

MARCÍLIO GOMES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DE BACTERIOCINAS E ANTIBIÓTICOS SOBRE A  
FERMENTAÇÃO RUMINAL, DIGESTIBILIDADE DE FIBRA E PRODUÇÃO  
DE METANO *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2016**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

Gomes-Silva, Marcílio, 1985 -  
S586i           Influência de bacteriocinas e antibióticos sobre a fermentação  
2016           ruminal, digestibilidade de fibra e produção de metano *in vitro*/ Marcílio  
Gomes da Silva. – Viçosa, MG, 2016.  
                  x, 59f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Bovino. 2. Rúmen - Fermentação. 3. Rúmen - Microbiologia. 4.  
Antibióticos. 5. Bovino - digestibilidade. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em  
Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 599.64

MARCÍLIO GOMES DA SILVA

**INFLUÊNCIA DE BACTERIOCINAS E ANTIBIÓTICOS SOBRE A  
FERMENTAÇÃO RUMINAL, DIGESTIBILIDADE DE FIBRA E PRODUÇÃO  
DE METANO *in vitro***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de julho de 2016.

---

Dra. Rosinéa Aparecida de Paula

---

Dra. Cláudia Braga Pereira Bento  
(Coorientadora)

---

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani  
(Orientador)

À Deus pela misericórdia infinita em tornar tudo isto possível.

## **OFEREÇO**

À minha mãe Maria Helena que por mim sempre dedicou amor e cumplicidade;  
Ao meu Pai Manoel pelos exemplos, ensinamentos e por nunca ter esquecido de me ensinar a ter perseverança, bom senso e buscar pelo melhor;  
Aos meus irmãos pela vida compartilhada e por me ensinarem a valorizar os bons momentos juntos

## **Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade da realização de mais esta etapa da minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador, Professor Hilário Cuquetto Mantovani pela orientação, paciência e dedicação constante na execução deste projeto. Sua serenidade na resolução dos problemas e o tratamento com as pessoas foi o principal aprendizado. Obrigado por tudo!

À coorientadora Dra. Cláudia Braga Bento pelos ensinamentos e sugestões e à Dra. Rosinéa Aparecida de Paula por ter aceito o convite para participar da banca.

Aos professores do Departamento de Microbiologia.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Microbiologia pela colaboração e agradável convivência em especial a Nilcea, Letícia, Senhor Cezário e Sandra.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de microbiologia de anaeróbios: Ana Júlia, Analice, Bianca, Cláudia, Déborah, Fábria, Isabela, Júlia, keitihelen, Letícia e Letícia Rossi, Raiane, Sofia e Wemerson pela cumplicidade durante estes anos aqui no Prédio Chotaro Chimoia. Em especial gostaria de agradecer às amigas: Juliana e Elsa pelo companheirismo, apoio profissional e pessoal nas horas mais difíceis.

Ao apoio da Embrapa Gado de Leite de Coronel Pacheco-MG fornecendo local para realização do experimento, bem como alojamento e ajuda nos procedimentos. Gostaria de agradecer especialmente a ajuda de Shirley Motta e Ellen Almeida, as quais se empenharam em fazer com que tudo acontecesse da melhor forma possível.

Aos amigos da turma de Ciências Biológicas de 2009, 2010 e amigos de Viçosa pelos inúmeros momentos de descontração que tornaram estes dois anos de mestrado inesquecíveis.

À minha FAMÍLIA que é ainda maior em generosidade, união e cumplicidade, presença constante na minha vida e motivo da minha alegria.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Marcílio Gomes da Silva, filho de Maria Helena Rodrigues de Oliveira Silva e Manoel Gomes da Silva, nasceu em 20 de setembro de 1985, em Tocantins – Minas Gerais.

Iniciou o curso de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Viçosa, em março de 2009, pelo qual graduou-se em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas em agosto de 2014.

Em 2014 ingressou no curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, oferecido pela Universidade Federal de Viçosa – Campus Viçosa.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
<b>RESUMO</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
1.1 Ruminantes e o ecossistema ruminal	3
1.2 Uso de antibióticos na pecuária bovina	5
1.2.1 Monensina Sódica	6
1.2.2 Virginiamicina	8
1.2.3 Resistência bacteriana a antibióticos	9
1.3 Bacteriocinas	10
1.3.1 Nisina e Bovicina HC5	11
1.4 Métodos de estudos <i>in vitro</i> de aditivos utilizados em bovinocultura	12
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO 2 – Influência de bacteriocinas e antibióticos sobre a fermentação ruminal, digestibilidade de fibra e produção de metano <i>in vitro</i></b>	<b>23</b>
2.1 INTRODUÇÃO	23
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	25
2.3 RESULTADOS	30
2.4 DISCUSSÃO	36
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
MATERIAL SUPLEMENTAR	51

## LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 Métodos de estudo da atividade <i>in vitro</i> de diferentes antimicrobianos preconizados para uso na bovinocultura.	15
Tabela 2 Teores de proteína bruta (PB), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente ácido corrigido para cinzas e proteína (FDAcp), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), Cinzas, Lignina, extrato etéreo (EE) e matéria seca (MS), nas dietas A, B e concentrado proteico.	27
Tabela 3 Efeito de bacteriocinas e antibióticos sobre pH ruminal (pH), concentração de amônia (NH <sub>3</sub> ), digestibilidade <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro (DIVFDN), Gases totais (GT), metano com base na matéria seca incubada (CH <sub>4</sub> MSi), metano com base na matéria seca degradada (CH <sub>4</sub> MSd), ácidos orgânicos voláteis totais (AOV), acetato (A), propionato (P), butirato (B) e relação acetato:propionato (A:P) em função dos diferentes tratamentos sobre inóculo de animal alimentado com silagem de milho (Dieta A).	33
Tabela 4 Efeito de bacteriocinas e antibióticos sobre pH ruminal (pH), concentração de amônia (NH <sub>3</sub> ), digestibilidade <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro (DIVFDN), Gases totais (GT), metano com base na matéria seca incubada (CH <sub>4</sub> MSi), metano com base na matéria seca degradada (CH <sub>4</sub> MSd), ácidos orgânicos voláteis totais (AOV), acetato (A), propionato (P), butirato (B) e relação acetato:propionato (A:P) em função dos diferentes tratamentos sobre inóculo de animal alimentado com silagem de milho/sorgo adicionado de concentrado proteico (Dieta B).	35

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 Gráfico biplot resultante da análise de componentes principais (PC) representando a distribuição dos tratamentos com antimicrobianos nas dietas à base de silagem de milho (A) e silagem de milho com adição de concentrado proteico (B) e das variáveis mensuradas da fermentação ruminal e digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVFDN). Cada ponto no gráfico representa a média de 21 observações colhidas no tempo para cada tratamento. Foram avaliadas as seguintes características da fermentação ruminal, além da digestibilidade: pH, gases totais (GT), Amônia (NH <sub>3</sub> ), Digestibilidade in vitro da FDN (DIV), Ácidos orgânicos voláteis totais (AOV), acetato (Ace), propionato (prop), butirato (but), acetato:propionato (a/p), Ch4MSi (Metano com base na MS incubada) e CH4MSd (Metano com base na MS degradada). Os tratamentos correspondem a: Monensina (MonA C = controle; MonA B = 1 mmol L <sup>-1</sup> ; MonA A = 5 mmol L <sup>-1</sup> e o mesmo para MonB C, MonB B e MonB A); virginiamicina (VirA C = controle; VirA B = 5 mmol L <sup>-1</sup> ; VirA A = 10 mmol L <sup>-1</sup> e respectivos valores para VirB C, VirB B e VirB A); bovicina HC5 (BovA C = controle; BovA B = 180 AU mL <sup>-1</sup> ; BovA A = 360 AU mL <sup>-1</sup> e respectivos valores para BovB C, BovB B e BovB A) e nisina (NisA C = controle; NisA B = 180 AU mL <sup>-1</sup> ; NisA A = 360 AU mL <sup>-1</sup> e respectivos valores para NisB C, NisB B e NisB A). Exemplo: MonA C = Monensina na dieta A (C=controle); MonA A = Monensina dieta A (A=dose alta); MonA B = Monensina dieta A (B=dose baixa).	37

## RESUMO

GOMES-SILVA, Marcílio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Influência de bacteriocinas e antibióticos sobre a fermentação ruminal, digestibilidade de fibra e produção de metano *in vitro***. Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Coorientadora: Cláudia Braga Pereira Bento.

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito de diferentes doses de bacteriocinas e antibióticos sobre a fermentação ruminal, digestibilidade de fibra e produção de metano *in vitro* utilizando líquido ruminal de vacas leiteiras alimentadas com dieta à base de silagem de milho (SM) ou silagem de milho/sorgo adicionado com 6 Kg de concentrado proteico (SMC). Amostras foram coletadas em diferentes tempos de incubação e foram realizadas análises da concentração de amônia e ácidos orgânicos voláteis, produção de metano e gases totais, digestibilidade *in vitro* (DIVFDN) e do pH ruminal. Três doses de cada antimicrobiano foram avaliadas: Bovicina HC5 e nisina (Doses A = 360 AU mL<sup>-1</sup>; B = 180 AU mL<sup>-1</sup>; C = controle); Monensina (Doses A = 5 mmol L<sup>-1</sup>; B = 1 mmol L<sup>-1</sup>; C = controle); Virginiamicina (Doses A = 10 mmol L<sup>-1</sup>; B = 5 mmol L<sup>-1</sup>; C = controle). Na dieta à base de silagem de milho, houve efeito significativo da interação (P<0,05) entre dose e inibidor para todas as variáveis testadas, exceto para ácidos orgânicos voláteis. A dose A de bovicina HC5 reduziu (P<0,05) a digestibilidade. Quando se adicionou monensina ao meio, houve redução (P<0,05) na digestibilidade, em relação ao controle. As concentrações de amônia não foram influenciadas (P>0,05) pelas doses de bovicina HC5 e virginiamicina. No entanto, a adição de nisina aumentou as concentrações de amônia (P<0,05), enquanto a monensina reduziu essas concentrações (P<0,05). As concentrações de metano com base na matéria seca degradada (CH<sub>4</sub>MSd) foram (30%) menores quando se adicionou (Dose A) bovicina HC5 (P<0,05). Além disso, a média da dose A de bovicina HC5, foi equivalente à média da dose A de virginiamicina, a qual reduziu CH<sub>4</sub>MSd em 20%. A monensina, não influenciou as concentrações de metano (P>0,05). A adição de bovicina HC5 reduziu (P<0,05) as concentrações de metano com base na matéria seca incubada (CH<sub>4</sub>MSi) em até 24%. No entanto, a média das doses de nisina e monensina não apresentaram diferença significativa (P>0,05) em relação ao controle para essa variável (CH<sub>4</sub>MSi). O pH final do líquido ruminal da vaca alimentada à base de silagem de milho/sorgo adicionado de 6 Kg de concentrado proteico (SMC), foi menor que 6,0. Houve efeito significativo da interação (P<0,05) entre dose e inibidor para todas as variáveis, exceto para pH, metano (CH<sub>4</sub>MSd) e digestibilidade na dieta SMC. As maiores concentrações de amônia na dieta SMC foram observadas quando se adicionou bovicina HC5. Contudo, não houve (P>0,05) diferença de efeito das doses (A e B) de nisina, monensina e virginiamicina na concentração de amônia em relação aos respectivos controles. Independente da dose do inibidor, as maiores concentrações de metano (CH<sub>4</sub>MSd) na dieta SMC foram observadas quando se adicionou monensina. Além disso, independente do inibidor adicionado, o uso de doses altas reduziu as concentrações de metano (CH<sub>4</sub>MSd). Os resultados indicaram que as bacteriocinas testadas apresentaram alguns efeitos positivos sobre a fermentação ruminal, digestibilidade de fibra e produção de metano *in vitro* na dieta SM. Bovicina HC5 apresentou efeitos similares a virginiamicina na dieta SM, reduzindo a relação acetato:propionato e concentração de CH<sub>4</sub>MSd. A adição de concentrado à dieta diminuiu o pH ruminal e reduziu a influência das bacteriocinas e antibióticos na fermentação *in vitro*.

## ABSTRACT

GOMES-SILVA, Marcílio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Influence of bacteriocins and antibiotics on ruminal fermentation, fiber digestibility and methane production *in vitro***. Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-Adviser: Cláudia Braga Pereira Bento.

The aim of this study was to investigate the effect of different doses of bacteriocins and antibiotics on ruminal fermentation, fiber digestibility and methane production *in vitro* using rumen fluid of dairy cows fed diets based on corn silage (CS) or silage corn/sorghum added with 6 kg of protein concentrate (CSC). Samples were collected at different incubation times and were carried out analysis of the concentration of ammonia and organic acids, methane production and total gases, *in vitro* digestibility (IVNDF) and ruminal pH. Three doses of each antimicrobial were evaluated: bovicin HC5 and nisin (Doses = 360 AU ml<sup>-1</sup>; B = 180 AU ml<sup>-1</sup>, C = control); Monensin (Doses = 5 mmol l<sup>-1</sup>; B = 1 mmol l<sup>-1</sup>, C = control); Virginiamycin (Doses A = 10 mmol l<sup>-1</sup>, B = 5 mmol l<sup>-1</sup>, C = control). In the diet based on corn silage, there was significant interaction (P <0.05) between dose and inhibitor for all variables tested, except for organic acids. The dose A of bovicin HC5 reduced (P<0.05) digestibility, similar to the doses (A and B) of monensin and virginiamycin. When monensin was added to the medium digestibility decreased (P<0.05) compared to the control. Ammonia concentrations were not affected (P>0.05) by doses of bovicin HC5 and virginiamycin. However, the addition of nisin increased concentrations (P<0.05), while monensin reduced ammonia during *in vitro* incubation (P<0.05). The methane concentration based on degraded dry matter (CH<sub>4</sub>MSd) were 30% lower when bovicin HC5 (Dose A) was added (P<0.05). Furthermore, the average dose of bovicin HC5 was equivalent to the mean dose of the virginiamycin, which reduced CH<sub>4</sub>MSd by 20%. The monensin did not affect methane concentrations (P>0.05). The addition of bovicin HC5 reduced (P<0.05) methane concentrations based on dry matter incubated (CH<sub>4</sub>MSi) up to 24%. However, the average doses of nisin and monensin showed no significant difference (P>0.05) in this variable compared to the control (CH<sub>4</sub>MSi). The final pH of the rumen fluid from cows fed silage based corn/sorghum added 6 kg of protein concentrate (SMC) was less than 6.0. There was a significant interaction (P<0.05) between dose and inhibitor for all variables, except for pH, methane (CH<sub>4</sub>MSd) and digestibility in the diet SMC. The highest ammonia concentrations in the diet SMC were observed when bovicin HC5 was added. However, no dose (A and B) of nisin, virginiamycin and monensin affected ammonia concentrations (P>0.05) compared to their respective controls. Regardless of the inhibitor dose, higher concentrations of methane (CH<sub>4</sub>MSd) in SMC diet were observed when monensin was added. Furthermore, independent of the inhibitor added, higher doses always decreased the concentrations of methane (CH<sub>4</sub>MSd). However, only nisin (Doses A and B) decreased the acetate:propionate ratio (P<0.05) in diet SMC, and no significant differences (P>0.05) were observed between doses of other antimicrobials and control and, among the tested inhibitors. Nevertheless, the relative values (A:P) were higher when monensin was added. These results indicated that the tested bacteriocins showed some positive effects on ruminal fermentation,

fiber digestibility and methane production *in vitro* in CS diet. Bovicin HC5 showed similar effects to virginiamycin in the CS diet, reducing the acetate:propionate ratio and concentration of CH<sub>4</sub>MSd. The addition of concentrate to the diet decreased ruminal pH and reduced influence of bacteriocins and antibiotics on the *in vitro* fermentation.

## INTRODUÇÃO GERAL

Os bovinos são animais herbívoros que possuem o estômago multicavitário, dividido em rúmen, retículo, omaso e abomaso. A relação simbiótica com microrganismos no rúmen fornece nutrientes derivados da fermentação de material lignocelulósico. As bactérias, por estarem em maior abundância na comunidade microbiana, exercem papel fundamental na fermentação. Os produtos da fermentação ruminal, como os ácidos orgânicos voláteis (AOV) e a proteína microbiana, são as principais fontes de energia e nutrientes para os ruminantes. Entretanto, o calor, o metano e a amônia, representam perdas de energia e proteína do alimento para o ambiente. Estratégias para maximizar a utilização do alimento e diminuir a perda de produtos finais da fermentação, tem sido alvo de diversos estudos. Pecuaristas e nutricionistas frequentemente manipulam a fermentação ruminal com o uso de aditivos com o objetivo de melhorar a conversão alimentar e a saúde dos animais ruminantes, aumentando o ganho de peso e o desempenho dos animais.

Nesse sentido, antibióticos como a monensina, virginiamicina, tetraciclina, lasalocida e salinomina, são muito utilizados comercialmente. No entanto, o uso de antibióticos como promotores de crescimento foi proibido em países da União Europeia em função do risco de seleção de bactérias resistentes a antibióticos e provável transmissão desses microrganismos para os consumidores. Assim, agentes antimicrobianos que não selecionem microrganismos resistentes ou que não sejam usados na prática clínica, tem sido alvo de estudos que visam encontrar alternativas aos antibióticos utilizados na produção animal. Com base nisso, substâncias como ácidos orgânicos, óleos essenciais, bacteriocinas, além de microrganismos (leveduras) e vírus, tem sido pesquisados como possíveis alternativas ao uso de antibióticos.

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos ribossomalmente que podem interromper o crescimento bacteriano inibindo a síntese de parede celular e formando poros na membrana plasmática. A nisina, uma bacteriocina produzida por linhagens de *Lactococcus lactis*, atua inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas e possui baixa toxicidade. Porém, estudos sobre o efeito de nisina na fermentação ruminal mostraram que bactérias do rúmen podem degradar este peptídeo. No entanto, bovicina HC5, uma bacteriocina produzida por *Streptococcus*

*equinus (bovis)* HC5 isolado do rúmen bovino, também foi sugerida como uma alternativa promissora para antibióticos utilizados como agentes promotores de crescimento. As pesquisas realizadas até agora não evidenciaram resistência à bovicina em bactérias ruminais sensíveis ao antimicrobiano. A bovicina HC5 apresenta ação contra bactérias Gram-positivas e espécies relacionadas, além de diminuir as concentrações de amônia e metano produzidos pela microbiota ruminal.

Pesquisas com foco no estudo dos efeitos e no mecanismo de ação de substâncias antimicrobianas utilizam incubações *in vitro* para avaliar a efetividade desses agentes. As técnicas *in vitro* possuem vantagens em relação aos estudos *in vivo*, tais como possibilidade de maior amostragem, menor custo, resultados rápidos, menor quantidade de alimento necessário para estudo, possibilidade de avaliação de vários aditivos ao mesmo tempo, além de permitir avaliar parâmetros da fermentação ruminal. Tipicamente, estudos para avaliar o efeito de antimicrobianos *in vitro* utilizam substratos solúveis adicionados ao líquido ruminal, favorecendo o crescimento de espécies microbianas sensíveis aos efeitos do antimicrobiano. Poucos trabalhos têm avaliado os efeitos de antimicrobianos *in vitro* utilizando condições próximas àsquelas encontradas *in vivo*. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar e comparar os efeitos de diferentes agentes antimicrobianos sobre a fermentação ruminal, utilizando condições de incubação mais próximas do sistema *in vivo*.

# CAPÍTULO 1

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Ruminantes bovinos e o ecossistema ruminal

Os bovinos são animais mamíferos que se alimentam principalmente de material vegetal (FERREIRA et al., 2016). No entanto, não possuem um sistema enzimático próprio capaz de degradar a fibra existente nesse alimento (KRAUSE et al., 2003). A digestão da fibra acontece pela ação de microrganismos anaeróbios que colonizam o rúmen (WEIMER; KOHN, 2016), um compartimento que apresenta condições estáveis de anaerobiose, pH variando de 5,5 a 6,9 – temperatura entre 38 °C e 40 °C e baixo potencial redox (-350 mV), além de alta capacidade tamponante e pressão osmótica (PUNIYA; SINGH; KAMRA, 2015).

Além do mais, o ecossistema ruminal é estável e dinâmico (KAMRA, 2005). A estabilidade é conferida pela microbiota ruminal que beneficia o hospedeiro provendo uma barreira que protege o animal contra microrganismos patogênicos e compostos tóxicos que entram no ecossistema por meio da dieta. Além disso, o rúmen é dinâmico porque mudanças na dieta ofertada ao animal podem causar mudanças nas populações microbianas e nas condições do ambiente ruminal que selecionam grupos de microrganismos mais adaptados às condições do ecossistema ruminal (KAMRA, 2005). Este ambiente apresenta alta capacidade de recuperar suas características iniciais (composição da microbiota e perfil metabólico) após sofrer algum tipo de perturbação causada por antimicrobianos, compostos fenólicos presentes na alimentação, mudanças na temperatura, pH, composição da dieta ou agentes microbianos externos (WEIMER, 2015).

O rúmen é considerado uma câmara de fermentação biológica funcionando como um sistema de cultura contínuo que possui condições físicas e químicas que sustentam o crescimento e atividade microbiana (BROUDISCOU; OFFNER; SAUVANT, 2014). A fermentação é catalisada por uma comunidade densa e diversa de microrganismos anaeróbicos, incluindo bactérias, archaeas, fungos e protozoários (CHAUCHEYRAS-DURAND; OSSA, 2014). Os microrganismos hidrolisam os componentes da dieta dando origem a vários produtos como ácidos orgânicos e

proteína microbiana, os quais podem ser utilizados pelo hospedeiro para gerar energia (PUNIYA; SINGH; KAMRA, 2015). No entanto, grupos específicos de microrganismo atuam produzindo amônia, hidrogênio, metano e calor para o ambiente. Quando esses grupos são inibidos, mais energia é disponibilizada para o hospedeiro, melhorando o desempenho animal (WEIMER; KOHN, 2016).

Dentre os microrganismos do rúmen, as bactérias representam o grupo microbiano mais abundante e desempenham papel dominante na fermentação ruminal, atuando de forma coordenada na degradação da fibra gerando, principalmente, ácidos orgânicos voláteis e proteína microbiana (HENDERSON et al., 2015). Os principais grupos bacterianos são representados por espécies que degradam carboidratos (celulose, hemicelulose e amido), além de espécies envolvidas na utilização de lipídeos, proteína, ureia e, na proteção contra fatores anti-nutricionais como taninos e saponinas (PUNIYA; SINGH; KAMRA, 2015).

A comunidade bacteriana é altamente diversa e sua composição pode ser alterada pela composição química da dieta e frequência de alimentação (HAN et al., 2015). Pecuaristas modificam a dieta com objetivo de melhorar a conversão alimentar e alcançar maior ganho de peso por quantidade de alimento ingerido (TAJIMA et al., 2001; WANG et al., 2012). Deste modo, mudanças significativas na abundância relativa da microbiota do rúmen, impostas pela dieta, podem levar a mudanças no padrão fermentativo e essas alterações podem ter influência no metabolismo animal (JAMI; WHITE; MIZRAHI, 2014).

A alteração no padrão fermentativo ruminal ocasionado pela mudança na dieta, tem como um dos objetivos aumentar a produção de ácidos orgânicos voláteis, uma vez que representam a principal fonte de energia para os ruminantes (SAHOO; JENA, 2014). O tipo e a proporção de ácidos orgânicos formados no rúmen vão depender do tipo de substrato fermentado, da população microbiana e do ambiente ruminal (SILVEIRA et al., 2016). Os principais ácidos orgânicos são acetato, butirato e propionato. O propionato é o substrato para a gliconeogênese, enquanto o acetato e o butirato são fontes para síntese de ácidos graxos (PISARČÍKOVÁ et al., 2016).

Além dos ácidos orgânicos, o entendimento do metabolismo de proteínas é muito importante para o controle das perdas energéticas durante o processo fermentativo (GULIŃSKI; SALAMOŃCZYK; MŁYNEK, 2016). O processo de

degradação proteica é complexo e tem a participação de várias espécies de microrganismos ruminais (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005). Além disso, o metabolismo de proteínas no rúmen depende de muitos fatores, incluindo solubilidade da proteína, resistência à degradação e taxa de passagem do alimento pelo rúmen (GENZEBU; TESHAY, 2015). A proteína que é ofertada ao animal é convertida pelos microrganismos em amônia e aminoácidos (GENZEBU; TESHAY, 2015).

A amônia é gerada pelo processo de desaminação oxidativa de aminoácidos no rúmen (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005). A amônia também é utilizada por microrganismos no rúmen, os quais a convertem em aminoácidos que podem ser convertidos em proteína microbiana (GULÍŃSKI; SALAMOŃCZYK; MŁYNEK, 2016). No entanto, quando a taxa de produção de amônia é maior que a taxa de utilização por microrganismos do rúmen, ocorre a perda de nitrogênio amoniacal na forma de ureia que é metabolizada e excretada pelo animal (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005).

Além disso, produtos finais da fermentação ruminal, como o metano, podem representar perda de energia de até 15% do alimento ingerido para o ambiente (MIHAELA et al., 2014). O metano entérico é o resultado do metabolismo de arqueas que utilizam o hidrogênio produzido por microrganismos ruminais para reduzir o dióxido de carbono em metano (JEYANATHAN et al., 2015). Antibióticos como a monensina apresentam ação inibitória sobre microrganismos produtores de hidrogênio no rúmen contribuindo para a redução da produção de metano por arqueas. A monensina também inibe bactérias hiperprodutoras de amônia, diminuindo a concentração de amônia no rúmen (ABRAR et al., 2015; YANG; RUSSELL, 1993).

## **1.2 Uso de antibióticos na pecuária bovina**

Os efeitos de antibióticos como a monensina sobre a fermentação ruminal, são pesquisados há décadas (ABRAR et al., 2015; CALLAWAY et al., 2003). Os antibióticos têm sido utilizados como agentes promotores de crescimento em animais de produção por apresentar efeitos positivos sobre a fermentação ruminal, diminuindo as concentrações de amônia, metano e aumentando as concentrações de propionato (CALLAWAY et al., 2003; DRONG et al., 2015). Esses compostos têm

sido extensivamente utilizados na pecuária e a maioria inibe principalmente bactérias Gram-positivas, responsáveis por gerar produtos considerados deletérios para o animal, como lactato, amônia e metano (AZZAZ; MURAD; MORSY, 2015). Os efeitos benéficos dos antibióticos estão relacionados à ação indireta dos antimicrobianos, melhorando as condições de higiene do animal ou influenciando a digestão dos alimentos (BUTAYE; DEVRIESE; HAESBROUCK, 2003). Além de inibir patógenos responsáveis por quadros clínicos que diminuem o desempenho do bovino, os antibióticos alteram os produtos de fermentação de grupos microbianos específicos do rúmen, forçando o microrganismo a gastar energia na tentativa de se recuperar do dano causado pela presença do antibiótico na célula (AZZAZ; MURAD; MORSY, 2015).

### **1.2.1 Monensina Sódica**

A monensina, um antibiótico ionóforo produzido por *Streptomyces cinnamonensis* (ŁOWICKI; HUCZYŃSKI, 2013), atua modificando o fluxo de prótons  $K^+$  e  $H^+$ , causando desequilíbrio osmótico desses íons pela entrada facilitada através da membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas. Na tentativa de restabelecer o equilíbrio iônico, o microrganismo geralmente realiza gasto energético excessivo que resulta em perda da viabilidade celular (AZZAZ; MURAD; MORSY, 2015).

Este antibiótico foi primeiramente utilizado como agente coccidiostático em aves nos Estados Unidos e posteriormente passou a ser utilizado como agente promotor de crescimento em ruminantes na bovinocultura norte americana (ŁOWICKI; HUCZYŃSKI, 2013). No entanto, monogástricos (cavalos) que foram tratados com monensina apresentaram complicações clínicas que resultaram em morte (BAUTISTA et al., 2014). Na pecuária brasileira monensina sódica e lasalocida são os ionóforos permitidos para serem utilizados como aditivos alimentares em produção animal (DEMARCO et al., 2014). No Brasil, o uso destes produtos é autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SALMAN; PAZIANI; SOARES, 2006).

A monensina é um dos antibióticos mais utilizados, pois seus efeitos estão relacionados ao aumento da eficiência alimentar com aumento no ganho de peso animal (SALMAN; PAZIANI; SOARES, 2006). No entanto, estudo recente reportou

o efeito positivo sobre a fermentação ruminal, sem alteração significativa em relação ao ganho de peso do bovino (FERREIRA CARVALHO et al., 2016). A monensina também é utilizada em bovinos que estão em processo de transição entre dietas ricas em forragens para dietas de alto concentrado (FERREIRA CARVALHO et al., 2016), pois inibe bactérias produtoras de ácido láctico resultando em aumento no pH ruminal, evitando assim a ocorrência de acidose ruminal, a qual geralmente ocorre nesse processo (AGUIAR et al., 2015; CLAYTON et al., 1999).

Os efeitos de monensina em reduzir as concentrações de metano entérico são bem consistentes entre os estudos já realizados (ABRAR et al., 2015; CALLAWAY; CARNEIRO DE MELO; RUSSELL, 1997; SILVEIRA et al., 2016). Entretanto, existe uma inconsistência em relação aos efeitos de monensina *in vivo* em alguns produtos finais da fermentação ruminal, como os efeitos nas concentrações de propionato (ABRAR et al., 2015).

Além disso, a monensina apresentou efeitos diferentes em estudos *in vitro* (LANA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006; YANG; RUSSELL, 1993). A monensina teve efeito inibitório sobre bactérias desaminadoras de aminoácidos centrifugadas do líquido ruminal de vacas holandesas alimentadas com grãos de soja e tratadas com 0 ou 350 mg/d de monensina. A aplicação de monensina reduziu as concentrações de amônia *in vitro* (YANG; RUSSELL, 1993). Lana e colaboradores (2002) avaliaram os efeitos de monensina em populações bacterianas proteolíticas. A ação de monensina sobre os microrganismos, neste estudo, reduziu a produção de amônia e a quantidade de proteína microbiana (LANA et al., 2002). Contudo, resultado diferente foi encontrado quando novilhos holandeses foram alimentados com dietas de alto e de baixo valor proteico em estudo *in vivo*, onde concentrações de amônia ruminal não sofreram alteração com adição de 28 mg de monensina/kg de matéria seca consumida (DE OLIVEIRA et al., 2005).

Além de amônia, os ácidos orgânicos voláteis foram influenciados negativamente pela monensina (30 ppm) quando novilhos holandeses foram alimentados com dietas de alto teor proteico. O ionóforo diminuiu as concentrações *in vivo* de acetato e butirato. Além disso, aumentou as concentrações de propionato resultando em baixa relação acetato:propionato (SILVEIRA et al., 2016). No entanto, em estudos em que o líquido ruminal foi diluído ou adicionado de substratos

solúveis, os efeitos do ionóforo em ácidos orgânicos voláteis foram diferentes (GARCIA, 2013).

### 1.2.2 Virginiamicina

Além de ionóforos utilizados em bovinocultura há também uma série de outros antibióticos não ionóforos utilizados na produção animal, tais como penicilina, lincomicina, neomicina, tilosina, bacitracina e virginiamicina, sendo que a maioria atua aumentando a taxa de conversão alimentar e ganho de peso (ALLEN; STANTON, 2014).

A virginiamicina - um antibiótico não ionóforo produzido por *Streptomyces virginiae* - foi descoberta na Bélgica em 1956. O composto é uma combinação de dois fatores (peptolídeos) M e S, os quais são componentes químicos que, quando combinados na proporção de 4:1 (M:S), agem sinergicamente ligando-se irreversivelmente às unidades 50S dos ribossomos, inibindo a síntese proteica de microrganismos sensíveis (COCITO, 1979). A virginiamicina atua principalmente sobre as bactérias Gram-positivas, aeróbias e anaeróbias (COE et al., 1999). Este antibiótico tem seu uso aceito como seguro e eficaz em nutrição animal em países como Estados Unidos, Brasil, Austrália e Japão (NUNEZ, 2008). Os estudos mostram que este composto adicionado aos suplementos controla o metabolismo aumentando a eficiência de utilização dos alimentos (PAGE, 2003).

A virginiamicina, assim como a monensina, atua inibindo microrganismos produtores de ácido láctico no rúmen e reduz a produção de metano entérico (CLAYTON et al., 1999; COE et al., 1999). Além disso, o antimicrobiano apresentou efeito aditivo junto a microrganismos utilizadores de lactato no rúmen como *Megasphaera elsdenii* (LEEuw et al., 2016). É um antibiótico que demonstra grande eficácia, principalmente, na adaptação de bovinos às dietas com alta proporção de concentrado, pois inibe a proliferação de bactérias produtoras de ácido láctico como *S. bovis* e *Lactobacillus ruminis*, evitando aumento da produção desse ácido e consequente aumento da acidez no rúmen (CLAYTON et al., 1999).

Guo et al. (2010) demonstraram que o antibiótico diminuiu as contagens de bactérias proteolíticas, amilolíticas, *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* spp. quando novilhos Luxi chineses foram tratados com dieta a base de forragem e concentrado (35:65) adicionada de 30 mg/kg concentrado de virginiamicina. Coe et al. (1999)

verificaram que virginiamicina afetou principalmente as populações de *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* spp. quando novilhos de raça holandesa sofreram uma mudança de dieta de volumoso para alto concentrado. Em outro experimento, onde avaliou-se acidose ruminal induzida nos animais, virginiamicina manteve baixas as concentrações de ácido láctico evitando a queda no pH ruminal (LEEuw et al., 2016; NAGARAJA; TAYLOR, 1987).

No entanto, o uso de virginiamicina (1,3g de virginiamicina/animal/dia) aplicada diretamente no rúmen (*in situ*) não alterou o pH ruminal e as concentrações de amônia em animais alimentados com dieta de silagem de milho adicionado de concentrado (30:70) (ORTOLAN, 2010). Entretanto, em experimento *in vitro*, o antibiótico manteve alto o pH ruminal e o acúmulo de ácido láctico foi menor, como observado em estudos anteriores onde o líquido ruminal foi originado de uma dieta de alto volumoso e acrescido de glicose, o que pode ter modificado o resultado da ação do aditivo (CLAYTON et al., 1999).

A virginiamicina é um aditivo que conduz a redução de impactos ambientais diminuindo a produção de metano (CLAYTON et al., 1996; MONTANO et al., 2014) e estudos anteriores sugerem que o antibiótico atuaria inibindo o crescimento de bactérias produtoras de hidrogênio do rúmen (*Lachnospira multiparis*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*), tendo como consequência indireta a redução na produção de metano entérico (COE et al., 1999; JOSÉ et al., 2013; NAGARAJA; TAYLOR, 1987).

### **1.2.3 Resistência bacteriana a antibióticos**

Apesar dos benefícios proporcionados com a aplicação de antibióticos na bovinocultura, o uso indiscriminado e imprudente destes pode implicar na seleção de estirpes resistentes que poderiam ser transmitidas para seres humanos por meio da ingestão de alimentos contaminados, do contato com fertilizantes de origem destes animais e contato direto com o gado (CHANG et al., 2015; RUSSELL; HOULIHAN, 2003). Com base nisso, foram proibidos na Europa o uso de Penicilina, Tetraciclina, Cloritetraciclina, Oxitetraciclina, Estreptomicina, Neomicina, Higromicina e Bacitracina de Magnésio. Além disso, antibióticos utilizados como promotores de crescimento (Bacitracina de Zinco, Espiramicina, Virginiamicina e a Tilosina) também foram banidos (EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL, 2003).

Apesar de todos os antimicrobianos estarem proibidos para uso como aditivo alimentar na Europa (ALLEN; STANTON, 2014), em países como Estados Unidos, a FDA (Food and Drug Administration), por meio de um estudo de avaliação da segurança ao consumidor, concluiu que virginamicina é segura para ser utilizada em bovinocultura (FDA, 2004). Outros países como Austrália e Japão permitem o uso deste produto em produção animal (NUNEZ, 2008).

Apesar do uso de alguns antibióticos ser liberado em alguns países, ainda é crescente a percepção negativa sobre o uso contínuo de antibióticos em práticas clínicas e na produção animal (LAMMIE; HUGHES, 2016). Conseqüentemente é crescente o esforço para encontrar alternativas ao uso de antibióticos, tanto na produção animal quanto na medicina humana (GARCIA-MIGURA et al., 2014). Contudo, a globalização tornou possível e exige altos índices de produtividade para poder suprir o consumo mundial (LAMMIE; HUGHES, 2016).

Por isso, a busca por alternativas ao uso de antibióticos é uma tendência e estudos com probióticos, ácidos orgânicos e bacteriocinas apresentaram resultados promissores (CALLAWAY et al., 2008; MANTOVANI et al., 2002). A substituição total dos antibióticos como promotores de crescimento seria viável, junto a melhorias no manejo e práticas de vacinação, uma vez que o uso integrado destas atividades continuaria a oferecer vantagens adicionais importantes, tanto ambientais como de saúde e produção animal (PAGE, 2003). A aplicação de antibióticos promotores de crescimento de forma inteligente e integrada a alternativas como ácidos orgânicos e bacteriocinas, por exemplo, aumentaria a eficiência da utilização de nutrientes diminuindo as exigências nutricionais (PAGE, 2003). Dentre as alternativas ao uso de antibióticos em manipulação da fermentação ruminal, bacteriocinas reportaram efeitos semelhantes a ionóforos utilizados como promotores de crescimento em bovinocultura (CALLAWAY; MELO; RUSSELL, 1997; LEE et al., 2002; LIMA et al., 2009).

### **1.3 Bacteriocinas**

Em 1999, Teather e colaboradores destacaram a possibilidade da aplicação de bacteriocinas na manipulação da fermentação ruminal. Bacteriocinas são peptídeos sintetizados ribossomalmente e com ação antimicrobiana principalmente contra organismos filogeneticamente relacionados (NES; YOON; DIEP, 2007). Esses

peptídeos podem ou não sofrer modificação pós-tradução por enzimas específicas e podem ser produzidas por microrganismos do domínio Bacteria e Archaea (NES; YOON; DIEP, 2007). No rúmen, várias espécies de bactérias produzem bacteriocinas, como *S. equinus* HC5, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus*, *Enterococcus faecium*, entre outras (HAN et al., 2015; MANTOVANI et al., 2002; RUSSELL; RYCHLIK, 2001). No entanto, o grande interesse no estudo destes peptídeos se deve ao fato de algumas bacteriocinas apresentarem atividade antimicrobiana em concentrações nanomolares, apresentando eficácia no combate a patógenos e por não apresentarem riscos de segurança alimentar (COTTER; ROSS; HILL, 2013).

### 1.3.1 Nisina e Bovicina HC5

A Nisina, uma bacteriocina do grupo A dos lantibióticos produzida por *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, possui status GRAS (Generally Recognized As Safe) sendo amplamente utilizada na indústria alimentícia como conservante natural (ZACHAROF; LOVITT, 2012). A nisina, assim como bovicina HC5, uma bacteriocina produzida por *S. equinus* HC5, liga-se ao precursor da síntese de peptídeo glicano (lipídeo II) inibindo a formação da parede celular. Além disso, esses peptídeos utilizam o lipídeo II como sítio de ligação para a formação de poros na membrana citoplasmática, com consequente extravasamento do conteúdo celular (BREUKINK; DE KRUIJFF, 1999; MANTOVANI; CRUZ; PAIVA, 2011; PAIVA et al., 2012).

A nisina é a bacteriocina mais estudada e caracterizada (ZACHAROF; LOVITT, 2012) e estudos *in vitro* com líquido ruminal demonstraram efeitos significativos do peptídeo em diminuir as concentrações de amônia, metano, ácidos orgânicos voláteis e hidrogênio. Além disso, a nisina influenciou negativamente a relação acetato: propionato e inibiu a fermentação de celulose, amido e de aminoácidos (CALLAWAY; CARNEIRO DE MELO; RUSSELL, 1997; OEZTUERK et al., 2010). A nisina foi efetiva na retenção de nitrogênio em ruminantes ao reduzir as concentrações de amônia *in vitro* quando ovelhas foram alimentadas com feno de alfafa. Entre 8 e 12 horas de incubação, a bacteriocina aumentou o pH, diminuiu concentrações de ácidos orgânicos voláteis totais e diminuiu concentrações de propionato e butirato (OEZTUERK et al., 2010). Apesar

do impacto positivo nos produtos finais da fermentação ruminal, algumas espécies de bactérias ruminais apresentaram resistência à nisina em doses baixas do antimicrobiano, o que torna inviável sua aplicação na manipulação da fermentação ruminal (RUSSELL, 2001).

A Bovina HC5, uma bacteriocina produzida por *Streptococcus (bovis) equinus* HC5, representa uma alternativa a nisina, uma vez que estudos posteriores demonstraram que as bactérias ruminais não se adaptaram ao antimicrobiano (LIMA et al., 2009; MANTOVANI et al., 2002; MANTOVANI; RUSSELL, 2008). A adição de células de *S. equinus* HC5 em culturas mistas de microrganismos ruminais separados por centrifugação e resuspendidos em meio basal, diminuiu a atividade específica de produção de amônia em 40%. A bovicina HC5 purificada também diminuiu a taxa de produção de amônia por microrganismos do rúmen (LIMA et al., 2009). O peptídeo também reduziu a produção *in vitro* de metano, quando adicionado ao líquido ruminal obtido de vacas alimentadas com mais de 50% de volumoso (LEE et al., 2002). As análises dos resultados mostraram que os microrganismos não se adaptaram ou não se tornaram resistentes ao antimicrobiano. Além disso, a análise do padrão de restrição do rRNA 16S de Archeae não foi diferente entre as culturas com e sem bovicina HC5 indicando que a bacteriocina não influenciou a população de archaeas metanogênicas (LEE et al., 2002). Os estudos comparativos entre os efeitos de bovicina HC5 e monensina reportaram efeito semelhante da bacteriocina e do ionóforo na fermentação ruminal (LEE et al., 2002; LIMA et al., 2009).

#### **1.4 Métodos de estudos *in vitro* de aditivos utilizados em bovinocultura**

As bacteriocinas têm apresentado efeitos semelhantes a antibióticos utilizados como promotores de crescimento em produção animal e, portanto, são consideradas como possíveis alternativas aos antibióticos utilizados na bovinocultura (LEE et al., 2002; LIMA et al., 2009). É grande o interesse por substâncias que possam ser utilizadas no combate a zoonoses e promover o maior desempenho do rebanho sem o risco de seleção de espécies bacterianas resistentes (GARCIA-MIGURA et al., 2014).

Por décadas os estudos *in vitro* são utilizados para prever os efeitos de agentes antimicrobianos no ecossistema ruminal (CALLAWAY; CARNEIRO DE

MELO; RUSSELL, 1997; MOHAMED; CHAUDHRY, 2008). O procedimento *in vitro* simula a digestão ruminal usando inóculo ruminal de animais alimentados em uma determinada dieta, a qual é colocada dentro de sacos porosos que permitem o acesso de microrganismos durante o processo de incubação (MOHAMED; CHAUDHRY, 2008). No entanto, ao longo dos anos esse procedimento foi realizado com alterações na manipulação do líquido ruminal (LR) (Tabela 1). Alguns autores separaram as células do líquido ruminal para avaliar os efeitos de antimicrobianos em populações mistas de microrganismos do rúmen (LANA et al., 2002; LEE et al., 2002; PECKA-KIEB et al., 2015). Muitos estudiosos optaram por adicionar substâncias que promovem a seleção de microrganismos desejáveis no líquido ruminal (substratos seletivos) como a tripticase, por exemplo, ao inóculo ou fazer a diluição do LR com meio de cultura sintético (Tabela 1). Além disso, muitos autores adicionaram solução tampão ao líquido ruminal para tentar simular as condições de tamponamento conferidas pela saliva do animal (JAYANEGARA et al., 2015; WALLACE; CHENG; CZERKAWSKI, 1980) (Tabela 1). No entanto, alguns estudos mostram a influência da forma como o líquido ruminal é manipulado antes de ser incubado, e de sua origem (tipo de animal, ou ração ministrada), sobre a degradação proteica, número de microrganismos no líquido ruminal e fatores que podem modificar o padrão fermentativo ruminal como pH, pressão de H<sub>2</sub> e potencial redox do ambiente *in vitro* (BROUDISCOU; OFFNER; SAUVANT, 2014; FURCHTENICHT; BRODERICK, 1987; KING; PLAIZIER, 2006). Com base nessas informações, no presente estudo não foram adicionados substratos seletivos, nem foram realizadas diluições ou adição de tampão ao líquido ruminal de animais alimentados sobre diferentes dietas. Além disso, foram avaliados antibióticos (Monensina e Virginiamicina) utilizados comercialmente em bovinocultura juntamente com bacteriocinas (Bovicina HC5 e Nisina) que apresentaram efeito semelhante a ionóforos em trabalhos anteriores (CALLAWAY; CARNEIRO DE MELO; RUSSELL, 1997; LIMA et al., 2009; MANTOVANI et al., 2002; NAGARAJA et al., 1995).

Assim, a proposta deste trabalho foi testar o efeito de antibióticos e bacteriocinas na fermentação ruminal *in vitro* simulando condições de incubação mais próximas ao sistema *in vivo* (ausência de substratos seletivos ou diluição do

líquido ruminal) com intuito de melhor explicar os mecanismos de ação dos antimicrobianos testados, uma vez que ainda não estão claros.

**Tabela 1** Métodos de estudo da atividade *in vitro* de diferentes antimicrobianos preconizados para uso na bovinocultura.

Aditivo	Concentração	Animal	Dieta	Meio	pH	Tipo de estudo	Autor (ano)
Monensina	0,1 - 25 ppm	Bezerro Brahman	Concentrado	LR filtrado e diluído, tampão e SS	7,0	<i>In vitro</i>	(RICHARDSON et al., 1976)
Nisina	4 mg nisin/g	Carneiros Cheviot	Dieta mista	Líquido de rúmen filtrado	6,55	<i>In vivo</i>	(SANTOSO et al., 2004)
Virginiamicina	0 - 200 ppm	Carneiro Cheviot	Dieta mista	LR adicionado de SS e NH <sub>4</sub> CO <sub>3</sub>	-	<i>In vitro</i>	(VAN NEVEL; DEMEYER; HENDERICKX, 2009)
Salinomicina	20 ppm	Ovelhas Dorper	Dieta mista	Líquido de rúmen filtrado	6,76	<i>In vitro</i>	(NAGARAJA; TAYLOR, 1987)
Monensina	13,9 mg/kg MS	Vacas Holandesas	Dieta mista	LR filtrado, tampão mineral, SS	6,7	<i>In vitro</i>	(WEIMER et al., 2011)
Monensina	5,0 mM	Vacas Holandesas	Dieta mista	Meio basal, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> e SS	-	<i>In vitro</i>	(YANG; RUSSELL, 1993)
Ácidos orgânicos	5 ppm	Gado Jersey	Dieta mista	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , cisteína hidrocloreida	6,5	<i>In vitro</i>	(CALLAWAY; MARTIN, 1996)
Virginiamicina	0 - 0,375 µg mL <sup>-1</sup>	Bezerros Bonsmara	Dieta mista	Líquido de rúmen + SS	-	<i>In vitro</i>	(LEEuw et al., 2016)
Saponinas	0,6 g L <sup>-1</sup>	Gado Jersey	Dieta mista	LR, meio e solução tampão	6,5	<i>In vitro</i>	(PATRA; YU, 2015)
Óleos essenciais	0,85 a 5 µL mL <sup>-1</sup>	Carneiro Wethers	Dieta mista	Líquido de rúmen e solução tampão	-	<i>In vitro</i>	(RIRA et al., 2015)
Taninos	0,5 a 1,0 mg mL <sup>-1</sup>	Gado Nelore	Dieta mista	Líquido de rúmen e solução tampão	-	<i>In vitro</i>	(JAYANEGARA et al., 2015)
Virginiamicina	30 ppm	Carneiro Wethers	Dieta mista	Líquido de rúmen e Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	6,75	<i>In vitro</i>	(GUO et al., 2010)
Nisina	5 µM	Gado Jersey	Volumoso	Cisteína hidrocloreida, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	<i>In vitro</i>	(CALLAWAY; MELO; RUSSELL, 1997)
Monensina pura	5,0 mM	Gado Nelore	Volumoso	Concentrado, uréia e tampão	7,03	<i>In vitro</i>	(BARBOSA et al., 2001)
Lasalocida	5,0 µM	Vacas Holandesas	Volumoso	LR esterilizado e substratos solúveis	-	<i>In vitro</i>	(LANA et al., 2002)
Bovicina HC5	500 AU mL <sup>-1</sup>	Gado Nelore	Volumoso	Meio basal	-	<i>In vitro</i>	(LEE et al., 2002)
Monensina	1 mg/kg	Carneiro Wethers	Volumoso	LR filtrado e Tampão McDougall	8,4	RUSITEC	(ADERINBOYE, 2012)
Própolis	30g 100 mL <sup>-1</sup>	Vacas Girolandas	Volumoso	LR esterilizado e SS	-	<i>In vitro</i>	(OLIVEIRA et al., 2006)
Bovicina HC5	50 AU mL <sup>-1</sup>	Vacas Holandesas	Volumoso	Sais, vitaminas e minerais	6,7	<i>In vitro</i>	(LIMA et al., 2009)

\*AU mL<sup>-1</sup> - uma unidade arbitrária (UA) é definida como o recíproco da maior diluição que mostraram uma zona de inibição com, pelo menos 5 mm de diâmetro; **LR** – Líquido ruminal; **SS** – substrato solúvel; **RUSITEC** (Rumen Simulation Technique) – Técnica de simulação ruminal; **Dieta mista**: volumoso adicionado de concentrado.

## 2.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAR, A. et al. Effect of monensin withdrawal on rumen fermentation, methanogenesis and microbial populations in cattle. **Animal Science Journal**, n. October 2014, p. n/a-n/a, 2015.
- ADERINBOYE, R. Y. Effect of dietary monensin inclusion on performance , nutrient utilisation , rumen volatile fatty acid concentration and blood status of West African dwarf bucks fed with basal diets of forages. p. 1079–1087, 2012.
- AGUIAR, M. D. S. M. et al. Síntese de proteína microbiana e concentração de ureia em novilhas leiteiras alimentadas com palma forrageira *Opuntia*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 999, 2015.
- ALLEN, H. K.; STANTON, T. B. Altered Egos: Antibiotic Effects on Food Animal Microbiomes. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 297–315, 2014.
- AZZAZ, H. H.; MURAD, H. A.; MORSY, T. A. Utility of ionophores for ruminant animals: A review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 9, n. 6, p. 254–265, 2015.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen Metabolism in the Rumen \*. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. July 2004, p. E9–E21, 2005.
- BARBOSA, N. G. S. et al. Fermentação da proteína de seis alimentos por microrganismos ruminais, incubados puros ou com monensina ou rumensin®. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1316–1324, 2001.
- BAUTISTA, A. C. et al. Diagnostic value of tissue monensin concentrations in horses following toxicosis. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, 2014.
- BREUKINK, E.; DE KRUIJFF, B. The lantibiotic nisin, a special case or not? **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1462, n. 1–2, p. 223–234, 1999.
- BROUDISCOU, L. P.; OFFNER, A.; SAUVANT, D. Effects of inoculum source, pH, redox potential and headspace di-hydrogen on rumen in vitro fermentation yields. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v. 8, n. 6, p. 931–7, 2014.
- BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A; HAESEBROUCK, F. Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed : Effects of Less Well Known Antibiotics on Gram-Positive Bacteria Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed : Effects of Less Well Known Antibiotics on Gram-Positive Bacteria. **Society**, v. 16, n. 2, p. 175–188, 2003.
- CALLAWAY, T. R. et al. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Current issues in intestinal microbiology**, v. 4, n. 2, p. 43–51, 2003.
- CALLAWAY, T. R. et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 217–225, 2008.
- CALLAWAY, T. R.; CARNEIRO DE MELO, A. M. S.; RUSSELL, J. B. The effect of nisin and monensin on ruminal fermentations in vitro. **Current Microbiology**, v. 35, n.

2, p. 90–96, 1997.

CALLAWAY, T. R.; MARTIN, S. A. Effects of Organic Acid and Monensin Treatment on In Vitro Mixed Ruminal Microorganism Fermentation of Cracked Corn 1 ABSTRACT : p. 1982–1989, 1996.

CHANG, Q. et al. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be? **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 3, p. 240–247, 2015.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; OSSA, F. The rumen microbiome: abundance, diversity, and new investigative tools. **The Professional Animal Scientist**, v. 30, p. 1–12, 2014.

CLAYTON, E. H. et al. Controlling methane production with virginiamycin. **Animal Production in Australia**, v. 1996. 21, p. 239–242, 1996.

CLAYTON, E. H. et al. Effects of feeding virginiamycin and sodium bicarbonate to grazing lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 7, p. 1545–1554, 1999.

COCITO, C. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. **Microbiological reviews**, v. 43, n. 2, p. 145–192, 1979.

COE, M. L. et al. Effect of Virginiamycin on Ruminal Fermentation in Cattle during Adaptation to a High Concentrate Diet and during an Induced Acidosis. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 8, p. 2259–2268, 1999.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 95–105, 2013.

DE OLIVEIRA, M. V. M. et al. Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1763–1774, 2005.

DEMARCO, C. F. et al. Monensin controlled-release capsules do not change performance and metabolic profile in unchallenged beef cattle. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1–6, 2014.

DRONG, C. et al. Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. n/a-n/a, 2015.

EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL. Regulation (EC) N° 1831/2003 of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**, v. 268, n. 1831, p. 29–43, 2003.

FDA. Risk Assessment of Streptogramin Resistance in *Enterococcus faecium* Attributable to the Use of Streptogramins in Animals. Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine. 2004. **Disponível em:** <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm048417.htm>>. **Acesso em:** 24 jun. 2016.

FERREIRA, L. M. M. et al. Comparison of feed intake, digestion and rumen function among domestic ruminant species grazing in upland vegetation communities. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. 1–11, 2016.

FERREIRA CARVALHO, R. et al. Use of calcareous algae and monensin in Nellore cattle subjected to an abrupt change in diet. **Produto a base de algas calcárias e monensina na transição abrupta para dietas com elevada proporção de**

**concentrado para bovinos Nelore.**, v. 46, n. 4, p. 713–718, 2016.

FURCHTENICHT, J. E.; BRODERICK, G. A. Effect of inoculum preparation and dietary energy on microbial numbers and rumen protein degradation activity. **Journal of dairy science**, v. 70, n. 7, p. 1404–10, 1987.

GARCIA, L. D. F. AVALIAÇÃO IN VITRO DE DIFERENTES ADITIVOS SOBRE A EMISSÃO DE METANO, A DEGRADABILIDADE DA MATÉRIA SECA, A PRODUÇÃO DE GASES, E AS CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA E ÁCIDOS GRAXOS VOLÁTEIS. 2013.

GARCIA-MIGURA, L. et al. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1–2, p. 1–9, 2014.

GENZEBU, D.; TESFAY, G. The role of bacteria in nitrogen metabolism in the rumen with emphasis of cattle . v. 4, n. 7, p. 282–290, 2015.

GULIŃSKI, P.; SALAMOŃCZYK, E.; MŁYNEK, K. Improving nitrogen use efficiency of dairy cows in relation to urea in milk - A review. **Animal Science Papers and Reports**, v. 34, n. 1, p. 5–24, 2016.

GUO, T. J. et al. Evaluation of the microbial population in ruminal fluid using real time PCR in steers treated with virginiamycin. v. 2010, n. 7, p. 276–285, 2010.

HAN, X. et al. Rumen Bacterial Diversity of 80 to 110-Day-Old Goats Using 16S rRNA Sequencing. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. e0117811, 2015.

HAO, H. et al. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JUN, p. 1–11, 2014.

HENDERSON, G. et al. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific reports**, v. 5, n. April, p. 14567, 2015.

JAMI, E.; WHITE, B. A.; MIZRAHI, I. Potential Role of the Bovine Rumen Microbiome in Modulating Milk Composition and Feed Efficiency. v. 9, n. 1, 2014.

JAYANEGARA, A. et al. Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 209, p. 60–68, 2015.

JEYANATHAN, J. et al. The use of direct-fed microbials for mitigation of ruminant methane emissions : a review To cite this version : The use of direct-fed microbials for mitigation of ruminant methane emissions : a review. 2015.

JOSÉ, A. et al. Combined use of ionophore and virginiamycin for finishing Nellore steers fed high concentrate diets. n. August, p. 229–236, 2013.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, n. 1, p. 124–135, 2005.

KING, J.; PLAIZIER, J. C. Effects of source of rumen fluid on in vitro dry matter digestibility of feeds determined using the DAISY(II) incubator. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 86, n. 3, p. 439–441, 2006.

KRAUSE, D. O. et al. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen:

- Microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 5, p. 663–693, 2003.
- LAMMIE, S. L.; HUGHES, J. M. Antimicrobial Resistance, Food Safety, and One Health: The Need for Convergence. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. annurev-food-041715-033251, 2016.
- LANA, R. D. P. et al. Efeito da Monensina e Lasalocida sobre a Atividade de Fermentação de Aminoácidos in Vitro pelos Microrganismos Ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 724–730, 2002.
- LANA, R. D. P.; RUSSELL, J. B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumoso ou concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 254–260, 2001.
- LEE, S. S. et al. The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 1, p. 51–55, 2002.
- LEEuw, K. J. et al. Effects of virginiamycin and monensin administered alone or together with *Megasphaera elsdenii* strain NCIMB 41125 on in vitro production of lactate and VFA and the effects of monensin and *M. elsdenii* strain NCIMB 41125 on health and performance of feedlot. **Livestock Science**, v. 183, p. 54–62, 2016.
- LIMA, J. R. et al. Bovicin HC5 inhibits wasteful amino acid degradation by mixed ruminal bacteria in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 292, n. 1, p. 78–84, 2009.
- ŁOWICKI, D.; HUCZYŃSKI, A. Structure and antimicrobial properties of monensin and its derivatives: Summary of the achievements. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- MANTOVANI, H. C. et al. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiology**, v. 148, n. 11, p. 3347–3352, 2002b.
- MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Bovicin HC5, a lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HC5, catalyzes the efflux of intracellular potassium but not ATP. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2247–2249, 2008.
- MIHAELA, G. et al. Methane Production in the Rumen and its Influence on Global Warming. v. 7, p. 64–70, 2014.
- MOHAMED, R.; CHAUDHRY, A. S. Methods to study degradation of ruminant feeds. **Nutrition research reviews**, v. 21, n. 1, p. 68–81, 2008.
- MONTANO, M. F. et al. Effects of monensin and virginiamycin supplementation in finishing diets with distiller dried grains plus solubles on growth performance and digestive function of steers. **Journal of Applied Animal Research**, v. 2119, n. May 2016, p. 1–9, 2014.
- NAGARAJA, T. G. et al. In Vitro Lactic Acid Inhibition and Alterations in Volatile Fatty Acid Production by Antimicrobial Feed Additives T . G . Nagaraja , M . B . Taylor , D . L . Harmon and J . E . Boyer The online version of this article , along with updated information and . p. 1064–1076, 1987.
- NAGARAJA, T. G. et al. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in faunated or ciliate-free sheep overfed with barley grain. **Small Ruminant Research**, v. 17, n. 1,

p. 1–8, 1995.

NAGARAJA, T. G.; TAYLOR, M. B. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 1620–1625, 1987.

NES, I. F.; YOON, S.-S.; DIEP, D. B. Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. **Food Science and Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 675–690, 2007.

NUNEZ. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Uso combinado de ionóforo e virginiamicina em novilhos Nelore confinados com dietas de alto concentrado Amoracyr José Costa Nuñez Piracicaba 2008. 2008.

OEZTUERK HAKAN; EMRE BAHRI; VEDAT SAGMANLIGIL; PISKIN IKSIN; REHA FIDANCI ULVI; PEKCAN MERT. **M66-Nisin\_Propolis.pdf**, 2010.

OLIVEIRA, J. S. DE et al. Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de aminoácidos in vitro pelos microrganismos ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 275–281, 2006b.

ORTOLAN, J. H. Efeito de aditivos no metabolismo ruminal e parâmetros sanguíneos em bovinos. 2010.

PAGE, S. **The role of enteric antibiotics in livestock production**. [s.l: s.n.].

PAIVA, A. D. et al. Toxicity of bovicin HC5 against mammalian cell lines and the role of cholesterol in bacteriocin activity. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 158, n. 11, p. 2851–2858, 2012.

PAIVA, A. D.; BREUKINK, E.; MANTOVANI, H. C. Role of lipid II and membrane thickness in the mechanism of action of the lantibiotic bovicin HC5. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5284–5293, 2011.

PATRA, A. K.; YU, Z. Effects of garlic oil, nitrate, saponin and their combinations supplemented to different substrates on in vitro fermentation, ruminal methanogenesis, and abundance and diversity of microbial populations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 6, n. December, p. 1782–1792, 2015.

PECKA-KIE??B, E. et al. In vitro study of the effect of corn dried distillers grains with solubles on rumen fermentation in sheep. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 18, n. 4, p. 751–758, 2015.

PISARČÍKOVÁ, J. et al. Quantification of organic acids in ruminal in vitro batch culture fermentation supplemented with fumarate using a herb mix as a substrate. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 96, n. 1, p. 60–68, 2016.

PUNIYA, A. K.; SINGH, R.; KAMRA, D. N. Rumen microbiology: From evolution to revolution. **Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution**, p. 1–379, 2015.

RICHARDSON, L. F. et al. EFFECT OF MONENSIN ON RUMEN FERMENTATION IN VITRO AND IN VIVO. v. 43, n. 3, 1976.

RIRA, M. et al. Effects of Plants Containing Secondary Metabolites on Ruminal Methanogenesis of Sheep in vitro. **Energy Procedia**, v. 74, p. 15–24, 2015.

RUSSELL, J. B. Factors That Alter Rumen Microbial Ecology. **Science**, v. 292, n.

5519, p. 1119–1122, 2001.

RUSSELL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 65–74, 2003.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science (New York, N.Y.)**, v. 292, n. 5519, p. 1119–1122, 2001.

SAHOO, A.; JENA, B. Organic Acids as Rumen Modifiers. v. 3, n. 11, p. 2262–2266, 2014.

SALMAN, A. K. D.; PAZIANI, S. DE F.; SOARES, J. P. G. Utilização de ionóforos para bovinos de corte. **Embrapa Rondônia**, n. 101, p. 20, 2006.

SANTOSO, B. et al. Effects of supplementing galacto-oligosaccharides, *Yucca schidigera* or nisin on rumen methanogenesis, nitrogen and energy metabolism in sheep. **Livestock Production Science**, v. 91, n. 3, p. 209–217, 2004.

SILVEIRA, A. M. DA et al. Effect of organic acids or monensin-sodium addition on fatty acid production of short chain and methane through the ruminal fermentation “in vitro”. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 1, p. 439, 2016.

TAJIMA, K. et al. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. v. 67, n. 6, p. 2766–2774, 2001.

TEATHER, R. M.; KALMOKOFF, M. L.; WHITFORD, M. F. The Role of Bacteriocins in Rumen Microbial Ecology. 1999. **Disponível em:** <<http://socrates.acadiau.ca/isme/symposium13/teather.pdf>>. **Acesso em:** jun. 2016.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I.; HENDERICKX, H. K. Effect of Virginiamycin on Carbohydrate and Protein Metabolism in the Rumen In Vitro. **Archiv für Tierernaehrung**, v. 34, n. 2, p. 149–155, 2009.

WALLACE, R. J.; CHENG, K. J.; CZERKAWSKI, J. W. Effect of monensin on fermentation characteristics of the artificial rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 672–674, 1980.

WANG, X. et al. Correlation between composition of the bacterial community and concentration of volatile fatty acids in the rumen during the transition period and ketosis in dairy cows. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 7, p. 2386–2392, 2012.

WEIMER, P. J. et al. Fiber digestion, VFA production, and microbial population changes during in vitro ruminal fermentations of mixed rations by monensin-adapted and unadapted microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 169, n. 1–2, p. 68–78, 2011.

WEIMER, P. J. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 1–16, 2015.

WEIMER, P. J.; KOHN, R. A. Impacts of ruminal microorganisms on the production of fuels: how can we intercede from the outside? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 8, p. 3389–3398, 2016.

YANG, C. M. J. .; RUSSELL, J. B. Effect of Monensin. v. 59, n. 10, p. 3250–3254,

1993.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50–56, 2012.

## CAPÍTULO 2

### **Influência de bacteriocinas e antibióticos sobre a fermentação ruminal, digestibilidade de fibra e produção de metano *in vitro***

#### **2.1 INTRODUÇÃO**

Em bovinocultura os aditivos são utilizados para manipular a fermentação ruminal, aumentar a eficiência alimentar, proporcionar maior ganho de peso, manter a sanidade dos rebanhos e viabilizar o melhor desempenho bovino (SNEERINGER et al., 2015). Extratos vegetais, lipídeos, ácidos orgânicos, probióticos e prebióticos, além de enzimas fibrolíticas e antibióticos, são aditivos preconizados ou já utilizados como modificadores da fermentação ruminal, no entanto, apresentam vantagens e desvantagens quanto ao efeito na fermentação ruminal (CALLAWAY et al., 2008; CALLAWAY; MARTIN, 1996; DING et al., 2014; HAO et al., 2014; LEEUW et al., 2016).

Dentre esses, os óleos essenciais reduzem as concentrações de metano entéricas, no entanto, diminuem as concentrações de ácidos orgânicos voláteis (JOCH et al., 2016). Testes *in vivo* com lipídeos reportaram aumento na síntese proteica pela microbiota ruminal, porém o excesso de lipídeos reduz a digestibilidade de fibra (FIORENTINI et al., 2015). Os ácidos orgânicos reduzem as concentrações de metano e amônia no rúmen, apesar disso, possuem alto custo (PISARČÍKOVÁ et al., 2016). Aditivos como prebióticos e probióticos aumentam a ação de bactérias fibrolíticas no rúmen, contudo, seus efeitos ainda são inconsistentes (UYENO; SHIGEMORI; SHIMOSATO, 2015). Além desses, as enzimas fibrolíticas aumentam digestibilidade de fibra, porém não impedem a menor geração de amônia ruminal (VALLEJO et al., 2016). Os antibióticos reduzem as concentrações de metano e amônia e aumentam as concentrações de propionato ruminal (AZZAZ; MURAD; MORSY, 2015), no entanto, o uso indiscriminado pode ocasionar problemas de toxicidade, além do risco de seleção de estirpes bacterianas resistentes que poderiam ser transmitidas para seres humanos por meio da ingestão de alimentos contaminados e pelo contato entre humanos e animais contaminados (HAO et al., 2014; THANNER; DRISSENER; WALSH, 2016).

Com base em estudos sobre a distribuição de genes de resistência a antibióticos nos sistemas de produção animal europeus (EUROPEAN PARLIAMENT AND THE

COUNCIL, 2003), a União Europeia decidiu banir o uso de antibióticos utilizados como promotores de crescimento na produção animal (GARCIA-MIGURA et al., 2014). No entanto, EUA, Brasil, Japão e Austrália permitem o uso de alguns antibióticos em doses subclínicas na promoção do crescimento animal (MARON; SMITH; NACHMAN, 2013). Contudo, estudos *in vitro* e *in vivo* de alternativas para manipulação da fermentação ruminal têm sido realizados (BEREAN et al., 2015; DING et al., 2014; PISARČÍKOVÁ et al., 2016; RIRA et al., 2015). No entanto, poucos estudos *in vitro* utilizam de líquido ruminal puro sem adição de substratos solúveis durante o processo de incubação (BEREAN et al., 2015). Nesse sentido, o presente trabalho avaliou os efeitos de bacteriocinas na fermentação ruminal *in vitro* utilizando-se de líquido ruminal puro e sem adição de substratos externos.

As bacteriocinas são definidas como peptídeos antimicrobianos sintetizados ribossomalmente por bactérias e archaeas e que apresentam estrutura química e mecanismos de ação diferentes (EGAN et al., 2016; FLAHERTY; FREED; LEE, 2014; RILEY; WERTZ, 2002). Algumas classes de bacteriocinas são eficazes, além de apresentar atividade antimicrobiana em concentrações nanomolares contra microrganismos do rúmen (COTTER; ROSS; HILL, 2013). A nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, reduziu as concentrações de metano e amônia durante a fermentação ruminal (CALLAWAY; CARNEIRO DE MELO; RUSSELL, 1997; ZACHAROF; LOVITT, 2012). No entanto, Lee *et al.* (2002b) demonstrou que enzimas presente no líquido ruminal, podem degradar esse peptídeo. A inconsistência entre essas observações indica que fatores como a composição da dieta e dose do inibidor podem influenciar o efeito na fermentação ruminal.

Apesar disso, estudos anteriores sugerem que bacteriocinas produzidas por bactérias ruminais como a bovina HC5 (sintetizada por *Streptococcus equinus* HC5), podem ser mais efetivas para manipular a fermentação ruminal (LIMA et al., 2009; MANTOVANI et al., 2002). Bovicina HC5 possui mecanismos de ação semelhante à nisina (PAIVA et al., 2012; PAIVA; BREUKINK; MANTOVANI, 2011), e estudos anteriores reportaram que bovicina HC5 reduziu as concentrações de amônia, metano e a desaminação de aminoácidos em culturas mistas de microrganismos do líquido de rúmen de forma similar a antibióticos utilizados comercialmente (HOULIHAN; MANTOVANI; RUSSELL, 2004; LIMA et al., 2009; LEE et al., 2002a). Além disso, a

bovicina HC5 possui baixa toxicidade sobre células mamárias e intestinais demonstrando potencial para ser aplicada em estudos *in vivo* (PAIVA et al., 2012). Todavia, o efeito de bovicina HC5 e bacteriocinas sobre a atividade fibrolítica e digestibilidade de fibra ainda não foi avaliado.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Animais e dietas

O líquido ruminal foi coletado de duas vacas da raça Girolando fistuladas no rúmen e com peso aproximado de 320 kg, conforme protocolo (nº 05/2016) aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV). Os animais foram abrigados em baias individuais com água *ad libitum* e a alimentação foi fornecida às 6h00 e 18h00. Os animais foram adaptados às dietas durante um período de quatorze dias. As dietas ofertadas aos animais foram formuladas de acordo com NRC (2001), sendo a dieta A composta de silagem de milho e a dieta B de silagem de milho/sorgo (*ad libitum*) adicionado de concentrado proteico (6Kg). O concentrado proteico consistiu de farinha de soja (35,0 %), milho moído (62,0 %), mistura de minerais (1,5 %) e da pedra calcária (1,5 %). A composição nutricional das respectivas dietas e do concentrado são apresentadas na tabela 2. Amostras (30 g) das dietas utilizadas no experimento foram processadas em peneira de 1 mm e avaliadas quanto ao teor de Matéria seca (MS), cinzas, proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), segundo metodologia descrita por Detmann *et al.* (2012). A metodologia utilizada para quantificação dos teores de lignina foi obtida de acordo com Detmann *et al.* (2012).

**Tabela 2** – Teores de proteína bruta (PB), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente ácido corrigido para cinzas e proteína (FDAcp), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), Cinzas, Lignina, extrato etéreo (EE) e matéria seca (MS), nas dietas A, B e concentrado proteico.

Componente (%)	Dieta A <sup>1</sup>	Dieta B <sup>2</sup>	Concentrado
MS <sup>4</sup>	91,76	93,58	89,26
FDN <sup>3</sup>	43,34	39,01	11,07
FDA <sup>3</sup>	25,21	23,02	4,24
PB <sup>3</sup>	8,73	15,27	20,42
EE <sup>3</sup>	5,33	5,33	5,55
Cinzas <sup>3</sup>	4,62	10,31	6,4
Lignina <sup>3</sup>	3,33	3,62	0,54

<sup>1</sup>Dieta à base de silagem de milho; <sup>2</sup>Dieta à base de silagem de milho/sorgo acrescido com concentrado proteico; <sup>3</sup>% com base na matéria seca; <sup>4</sup>% com base na matéria natural.

### 2.2.2 Incubação *in vitro*

No dia anterior a incubação, 350 mg dos substratos (Silagem de milho ou silagem de milho/sorgo mais concentrado proteico) foram pesados e transferidos para sacos filtro F57 (Ankon<sup>®</sup>), os quais foram selados e inseridos nos frascos de incubação (50 mL). Antes da inoculação com líquido ruminal, os frascos foram transferidos para sala climatizada a 39°C. O conteúdo ruminal foi coletado cerca de duas horas após a alimentação matinal dos animais. O inóculo foi filtrado em sacos de náilon e dupla camada de gazes e acondicionado em garrafas térmicas pré-aquecidas com água à 39°C, as quais foram imediatamente transportadas para a sala climatizada a 39°C do Laboratório de Microbiologia do Rúmen do Complexo Multiusuário da Embrapa Gado de Leite de Coronel Pacheco-MG. O líquido ruminal (33 mL) foi adicionado anaerobicamente (sob fluxo de CO<sub>2</sub>) aos frascos que continham os substratos. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha e lacres de alumínio e incubados a 39°C por 48 h. Foram avaliados quatro inibidores e três concentrações de cada inibidor: C – controle, Dose A (Alta) e Dose B (baixa), respectivamente; Bovicina HC5 (0,180 e 360 AU mL<sup>-1</sup>); Nisina (0,180 e 360 AU mL<sup>-1</sup>); Monensina (0,1 e 5 µmol L<sup>-1</sup>) e Virginiamicina (0, 5 e 10 µmol L<sup>-1</sup>). Das doses avaliadas, uma dose é mais comumente utilizada em experimentos *in vitro* (Dose B) e uma dose (Dose A) é representada utilizada em estudos *in vivo*, foram comparadas entre si e o controle (Tabelas 3 e 4).

Foram feitas amostragens nos intervalos de tempo de 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h de incubação. O pH foi analisado em pHmetro Modelo MPA-210 (Tecnopon Company, Piracicaba, SP, Brasil) e as amostras foram congeladas a -20 °C e transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios da Universidade Federal de Viçosa para análise das características da fermentação ruminal.

### 2.2.3 Antimicrobianos

Extratos semi-purificados de bovicina HC5 foram preparados a partir de culturas de *S. equinus* HC5 por um procedimento envolvendo NaCl ácido como descrito anteriormente (MANTOVANI et al., 2002). As atividades antimicrobianas das bacteriocinas foram determinadas por ensaio de difusão em ágar (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976). Bovicina HC5 e nisina (2,5%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foram diluídas em série em solução de fosfato (5 mM, pH 2,0) e avaliadas para a atividade antimicrobiana usando *Alicyclobacillus acidoterrestris*

DSMZ 2498 como microrganismo indicador ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>). A atividade da bovicina HC5 e nisina, expressa em unidades arbitrárias (AU mL<sup>-1</sup>), foi calculada a partir do recíproco da maior diluição que apresentou zona de inibição visível, considerando um halo mínimo de 5 mm, descontando o diâmetro do orifício (LEWUS; KAISER; MONTVILLEL, 1991). A atividade antimicrobiana obtida contra *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSMZ 2498 foi de 360 AU mL<sup>-1</sup> para bovicina HC5 e nisina, respectivamente. Volumes de 0,250 e 0,500 mL da solução de nisina e de 1,0 ou 2,0 mL da solução de bovicina HC5, foram adicionados para atingir as concentrações estabelecidas em cada tratamento.

A monensina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) foi diluída em solução de etanol (95%). O ionóforo foi adicionado (0,5 mL) a partir de soluções estoque em cada garrafa anaeróbia até a concentração final necessária. Nos controles foi adicionado igual volume de etanol. A virginiamicina (Phibro<sup>®</sup>, composição: virginiamicina e carbonato de cálcio 90%) foi diluída em água e adicionada (0,5 mL) as garrafas anaeróbias até a concentração necessária. Os antibióticos foram armazenados a 4°C.

#### **2.2.4 Determinação da concentração de amônia**

A concentração de amônia foi determinada pelo método colorimétrico de Chaney e Marbach (1962). A absorbância foi medida a 630 nm em espectrofotômetro Spectronic 20D (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA) e cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) foi utilizado como padrão. A amônia total (mmol L<sup>-1</sup>) foi expressa como a diferença entre a concentração de amônia após 24 h de incubação e o tempo zero (início da incubação).

#### **2.2.5 Determinação de ácidos orgânicos voláteis**

A concentração de ácidos orgânicos voláteis foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Dual (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) acoplado a um detector de índice de refração (IR) Shodex RI-101 mantido a 40°C. A separação dos ácidos orgânicos foi feita em coluna de exclusão iônica Phenomenex Rezex ROA (300 x 7,8 mm) (Phenomenex Inc. Torrance, CA, USA) mantida a 45°C. A fase móvel utilizada continha ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 5 mmol e o fluxo foi de 0,7 mL min<sup>-1</sup>. As amostras de líquido ruminal (2 mL)

foram centrifugadas (12000 g, 10 min) e o sobrenadante livre de células foi tratado como descrito por Siegfried *et al.* (1984).

### **2.2.6 Coleta de amostras para análise de metano (CH<sub>4</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e gases totais**

Após o procedimento de incubação *in vitro* descrito no item (2.2.2), a pressão originada pelos gases foi mensurada (nos tempos de 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas de incubação) por meio de um transdutor de pressão (DPI 705 – GE) (THEODOROU *et al.* 1994), concomitantemente a coleta de gases foi realizada nos mesmos intervalos de tempo, para frascos exetainer evacuados de 6,8 mL (Labco Ltd, High Wycombe, Reino Unido) para posterior leitura em cromatografia gasosa. Após amostragem, os gases acumulados foram liberados e a pressão interna foi zerada em cada intervalo de coleta.

Os valores de pressão em libra por polegada quadrada (PSI) foram convertidos em volume conforme a equação:  $\text{Volume (mL)} = 0,1155x^2 + 3,093x + 0,597$ ;  $R^2 = 0,9874$ , estabelecida para as condições do laboratório. Os volumes produzidos foram ajustados para gramas de matéria seca de substrato incubado.

A quantificação de metano e dióxido de carbono foi feita por cromatografia gasosa (Agilent Technologies, modelo 7820A, software de interface EzChrom Elite). O equipamento foi equipado com duas válvulas de seis vias, sendo uma utilizada para o sistema amostrador interligado a um loop de 0,5 mL. Um injetor tipo split-splitless foi utilizado no modo split a 50:1 a uma temperatura de 120 °C. A outra, como seletora, foi utilizada para permitir aos constituintes passarem ou não pela segunda coluna. O sistema de separação foi constituído de duas colunas: uma HP-Plot/Q (30m x 0,530 mm x 40,0 µm) e uma HP-Molesieve (30m x 0,530mm x 25,0 µm) (Agilent Technologies Brasil). O sistema de detecção foi composto por um sistema de condutividade térmica (TCD) a 200 °C, com 25 mL min<sup>-1</sup> como fluxo de referência, 3 mL min<sup>-1</sup> de fluxo de complementação (H<sub>2</sub>); 10 mL min<sup>-1</sup> coluna mais complementação constante. A segunda coluna utilizou H<sub>2</sub> como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 7 mL min<sup>-1</sup>, equipada com um detector de ionização de chama (FID) a 300 °C e taxa de fluxo de H<sub>2</sub> de 10 mL min<sup>-1</sup>, 400 mL min<sup>-1</sup> de fluxo de ar sintético e 25 mL min<sup>-1</sup> de fluxo de complementação. O cromatógrafo gasoso também foi equipado com um metanador mantido a 375°C, o qual permitiu a detecção de concentrações muito baixas de CO<sub>2</sub>. A temperatura do forno foi mantida a 50 °C por 4,5 minutos, tempo necessário para a eluição dos constituintes

desejados. A Calibração do cromatografo foi realizada com padrões de referência nas concentrações de CH<sub>4</sub> - 5,05; 10,2; 14,7; 20,1 (%) e CO<sub>2</sub>: 20,2; 39,7; 58,3; 79,9 (%). A produção de gás total foi expressa em ml/gramas de MS incubada e, metano foi expresso como ml/gramas de MS degradada ou ml/gramas de MS incubada.

### **2.2.7 Avaliação da digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN)**

A DIVFDN foi determinada pelo método proposto por Tilley e Terry (1963), com algumas modificações, como se segue. O fluido ruminal foi coletado (amostras de 5 Litros) de duas vacas Girolandas fistuladas no rúmen, 2 h após a alimentação. Os animais tinham acesso *ad libitum* às respectivas rações como descrito no item 2.2.1. A digesta ruminal foi filtrada por meio de quatro camadas de gaze, armazenada em garrafas térmicas e imediatamente transportadas para o laboratório, no qual o fluido ruminal foi incubado a 39 °C durante 48 horas. A análise DIVFDN foi realizada em duas fases. Na primeira fase, 350 mg de amostra das rações foram pesadas e misturadas com cerca de 33 mL de fluido ruminal (em média) em garrafas anaeróbicas, seguido da adição dos antimicrobianos, no entanto, sem acréscimo de solução tampão McDougall. As garrafas foram seladas com rolhas de borracha, anilhas de alumínio e foram incubadas a 39 °C sem agitação durante 48 h. No segundo passo, os ankon's (previamente secos e pesados antes da incubação) foram lavados três vezes com água destilada quente. Após lavagem, os saquinhos foram transferidos para garrafas universais e preenchidas com 70 mL de solução de detergente neutro. Os frascos contendo os saquinhos foram esterilizados a 121 ° C durante 15 min. Após autoclavagem, os saquinhos foram lavados várias vezes com água quente até a solução de detergente neutro ter sido removida, seguido de uma lavagem final com 15 ml de acetona pura. Os ankons foram transferidos para o forno a 105 °C até peso constante. Todas as análises foram realizadas duas vezes em triplicata. A digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (%) foi calculada com base nas equações propostas por Tilley e Terry (1963).

### **2.2.8 Ensaio experimental e análise estatística**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e analisado separadamente para cada dieta, de acordo com um fatorial 4 x 3, com 4 inibidores e 3 concentrações de inibidor. As incubações foram realizadas em triplicata e

os efeitos foram avaliados em sete diferentes períodos de tempo (0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas). As médias das variáveis dependentes (pH, concentração de amônia, AOV, CH<sub>4</sub> e produção total de gás) foram testadas em ANOVA para o efeito de inibidores, dosagens de inibidores e para o efeito da interação entre ambos os fatores. Para os resultados significativos na ANOVA, foi realizado um teste de Tukey com significância de 5% (SAS, Ferreira 2011). Análises de componentes principais de todas as variáveis consideradas (pH, amônia, ácidos orgânicos voláteis, metano corrigido para matéria seca incubada e degradada, digestibilidade *in vitro* da MS e gases totais) e dos tratamentos com efeitos significativos foram realizadas utilizando o software Past (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Efeito de antibióticos e bacteriocinas nas características da fermentação ruminal, digestibilidade *in vitro* e produção de metano.

Em uma dieta de silagem de milho (SM), houve efeito significativo da interação ( $P < 0,05$ ) entre dose e inibidor para todas as variáveis testadas, exceto para ácidos orgânicos voláteis (Tabela 3). A adição de bovicina HC5 reduziu ( $P > 0,05$ ) o pH, porém as médias das doses avaliadas não foram diferentes ( $P > 0,05$ ). Tanto nisina quanto monensina não apresentaram efeitos no pH em relação ao controle ( $P > 0,05$ ). Contudo, quando se adicionou virginiamicina (Dose B), o pH aumentou em comparação a outros inibidores. No entanto, não houve diferença entre as médias das doses de virginiamicina (Figura suplementar 8).

Somente bovicina HC5 aumentou ( $P < 0,05$ ) a digestibilidade em uma dose baixa do antimicrobiano, contudo, essa dose não foi diferente do controle ( $P > 0,05$ ). A digestibilidade com adição de nisina (Dose B) foi menor quando comparado com bovicina HC5 (Dose B). A dose A de bovicina HC5 reduziu ( $P < 0,05$ ) a digestibilidade, similar às doses (A e B) de monensina e virginiamicina. Quando se adicionou monensina ao meio, houve ( $P < 0,05$ ) redução na digestibilidade em relação ao controle, no entanto, as médias das doses (A e B) foram similares ( $P > 0,05$ ). As doses A e B de monensina apresentaram valores equiparáveis às médias de virginiamicina ( $P > 0,05$ ),

sendo verificado que a digestibilidade com adição de virginiamicina foi menor em relação ao ionóforo (Figura suplementar 8).

**Tabela 3** – Efeito de bacteriocinas e antibióticos sobre pH ruminal (pH), concentração de amônia (NH<sub>3</sub>), Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN), Gases totais (GT), metano com base na matéria seca incubada (CH<sub>4</sub> MSi), metano com base na matéria seca degradada (CH<sub>4</sub> MSd), ácidos orgânicos voláteis totais (AOV), acetato (A), propionato (P), butirato (B) e relação acetato:propionato (A:P) em função dos diferentes tratamentos sobre inóculo de animal alimentado com silagem de milho (Dieta A).

Bov-Bovicina HC5; Nis-Nisina; Mon-Monensina; Vir-Virginiamicina; C-Controle; B-Dose baixa; A-Dose alta; I – Inibidor; D – Dose; EPM – erro padrão da média. <sup>1</sup>dados em porcentagem (%); <sup>2</sup>mM; <sup>3</sup>mL de gás/ g de MS degradada; <sup>4</sup>mL de gás/g de MS degradada; <sup>5</sup>mL de gás/g de MS incubada. <sup>6</sup>mmol/L. Letras iguais em uma mesma linha não se diferiram a 5% de probabilidade.

As concentrações de amônia não foram influenciadas (P>0,05) pelas doses de

Item	Inibidor				EPM	Dose			EPM	p-valor		
	BOV	NIS	MON	VIR		C	B	A		I	D	I x D
pH	6,24	6,31	6,3	6,36	0,01	6,31	6,3	6,29	0,01	<,0001	0,247	<,0001
<sup>1</sup> DIVFDN	59,83	60,98	58,28	57,3	0,26	60,7	59,1	57,49	0,22	<,0001	<,0001	<,0001
<sup>2</sup> NH <sub>3</sub>	11,69	13,02	7,87	11,32	0,25	10,93	11,56	10,44	0,22	<,0001	0,0046	<,0001
<sup>3</sup> GT	27,67	28,71	28,3	27,12	0,23	29,04	27,76	27,04	0,2	0,0003	<,0001	0,0008
<sup>4</sup> CH <sub>4</sub> MSd	6,89	8,05	8,3	7,49	0,12	8,31	7,68	7,05	0,1	<,0001	<,0001	<,0001
<sup>5</sup> CH <sub>4</sub> MSi	3,41	3,97	4,05	3,6	0,05	4,09	3,75	3,44	0,04	<,0001	<,0001	<,0001
<sup>6</sup> AOV	101,19 <sup>b</sup>	101,25 <sup>b</sup>	102,02 <sup>b</sup>	108,35 <sup>a</sup>	1,44	103,12	102,69	103,79	1,24	0,004	0,8232	0,0719
<sup>6</sup> A	61,67	61,78	64,18	61,82	0,24	62,74	62,33	62,02	0,21	<,0001	0,0659	0,0017
<sup>6</sup> P	18,84	18,42	18,91	18,55	0,07	18,24	18,68	19,12	0,06	0,0002	<,0001	0,0003
<sup>6</sup> B	11,88	12,01	11,48	11,86	0,06	12,01	11,93	11,48	0,06	<,0001	<,0001	0,0015
A:P	3,31	3,38	3,39	3,37	0,01	3,45	3,36	3,28	0,01	<,0001	<,0001	0,0015

bovicina HC5 e virginiamicina. A adição de nisina (Doses A e B) aumentou as concentrações de amônia (P<0,05), sendo as médias de tais doses semelhantes (P>0,05). No que tange à monensina, a adição (doses A e B) do inibidor reduziu as concentrações de amônia, em relação ao controle (P<0,05) (Figura suplementar 8).

A maior dose (A) de bovicina HC5 reduziu (P<0,05) as concentrações de gases totais (24%) em relação ao controle. A nisina (Doses A e B) não apresentou diferença significativa em relação ao controle (P>0,05). A média da dose A de monensina também foi igual à média das doses (A e B) de virginiamicina em reduzir (8%) as concentrações de gases totais (P>0,05). No entanto, a média das doses de virginiamicina não diferiram (P>0,05). Apesar disso, as médias das doses A e B de virginiamicina foram diferentes (P<0,05) do controle (Figura suplementar 8). As concentrações de metano com base na matéria seca degradada (CH<sub>4</sub>MSd) foram (30%) menores quando se adicionou (Doses A) bovicina HC5 (P<0,05). Além disso, a média da dose A de bovicina HC5, foi equivalente à média da dose A de virginiamicina, a qual reduziu

CH<sub>4</sub>MSd em 20%. No entanto, somente a média da dose A foi diferente ( $P < 0,05$ ) do controle. Quando monensina foi adicionada ao líquido ruminal incubado, a média das doses A e B não foram diferentes do controle ( $P > 0,05$ ) (figura suplementar 8).

A adição de bovicina HC5 reduziu ( $P < 0,05$ ) as proporções de metano com base na matéria seca incubada (CH<sub>4</sub>MSi), em ambas as doses, sendo que a maior dose da bacteriocina reduziu CH<sub>4</sub>MSi em até 24%. No entanto, a média das doses de nisina e monensina não apresentou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) em relação ao controle. Verificou-se que as doses A e B de bovicina HC5 foram equivalentes ( $P > 0,05$ ) às doses A e B de virginiamicina (Figura suplementar 8).

Não existiu ( $P > 0,05$ ) interação entre os fatores dose e inibidor quando se avaliou o efeito dos antimicrobianos na variável ácidos orgânicos voláteis totais (AOV). A análise de cada antimicrobiano mostrou que as concentrações de ácidos orgânicos foram maiores quando se adicionou virginiamicina independente da dose (Tabela 3). A maior dose de bovicina HC5 (Dose A) reduziu ( $P > 0,05$ ) a relação acetato:propionato em aproximadamente 8%. Sendo que para a maior dose dos demais antimicrobianos esse percentual ficou em torno de 5% (Figura suplementar 16).

Quando na dieta foi adicionado concentrado proteico (SMC), o pH final em relação à dieta de silagem de milho (SM) foi menor que 6,0. A digestibilidade foi maior, assim como as concentrações de amônia e de ácidos orgânicos voláteis totais (Tabelas 3 e 4). Houve efeito significativo da interação ( $P < 0,05$ ) entre dose e inibidor para as variáveis amônia (NH<sub>3</sub>), gases totais (GT), metano com base na matéria seca incubada (CH<sub>4</sub>MSi), ácidos orgânicos voláteis (AOV), acetato (A), propionato (P), butirato (B) e para a relação acetato:propionato (A:P). No entanto, não existiu efeito significativo da interação entre dose e inibidor para pH, digestibilidade (DIVFDN) e metano com base na matéria seca degradada (CH<sub>4</sub>MSd) (Tabela 4). Independente das doses dos inibidores, as médias de pH foram semelhantes (Dieta SMC) para bovicina HC5 e monensina, mas diferente das médias de nisina e virginiamicina, as quais foram iguais (Tabela 4).

Nenhum dos antimicrobianos avaliados modificou ( $P > 0,05$ ) a digestibilidade em relação ao controle (Dieta SMC), independente das doses avaliadas (Tabela 4). As maiores concentrações de amônia foram observadas quando se adicionou bovicina HC5, sendo que as doses do peptídeo não foram diferentes ( $P > 0,05$ ). Contudo, não houve

( $P>0,05$ ) diferença de efeito de doses (A e B) de nisina, monensina e virginiamicina em relação aos respectivos controles (Figura suplementar 9).

**Tabela 4** – Efeito de bacteriocinas e antibióticos sobre pH ruminal (pH), concentração de amônia ( $\text{NH}_3$ ), digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN), Gases totais (GT), metano com base na matéria seca incubada ( $\text{CH}_4$  MSi), metano com base na matéria seca degradada ( $\text{CH}_4$  MSd), ácidos orgânicos voláteis totais (AOV), acetato (A), propionato (P), butirato (B) e relação acetato:propionato (A:P) em função dos diferentes tratamentos sobre inóculo de animal alimentado com silagem de milho/sorgo adicionado de concentrado proteico (Dieta B).

Item	Inibidor				EPM	Dose			EPM	p-valor		
	BOV	NIS	MON	VIR		C	B	A		I	D	I x D
pH	5.82 <sup>b</sup>	5.88 <sup>a</sup>	5.84 <sup>b</sup>	5.90 <sup>a</sup>	0.01	5.86	5.85	5.87	0.01	0.0005	0.4446	0.0848
<sup>1</sup> DIVFDN	64.35	63.49	63.77	63.14	0.97	63.86	64.76	62.44	0.84	0.8407	0.1682	0.5503
<sup>2</sup> $\text{NH}_3$	35.98	25.28	22.67	24.21	0.83	26.84	27.20	27.06	0.72	<.0001	0.9411	0.0001
<sup>3</sup> GT	23.22	22.89	23.68	22.43	0.12	23.76	23.01	22.38	0.11	<.0001	<.0001	<.0001
<sup>4</sup> $\text{CH}_4$ MSd	6.76 <sup>b</sup>	7.17 <sup>b</sup>	8.07 <sup>a</sup>	7.26 <sup>b</sup>	0.26	7.89 <sup>a</sup>	7.23 <sup>b</sup>	6.83 <sup>b</sup>	0.22	0.0113	0.0088	0.1935
<sup>5</sup> $\text{CH}_4$ MSi	3.30	3.51	3.81	3.39	0.08	3.75	3.44	3.31	0.07	0.0005	0.0003	0.0076
<sup>6</sup> AOV	144.74	152.26	146.99	151.80	0.99	151.05	148.23	147.56	0.86	<.0001	0.0197	0.0014
<sup>6</sup> A	64.28	63.43	65.88	63.14	0.09	64.16	64.29	64.10	0.08	<.0001	0.2494	<.0001
<sup>6</sup> P	17.61	17.92	17.20	17.76	0.05	17.30	17.72	17.84	0.05	<.0001	<.0001	<.0001
<sup>6</sup> B	11.15	11.62	11.09	11.79	0.06	11.53	11.36	11.36	0.05	<.0001	0.0313	<.0001
A:P	3.61	3.54	3.70	3.57	0.02	3.68	3.58	3.56	0.02	0.0002	0.0003	0.0409

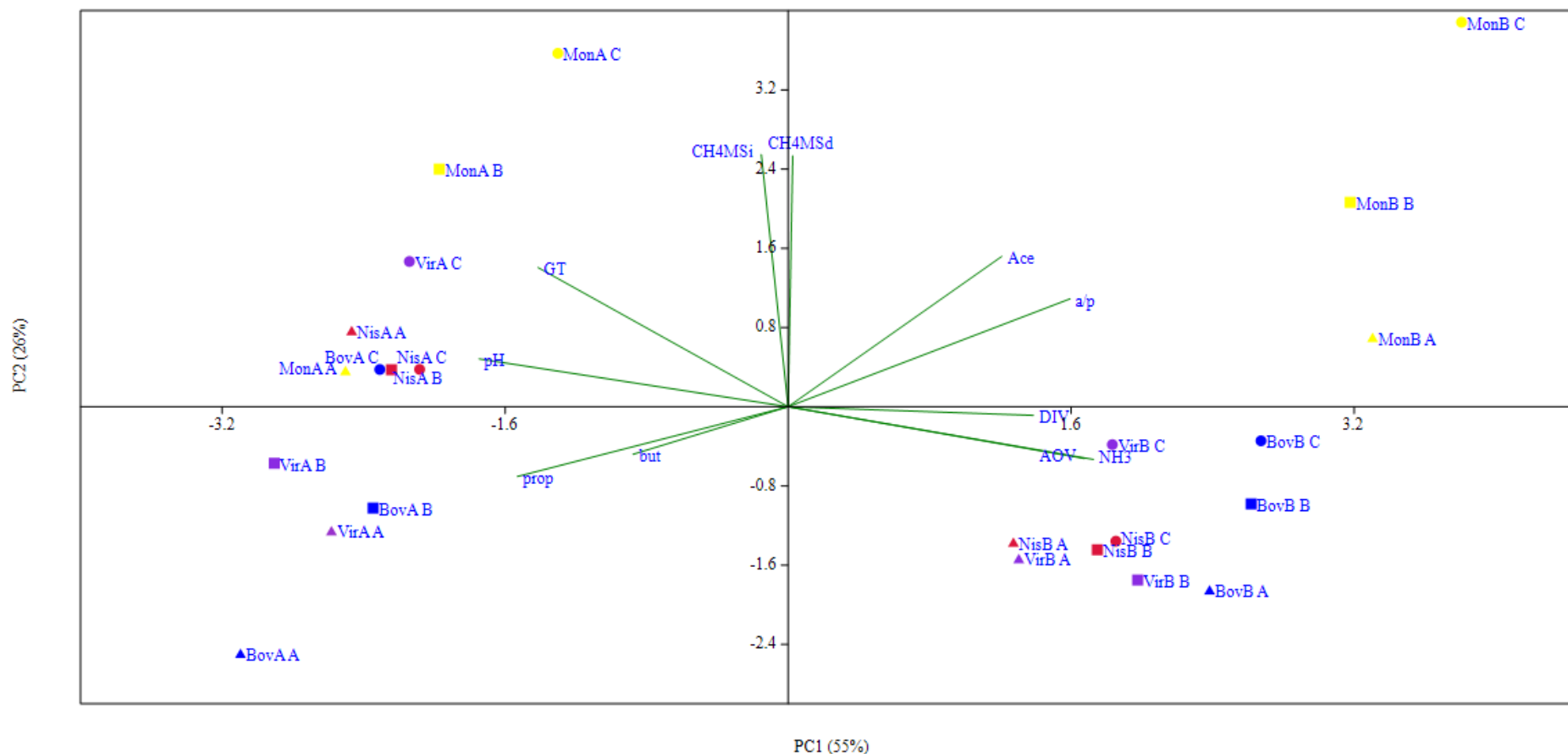
Bov-Bovicina HC5; Nis-Nisina; Mon-Monensina; Vir-Virginiamicina; C-Controle; B-Dose baixa; A-Dose alta; I – Inibidor; D – Dose; EPM – erro padrão da média. <sup>1</sup>dados em porcentagem (%); <sup>2</sup>mM; <sup>3</sup>mL de gás/ g de MS degradada; <sup>4</sup>mL de gás/g de MS degradada; <sup>5</sup>mL de gás/g de MS incubada. <sup>6</sup>mmol/L. Letras iguais em uma mesma linha não se diferiram a 5% de probabilidade.

As concentrações de gases totais foram menores quando se adicionou a dose A de bovicina HC5 em uma dieta SMC ( $P<0,05$ ). A média da dose A de bovicina HC5 teve efeito similar ( $P>0,05$ ) às médias da dose B de nisina e virginiamicina (Doses A e B). No entanto, a monensina não apresentou efeito ( $P>0,05$ ) em relação ao controle (Figura suplementar 9). Independente da dose do inibidor, as maiores concentrações de metano ( $\text{CH}_4$ MSd) foram observadas quando se adicionou monensina ao líquido ruminal. Além disso, independente do inibidor adicionado, o uso de doses altas reduziu as concentrações de metano ( $\text{CH}_4$ MSd) (Tabela 4). Contudo, somente a dose A de bovicina HC5 reduziu ( $P<0,05$ ) as concentrações de metano ( $\text{CH}_4$ MSi) e de ácidos orgânicos voláteis totais (figuras suplementares 19 e 20). Todavia, somente a nisina (Doses A e B) diminuiu a relação acetato:propionato ( $P<0,05$ ), não existindo diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre as doses dos demais antimicrobianos e o controle e, entre os inibidores testados. Apesar disso, os valores da relação foram maiores quando se adicionou monensina (Figura suplementar 9).

Para realizar uma análise do efeito das doses dos antimicrobianos nas variáveis analisadas, foram construídos gráficos com base nas médias das três repetições de cada

tratamento em cada um dos tempos de incubação (0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas) (Figuras suplementares 1 a 7). Além disso, a análise de componentes principais (PCA) foi realizada para representar a distribuição dos tratamentos e sua relação com as variáveis mensuradas (pH, digestibilidade, amônia, ácidos orgânicos voláteis, metano, gases totais e da relação acetato:propionato. A análise explicou 81% da variância acumulada para as dietas e tratamentos (Figura 1). Os vetores indicam as variáveis que estão influenciando com maior intensidade os tratamentos em cada quadrante.

A análise da Figura 1 mostrou que em uma dieta de silagem de milho, as variáveis CH<sub>4</sub>MSi e GT foram influenciadas a uma dose baixa de monensina. No entanto, a dose A de monensina e as doses A e B de nisina influenciaram o pH. Todavia, as doses (A e B) de bovicina e virginiamicina influenciaram as variáveis propionato e butirato. Em uma dieta de silagem de milho com adição de concentrado, as variáveis digestibilidade, ácidos orgânicos voláteis totais e amônia, foram influenciadas pelos antimicrobianos virginiamicina, nisina e bovicina HC5, enquanto as variáveis metano (CH<sub>4</sub>MSd), acetato e a relação acetato:propionato foram relacionadas ao tratamento contendo monensina.



**Figura 1** – Gráfico biplot resultante da análise de componentes principais (PC) representando a distribuição dos tratamentos com antimicrobianos nas dietas à base de silagem de milho (A) e silagem de milho com adição de concentrado proteico (B) e das variáveis mensuradas da fermentação ruminal e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVFDN). Cada ponto no gráfico representa a média de 21 observações colhidas no tempo para cada tratamento. Foram avaliadas as seguintes características da fermentação ruminal, além da digestibilidade: pH, gases totais (GT), Amônia (NH<sub>3</sub>), Digestibilidade *in vitro* da FDN (DIV), Ácidos orgânicos voláteis totais (AOV), acetato (Ace), propionato (prop), butirato (but), acetato:propionato (a/p), CH<sub>4</sub>MSi (Metano com base na MS incubada) e CH<sub>4</sub>MSd (Metano com base na MS degradada). Os tratamentos correspondem a: Monensina (MonA C = controle; MonA B = 1 mmol L<sup>-1</sup>; MonA A = 5 mmol L<sup>-1</sup> e o mesmo para MonB C, MonB B e MonB A); virginiamicina (VirA C = controle; VirA B = 5 mmol L<sup>-1</sup>; VirA A = 10 mmol L<sup>-1</sup> e respectivos valores para VirB C, VirB B e VirB A); bovicina HC5 (BovA C = controle; BovA B = 180 AU mL<sup>-1</sup>; BovA A = 360 AU mL<sup>-1</sup> e respectivos valores para BovB C, BovB B e BovB A) e nisina (NisA C = controle; NisA B = 180 AU mL<sup>-1</sup>; NisA A = 360 AU mL<sup>-1</sup> e respectivos valores para NisB C, NisB B e NisB A). **Exemplo:** MonA C = Monensina na dieta A (C=controle); MonA A = Monensina dieta A (A=dose alta); MonA B = Monensina dieta A (B=dose baixa).

## 2.4 DISCUSSÃO

A suplementação com concentrado proteico nas dietas para ruminantes tem o objetivo de aumentar o ganho energético animal e aumentar o ganho de peso diário (PETRI et al., 2013). A alteração do pH ruminal é um dos principais fatores decorrentes desta prática e causa mudanças nas populações microbianas do rúmen podendo gerar problemas digestivos para o animal (SINGH et al., 2014; WEIMER, 2015). Mudanças nos padrões fermentativos ruminais como queda no pH decorrentes da suplementação com concentrado foram observadas no presente estudo (Tabela 4). No entanto, as concentrações de amônia apresentaram comportamento diferente do reportado na literatura (LANA; CUNHA; BORGES, 2000), mas estão de acordo com estudos mais recentes que avaliaram as características do fluido ruminal de animais que se alimentaram em dietas com adição de concentrado (SERMENT et al., 2016).

Neste estudo a adição de concentrado foi utilizada com intuito de permitir avaliar o comportamento de antimicrobianos (Bovicina HC5, nisina, monensina e virginiamicina) que em estudos anteriores demonstraram efeito potencializado em pH ácido (CALLAWAY; CARNEIRO DE MELO; RUSSELL, 1997; GUO et al., 2010; HOULIHAN; MANTOVANI; RUSSELL, 2004). A bovicina HC5, por exemplo, foi um peptídeo que demonstrou melhor atividade em pH ácido (pH<6,0) em estudo sobre o efeito em *Listeria monocytogenes* (MANTOVANI; RUSSELL, 2003).

Pesquisas sobre o efeito de bovicina HC5 nas concentrações ruminais de amônia, metano foram realizadas, no entanto, estudos sobre a influência na digestibilidade de fibra são escassas (LEE et al., 2002; MANTOVANI; RUSSELL, 2008; LIMA et al., 2009). A redução na digestibilidade observada na dieta SM com a adição da dose A (360 AU mL<sup>-1</sup>) de bovicina HC5 (Figura suplementar 8) poderia ser o resultado da ação do peptídeo em grupos bacterianos que atuam na degradação da fibra como *Ruminococcus albus* B199 (fermentadora de celulose) e *Butyrivibrio brisolvens* 49 e *Butyrivibrio brisolvens* JL5, ambas degradadoras de hemicelulose (MANTOVANI et al., 2002). Na dieta SMC a bacteriocina não influenciou a digestibilidade, uma vez que estes grupos de microrganismos estariam ausentes devido à queda no pH (RUSSELL; RYCHLIK, 2001). Além disso, estudos futuros que verifiquem o efeito de bovicina HC5 em enzimas fibrolíticas de microrganismos ruminais são necessários (LEE et al., 2002; MANTOVANI et al., 2002b; LIMA et al., 2009).

O efeito de bovicina HC5 em reduzir a digestibilidade (Dieta SM) estaria relacionado à redução nas concentrações de gases totais e metano (CH<sub>4</sub>MSd e CH<sub>4</sub>MSi), visto que uma menor quantidade de substratos estaria disponível para bactérias produtoras de hidrogênio, o principal substrato para a metanogênese (Figura suplementar 8). O efeito de bovicina HC5 nas concentrações de metano (CH<sub>4</sub>MSd e CH<sub>4</sub>MSi) esteve de acordo com estudos anteriores, contudo em menor proporção (30%), pois Lee *et al.* (2002) demonstraram que a bovicina HC5 reduziu em 50% as concentrações de metano. No entanto, os autores utilizaram líquido ruminal de animais que se alimentaram com dieta à base de volumoso, porém com maior teor de proteína bruta (14%) e além disso, o inóculo foi obtido da região central do frasco de coleta após a sedimentação de partículas e protozoários, e o meio foi suplementado com H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, podendo essas modificações explicar o melhor efeito nos resultados de Lee e colaboradores (2002).

Apesar de ter influenciado negativamente a digestibilidade, a bacteriocina aumentou as concentrações de propionato, o qual é resultando do processo de degradação da proteína no rúmen e a principal fonte de energia para o animal. Este processo também gera amônia que pode ser reutilizado por microrganismos como fonte de nitrogênio para síntese proteica (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005).

Resultados anteriores indicaram que bovicina HC5 diminuiu a atividade de desaminação de aminoácidos e a taxa de produção de amônia por culturas mistas de microrganismos ruminais (LIMA *et al.*, 2009). No entanto, naquele trabalho o líquido ruminal foi centrifugado e os microrganismos ruminais foram resuspendidos em meio de cultura anaeróbio adicionado de Trypticase (15 g/L), uma fonte de aminoácidos e peptídeos (LIMA *et al.*, 2009). Em contraste, no presente estudo, bovicina HC5 e nisina foram adicionadas ao líquido ruminal sem diluição contendo 350 mg da dieta à base SMC consumida pelos animais utilizados no experimento. Nessas condições (SMC) observou-se alterações das concentrações de amônia resultante da fermentação ruminal (Figura suplementar 9), o que difere das observações feitas por Lima *et al.* (2009). A discrepância entre esses resultados pode ser devida a diversos fatores. Por exemplo, a abundância de aminoácidos fornecida aos microrganismos ruminais nas culturas em batelada pode favorecer a seleção de populações menos sensíveis à ação da bacteriocina. Na presença de substratos mais complexos, como no presente estudo, a

atividade de desaminação de microrganismos menos sensíveis a bacteriocina pode ser responsável pelo acúmulo de amônia durante a fermentação. Alternativamente, os efeitos desses antimicrobianos sobre as populações de microrganismos utilizadores de amônia podem ser distintos, contribuindo para os resultados obtidos no presente estudo (Figura suplementar 9).

Em uma dieta SMC a bovicina HC5 teria sua ação reduzida devido à ação de enzimas proteolíticas no líquido ruminal (MANTOVANI et al., 2002), no entanto, a bacteriocina não seria inativada a tempo de impedir sua ação em grupos de microrganismo envolvidos com a síntese de substratos para a metanogênese e que consomem nitrogênio amoniacal explicando as menores concentrações de ácidos orgânicos, metano e gases totais. Assim, o peptídeo redirecionaria o metabolismo microbiano de produção de metano e butirato, para produção de propionato (Figura suplementar 9).

No presente estudo, o aumento nas concentrações de amônia observado quando nisina foi incubada com o líquido ruminal obtido da vaca alimentada com SM (Figura suplementar 3) provavelmente foi devido à bacteriocina ter efeito contra microrganismos fermentadores de carboidratos estruturais, os quais utilizam amônia como principal fonte de nitrogênio para síntese de proteínas, resultando em maior acúmulo de amônia com adição do inibidor. Contudo, em uma dieta SMC a nisina apresentou efeito em mais variáveis (GT, acetato, propionato, A:P), demonstrando que o pH (<6,0) pode ter conferido maior atividade ao peptídeo. Estes resultados também foram observados por Callaway et al., (1997), no entanto, os autores utilizaram microrganismos advindos de animal alimentado com volumoso e o líquido ruminal foi diluído em meio sintético 33% (v/v). A diferença de atividade observada nas duas dietas pode ser o resultado da atividade proteolítica que possivelmente inativou a nisina na dieta de SM. Essa atividade também teria o mesmo efeito sobre a nisina na dieta SMC, no entanto, o efeito positivo do pH possibilitou maior tempo de atividade e alcance de maior grupo de microrganismos pelo inibidor (Tabelas 3 e 4) (Lee et al., 2002b).

A monensina teve efeito diferente entre as dietas no que tange às concentrações de amônia (Tabelas 3 e 4). Conforme Lana e Russell (2001) demonstraram, a dieta pode influenciar os resultados da ação do ionóforo, uma vez que bactérias ruminais mistas de animais recebendo forragem foram mais sensíveis à monensina quando comparadas

àquelas de animais recebendo concentrado. Esse fato pode explicar a observação de que o antimicrobiano não apresentou efeito sobre a concentração de amônia, propionato, gases totais, pH e digestibilidade, quando incubada no líquido ruminal da dieta SMC (Figuras suplementares 9). Além disso, os resultados do presente trabalho estão de acordo com Drong *et al.* (2015), os quais reportaram que as concentrações de amônia *in vivo* não sofreram alteração por monensina quando vacas leiteiras foram alimentadas com dieta a base de concentrado. Do mesmo modo, quando Ives *et al.* (2002) alimentaram novilhos com dieta a base de concentrado proteico, observou-se aumento das concentrações de amônia no tratamento com monensina.

Apesar de estudos anteriores mostrarem que diversos microrganismos ruminais são sensíveis à monensina (NAGARAJA; TAYLOR, 1987), algumas pesquisas afirmam que os efeitos de monensina na fermentação ruminal não poderiam ser completamente explicados pela consequente inibição de microrganismos Gram-positivos e archaeas (ABRAR *et al.*, 2015; HOOK *et al.*, 2009; WEIMER *et al.*, 2008). Apesar disso, as concentrações de metano foram diferentes quando se adicionou o aditivo (Figuras suplementares 8 e 9). Além disso, diversos estudos reportaram que o ionóforo aumentou o pH ruminal tornando possível a adaptação de animais na transição de dietas volumosas para dietas de alto concentrado. Contudo, alguns estudos *in vivo* preconizaram não existir influência do antimicrobiano na acidez ruminal (ADERINBOYE, 2012; DRONG *et al.*, 2015). A ausência na variação de pH observada na dieta SM (Figura suplementar 8), pode ser devido à ausência de variação nas concentrações de ácidos orgânicos voláteis totais nos tratamentos com monensina ou à capacidade tamponante do hospedeiro.

Os efeitos de monensina sobre a digestibilidade da fibra em dietas à base de volumoso ou dietas de volumoso e concentrado, ainda são controversos (KOOK *et al.* 1999; ZEOULA *et al.*, 2014). No entanto, estudos anteriores reportaram efeitos semelhantes aos observados no presente trabalho, tanto para avaliações realizadas *in vitro* quanto *in vivo* (ADERINBOYE, 2012; ISHLAK; GÜNAL; ABUGHAZALEH, 2015; WEIMER *et al.*, 2011). Alguns autores sugerem que a divergência de resultados entre diferentes estudos estaria relacionada com fatores como a composição da dieta, o tempo de adaptação dos animais à dieta, o tempo em que as amostras foram recolhidas e à concentração do aditivo (BODAS *et al.*, 2012; ISHLAK; GÜNAL;

ABUGHAZALEH, 2015; MCGUFFEY; RICHARDSON; WILKINSON, 2001). Nossos resultados mostram que a mudança na população microbiana causada pela dieta pode ter mostrado efeitos diferentes do ionóforo na modificação da fermentação ruminal, uma vez que as variáveis digestibilidade, amônia, gases totais, metano, propionato e acetato apresentaram respostas diferentes conforme a aplicação do antimicrobiano.

No presente estudo, também se avaliou os efeitos da virginiamicina sobre a fermentação ruminal e digestibilidade *in vitro*. Este antibacteriano possui espectro de ação semelhante à monensina e inibe principalmente bactérias ruminais Gram-positivas produtores de ácido lático. Além disso, estimula microrganismos utilizadores de lactato, tal como *Megasphaera elsdenii* (LEEUEW et al., 2016; NAGARAJA et al., 1987).

Estudos anteriores reportaram que virginiamicina mantém elevado o pH ruminal em animais que se alimentam de dietas com alta proporção de concentrado e auxiliou na adaptação de animais na transição de dietas ricas em volumoso para dietas ricas em concentrado, situação que normalmente resulta em acidose no rúmen (CLAYTON et al., 1999; GUO et al., 2010). Apesar disso, alguns autores não verificaram diferenças no pH ruminal de animais alimentados com dietas à base de concentrado adicionado de virginiamicina (IVES et al., 2002). No presente estudo, o pH foi o mais elevado com a aplicação do antibiótico, mostrando uma tendência em manter uma estabilidade do pH ruminal como demonstrado em estudos anteriores (CLAYTON et al., 1999; GUO et al., 2010), apesar disso, as maiores concentrações de ácidos orgânicos foram observadas com adição do antimicrobiano em relação aos demais (Tabelas 3 e 4).

Trabalhos anteriores reportaram que virginiamicina não influenciou a digestibilidade *in vivo* em estudos realizados com animais que se alimentaram com silagem de milho adicionado de concentrado (65:35) (BOUCQUE et al., 1990). O mesmo resultado foi reproduzido neste estudo *in vitro* e esse fato pode demonstrar que a adição de concentrado na dieta pode causar mudanças na população bacteriana que poderiam sofrer algum efeito do antibiótico (Figura suplementar 9).

Além disso, procedimentos experimentais poderiam influenciar na atividade do inibidor, visto que Kook *et al.* (1999) reportaram redução na digestibilidade *in vitro* da matéria seca quando virginiamicina foi adicionada a líquido ruminal diluído (20% v/v)

obtido de animais alimentados com palha de arroz tratada ou não com amônia. No entanto, os efeitos do antibiótico na digestibilidade foram mais evidentes no inóculo não tratado com amônia, a principal fonte de nitrogênio para microrganismos fibrolíticos. Contudo a redução da digestibilidade (dieta SM) corroboram com os achados de kook *et al.* (1999) e também com a pesquisa de Nagaraja e Taylor (1987), os quais verificaram que a virginiamicina inibiu o crescimento de microrganismos fibrolíticos Gram-positivos do rúmen como, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*.

Por meio da técnica de PCR em tempo real, Guo e colaboradores (2010) constataram que microrganismos proteolíticos e amilolíticos foram inibidos por virginiamicina quando novilhos foram alimentados à base de volumoso e concentrado (35:65). No presente estudo, as concentrações de amônia não foram afetadas com uso do aditivo (Figura suplementar 10 e 18), sugerindo que microrganismos envolvidos na desaminação de aminoácidos não foram afetados pelo antimicrobiano. Além disso, os resultados na dieta SMC estão de acordo com estudos *in vivo* onde dietas de alto concentrado foram ministradas a ruminantes (IVES *et al.*, 2002; NAGARAJA *et al.*, 1995).

O resultado nas concentrações de metano e gases totais em ambas as dietas (Figuras suplementares 8 e 9) indicam que virginiamicina pode causar efeito indireto na produção de metano durante a fermentação reduzindo a disponibilidade de substrato (H<sub>2</sub>) para a utilização por arqueias metanogênicas (CLAYTON *et al.*, 1996). O antibiótico parece redirecionar o metabolismo no sentido de produção de ácidos orgânicos e inibir no sentido de produção de gases (Dietas SM e SMC).

Além disso, Clayton *et al.* (1996) verificaram que microrganismos produtores de propionato e resistentes ao antimicrobiano, como *M. elsdenii*, por exemplo, podem prevalecer em condições de baixo pH no ambiente do ruminal como a condição imposta na dieta SMC (Tabela 4). Com base nessas informações e nos resultados obtidos por Nagaraja e Taylor (1987), a menor produção de gases, metano e o aumento nas concentrações de propionato na dieta SMC, pode ser devido à redução de populações produtoras de H<sub>2</sub> como *R. albus* e *R. flavefaciens*, e aumento nas populações de microrganismos como *M. elsdenii*, por exemplo.

Os antimicrobianos avaliados neste trabalho apresentaram alguns efeitos distintos daqueles reportados na literatura. Foram detectadas diferenças de mecanismo

de ação de antibióticos e bacteriocinas adicionados em líquido ruminal obtido de animais alimentados com dietas distintas (CALLAWAY; CARNEIRO DE MELO; RUSSELL, 1997; COE et al., 1999; LIMA et al., 2009; YANG; RUSSELL, 1993). Diversos autores reportaram que a dieta, a diluição do líquido ruminal (inóculo) e a adição de substratos solúveis no inóculo ruminal, podem causar alterações nas proporções dos produtos finais da fermentação ruminal em experimentos *in vitro*. Procedimentos experimentais e mudanças na dieta animal podem influenciar a dinâmica do processo fermentativo e o efeito dos agentes antimicrobianos (LANA; RUSSELL, 2001). A natureza do inóculo (adaptado à dieta de baixa ou alta forragem), bem como os procedimentos de manipulação do líquido ruminal e preparo do inóculo influencia o pH, a pressão de H<sub>2</sub> e o potencial redox das incubações *in vitro* (BROUDISCOU; OFFNER; SAUVANT, 2014), além de afetar a degradação proteica e a abundância de microrganismos ruminais durante a fermentação (FURCHTENICHT; BRODERICK, 1987; KING; PLAIZIER, 2006). Esses fatores podem justificar alguns dos resultados distintos da ação dos antimicrobianos observados neste estudo (BROUDISCOU; OFFNER; SAUVANT, 2014; FURCHTENICHT; BRODERICK, 1987; KING; PLAIZIER, 2006; RICHARDSON et al., 1976).

A análise das componentes principais mostrou que, o concentrado teve influência no pH da dieta SMC, uma vez que o vetor esteve apontado para a dieta SM, mesmo existindo semelhança estatística entre aditivos (Bovicina HC5 e monensina; Nisina e virginiamicina) na dieta SMC (Figura 1). Além disso, existiu uma inconsistência quando os vetores apontaram para monensina e nisina na dieta SM, uma vez que estes inibidores não apresentaram efeito significativo ( $P > 0,05$ ) no pH (Figura 1). Em termos de digestibilidade, a mesma parece ter sido influenciada pelo concentrado na dieta SMC, dado que nenhum antimicrobiano a afetou ( $P > 0,05$ ) e, pelos aditivos na dieta SM, porque somente nisina não a modificou. As concentrações de metano estiveram relacionadas à monensina e os vetores mais próximos à componente com maior parcela da variabilidade (55%) e não parece ter sofrido influência da adição de concentrado proteico, a monensina não afetou as concentrações de metano na dieta SM. As concentrações de amônia foram relacionadas consistentemente à adição de concentrado e a bovicina HC5, estando o vetor no quadrante referente à dieta SMC e apontando mais diretamente para a bovicina HC5 e afastado do quadrante de

monensina, a qual não alterou as concentrações deste composto. As concentrações de propionato estiveram associadas à bovicina HC5 e à virginiamicina, no entanto, a virginiamicina não alterou significativamente essas concentrações na dieta SM (Figura suplementar 8).

Portanto, o efeito de bovicina HC5 nas concentrações de amônia, em condições de incubação mais próximas do sistema *in vivo*, foi diferente de estudos realizados sob outras condições (com adição de substratos solúveis e diluição). Apesar do efeito negativo na digestibilidade *in vitro* da matéria seca com consequente redução das concentrações de gases, a bovicina HC5 aumentou as proporções de propionato em uma dieta de silagem de milho (Tabela 3). A nisina parece ter apresentado melhor efeito em uma dieta com pH mais ácido (SMC). No entanto, a monensina teve sua ação diferente em uma dieta SMC, onde somente afetou metano, acetato e butirato. A virginiamicina reduziu as concentrações de metano em ambas as dietas, mas não alterou as concentrações de amônia e, na dieta SM não influenciou as proporções de propionato, no entanto, aumentou o pH ruminal. Contudo, não modificou o pH na dieta SMC.

## 2.5 REFERÊNCIAS

- ABRAR, A. et al. Effect of monensin withdrawal on rumen fermentation, methanogenesis and microbial populations in cattle. **Animal Science Journal**, n. October 2014, p. n/a-n/a, 2015.
- ADERINBOYE, R. Y. Effect of dietary monensin inclusion on performance , nutrient utilisation , rumen volatile fatty acid concentration and blood status of West African dwarf bucks fed with basal diets of forages. p. 1079–1087, 2012.
- AZZAZ, H. H.; MURAD, H. A.; MORSY, T. A. Utility of ionophores for ruminant animals: A review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 9, n. 6, p. 254–265, 2015.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen Metabolism in the Rumen \*. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. July 2004, p. E9–E21, 2005.
- BEREAN, K. J. et al. A unique in vivo approach for investigating antimicrobial materials utilizing fistulated animals. **Scientific Reports**, v. 5, n. November 2014, p. 11515, 2015.
- BODAS, R. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites &. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1–4, p. 78–93, 2012.
- BOUCQUE, V. et al. Response to Virginiamycin in Finishing Beef Bulls Fed a Maize Silage Diet or a Complete Dry Feed. **Archiv für Tierernaehrung**, v. 40, n. 5–6, p. 475–481, 1990.
- BREUKINK, E.; DE KRUIJFF, B. The lantibiotic nisin, a special case or not? **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1462, n. 1–2, p. 223–234, 1999.
- BROUDISCOU, L. P.; OFFNER, A.; SAUVANT, D. Effects of inoculum source, pH, redox potential and headspace di-hydrogen on rumen in vitro fermentation yields. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v. 8, n. 6, p. 931–7, 2014.
- CALLAWAY, T. R. et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 217–225, 2008.
- CALLAWAY, T. R.; CARNEIRO DE MELO, A. M. S.; RUSSELL, J. B. The effect of nisin and monensin on ruminal fermentations in vitro. **Current Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 90–96, 1997.
- CALLAWAY, T. R.; MARTIN, S. A. Effects of Organic Acid and Monensin Treatment on In Vitro Mixed Ruminal Microorganism Fermentation of Cracked Corn 1 ABSTRACT : p. 1982–1989, 1996.
- CHANEY, A. L.; MARBACH, E. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clin Chem** v. 8, n. 2, p. 130-132, 1962.
- CLAYTON, E. H. et al. Controlling methane production with virginiamycin. **Animal Production in Australia**, v. 1996. 21, p. 239–242, 1996.
- CLAYTON, E. H. et al. Effects of feeding virginiamycin and sodium bicarbonate to grazing lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 7, p. 1545–1554, 1999.
- COE, M. L. et al. Effect of Virginiamycin on Ruminal Fermentation in Cattle during

Adaptation to a High Concentrate Diet and during an Induced Acidosis. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 8, p. 2259–2268, 1999.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 95–105, 2013.

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. (Eds.) Métodos para análise de alimentos. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.

DING, G. et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on Rumen Fermentation Characteristics, Nutrient Degradation and Cellulase Activity of Steers Fed Diets with Different Concentrate to Forage Ratios. v. 2, n. 6, p. 303–308, 2014.

DRONG, C. et al. Effect of monensin and essential oils on performance and energy metabolism of transition dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. n/a-n/a, 2015.

EGAN, K. et al. Bacteriocins: Novel solutions to age old spore-related problems? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, 2016.

EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL. Regulation (EC) N° 1831/2003 of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**, v. 268, n. 1831, p. 29–43, 2003.

FERREIRA D. F. Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciências Agrotécnicas**, v. 38, n. 2, 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S141370542014000200001&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141370542014000200001&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em: 01 mar. 2016.

FERREIRA, L. M. M. et al. Comparison of feed intake, digestion and rumen function among domestic ruminant species grazing in upland vegetation communities. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, p. 1–11, 2016.

FERREIRA CARVALHO, R. et al. Use of calcareous algae and monensin in Nellore cattle subjected to an abrupt change in diet. **Produto a base de algas calcárias e monensina na transição abrupta para dietas com elevada proporção de concentrado para bovinos Nelore.**, v. 46, n. 4, p. 713–718, 2016.

FIORENTINI, G. et al. Effect of lipid sources with different fatty acid profiles on intake, nutrient digestion and ruminal fermentation of feedlot Nellore steers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 11, p. 1583–1591, 2015.

FLAHERTY, R. A.; FREED, S. D.; LEE, S. W. The Wide World of Ribosomally Encoded Bacterial Peptides. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 7, p. 1–4, 2014.

FURCHTENICHT, J. E.; BRODERICK, G. A. Effect of inoculum preparation and dietary energy on microbial numbers and rumen protein degradation activity. **Journal of dairy science**, v. 70, n. 7, p. 1404–10, 1987.

GARCIA-MIGURA, L. et al. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1–2, p. 1–9, 2014.

GUO, T. J. et al. Evaluation of the microbial population in ruminal fluid using real time PCR in steers treated with virginiamycin. v. 2010, n. 7, p. 276–285, 2010.

- HAO, H. et al. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JUN, p. 1–11, 2014.
- HOOKE, S. E. et al. Long-Term Monensin Supplementation Does Not Significantly Affect the Quantity or Diversity of Methanogens in the Rumen of the Lactating Dairy Cow. v. 75, n. 2, p. 374–380, 2009.
- HOULIHAN, A. J.; MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Effect of pH on the activity of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, n. 1, p. 27–32, 2004.
- ISHLAK, A.; GÜNAL, M.; ABUGHAZALEH, A. A. The effects of cinnamaldehyde, monensin and quebracho condensed tannin on rumen fermentation, biohydrogenation and bacteria in continuous culture system. **Animal Feed Science and Technology**, v. 207, p. 31–40, 2015.
- IVES, S. E. et al. Effects of virginiamycin and monensin plus tylosin on ruminal protein metabolism in steers fed corn-based finishing diets with or without wet corn gluten feed 1, 2. p. 3005–3015, 2002.
- JOCH, M. et al. In vitro Screening of Essential Oil Active Compounds for Manipulation of Rumen Fermentation and Methane Mitigation. v. 29, n. 7, p. 952–959, 2016.
- KING, J.; PLAIZIER, J. C. Effects of source of rumen fluid on in vitro dry matter digestibility of feeds determined using the DAISY(II) incubator. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 86, n. 3, p. 439–441, 2006.
- KOOK, K. et al. Influence of monensin and virginiamycin on in vitro ruminal fermentation of ammoniated rice straw. **Journal of Animal Science**, v. 12, n. 4, p. 544–547, 1999.
- LANA, R. D. P.; RUSSELL, J. B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumoso ou concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 254–260, 2001.
- LANA, R. P.; CUNHA, L. T. DA; BORGES, A. C. Efeito da acidez no controle da produção de amônia e crescimento microbiano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1876–1882, 2000.
- LEE, S. S. et al. The effect of bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5, on ruminal methane production in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 1, p. 51–55, 2002a.
- LEE, S. S.; MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. The binding and degradation of nisin by mixed ruminal bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 339–345, 2002b.
- LEEuw, K. J. et al. Effects of virginiamycin and monensin administered alone or together with *Megasphaera elsdenii* strain NCIMB 41125 on in vitro production of lactate and VFA and the effects of monensin and *M. elsdenii* strain NCIMB 41125 on health and performance of feedlot. **Livestock Science**, v. 183, p. 54–62, 2016.
- LEWIS, C. B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. v. 57, n. 6, p. 1683–1688, 1991.

- LIMA, J. R. et al. Bovicin HC5 inhibits wasteful amino acid degradation by mixed ruminal bacteria in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 292, n. 1, p. 78–84, 2009.
- MANTOVANI, C.; RUSSELL, J. B. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bovicin HC5, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. v. 89, p. 77–83, 2003.
- MANTOVANI, H. C. et al. Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. **Microbiology**, v. 148, n. 11, p. 3347–3352, 2002b.
- MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Bovicin HC5, a lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HC5, catalyzes the efflux of intracellular potassium but not ATP. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2247–2249, 2008.
- MARON, D. F.; SMITH, T. J.; NACHMAN, K. E. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. **Globalization and health**, v. 9, n. 1, p. 48, 2013.
- MCGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for Dairy Cattle: Current Status and Future Outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E194–E203, 2001.
- NAGARAJA, T. G.; TAYLOR, M. B. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 1620–1625, 1987.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Dairy Cattle – NRC. Washington, D.C.: **National Academy Press**. 2001. 157p.
- PAIVA, A. D. et al. Toxicity of bovicin HC5 against mammalian cell lines and the role of cholesterol in bacteriocin activity. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 158, n. 11, p. 2851–2858, 2012.
- PAIVA, A. D.; BREUKINK, E.; MANTOVANI, H. C. Role of lipid II and membrane thickness in the mechanism of action of the lantibiotic bovicin HC5. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5284–5293, 2011.
- PAST, Software Package for Education and Data Analysis. 2016. **Disponível em:** <<http://folk.uio.no/ohammer/past/>>. **Acesso em:** 23/03/2016.
- PISARČÍKOVÁ, J. et al. Quantification of organic acids in ruminal in vitro batch culture fermentation supplemented with fumarate using a herb mix as a substrate. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 96, n. 1, p. 60–68, 2016.
- RICHARDSON, L. F. et al. Effect of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo. v. 43, n. 3, 1976.
- RILEY, M. A; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. **Annual review of microbiology**, v. 56, p. 117–137, 2002.
- RIRA, M. et al. Effects of Plants Containing Secondary Metabolites on Ruminal Methanogenesis of Sheep in vitro. **Energy Procedia**, v. 74, p. 15–24, 2015.
- RUSSELL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 65–74, 2003.
- RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**

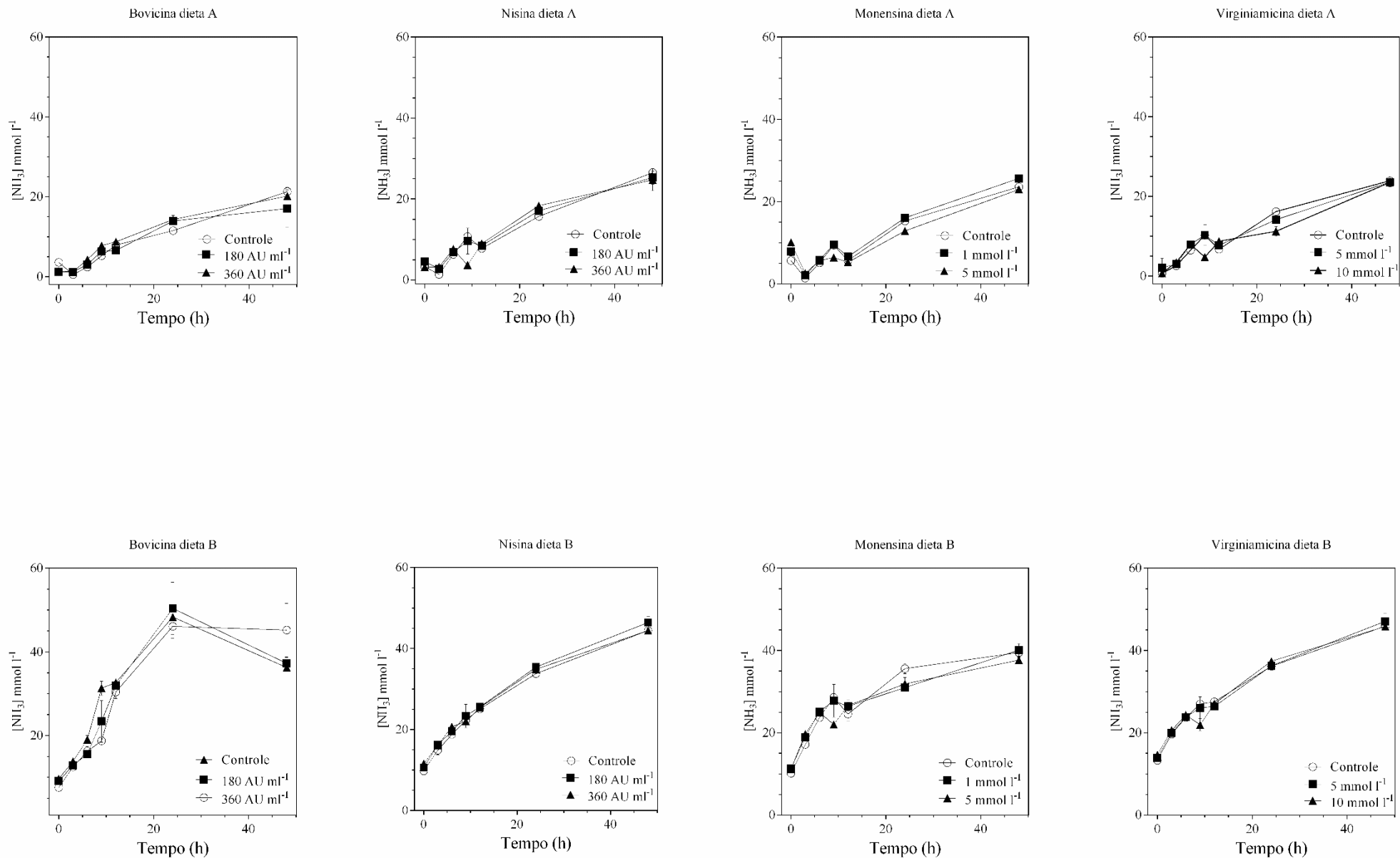
- (New York, N.Y.), v. 292, n. 5519, p. 1119–1122, 2001.
- SERMENT, A. et al. In vitro fermentation of total mixed diets differing in concentrate proportion: Relative effects of inocula and substrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 1, p. 160–168, 2016.
- SIEGFRIED B. R.; RUCKEMANN H.; STUMPF, G. Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. **Landwirtschaft Forsch** v. 37, p. 298, 1984.
- SINGH, K. M. et al. Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. **MGENE**, v. 2, p. 191–199, 2014.
- SNEERINGER, S. et al. Economics of Antibiotic Use in U.S. **Livestock Production**. n. 200, p. 1–100, 2015.
- TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. v. 40, n. 3, p. 722–756, 1976.
- TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **J. Br. Grassl. Soc.** v. 18, p. 104–111, 1963.
- THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology** v. 3-4, n. 48, p. 185–197, 1994.
- THANNER;DRISSNER;WALSH. Antimicrobial resistance in Agriculture. **American society for microbiology**, v. 7, n. Microbial resistance, p. 1–7, 2016.
- UYENO, Y.; SHIGEMORI, S.; SHIMOSATO, T. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. **Microbes and environments / JSME**, v. 30, n. 2, p. 126–32, 2015.
- VALLEJO, L. H. et al. Effects of xylanase supplementation on feed intake, digestibility and ruminal fermentation in Rambouillet sheep. **Journal of Agricultural Science**, p. 1110–1117, 2016.
- WEIMER, P. J. et al. Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. p. 135–145, 2008.
- WEIMER, P. J. et al. Fiber digestion, VFA production, and microbial population changes during in vitro ruminal fermentations of mixed rations by monensin-adapted and unadapted microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 169, n. 1–2, p. 68–78, 2011.
- WEIMER, P. J. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 1–16, 2015.
- YANG, C. M. J. .; RUSSELL, J. B. Effect of Monensin. v. 59, n. 10, p. 3250–3254, 1993.
- ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50–56, 2012.
- ZEOULA, L. M. et al. Digestibilidade total e degradabilidade ruminal in situ de dietas

volumosas com inclusão de ionóforo ou probiótico para bubalinos e bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 2063, 2014.

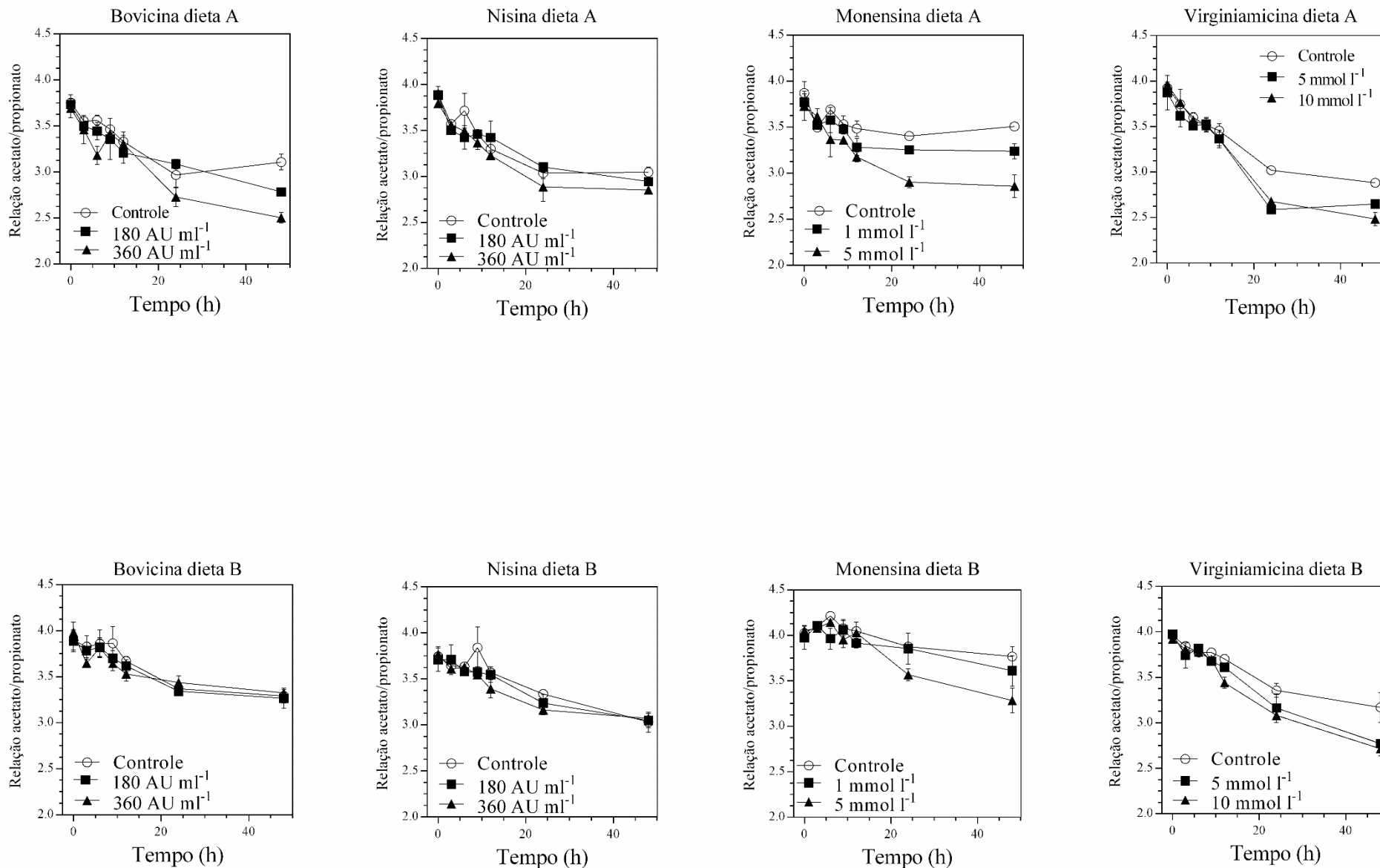
## CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A nisina, independente da dieta utilizada, não alterou o pH, as concentrações de butirato, e a digestibilidade *in vitro*. No entanto, quando concentrado foi adicionado à dieta, observou-se redução nas concentrações de metano e aumentando das concentrações de propionato. A bovicina HC5, independente da dieta, diminuiu as concentrações de metano e gases totais, aumentou as concentrações de propionato e não influenciou na concentração de acetato. Em dieta com adição de concentrado a bovicina HC5 não influenciou a digestibilidade, o pH, contudo aumentou as concentrações de amônia, reduziu as concentrações de metano e gases totais e aumentou as concentrações de propionato. O ionóforo monensina não influenciou o pH em ambas as dietas. Na dieta à base de silagem de milho, houve redução da digestibilidade, e das concentrações de amônia e gases totais. Monensina não influenciou as concentrações de metano e acetato, todavia aumentou as concentrações de propionato. Na dieta SMC não afetou a digestibilidade, concentração de amônia, de gases totais, de ácidos orgânicos e de propionato. No entanto, reduziu as concentrações de metano. O antibiótico virginiamicina, independente da dieta, não influenciou as concentrações de amônia e butirato, mas reduziu as concentrações de gases totais e metano. A virginiamicina aumentou o pH apenas na dieta SM. Além disso, reduziu a digestibilidade em uma dieta SM, contudo, aumentou a concentração de propionato na dieta SMC.

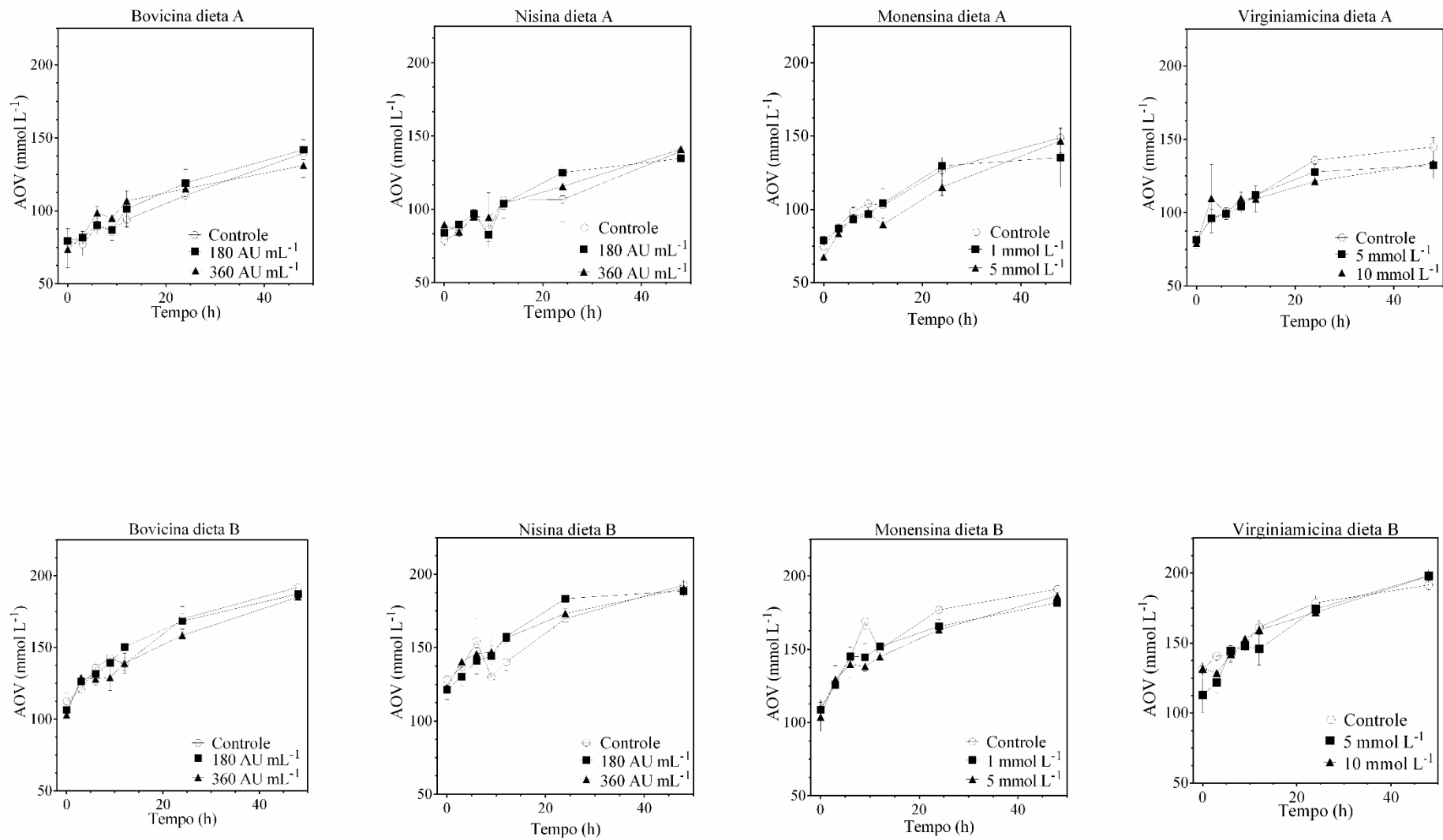
Este estudo demonstrou que as condições de incubação afetam a atividade de aditivos alimentares *in vitro* sendo os efeitos destes reduzidos quando não se utiliza diluição do líquido ruminal ou adição de substratos solúveis. Os resultados do presente estudo sugerem ainda que essas condições *in vitro* poderiam ser úteis para identificar inibidores que são potencialmente eficazes *in vivo*.



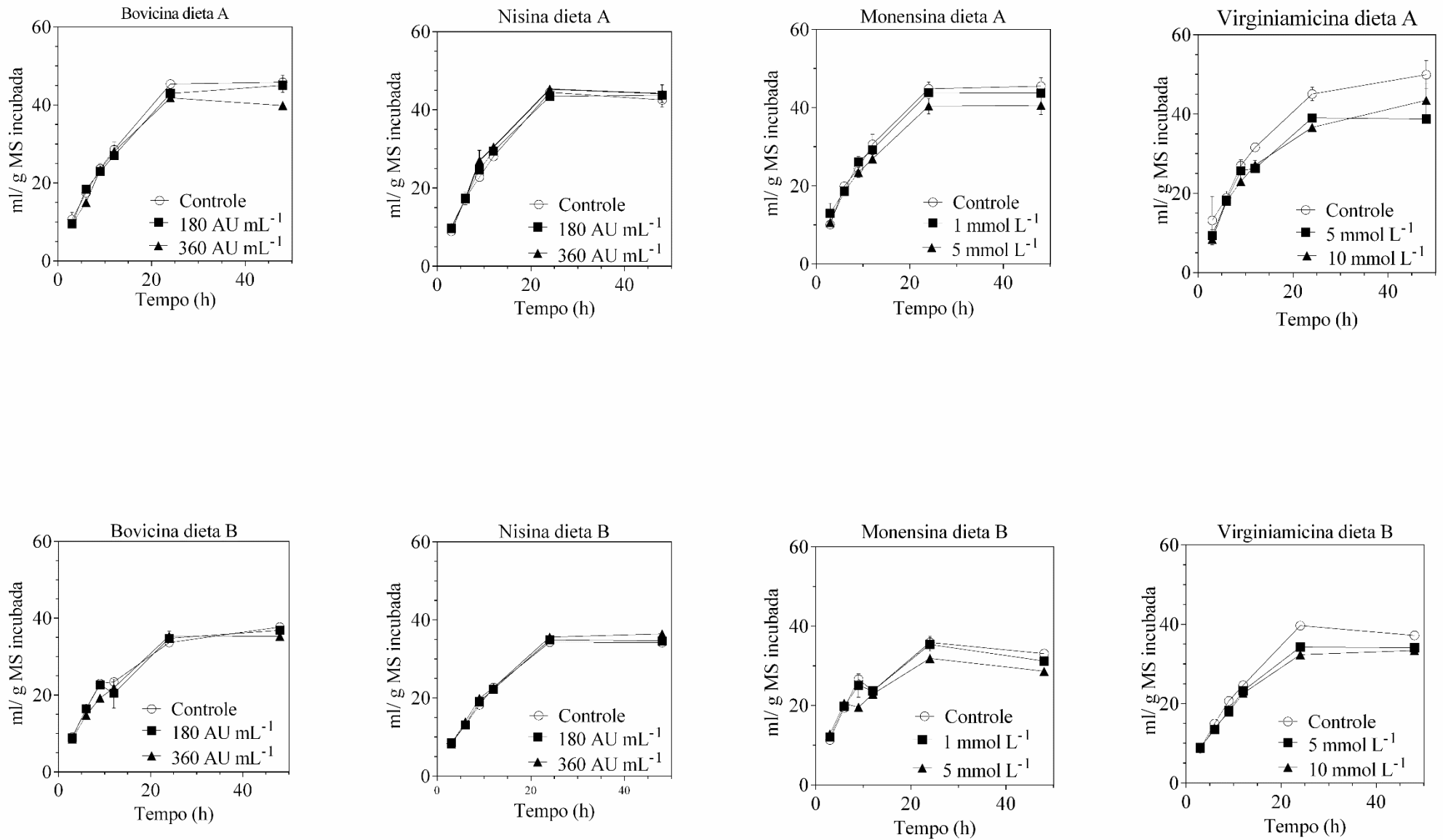
**Figura suplementar 1** Efeito de diferentes doses de bacteriocinas e antibióticos sobre a amônia ruminal durante os intervalos (0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h) de incubação, nas dietas A e B.



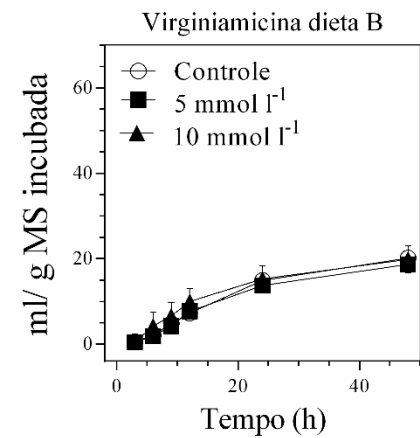
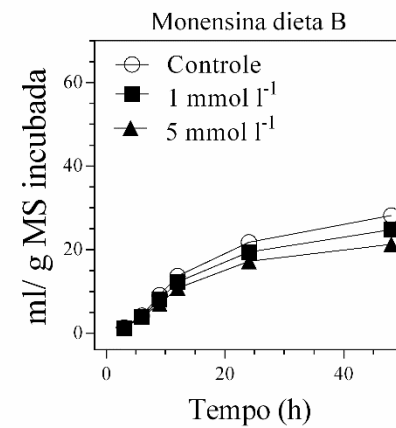
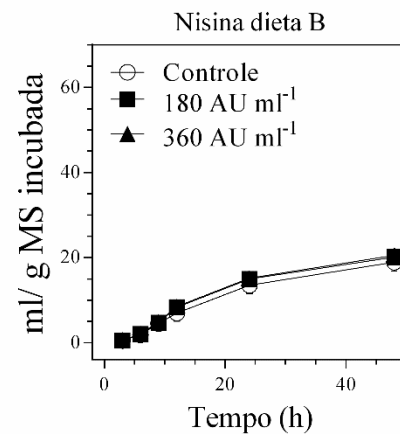
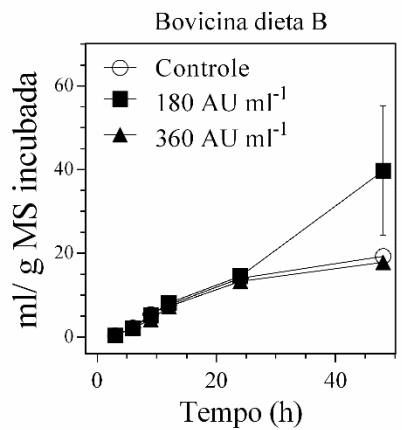
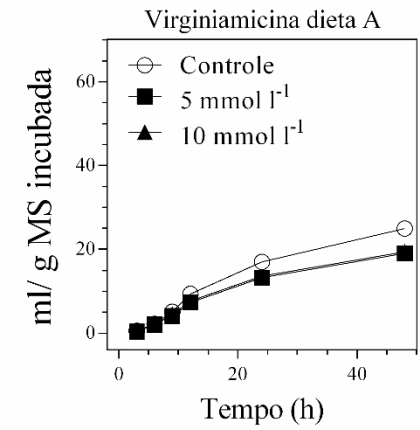
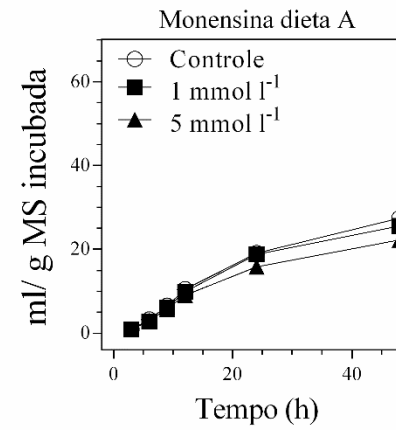
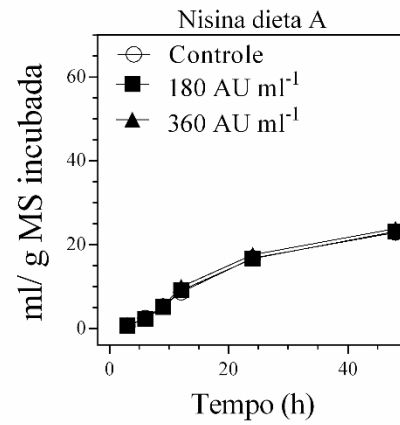
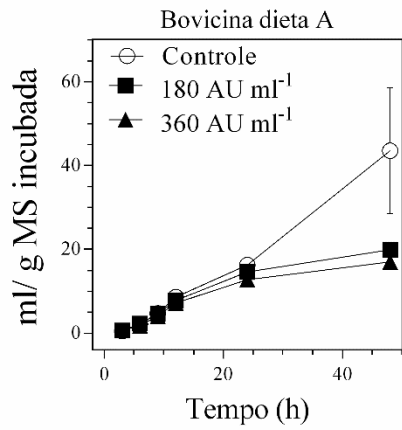
**Figura suplementar 2** Efeito de diferentes doses de bacteriocinas e antibióticos sobre a relação acetato:propionato durante os intervalos (0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h) de incubação, nas dietas A e B.



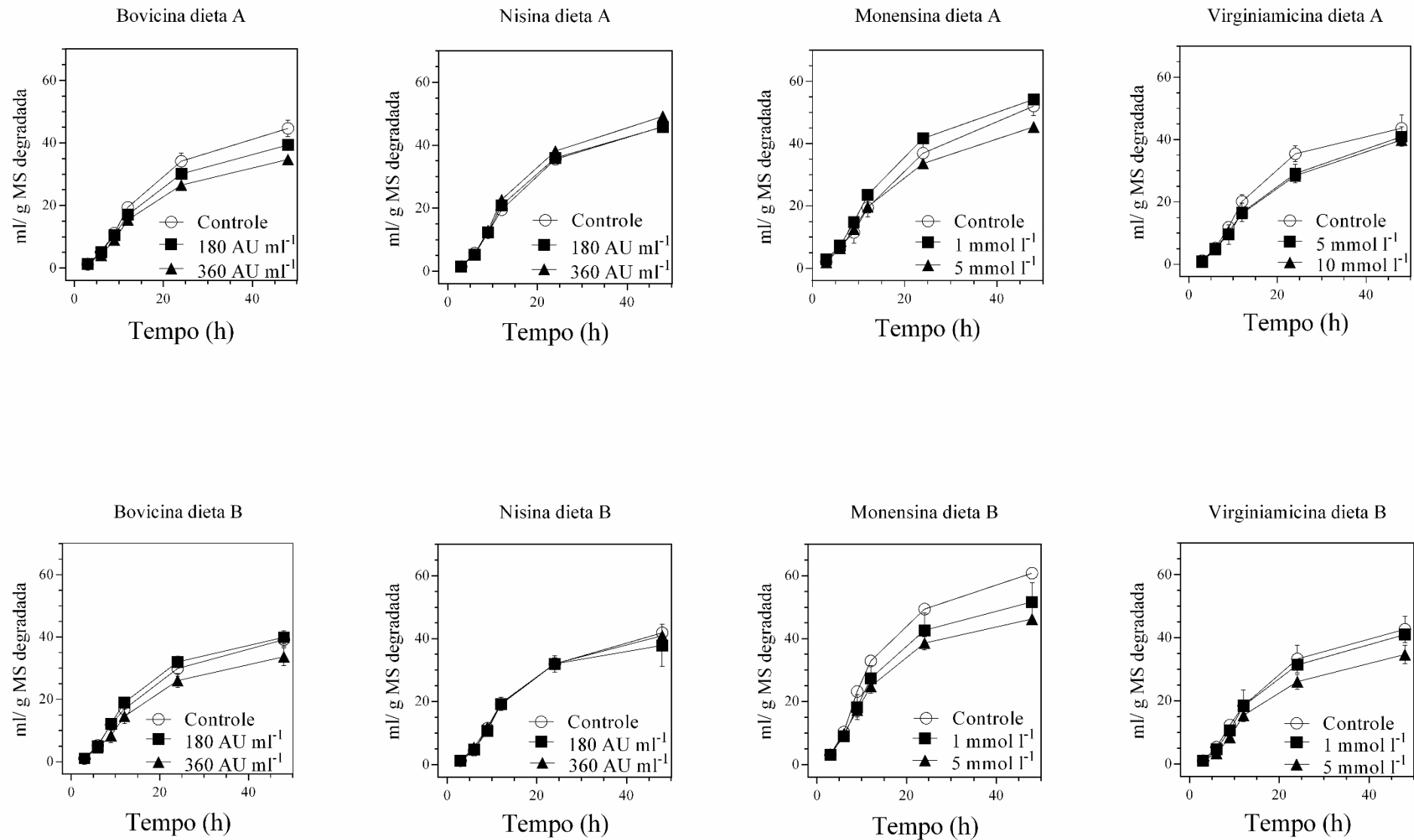
**Figura suplementar 3** Efeito de diferentes doses de bacteriocinas e antibióticos sobre as concentrações de ácidos orgânicos voláteis totais (AOV) durante os intervalos (0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h) de incubação, nas dietas A e B.



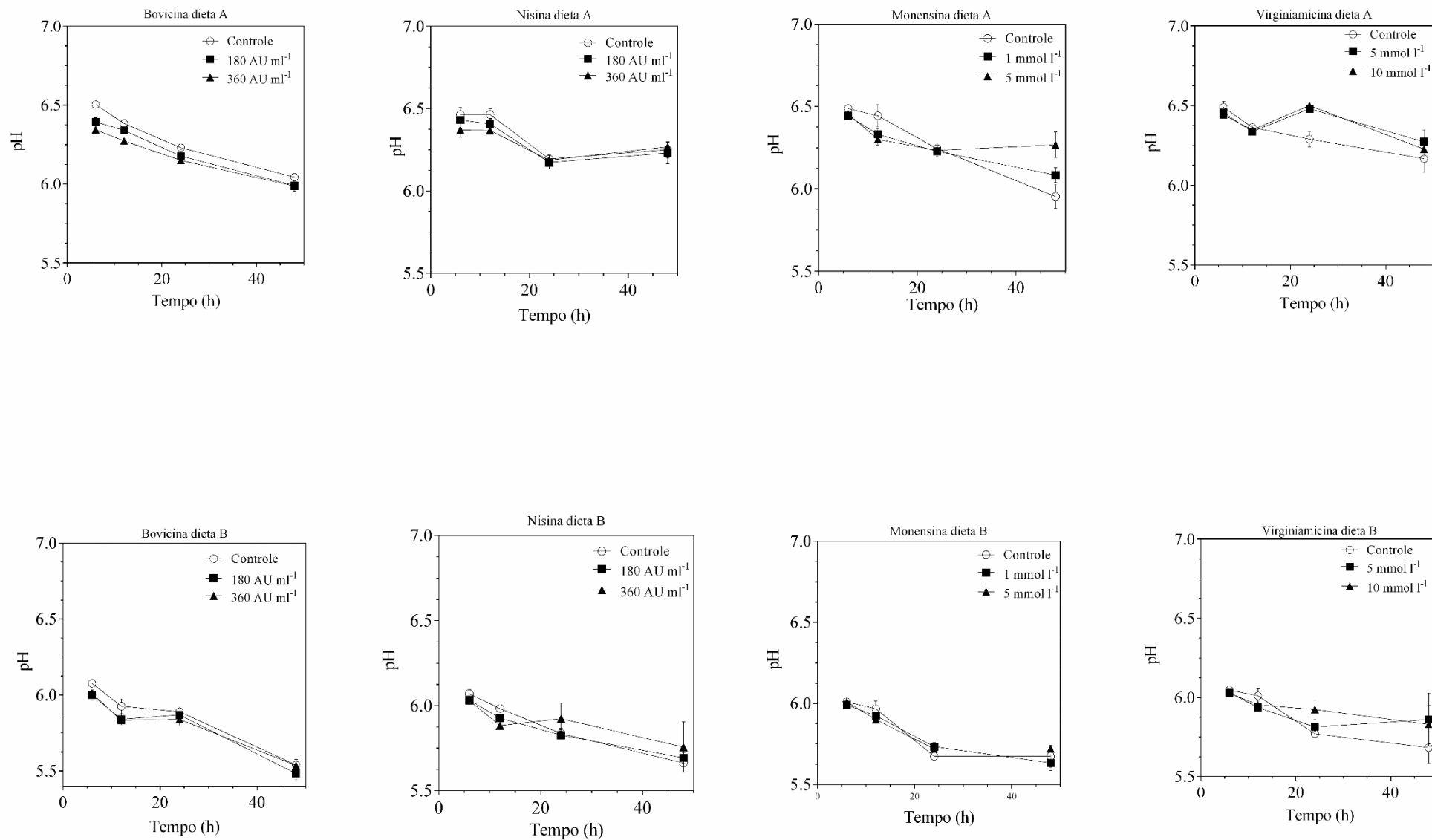
**Figura suplementar 4** Efeito de diferentes doses de bacteriocinas e antibióticos sobre o volume de gases totais durante os intervalos (0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h) de incubação, nas dietas A e B.



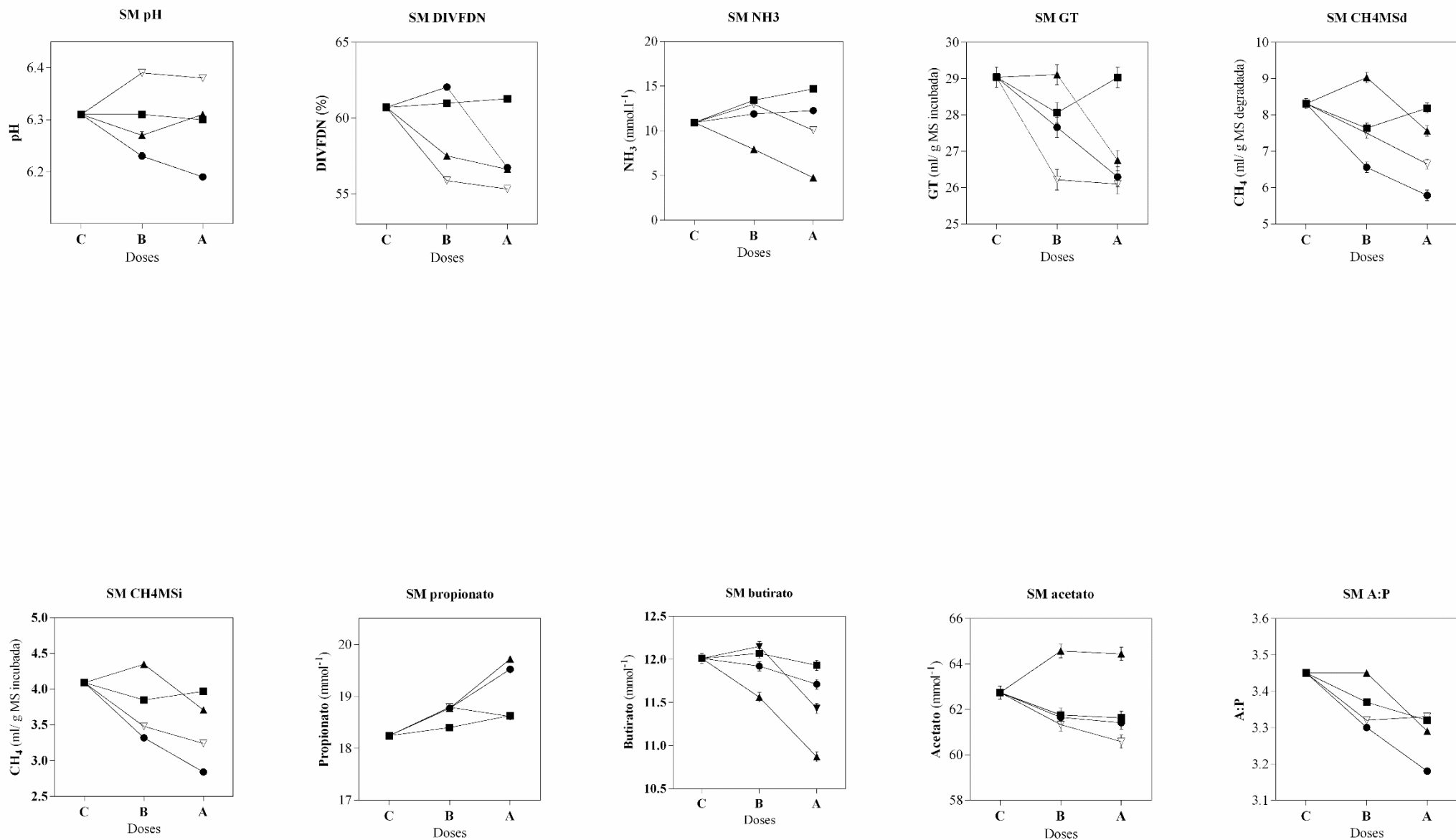
**Figura suplementar 5** Efeito de diferentes doses de bacteriocinas e antibióticos sobre o volume de metano com base na matéria seca incubada durante os intervalos (0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas) de incubação, nas dietas A e B.



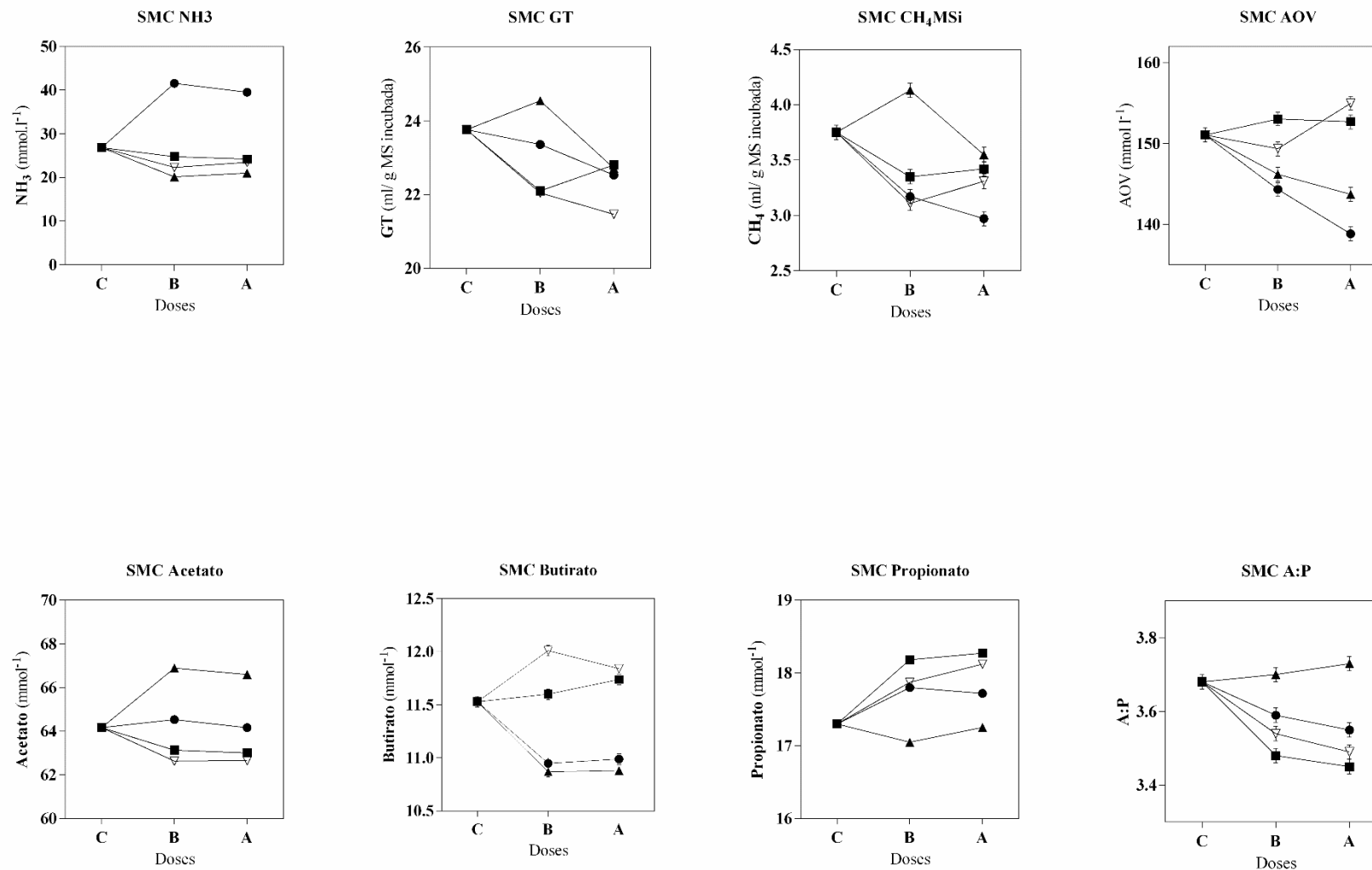
**Figura suplementar 6** Efeito de diferentes doses de bacteriocinas e antibióticos sobre o volume de metano liberado com base na matéria seca degradada durante os intervalos (0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h) de incubação, nas dietas A e B.



**Figura suplementar 7** Efeito de diferentes doses de bacteriocinas e antibióticos sobre o pH ruminal durante os intervalos (0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h) de incubação, nas dietas A e B.



**Figura suplementar 8** - Efeito de doses alta (A) e baixa (B) de bacteriocinas e antibióticos sobre o pH, DIVFDN, NH<sub>3</sub>, GT, CH<sub>4</sub>MSd, CH<sub>4</sub>MSi, propionato, butirato, acetato e A:P. (●) – Bovicina HC5; (■) – Nisina; (▲) – Monensina e (▽) – Virginiamicina. C – Controle; SM – silagem de milho.



**Figura suplementar 9** - Efeito de doses alta (A) e baixa (B) de bacteriocinas e antibióticos sobre o pH, DIVFDN, NH<sub>3</sub>, GT, CH<sub>4</sub>MSd, CH<sub>4</sub>MSi, propionato, butirato, acetato e A:P. (●) – Bovicina HC5; (■) – Nisina; (▲) – Monensina e (▽) – Virginiamicina. C – Controle; SMC – silagem de milho/sorgo e concentrado.