média; ³Interação entre tratamento e tempo.

De acordo com (NRC, 1989), é necessária concentração de 5 mg/dL de N-NH₃ no fluido para a adequada digestão da matéria seca no ecossistema ruminal. No entanto, segundo Leng (1990) a concentração de N-NH₃ ruminal deve ser maior de 10 mg/dL para maximizar a digestão. As concentrações de N-NH₃ reduzem após 4 horas da alimentação, devido à diluição (alimento, água e saliva), e dependendo da dieta e quantidade ingerida o pico pode acontecer entre 6 a 12 h após a alimentação (DEHORITY, 2003).

Lewis et al. (1996) e Martins et al. (2002) não encontraram efeito significativo entre os tratamentos para as concentrações de N-NH₃ ruminal com a adição de enzimas na dieta de

bovinos. No presente estudo, os valores médios antes da incubação de 14,83 mg/dL e após a incubação de 16,63 mg/dL estão acima do valor mínimo descrito na literatura para que ocorra a máximo crescimento dos microrganismos e a produção de proteína microbiana.

Mensuração de pH

Neste estudo não houve efeito ($P>0,05$) das enzimas sobre o perfil de pH ruminal, independentemente de tratamento. Os animais tiveram o pH médio, mínimo e máximo de 6,0, 5,27 e 6,78, respetivamente (Tabela 10). O tempo em minutos no qual o pH permaneceu abaixo de 5,8, 6,0, 6,2 e 6,5 e a área de pH abaixo de 5,8, 6,0, 6,2 e 6,5, não sofreram influência dos tratamentos ($P>0,05$).

Tabela 10 – Efeito de enzimas na alimentação de bovinos sobre as variáveis de pH ruminal medidas continuamente durante 24 h.

Variáveis	Tratamentos						
	Controle	Amilase	Xilanase	C + P ¹	Pool	EPM ²	Probab ³ .
pH médio	5,98	6,16	5,95	6,01	5,89	0,06	NS
pH mínimo	5,25	5,41	5,13	5,38	5,19	0,06	NS
pH máximo	6,68	6,95	6,71	6,87	6,69	0,06	NS
Tempo de pH abaixo de 5,8 (min)	572	388	562	496	635	67,44	NS
Tempo de pH abaixo de 6,0 (min)	742	556	722	708	875	67,54	NS
Tempo de pH abaixo de 6,2 (min)	926	742	860	942	1132,5	72,34	NS
Tempo de pH abaixo de 6,5 (min)	1198	1030	1158	1216	1300	64,26	NS
Área de pH abaixo de 5,8 (h.pH/dia)	2,47	1,88	4,47	2,14	3,02	0,61	NS
Área de pH abaixo de 6,0 (h.pH/dia)	4,65	3,44	6,61	4,21	5,54	0,8	NS
Área de pH abaixo de 6,2 (h.pH/dia)	7,43	5,61	9,24	6,91	8,88	0,99	NS
Área de pH abaixo de 6,5 (h.pH/dia)	12,75	8,49	13,0	12,34	13,36	1,34	NS

¹C + P = Celulase + protease; ²EPM = Erro padrão da média; ³Probab. = Probabilidade.

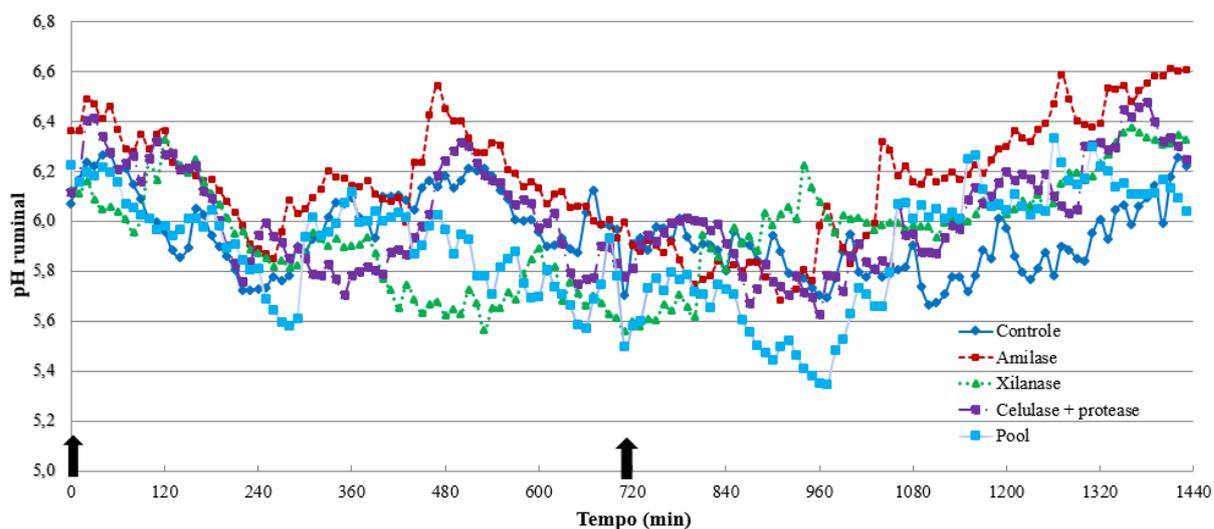
A concentração de FDN na dieta é um parâmetro que influencia a habilidade em estimular a mastigação e salivação e, conseqüentemente, em melhorar o tamponamento do rúmen. Os resultados indicam que a atividade de mastigação é afetada pelo FDN dietético que desempenha um papel decisivo na regulação do pH ruminal. Beauchemin et al. (2008) relataram que maiores proporções de MS de forragem na MS da dieta total e FDN de maior tamanho de partículas na dieta aumentam a secreção diária total de saliva, melhorando o poder tamponante do rúmen.

As variações de pH do conteúdo ruminal no decorrer de 24 h, mensuradas a cada 10 minutos, deixam evidentes que os valores de pH, durante 24 h, não apresentaram variações fora dos limites ótimos para a fermentação ruminal, indicando que a inclusão de diferentes

proporções de enzimas não oferece riscos de distúrbios digestivos ao metabolismo ruminal. Mesmo aumentando a quantidade total de AGCC, esse aumento não foi suficiente para reduzir o pH a níveis críticos. As proporções de enzimas utilizadas foram eficientes em manter o pH ruminal durante o período crítico de 3 a 4 h após a alimentação e o valor médio de pH obtido nesta pesquisa foi de 6,0, que pode estar associado à adequada digestão da fibra (MERTENS, 1979).

O pH teve seu valor mais elevado para todos os tratamentos por volta de 50 minutos após a alimentação matutina. Forsberg (1992) relata que o pH ótimo para atividade das enzimas fibrolíticas produzidas por microrganismos é acima de 6,2. No presente estudo, foi encontrado valor médio de pH máximo de 6,78. A melhor estabilidade do ambiente ruminal se dá pela redução das variações de pH (WALLACE, 1994). A dieta de animais em confinamento apresenta maior proporção de concentrados, o que reduz o pH ruminal, criando um ambiente menos favorável para desenvolvimento dos microrganismos celulolíticos e metanogênicos no ecossistema ruminal (PETRI et al., 2012).

Figura 5 - pH (média de 5 observações) mensurado durante 24 h em bovinos alimentados com enzimas. As setas representam o momento do fornecimento da alimentação.



Contagem de protozoários

A adição de enzimas não promoveu alteração ($P>0,05$) na concentração e porcentagem de protozoários dos diferentes gêneros e subfamílias presentes no rúmen (Tabela 11).

Tabela 11 - Efeito da adição de enzimas na dieta de bovinos sobre a contagem total e diferencial de protozoários.

Variáveis	Tratamentos						Probabilidade		
	Controle	Amilase	Xilanase	C+P ¹	Pool	EPM ²	Trat.	Tempo	Interação ³
	Protozoários x 10 ³ /mL								
<i>Dasytricha</i>	2,88	4,00	3,22	3,65	2,88	0,228	NS	NS	NS
<i>Diplodiniinae</i>	6,67	7,15	5,62	8,06	8,21	0,423	NS	NS	NS
<i>Entodinium</i>	399,5	460,5	429,5	451,7	478,2	14,24	NS	NS	NS
<i>Isotricha</i>	0,960	1,344	1,488	1,056	1,488	0,173	NS	NS	NS
Total	410,0	473,0	439,8	464,4	490,8	14,59	NS	NS	NS
	Protozoários (%)								
<i>Dasytricha</i>	0,774	0,898	0,849	0,870	0,622	0,061	NS	NS	NS
<i>Diplodiniinae</i>	1,570	1,563	1,337	1,639	1,565	0,074	NS	NS	NS
<i>Entodinium</i>	97,44	97,29	97,49	97,28	97,54	0,110	NS	NS	NS
<i>Isotricha</i>	0,205	0,249	0,313	0,202	0,266	0,031	NS	NS	NS

¹C + P = Celulase + protease; ²EPM = Erro padrão da média; ³Interação entre tratamento e tempo.

O gênero *Entodinium* representou 97,41% do total de protozoários do rúmen e esteve presente em maiores concentrações em todos os tratamentos. Apresentando concentração média, de 443,88 x 10³/mL. A população total de protozoários no líquido ruminal não foi afetada pela adição de enzimas (Tabela 10). Entretanto, outros estudos demonstraram que a diversidade, complexidade do ecossistema e as condições ruminais (pressão osmótica, pH e taxa de diluição) podem influenciar o crescimento da população de protozoários em dietas de alto concentrado (GUAN et al., 2006). O ecossistema ruminal representa um desafio da funcionalidade e prevalência dos carboidratos utilizados pela população do rúmen (MORGAVI et al., 2012).

O gênero *Entodinium* representa mais de 90% dos protozoários encontrados no ecossistema ruminal em animais recebendo dieta de alta proporção de concentrado (BROWN; PONCE; PULIKANTI, 2006). De fato, o gênero mais abundante encontrado foi o *Entodinium*, com 97,41% do total de protozoários neste experimento (dieta com 70% de concentrado) semelhante a concentração encontrada por Guan et al. (2006), que encontraram uma proporção de 91,1% do gênero *Entodinium* do total de protozoários, utilizando dieta composta por 70% de concentrado para animais confinados. Este gênero predomina no ecossistema ruminal da maioria dos animais variando de 80 a 90% da população total no rúmen (DEHORITY, 2003). Em outro estudo, com ovinos, *Entodinium* também foi o gênero predominante entre os protozoários variando de 87,3 a 97,8% da concentração total

(FRANZOLIN et al., 2000). Jeyanathan et al. (2011) reportaram que a diversidade de protozoários pode ser afetada pelas variações da dieta, metodologia utilizada e amostragem do rúmen.

Arqueas metanogênicas vivem em associação com protozoários ciliados no rúmen, portanto, sugere-se que decréscimo no número de protozoários, reduziria o número de *arqueas* metanogênicas, diminuindo, assim, as emissões de metano. No entanto, Zhou et al. (2011) demonstram que a adição de enzimas exógenas provocou desvios no ecossistema ruminal, sem causar efeito nas populações de protozoários, bactérias ou *arqueas* metanogênicas ou ainda no perfil de pH no rúmen.

4.3 Produção de metano através da biodigestão anaeróbia

Determinação de pH

Não houve efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos em relação aos valores de pH (Tabela 12). No entanto, os dados demonstram que o afluente estava com um pH ácido e que o processo de biodigestão conseguiu elevá-lo a um pH próximo do neutro, mostrando que os fatores iniciais não promoveram quaisquer alterações na biodigestão anaeróbia. Sendo assim, o presente estudo mostrou-se eficiente, pois o pH é um importante indicador do desenvolvimento metanogênico, ou seja, a produção ótima de biogás é conseguida quando o valor do pH do conteúdo do biodigestor está próximo a 7,0 (SOUSSANA et al., 2010). Segundo Ogejo & Li (2010), no processo de biodigestão a variação de pH ideal se mantém em torno de 6,5 a 8,5, sendo que os valores registrados neste trabalho se enquadraram próximos ao intervalo recomendado, o que provavelmente não foi fator de interferência sobre as condições de desenvolvimento da biodigestão anaeróbia para nenhum dos tratamentos.

Tabela 12 – Resultados de pH para afluentes e efluentes em biodigestores abastecidos com fezes de bovinos alimentados com enzimas.

Variáveis	Tratamentos						
	Controle	Amilase	Xilanase	C+P ¹	Pool	EPM ²	Probab ³ .
pH afluentes	6,28	6,45	6,47	6,57	6,48	0,0579	NS
pH efluentes	7,07	7,02	7,00	7,00	7,11	0,0208	NS

¹C + P = Celulase + protease; ²EPM = Erro padrão da média; ³Probab. = Probabilidade.

A elevação do pH é característica de processos metanogênicos estáveis que produzem alcalinidade, quando ocorre a digestão do nitrogênio, com aumento da concentração de amônia, a qual pode elevar o pH ao valor 8. Quando o nível de produção de metano atinge a estabilidade, o pH alcança valores entre 7,2 a 8,2 (FAO, 1996). O processo de produção do biogás depende da temperatura, do pH do substrato e da concentração de nutrientes. A produção do gás tem sua velocidade ótima atingida com pH entre 7 e 8 e temperatura ao redor de 35 °C (AKAO et al., 1992).

Sólidos totais e voláteis

Os ST e SV dos afluentes e efluentes dos diferentes tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si. No entanto, o processo de biodigestão proporcionou, em média, uma redução de 29,28% de sólidos totais e redução de 35,09% de sólidos voláteis (Tabela 13)

Tabela 13 - Sólidos totais e voláteis destruídos em biodigestores abastecidos com fezes de bovinos alimentadas com enzimas.

Variáveis	Tratamentos						
	Controle	Amilase	Xilanase	C+P ¹	Pool	EPM ²	Probab ³ .
ST afluentes (%)	4,27	4,35	4,15	4,13	4,33	0,0700	NS
SV afluentes (%)	3,59	3,97	3,71	3,61	3,94	0,0816	NS
ST efluentes (%)	3,22	3,47	3,12	3,10	3,34	0,0801	NS
SV efluentes (%)	2,60	2,27	2,50	2,43	2,65	0,0842	NS
ST reduzido (%)	28,51	33,09	30,23	27,40	26,02	2,4424	NS
SV reduzido (%)	32,11	35,98	37,31	34,81	35,73	2,2338	NS

ST: sólidos totais; SV: sólidos voláteis; ¹C + P = Celulase + protease; ²EPM = Erro padrão da média; ³Probab. = Probabilidade.

Sólidos voláteis reduzidos são utilizados para mensurar o desempenho do processo de biodigestão, além de ser um indicador direto da atividade metabólica da comunidade microbiológica. Para biodigestores em escala industrial operados sob condições de temperatura, redução de 40% é considerado um valor aceitável (RIMKUS et al., 1982).

Davidsson et al. (2008) relataram que a redução de sólidos voláteis dos dejetos bovinos pelo processo de biodigestão anaeróbia varia entre 30%-45%. Em nosso estudo, a destruição de sólidos voláteis foi 35,09%, o que indica bom desempenho do reator dos biodigestores.

Orrico Junior et al. (2010), avaliaram a eficiência do processo de biodigestão anaeróbia em biodigestores batelada abastecidos com dejetos de bovinos alimentados com

60% volumoso e 40% concentrado e 40% volumoso e 60% concentrado, submetidos a 30, 60, 90 e 120 dias de tempo de retenção hídrica, obtiverem reduções nos teores de SV, em média, de 44,05%, e observaram que o aumento da proporção de volumoso na dieta levou a menor eficiência do processo, obtendo uma baixa degradação de fibras.

Sendo assim, os resultados da baixa redução podem estar relacionados à composição da dieta, que foi à base de concentrado, e isso conseqüentemente foi agregado ao dejetos. Já que os bovinos conseguem aproveitar grande parte do concentrado e parte do volume, sendo que a fração indigestível presente no volumoso acaba excretada nas fezes e esta fração possui baixo aproveitamento no biodigestor.

No entanto, os dejetos de monogástricos possuem maior redução, pois a dieta dos mesmos é a base somente de concentrado. Steil et al. (2002) obtiveram reduções de SV de 61% na biodigestão anaeróbia de dejetos de aves poedeiras, valor este quase duas vezes maior que os valores encontrados no presente estudo. Valores inferiores de redução de SV (47%) foram encontrados por Santos et al. (2004), que trabalharam com biodigestão anaeróbia de dejetos de galinhas poedeiras criadas sob diferentes temperaturas.

Produção de biogás e metano

Não houve efeito ($P>0,05$) dos tratamentos sobre as variáveis da produção de biogás (Tabela 14), mostrando que os tratamentos que continham dejetos de animais alimentados com dietas aditivadas por enzimas não influenciaram a concentração e rendimento de metano, e mantiveram-se iguais aos biodigestores da dieta controle.

O potencial de produção de metano foi semelhante entre os tratamentos. Em média, foram produzidos 0,029 litros de metano por grama adicionado de fezes, 0,236 litros de metano por grama de sólidos voláteis adicionados e 0,714 litros de metano por grama de sólidos voláteis reduzidos (Tabela 14).

Tabela 14 - Rendimento e concentração de biogás e metano em biodigestores abastecidos com fezes de bovinos alimentados com enzimas.

Variáveis	Tratamentos					EPM ⁴	Probab ⁵ .
	Controle	Amilase	Xilanase	C+P ³	Pool		
Biogás total (L)	14,66	14,27	14,01	14,35	14,77	1,0828	NS
CH ₄ (L)	15,86	14,86	15,75	15,34	16,08	0,7010	NS
CH ₄ (%)	68,63	68,84	74,48	69,53	71,98	0,8753	NS
CH ₄ / fezes L/g)	0,030	0,026	0,030	0,030	0,030	0,0095	NS
CH ₄ / SV adicionado (L/g)	0,243	0,243	0,225	0,240	0,230	0,0094	NS
CH ₄ / SV reduzido (L/g)	0,743	0,603	0,655	0,726	0,640	0,0615	NS

¹L: litros; ²g: grama; ³C+P = celulase + protease; ⁴EPM = Erro padrão da média; ⁵Probab. = Probabilidade.

De acordo com Soto-Salanova (1996), as enzimas alimentares provocam a ruptura das paredes celulares das fibras, degradam as proteínas e diminuem os efeitos dos fatores antinutritivos, tornando os nutrientes mais disponíveis, tanto para o animal como para as bactérias anaeróbias presentes nos biodigestores. Isso faz com que se tenha maior disponibilidade de nutrientes e conseqüentemente se aumente a produção de biogás, o que não foi observado no presente estudo, onde as enzimas não interferiram nos resultados de produção de biogás e metano.

As diferenças não encontradas entre os tratamentos podem estar relacionadas com a composição do substrato, onde a proporção das enzimas adicionadas na dieta dos animais, não promoveram mudanças na composição do dejetos que compõe o substrato, sendo assim elas permaneceram semelhantes com o tratamento controle e não proporcionaram mudanças na produção de biogás.

No presente estudo, apesar de o volumoso estar contido na dieta, a concentração do metano em média, entre os tratamentos foi de 70,60 % de metano, quando os dejetos foram tratados em biodigestores do tipo batelada. Já Miranda (2005) obteve biogás com 65,73% de metano em biodigestores de bancada, Orrico Junior (2008) obteve 66,55% de metano em biodigestores do mesmo tipo, enquanto Silva (1998) descreve que a composição do biogás varia de 60 a 70% de metano em biodigestores batelada, estando dentro dos valores encontrados nesse trabalho. Sendo assim, o processo de biodigestão se mostrou eficiente, pois, segundo Soussana et al. (2010), quanto maior for a proporção de metano, mais eficiente é o biogás para produção de energia. Gopalan et al. (2013) reportaram rendimento médio de metano de 0,17 g/L com variação de 0,07 – 0,28 L/g, estes dados estão de acordo com nossos dados, no qual houve rendimento de metano foi 0,24 L/g.

No entanto, tem sido observado, rendimento de metano, produzido por dejetos de diferentes origens podem ser variáveis e são afetados por diversos fatores como: dieta, espécie, estágio de crescimento, tipo de material da cama, processo de degradação no armazenamento (ANGELIDAKI et al., 2000).

5 CONCLUSÕES

A adição de diferentes tipos e concentrações de enzimas não afeta a eficiência do uso de nutrientes no metabolismo ruminal de bovinos.

A associação das enzimas exógenas melhora a produção de ácidos acético e propiônico sem aumentar a emissão de CH₄ pelos ruminantes para a atmosfera.

A utilização das enzimas, nas proporções adicionada nas dietas, não interferiu à produção de biogás ou metano das fezes, bem como os teores sólidos do efluente.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, supl. esp., p. 260-258, 2008.
- ALSERSY, H. et al. Effect of Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus*) ensilaging with two developed enzyme cocktails on feed intake, nutrient digestibility and ruminal fermentation in sheep. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 86, n. 1, p. 51-58, 2015.
- AKAO, T. et al. The methane fermentation of Citrus unshu peel pretreated with fungus enzymes. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 41, p. 35-39, 1992.
- ANGELIDAKI, B. K.; AHRING, B. K. Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 41, p. 189-194, 2000.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS- AOAC. **Official methods of analyses**. 18th ed. Arlington, VA, USA: AOAC, 2006.
- _____. **Official methods of analysis**. 16th ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC, 1995.
- _____. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, VA, USA: AOAC, 1990.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22nd ed. Washington, D.C.: American Public Health Associa, 2012. (Prepared and published jointly by American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, joint editorial board, Eugene W. Rice et al.).
- _____. **Standard methods**. 19. ed. Washington, D.C., 1995.
- ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 111-150.
- ARRIOLA, K. G. et al. Effect of fibrolytic enzyme application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 94, p. 832-841, 2011.
- AVELLANEDA, J. H. et al. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestion of Guinea grass hay. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 149, p. 70-77, 2009.
- AVELLANEDA-CEVALLOS, J. H. et al. Effect of an exogenous fibrolytic enzyme on intake and ruminal variables in lambs fed Guines grass (*Panicum maximum* var. Mombassa) hay. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, supl. 1, p. 45, 2004.
- BATEMAN, J. **Nutrición animal**: manual de métodos analíticos. México: Herrero Hermanos, 1970.

BATISTA, L. F. **Construção e operação de biodigestores**. Brasília: EMATER, 1981.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Clayton, v. 48, p. 21-27, 2008.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Use of fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 14, p. E37-E47, 2003.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Enzymes and direct fed microbials in diets for dairy cows. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 2000, Columbus. **Proceedings...** Columbus: Ohio State University, 2000. p. 85-95.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Use of feed enzymes in ruminant nutrition. In: PACIFIC NORTHWEST NUTRITION CONFERENCE, 33., 1998, Vancouver. **Proceedings...** Vancouver: British Columbia, 1998b. p. 121-135.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Effects of fibrolytic enzyme in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 4, p. 645-653, 1997.

BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 23-36, 2004.

BEAUCHEMIN, K. A.; HOLTSHAUSEN, L. Developments in enzyme usage in ruminants. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. Wallingford, UK: CABI Publ., 2011. p. 206-230.

BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; PETIT, H. V. Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 431-440, 2007.

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. The potential use of feed enzymes for ruminants. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 58., 1996, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: University de Cornell, 1996. 1 CD-ROM.

BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion on dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 82, p. 378-390, 1999.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, n. 2, p. 567-590, 1990.

BERNDT, A. Impacto da pecuária de corte brasileira sobre os gases do efeito estufa. In: SIMPOSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 7., Viçosa, 2010. **Anais...** Viçosa: UFV, 2010. p. 121-1470.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.

BONILLA, C. J. A.; LEMUS, F. C. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. **Revista Mexicana de Ciências Pecuárias**, México, v. 3, p. 215-246, 2012.

BROWN, M.; PONCE, C.; PULIKANTI, R. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 25-33, 2006.

BUDDLE, B. M. et al. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. **The Veterinary Journal**, London, v. 188, n. 1, p. 11-17, 2011.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, v. 2, n. 6, p. 254-267, 2005.

CARVALHO, F. A. N. **Nutrição de bovinos a pasto**. Belo Horizonte: Papel Form Editora Ltda, 2003. 428 p.

CASTRILLÓN, L. et al. Anaerobic thermophilic treatment of cattle manure in UASB reactors. **Waste management and Research**, London, v. 20, n. 4, p. 350-356, 2002.

CHALUPA, W. Manipulating rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 46, n. 3, p. 585-599, 1977.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F. et al. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, p. 5-26, 2008.

CHAUCHEYRAS, F. et al. In vitro H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 9, p. 3466-3467, 1995.

CHEN, K. H. et al. Effect of enzyme treatment or steam - flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 78, p. 1721-1727, 1995.

CHENG, K. J.; McALLISTER, T. A. Compartmentation in the rumen in the rumen. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London, UK: Blackie Academic & Professional, 1997. p. 492-522.

CHERNEY, D. J. R.; SICILIANO, J. J.; PELL, A. N. Technical note: forage "in vitro" dry matter digestibility as influenced by fiber source in the donor cow diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, p. 1335-1338, 1993.

CHILIBROSTE, P. et al. Duration of regrowth of ryegrass (*Lolium perenne*) effects on grazing behavior, intake, rumen fill and fermentation of lactating cows. **Journal Dairy Science**, v. 83, n. 5, p. 984-995, 2000.

CLARK, H.; KLEIN, C.; NEWTON, P. **Potential management practices and technologies to reduce nitrous oxide, methane and carbon dioxide emissions from New Zealand Agriculture**. Ngaherehere: Ministry of Agriculture and Forestry. Disponível em: <<http://www.maf.govt.nz/mafnet/rural-nz/sustainable-resource-use/climate/green-house-gasmigration/ghg-mitigation.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2010

CLAUSS, M. et al. A case of non-scaling in mammalian physiology? Body size, digestive capacity, food intake, and ingesta passage in mammalian herbivores. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, Philadelphia, v. 148, p. 249-265, 2007.

COLOMBATTO, D.; BEAUCHEMIN, K. A. A proposed methodology to standardize the determination of enzyme activities present in enzyme additives used in ruminant diets. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 83, p. 559-568, 2003.

CONCEIÇÃO, D. et al. Redução de cromo hexavalente por bactérias isoladas de solos contaminados com cromo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1661-1667, 2007.

DADO, R. G.; ALLEN, M. S. Intake limitations, feeding behavior, and rumen function of cows challenged with rumen fill from dietary fiber on inert bulk. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 78, p. 118-133, 1995.

DAVIDSSON, A. et al. Co-digestion of grease trap sludge and sewage sludge. **Waste Management**, Kidlington, v. 28, p. 986-992, 2008.

DEHORITY, B. A. **Rumen microbiology**. Nottingham: Nottingham University Press, 2003.

DEHORITY, B. A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa**. Florida: CRC Press Inc., 1993. 96 p.

DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P. A. Effect of ruminal cellulolytic bacterial concentrations on in situ digestion of roughage cellulose. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 11, p. 2905-2911, 1998.

DE HAAN, R. et al. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, New York, v. 9, n. 1, p. 87-94, 2007.

DEMIRER, G. N.; CHEN, S. Two-phase anaerobic digestion of unscreened dairy manure. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 4, p. 3542-3549, 2005.

DOREAU, M.; BAUCHART, D.; CHILLIARD, Y. Enhancing fatty acid composition of milk and meat through animal feeding. **Animal Production Science**, Clayton, v. 51, n. 1, p. 19-29, 2010.

ELLIS, J. L. et al. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain-fed beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 8, p. 2717-2726, 2012.

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

EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of a proteolytic feed enzyme on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 88, p. 2140-2153, 2005.

EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using in vitro fermentation characteristics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 132, p. 298-315, 2007.

FRANCE, J.; BEEVER, D. E.; SIDDON, R. C. Compartmental schemes forestimating methanogenesis in ruminants from isotope dilution data. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 164, p. 206-218, 1993.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION UNITED OF THE NATIONS - FAO. A system approach to biogas technology. In: _____. **Biogás technology: a training manual for extension**. Kathmandu, 1996.

FERRARETTO, L. F. et al. Influence of a reduced-starch diet with or without exogenous amylase on lactation performance by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 94, p. 1490-1499, 2011.

FOLDAGER, J. **Protein requirement and non-protein nitrogen for high producing cow in early lactation**. 1977. Tese (Doutorado) - East Lansing - Michigan State University, 1977.

FONTES, C. M. The resistance of cellulases and xylanases to proteolytic inactivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 43, p. 52-57, 1995.

FUENTES YAGUE, J. L. **Construcciones para la Agricultura y la Ganaderia**. 6th ed. Madrid: Madrid Ediciones Mundi-Prensa, 1992. 414 p.

FRANZOLIN, R. et al. Efeitos de rações com níveis crescentes de cana-de-açúcar em substituição à silagem de milho sobre a população de protozoários ciliados no rúmen de ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, p. 1452-1457, 2000.

GIRALDO, L. A. et al. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 1617-1623, 2008.

GOPALAN, P.; JENSEN, P. D.; BATSTONE, D. J. Biochemical methane potential of beef feedlot manure: impact of manure age and storage. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 42, n. 4, p. 1205-1212, 2013.

GUAN, H. et al. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 1896-1906, 2006.

HARDOIN, P. C.; GONÇALVES, A. D. M. A. Avaliação do potencial do emprego do biogás nos equipamentos utilizados em sistemas de produção de leite. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 3., 2000, Campinas. **Anais eletrônicos...** Campinas, 2003. Disponível em:

<http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC000000002200000100053&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 10 jan. 2017.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. Amilase fúngica. In: **Bioquímica das fermentações**. 1982. 56 p.

HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T. A.; CHENG, K. J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed barley grain diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, p. 477-487, 2000.

HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T. A.; CHENG, K. J. Stability of exogenous polysaccharide-degrading enzyme in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 76, p. 161-168, 1998.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. **Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge, UK, USA: Cambridge University Press, 2007.

JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 160, p. 1-22, 2010.

JEYANATHAN, J. et al. Methanogen community structure in the rumens of farmed sheep: cattle and red deer fed different diets. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 76, p. 311-326, 2011.

JOHNSON, D. E. et al. **Perspective on ruminant methane emission**. Fort Collins: Colorado State University, 1993.

JOHNSON, K. A. The use of SF₆ as an inert gas tracer for use in methane measurements. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, 1992.

JOHNSON, K. A. et al. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF₆ tracer technique. **Environmental Science and Technology**, Washington, v. 28, n. 1, p. 359-362, 1994.

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

KAMINSKI, M. Determination of carbon monoxide, methane and carbon dioxide in refinery hydrogen gases and air by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 989, p. 277-283, 2003.

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

KRAUSE, K. M.; COMBS, D. K.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows. II. Ruminal pH and chewing activity. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 85, p. 1947-1957, 2002.

KRAUSE, M. et al. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 2912-2920, 1998.

KREUZER, M.; HINDRISCHESEN, I. K. Methane mitigation in ruminants by dietary means. The role of their methane emission from manure. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 199-206, 2006.

KULASEK, G. A. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood and blood cells using urease and phenolreagent. **Polskie Archiwum Weterynaryjne**, Poland, v. 15, n. 4, p. 801-810, 1972.

KUNG, L. et al. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 83, p. 115-122, 2000.

KUNG, L. Jr.; TREACHER, R. J.; COHEN, M. A. Enzyme-treated forages for lactating cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, suppl. 1, p. 196, 1998.

LASCANO, C. E.; CÁRDENAS, E. Alternatives for methane emission mitigation in livestock systems. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 175-182, 2010.

LE LIBOUX, S.; PEYRAUD, J. L. Effect of forage particle size and feeding frequency on fermentation patterns and sites and extent of digestion in dairy cows fed mixed diets. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 76, p. 297-319, 1999.

LENG R. A. Factors affecting the utilization of "poor-quality" forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 3, p. 277-303, 1990.

LEWIS, G. E, et al. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 3020-3028, 1996.

LEWIS, G. E. et al. Effect of directfed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 82, p. 611-617, 1999.

LUCAS JR, J. **Considerações sobre o uso do estrume de suínos como substrato para três sistemas de biodigestores anaeróbios**. 1994. 137 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1994.

MAEKAWA, M. et al. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 85, n. 5, p. 1165-1175, 2002.

MARINO, C. T. et al. Effects of adding polyclonal antibody preparations on ruminal fermentation patterns and digestibility of cows fed different energy sources. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, p. 3228-3235, 2011.

MARTINS, A. S. et al. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 2118-2124, 2006.

MARTINS, M. F. **Efeito de diferentes fontes energéticas da dieta sobre a produção de metano ruminal utilizando a técnica de fermentação ruminal *ex situ* (micro-rúmen) em bovinos**. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

MCALLISTER, T. A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxon: Cab International, 2001. p. 273-297.

MCALLISTER, T. A. et al. Effect of exogenous enzymes on digestibility of barley silage and growth performance of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 79, n. 3, p. 353-360, 1999.

MCALLISTER, T. A. et al. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 76, n. 10, p. 231-243, 1996.

MERTENS D. R. **Effects of buffers upon fiber digestion**. Piscataway, NJ, USA: Church and Dwight Co., Inc., 1979.

MERTENS, D. R.; STRAWN, T. L.; CARDOZA, R. Modelling ruminal particle size reduction: its relationship to particle size description. In: KENNEDY, P. M. (Ed.). **Techniques in particle size analysis of feed and digesta in ruminants**. Edmonton, Alberta: Canadian Society of Animal Science Publication 1, 1984. p. 134-141.

MILLER, W. H.; KOES, R. M. Construction and operation of an open-circuit indirect calorimetry system for small ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 66, n. 4, p. 1042-1047, 1988.

MIRANDA, A. P. **Influência da temperatura e do tempo de retenção hidráulica em biodigestores alimentados com dejetos de bovinos e suínos**. 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

MOLLER, H. B. et al. Feces composition and manure derived methane yield from dairy cows: influence of diet with focus on fat supplement and roughage type. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 94, p. 36-43, 2014.

MORAES, L. M. P. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Suma, 2004.

MORGAVI, D. P. et al. Stability and stabilization of potential feed additive enzymes in rumen fluid. **Enzyme and Microbial Technology**, Philadelphia, v. 26, n. 2-4, p. 171-177, 2000.

MORSE, D. et al. Effects of concentration of dietary phosphorus on amount and route of excretion. **Journal Dairy Science**, New York, v. 75, p. 3039-3049, 1992.

MOSS, A. R.; JOUANY, J. P.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, Cambridge, v. 49, n. 1, p. 231-253, 2000.

MURRAY, R. M.; BRYANT, A. M.; LENG, R. A. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 36, p. 1-14, 1976.

MUZAKHAR, K. et al. Purification and properties of α -L-arabinofuranosidase and endo- β -D-1,4-galactanase from *Aspergillus niger* KF-267 which liquefied the Okara.

In: OHMIYA, K. et al. **Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation**. Tokyo: University Publishers Co. Ltda, 1999. p. 133-143.

NARDONE, A. et al. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 130, p. 57-69, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academies Press, 2001. 381 p.

_____. **Requeriments dairy cattle**. 6. ed. Washington, DC: Academic Press, 1989.

NEWBOLD, C. J. et al. Propionate precursors as possible alternative electron acceptors to methane in ruminal fermentation. In: TAKAHASHI, J.; YOUNG, B. A. (Eds.). **Greenhouse gases and animal agriculture**. Amsterdam: Elsevier, 2002. p. 151-154.

NKRUMAH, J. D. et al. Relationships of feedlot efficiency, performance, and feeding behaviour with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 145-153, 2006.

NOGUEIRA FILHO, J. C. M. et al. Níveis de proteína degradável para novilhas em crescimento sobre a concentração de protozoários ciliados e outros parâmetros ruminais. **Acta Scientiarum, Animal Science**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 945-951, 2001.

NOVAK, S. M.; FIORELLI, J. L. Greenhouse gases and ammonia emissions from organic mixed crop-dairy systems: a critical review of mitigation options. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 30, p. 215-223, 2010.

OLIVEIRA, M. V. et al. Influência da monensina sódica no consumo e na digestibilidade de dietas com diferentes teores de proteína para ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 3, p. 643-651, 2007.

ORRICO, A. C. A.; LUCAS JÚNIOR, J.; ORRICO JÚNIOR, M. A. P. Caracterização e biodigestão anaeróbia dos dejetos de caprinos. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 639-647, 2007.

ORRICO JUNIOR, M. A. P.; ORRICO, A. C. A.; LUCAS JUNIOR, J. Influência da relação volumoso: concentrado e do tempo de retenção hidráulica sob a biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 386-394, 2010.

- PARK, A. F. et al. Characterization of ruminal dynamics in Holstein dairy cows during the periparturient period. **Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, p. 571-582, 2011.
- PEDREIRA, M. S. et al. Ruminal methane emission by dairy cattle in southeast **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 6, p. 742-750, 2009.
- PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; MUTSVANGWA, T. An evaluation of the accuracy and precision of a stand-alone submersible continuous ruminal pH measurement system. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 89, p. 2132-2140, 2006.
- PETRI, R. M. et al. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 112, p. 1152-1162, 2012.
- PRIMAVESI, O. et al. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 277-283, 2004.
- PRIMAVESI, O. et al. **Técnica do gás traçador SF₆ para medição campo do metano ruminal em bovinos: adaptações para o Brasil**. São Carlos: Emprapa Pecuária Sudeste, 2004. 77 p. (Documento, 39).
- REYNOLDS, C. K. et al. Visceral tissue mass and rume volume in dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. **Journal of Dairy Science**, New York, p. 961-971, 2004.
- RIMKUS, R. R. et al. Full-scale thermophilic digestion at the West-Southwest Sewage Treatment Works, Chicago, Illinois. **Water Pollution Control Federation**, Alexandria, v. 54, n. 11, p. 1447-1457, 1982.
- RIVERA, A. R. et al. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado com aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 3, p. 617-624, 2010.
- ROJO, R. et al. Influence of cellulase addition to dairy goat diets on digestion and fermentation milk production and fatty acid content. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 153, n. 8, p. 1514-1523, 2015.
- 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 foods**. New York: Marcel Dekker, 1981. p. 123-158.
- RODE, L. M.; YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Fibrolytic enzyme supplemented for dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 82, n. 10, p. 2121-2126, 1999.
- RODRIGUES, P. H. M. et al. Descrição da metodologia *ex situ* de estudo da fermentação ruminal (micro-rúmen) com vistas à mensuração da produção de metano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., 2012, Brasília. **Anais...** Disponível em: <<http://www.sbz.org.br/reuniaoanual/anais/?idiom=pt>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, 2002. 119 p.

RUSSEL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 292, p. 1119-1122, 2001.

SAS. **User's Guide**. Statistics. Version 9.4 ed. Cary. NC: SAS Inst., 2013.

SALEM, A. Z. M. et al. Feed intake, nutrient digestibility, nitrogen utilization, and ruminal fermentation activities in sheep fed Atriplex halimus ensiled with three developed enzyme cocktails. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 60, p. 185-194, 2015.

SALEEM, F. et al. The bovine ruminal fluid metabolome. **Metabolomics**, New York, v. 9, n. 2, p. 360-378, 2013.

SANTOS, T. M. B.; LUCAS JÚNIOR, J. Balanço energético em galpão de frangos de corte. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 25-36, 2004.

SCHELLING, G. T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 58, n. 6, p. 1518-1527, 1984.

SCHINGOETHE, D. J.; STEGEMAN, G. A.; TREACHER, R. J. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 82, p. 996-1003, 1999.

SILVA, F. M. et al. Desempenho de um aquecedor de água a biogás. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 608-614, 2005.

SILVA, F. M. Utilização do biogás como combustível. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 27., 1998, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA/SBEA, 1998. p. 96-125.

SNYDER, C. S.; BRUULSEMA, T. W.; JENSEN, T. L. Melhores práticas de manejo para minimizar emissões de gases de efeito estufa associadas ao uso de fertilizantes. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, p. 13-14, 2008.

SOMMER, S. G.; MOLLER, H. B. Algorithms for calculating methane and nitrous oxide emission from manure management. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 69, n. 2, p. 143-154, 2004.

SOTO-SALANOVA, M. F. et al. Uso de enzimas em dietas de milho e soja para frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVICOLA, 1996, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 1996. p. 71-76.

SOUSSANA, J. F.; TALLEC, T.; BLANFORT, V. Mitigation the greenhouse gas balance of ruminant production systems through carbon sequestration in grasslands. **Animal**, Cambridge, v. 4, p. 334-350, 2010.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, p. 136-150, 2008.

VAHJEN, W.; SIMON, O. Biochemical characteristics of non-starch polysaccharide hydrolyzing enzyme preparations designed as feed additives for poultry and piglet nutrition Arch. **Animal Nutrition**, Beijing, v. 52, p. 1-14, 1999.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal, SP: Funep, 2006. p. 151-182.

VAN HORN, H. H. et al. Components of dairy manure management systems. **Journal Dairy Science**, New York, v. 77, p. 2008-30, 1994.

VAN KESSEL, J. A.; RUSSEL, J. B. The effect of pH on ruminal methanogenesis, **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 20, n. 4, p. 205-210, 1996.

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

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Corvallis, OR, USA: O and B. Books, 1982.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. S. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

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

WALLACE, R. J. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal of Animal Science**, Champaign v. 72, p. 2992-3003, 1994.

WANG, M. et al. Responses of methane production and fermentation pathways to the increased dissolved hydrogen concentration generated by eight substrates in in vitro ruminal cultures. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 194, p. 1-11, 2014.

WANG, L.A.; Goonewardene, Z. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1-11, 2004.

WESTBERG, H. H. et al. **A SF₆ tracer technique**: methane measurement from ruminants. Washington: State University Pullman, 1998.

WUEBBLES, D. J.; HAYHOE, K. Atmospheric methane and global change. **Earth-Science Reviews**, Amsterdam, v. 57, p. 177-210, 2002.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diets. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 83, p. 2512-2520, 2000.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 82, p. 391-403, 1999.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; VEDRES, D. D. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 102, p. 137-150, 2002.

YOKOYAMA, M. T.; JOHNSON, K. A. Microbiology of the rumen and intestine. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The Ruminant animal digestive physiology and nutrition**. 5. ed. New Jersey: Englewood, Cliffs, 1993. p. 125-144.

ZHOU, M. et al. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 111, p. 1148-1158, 2011.