

**DESEMPENHO E EFICIÊNCIA ALIMENTAR
DE VACAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS
COM LEVEDURA VIVA**

LUCIENE LIGNANI BITENCOURT

2008

LUCIENE LIGNANI BITENCOURT

**DESEMPENHO E EFICIÊNCIA ALIMENTAR DE VACAS LEITEIRAS
SUPLEMENTADAS COM LEVEDURA VIVA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Doutor Marcos Neves Pereira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Bitencourt, Luciene Lignani.

Desempenho e eficiência alimentar de vacas leiteiras suplementadas
com levedura viva / Luciene Lignani Bitencourt. -- Lavras : UFLA, 2008.
58 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Bibliografia.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Digestibilidade. 3. Produção de leite. 4.
Consumo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.2142

LUCIENE LIGNANI BITENCOURT

**DESEMPENHO E EFICIÊNCIA ALIMENTAR DE VACAS LEITEIRAS
SUPLEMENTADAS COM LEVEDURA VIVA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 29 de fevereiro de 2008

Profª. Dra. Nadja Gomes Alves – UFLA

Prof. Dr. Ronaldo Braga Reis - UFMG

Prof. Dr. Sandro César Salvador – UFLA

**Prof. Doutor Marcos Neves Pereira
UFLA
(Orientador)**

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

Aos meus pais, José e Lúcia,

Ao meu irmão, Flávio, e

Ao meu sobrinho Mateus,

DEDICO.

“Para aqueles que acreditaram em mim quando eu não mais acreditava em mim
mesmo,

Para aqueles que com seu sorriso removeram a sombra do meu rosto,

Para aqueles que trocaram, sem regatear, sua alegria sincera pelos meus pesares,

Para aqueles cujo amor e cujo riso me deram asas e um céu azul para voar,

Para aqueles por quem minha gratidão será sempre pequena, nesta vida ou na
próxima

Para meus amigos”,

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar a chance de atingir mais um objetivo nesta vida.

Aos meus pais, José e Lúcia, pela dedicação infinita em me educar para o bem, pelo amor e paciência, pelos ensinamentos de vida, por entenderem a necessidade da distância, e por tudo que me oferecem e por mim fazem.

Ao meu irmão, Flávio, pelo extraordinário significado que tem em minha vida, por todas as portas abertas que auxiliaram minha formação acadêmica, pela contribuição e apoio em mais esta etapa importante do meu crescimento e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao meu orientador, professor Marcos Neves Pereira, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos sobre o fascinante mundo da nutrição de bovinos leiteiros, e pela maestria com que executou seu papel de orientador, contribuindo para a qualidade final desta dissertação.

À minha co-orientadora, professora Nadja Gomes Alves, pela amizade e carinho, pelo apoio e incentivo, pelos sábios conselhos, pela confiança no meu trabalho e por todas as oportunidades a mim oferecidas.

À Universidade Federal de Lavras, por meio do Departamento de Zootecnia, por permitir a realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Ouro Fino Saúde Animal, pelo financiamento deste projeto.

Ao amigo José Ricardo e à sua esposa Edinha, pelo carinho com que me receberam e por me acolherem como mais um membro de sua família. Obrigada pela amizade, pelo indispensável auxílio durante a condução do experimento e realização das análises estatísticas e pela presença constante nessa importante etapa.

A todos os integrantes do Grupo do Leite, pela imensa colaboração na realização do experimento e sem os quais seria impossível a apresentação deste trabalho.

Ao bolsista Gilson, pela dedicação ao enorme trabalho de produção dos dados aqui relatados.

Aos colegas de pós-graduação, Flávio, Leandra, Bruno e Junio, pela agradável convivência, ajuda e enriquecimento da minha formação através de suas experiências.

Aos amigos, eternos irmãos de coração, Andréa, Bruno e Márcio, por se fazerem presentes, apesar do tempo e da distância teimarem em nos afastar, por estarem incondicionalmente ao meu lado e me incentivarem, mesmo nas mais absurdas empreitadas.

À amiga Fabiana, pelos reagentes que contribuíram para realização das análises laboratoriais, pela ajuda na formatação final deste trabalho, pela amizade eterna e por sempre estar do lado da linha disposta a me ouvir.

Às amigas Priscila, Fernandinha, Rafaella e Marina pelo carinho, incentivo e presença constantes, ainda que estejamos separadas por algumas milhas de distância.

Aos funcionários da Fazenda São Francisco, César, José Carlos e Alexandre, e ao gerente Flávio Neves Pereira, pela ajuda e agradável convívio durante o transcorrer da minha estadia por lá.

Aos professores Antônio Marcos e João Bosco pela presteza em todos os momentos em que precisei de equipamentos de seus laboratórios.

Ao meu fiel companheiro Ted, pela presença durante toda redação deste trabalho, mesmo sem entender uma palavra.

Às vacas Ada, Aline, Aranda, Áurea, Barbie, Beauty, Bell, Celebridade, Cissa, Farra, Flora, Ivory, Jackie, Katherine, Manhã, Nara, Paris, Poema, Udelline e Vitória, que mesmo sem saber, doaram parte de suas vidas à ciência, o meu profundo respeito e admiração.

A todos os tios, tias, primos e primas, que acreditaram no meu potencial, me incentivaram, apoiaram e rezaram por mim.

A todos que, em algum momento e de alguma forma, tenham contribuído com esta empreitada.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 “Direct-fed microbials” versus probióticos	3
2.2 Leveduras	4
2.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.2.2 Cultura de levedura	5
2.3 Ação do <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no rúmen	6
2.3.1 Anaerobiose	6
2.3.2 Fatores de crescimento	7
2.3.3 Concentração de lactato	8
2.3.4 pH ruminal	11
2.3.5 Proteólise e concentração ruminal de amônia	13
2.3.6 Consumo de elétrons e metanogênese	14
2.3.7 Digestibilidade da fibra	19
2.3.8 Fluxo de proteína microbiana do rúmen	22
2.3.9 Perfil de fermentação.....	23
2.4 Resposta animal	25
2.4.1 Consumo de matéria seca.....	25

2.4.2 Produção de leite	27
2.4.3 Secreção de sólidos do leite	30
2.5 Outras respostas à suplementação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
2.5.1 Resposta Imune	32
2.5.2 Desenvolvimento ruminal em bezerros	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5 CONCLUSÕES	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

RESUMO

BITENCOURT, Luciene Lignani. **Desempenho e eficiência alimentar de vacas leiteiras suplementadas com levedura viva**. 2008. 58 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O desempenho e a utilização de nutrientes por vacas leiteiras suplementadas com *Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077 (Lallemand SAS, França) foram avaliados. Vinte vacas Holandesas, com média de 143±49 dias em lactação no início do experimento, formaram dez blocos com base na produção de leite e foram aleatoriamente alocadas a uma sequência de dois tratamentos, em delineamento de reversão simples, com períodos de 28 dias. Mensurações foram realizadas na quarta semana de cada período. Os tratamentos foram: 10 g do produto Natucell (Ouro Fino Saúde Animal, Brasil), capaz de propiciar 1×10^{10} ufc de leveduras vivas, ou a mesma quantidade de placebo. Os tratamentos foram alocados sobre a dieta total de cada vaca. A composição da dieta foi (% MS): Silagem de milho (43,9), feno de tifton (2,0), milho floculado (14,4), polpa cítrica peletizada (16,9) e farelo de soja (21,7). O teor de proteína bruta da dieta foi 16,8%, FDN foi 30,9% e CNF foi 41,0% da MS. Os dados foram analisados com um modelo contendo os efeitos de bloco, vaca dentro de bloco, período e tratamento. A suplementação com leveduras aumentou as produções diárias de leite (29,4 vs. 28,5 kg, $P=0,11$), proteína (0,919 vs. 0,884 kg, $P=0,05$) e lactose (1,265 vs. 1,212 kg, $P=0,06$), e não teve efeito sobre a gordura do leite ($P=0,53$). O consumo diário de matéria seca foi 21,4 kg com leveduras e 20,7 no controle ($P=0,11$). A digestibilidade aparente da FDN no trato digestivo total foi 48,1% com leveduras e 43,2% para o controle ($P=0,08$). Houve aumento no consumo de matéria orgânica digestível com a suplementação de leveduras ($P=0,07$). Os parâmetros descrevendo a fermentação e os microorganismos do rúmen não variaram entre os tratamentos. A concentração de derivados purínicos na urina foi numericamente aumentada pela suplementação com leveduras ($P>0,20$). A resposta positiva em desempenho à suplementação com leveduras vivas parece ter sido resultado da melhor digestibilidade da dieta.

¹ **Comitê Orientador:** Prof. Marcos Neves Pereira – UFLA (Orientador), Prof^ª. Nadja Gomes Alves – UFLA, Prof^ª. Adriana de Souza Coutinho – UFLA.

ABSTRACT

BITENCOURT, Luciene Lignani. **Performance and feed efficiency of lactating cows supplemented with live yeast.** 2008. 58 p. Dissertation (Master in Animal Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.²

Performance and nutrient utilization of dairy cows supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* strain CNCM I-1077 (Lallemand SAS, France) were evaluated. Twenty Holsteins, averaging 143±49 days in lactation at the beginning of the trial, formed ten blocks based on milk yield and were randomly assigned to a sequence of two treatments, in a cross-over design, with 28-day periods. Measurements were performed on the fourth week of each period. Treatments were: 10 g of the product Natucell (Ouro Fino Saúde Animal, Brazil) capable of providing 1x10¹⁰ cfu of live yeast or the same amount of placebo. Treatments were fed daily by allocation to each cow over the individually fed TMR. Diet composition was (% of DM): Corn silage (43.9), tifton hay (2.0), steam-flaked corn (14.4), pelleted citrus pulp (16.9), and soybean meal (21.7). Diet crude protein content was 16.8%, NDF was 30.9%, and NFC was 41.0% of DM. Data was analyzed with a model containing the effects of block, cow within block, period and treatment. Yeast supplementation increased daily milk (29.4 vs. 28.5 kg, *P*=0.11), protein (0.919 vs. 0.884 kg, *P*=0.05) and lactose yields (1.265 vs. 1.212 kg, *P*=0.06), and had no effect on milk fat (*P*=0.53). Daily dry matter intake was 21.4 kg with yeast and 20.7 for the control (*P*=0.11). Total tract apparent digestibility of the NDF was 48.1% with yeast and 43.2% for the control (*P*=0.08). There was a increased intake of digestible organic matter with yeast supplementation (*P*=0.07). Rumen fermentation and microbial parameters did not change between treatments. The concentration of purine derivatives in urine was numerically increased by yeast supplementation (*P*>0.20). The positive performance response to live yeast supplementation may have been the result of better diet digestibility.

² **Guidance Committee:** Prof. Marcos Neves Pereira – UFLA (Advisor), Profª. Nadja Gomes Alves – UFLA, Profª. Adriana de Souza Coutinho – UFLA

1 INTRODUÇÃO

O rúmen é um ecossistema aberto, no qual o alimento consumido pelo animal é continuamente transformado em ácidos graxos voláteis e massa microbiana, as principais fontes de energia e proteína para o ruminante. As interações entre as espécies de microorganismos do rúmen e o ruminante são exemplos mais perfeitos e complexos da possibilidade de simbiose entre seres vivos (Russell, 2002). No entanto, as práticas alimentares necessárias para atender a alta demanda nutricional de ruminantes de alto desempenho são um novo desafio à microflora ruminal (Pereira, 2005). A manipulação da fermentação ruminal é uma rota capaz de aumentar a eficiência digestiva nestes animais (Weimer, 1998).

A suplementação dietética de aditivos microbianos pode aumentar a eficiência digestiva de ruminantes (Wallace, 1994). Estes probióticos são uma alternativa atraente relativamente ao uso de promotores de desempenho químicos por serem mais coerentes à tendência “naturalista” do mercado consumidor. A suplementação com cepas específicas de leveduras vivas pode aumentar o consumo de matéria seca (Wohlt et al., 1991; Erasmus et al., 1992) e a produção de leite (Williams et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Piva et al., 1993). O principal mecanismo pelo qual estes microorganismos exercem efeito positivo sobre o desempenho animal parece estar associado à atuação sobre a função ruminal (Dawson et al., 1990).

As respostas observadas quanto ao uso de leveduras são dependentes da dosagem, do tipo de microorganismo, da dieta basal e do manejo alimentar adotado (Newbold et al., 1995). As leveduras disponíveis no mercado variam quanto a espécie e cepa, número de células vivas e tipo do meio de crescimento

utilizado (Erasmus et al., 1992), não sendo, provavelmente, correto assumir que todas induzem resposta idêntica sobre o ambiente ruminal (Callaway & Martin, 1997). A eficácia em ruminantes de cepas produzidas industrialmente deve ser comprovada experimentalmente.

Estudos *in vitro* utilizando *Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077 têm demonstrado a habilidade desta levedura de melhorar o ambiente ruminal (Michalet-Doreau & Morand, 1997), estimular a população microbiana (Michalet-Doreau et al., 1997) e aumentar a digestão da fibra (Chaucheyras-Durand, 2001). A resposta em desempenho de vacas leiteiras à suplementação com esta levedura pode ser positiva (Chevaux et al., 2002; Sniffen et al., 2004). O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 sobre o desempenho e a eficiência alimentar de vacas leiteiras alimentadas com dietas baseadas em silagem de milho, alta inclusão de polpa cítrica peletizada e baixo teor de amido oriundo do concentrado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 “Direct-fed microbials” versus probióticos

A utilização de probióticos na alimentação de animais de produção foi inicialmente baseada na possibilidade de efeito benéfico sobre o trato digestivo inferior, por favorecer o estabelecimento de uma microflora intestinal mais desejável, capaz de prevenir a sua colonização por microorganismos patogênicos (Krehbiel, 2003). Mais recentemente, tem sido demonstrado que alguns probióticos podem atuar benéficamente sobre o ambiente ruminal (Martin & Nisbet, 1992; Newbold et al., 1996).

Os probióticos podem ser definidos como suplementos alimentares microbianos vivos que afetam de maneira benéfica o animal hospedeiro por melhorar sua flora microbiana intestinal (Fuller, 1989). Segundo Vanbelle et al. (1990), a maioria dos pesquisadores assume que o termo probiótico se refere a um produto com quantidades significativas e viáveis de bactérias lácticas.

Em 1989, o FDA norte-americano recomendou que a utilização do termo “direct-fed microbial” (DFM) seria mais correta que a de probióticos. O FDA define como DFM uma fonte viva (viável) de microorganismos de ocorrência natural (Martin & Nisbet, 1992). Os microorganismos utilizados como DFM para ruminantes incluem fungos e bactérias. Entretanto, leveduras comerciais nem sempre são uma fonte viva de microorganismos.

2.2 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares eucariontes, isto é, organismos com núcleo organizado, pertencentes ao Reino Protista. Por serem organismos aclorofilados, são heterótrofos. Estes podem viver tanto na presença como na ausência de oxigênio, reproduzindo-se rapidamente quando o meio é rico em oxigênio (Tortora et al., 2000). São de ocorrência natural dentro do rúmen (Lund, 1974). Seu crescimento ótimo se dá a uma temperatura de 25°C, ou seja, abaixo da temperatura do fluido ruminal, ao redor de 39°C. A limitada reprodução destes microorganismos dentro do rúmen sugere que as leveduras nele presentes são membros transitórios do fluido, sendo continuamente introduzidos pela alimentação.

2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Apesar de cepas de *Aspergillus oryzae* serem comercializadas para ruminantes (Amaferm, BioZyme Enterprises, Inc., St. Joseph, EUA), a levedura mais utilizada na alimentação animal é o *Saccharomyces cerevisiae* (Martin & Nisbet, 1992). Esta espécie de levedura é comumente encontrada no ambiente ruminal e, como o próprio nome indica, é uma ativa fermentadora de carboidratos (Lund, 1974). A temperatura e a composição química do fluido ruminal tendem a ser inibitórios para o crescimento do *Saccharomyces cerevisiae* (Wallace & Newbold, 2007). Entretanto, apesar de não se reproduzirem no ambiente ruminal, as leveduras retêm sua atividade metabólica e viabilidade (Newbold et al., 1996).

Por não ser capaz de colonizar o trato digestivo, o *Saccharomyces cerevisiae* necessita ser constantemente introduzido com o alimento.

Chaucheyras-Durand et al. (1998) demonstraram que o número de células viáveis de levedura reduz drasticamente no fluido ruminal 30 horas depois de cessada a suplementação. Estes autores relataram, ainda, que de 17 a 34% das células de leveduras permanecem vivas durante seu trânsito pelo trato gastrointestinal.

No Instituto Luis Pasteur, na França, encontram-se registradas mais de duas mil cepas de leveduras. As cepas diferem quanto às propriedades físico-químicas, o que confere a elas propriedades metabólicas distintas. Existem leveduras que metabolizam quantidades elevadas de açúcares, outras que toleram altos níveis de sal, assim como cepas que são mais sensíveis às altas temperaturas. Resistência a antibióticos e capacidade respiratória também são características de algumas cepas. As diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* diferem na sua habilidade de promover mudanças na fermentação ruminal, havendo, assim, cepas tidas como específicas para ruminantes (Newbold et al., 1995).

2.2.2 Cultura de levedura

A cultura de levedura é o produto composto por células vivas de leveduras e seu meio de crescimento, desidratado de uma maneira que permita preservar a capacidade fermentativa desses microorganismos (Association of American Feed Control Officials, 1997). Normalmente os suplementos comerciais são constituídos pela cultura de levedura, constituída por uma única cepa e um número variável de células viáveis (ufc/g) (Wallace & Newbold, 2007). Entretanto, alguns produtos são compostos por leveduras mortas e seu mecanismo de ação não envolve a atividade metabólica das leveduras no ambiente ruminal (Diamond V, Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA). Nas culturas de leveduras inativas a ação é mediada pelos metabólitos do processo

fermentativo gerados industrialmente, e que podem estar presentes nos organismos ou no meio de cultivo.

2.3 Ação do *Saccharomyces cerevisiae* no rúmen

Alguns mecanismos de ação têm sido descritos para explicar os efeitos que as culturas de *Saccharomyces cerevisiae* exercem sobre a microbiota do rúmen e a produção animal. Wallace (1994) propôs um modelo sugerindo que as respostas em consumo e desempenho animal induzidas por leveduras são mediadas por alterações na fermentação ruminal e na digestão.

2.3.1 Anaerobiose

Apesar de o rúmen ser considerado um ambiente anaeróbico, algum oxigênio é carregado quando do consumo de alimentos, ruminação ou ingestão de água (Scott et al., 1983). A presença de O₂ no rúmen pode inibir o crescimento de bactérias estritamente anaeróbicas (Rose, 1987) e o O₂ adsorvido às partículas alimentares pode prejudicar a adesão de bactérias celulolíticas à celulose (Roger et al., 1990).

A remoção do O₂ presente no ambiente ruminal, pela atividade respiratória das leveduras, pode elevar o número de bactérias anaeróbicas no fluido ruminal, principalmente bactérias celulolíticas (Wallace & Newbold, 2007), entretanto existe pouca informação na literatura sobre quanto a atividade respiratória das leveduras varia entre as diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Newbold et al. (1996) estimaram que a capacidade de consumo de oxigênio das cepas NCYC 240 e NCYC 1026 seria de $155 \pm 20,8$ $\mu\text{mol/min/g}$.

Newbold et al. (1996) adicionaram quatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, NCYC 240, NCYC 1026, NCYC 694, NCYC 1088, ao fluido ruminal *in vitro*, na concentração de 1,3 mg/ml, e observaram que as cepas NCYC 240 e NCYC 1026 aumentaram a taxa de desaparecimento de O₂ em 46 e 89%, respectivamente, e estimularam o crescimento de bactérias relativamente ao controle. As cepas NCYC 694 e NCYC 1088, que não foram capazes de afetar a utilização de O₂, também não alteraram o número de bactérias, sugerindo que o consumo de O₂ é um mecanismo pelo qual leveduras podem estimular o crescimento da população microbiana no rúmen.

2.3.2 Fatores de crescimento

As leveduras poderiam afetar o crescimento microbiano no rúmen pela secreção de compostos químicos no fluido ou pela presença dos mesmos no meio de cultivo e nos microorganismos produzidos industrialmente. Tem sido proposto que ácidos orgânicos, principalmente malato, vitaminas, em especial as do complexo B, e aminoácidos atuam como fatores de crescimento capazes de estimular a microbiota do rúmen (Nisbet & Martin, 1991).

Callaway & Martin (1997) postularam que a síntese microbiana de vitamina B e ácidos orgânicos seria satisfatória para suprir a exigência por estes nutrientes para o animal e para os microorganismos. No entanto, esta síntese pode não ser constante entre as diferentes dietas. Sendo assim, o fornecimento de leveduras promoveria uma maior concentração desses fatores solúveis, estimulando a síntese microbiana.

Newbold et al. (1996) observaram que houve produção de malato por células de *Saccharomyces cerevisiae* cepa NCYC 240 incubadas *in vitro*. A concentração inicial de malato no fluido ruminal subiu de 10 para 25,5 mg/l depois de 2 horas, equivalente a 12,8 mg de malato/g de levedura incubada. A

centrifugação e remoção das células de leveduras do fluido ruminal resultaram em diminuição na concentração de ácido málico, indicando que o malato estava majoritariamente presente dentro das células.

Newbold et al. (1996) também avaliaram os efeitos da levedura e do ácido málico sobre a população microbiana ruminal *in vivo*. Quatro ovelhas adultas fistuladas no rúmen foram utilizadas em delineamento do tipo Quadrado Latino 4x4, com períodos de 18 dias. Os animais foram alimentados com 0,85 kg de cevada e 0,55 kg de feno de gramínea e os tratamentos foram: Controle não suplementado, 4 g/dia de *Saccharomyces cerevisiae* cepa NCYC 240, 50 mg/d de malato misturada à cevada ou infusão ruminal de 100 mg/d de malato, de forma a simular uma possível liberação contínua de ácido málico no fluido ruminal por células lisadas de leveduras. A suplementação com leveduras vivas aumentou em 39% o número total de bactérias por ml de fluido. Houve tendência de aumento na população de bactérias celulolíticas com a adição de *Saccharomyces cerevisiae* e ácido málico à dieta. Efeitos benéficos do malato sobre a fermentação ruminal têm sido relatados quando quantidades maiores do que aquelas supridas pela adição de leveduras à dieta são utilizadas (Kung et al., 1982; Martin & Streeter, 1995).

2.3.3 Concentração de lactato

A *Selenomonas ruminantium* é uma bactéria gram-negativa comumente encontrada no ambiente ruminal e pode representar 51% do total de bactérias viáveis encontradas no rúmen (Caldwell & Bryant, 1966), podendo crescer sob condições dietéticas diversas e fermentar diferentes tipos de carboidratos solúveis (Hungate, 1966). Linehan et al. (1978) mostraram que *S. ruminantium* requer aspartato, CO₂, ácido pentabenzóico e biotina para seu crescimento em meio contendo lactato. A demanda por aspartato pode ser suprida por malato ou

fumarato. Malato e fumarato são intermediários da rota do ácido decarboxílico, responsável pela conversão de piruvato em propionato, via succinato, presente em *S. ruminantium* (Russell, 2002).

O crescimento e a conseqüente multiplicação celular de *S. ruminantium* a partir de malato ou fumarato parecem estar associados à síntese de ATP quando fumarato é reduzido a succinato, em reação catalizada pela enzima fumarato redutase (Melville et al., 1988). Além disso, a conversão de malato a fumarato, e posteriormente a succinato, consome elétrons. O consumo de H₂ nesta reação possibilita o aumento da conversão de lactato em piruvato. *S. ruminantium* foi incapaz de metabolizar lactato na presença de H₂ (Martin & Park, 1996). Este fato sugere que a oxidação de lactato a piruvato, catalizada pela enzima lactato desidrogenase, é limitada pelo acúmulo de equivalentes redutores no meio. O fato de *S. ruminantium* produzir ATP e consumir elétrons a partir de malato como substrato propicia a oxidação de lactato a piruvato, sem penalizar a disponibilidade de energia para crescimento microbiano. O estímulo do crescimento da *S. ruminantium* poderia prevenir o acúmulo excessivo de lactato no ambiente ruminal.

Nisbet & Martin (1991) adicionaram 0, 10, 25, 50 e 100 µl/ml de extratos aquosos de leveduras autoclavadas (Yea-Sacc, *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026, Alltech, Nicholasville, EUA) e observaram que a utilização de lactato por *S. ruminantium* foi estimulada, assim como seu crescimento comparativamente ao grupo controle. Quando a levedura autoclavada foi adicionada ao meio de cultura contendo lactato, e sem a presença de *S. ruminantium*, não foi observada metabolização do ácido láctico. O teor de malato no extrato aquoso de levedura foi 4,9 mM, logo o tratamento com 10 µl/ml resultou em 0,490 mM de malato no meio de cultura. Concentrações similares de ácido málico também foram adicionadas ao meio de cultura contendo lactato, e foram capazes de estimular a metabolização deste substrato

por *S. ruminantium*, sendo que a maior atividade do microorganismo foi observada com 10 mM de malato.

O *Saccharomyces cerevisiae* é um ativo fermentador de carboidratos (Lund, 1974). Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade deste microorganismo de competir com *Streptococcus bovis* por substrato rapidamente fermentável (Chaucheyras et al., 1996). Quando *S. bovis* foi incubado na ausência de leveduras em meio contendo glicose, a concentração de lactato alcançou 16 mM após 5 horas de incubação. A adição de leveduras autoclavadas ao meio não alterou a concentração de lactato. A concentração de lactato foi reduzida em 54% quando *S. bovis* foi cultivado em presença de células vivas de *Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077. A glicose presente na monocultura de *S. bovis* foi completamente utilizada em 30 minutos, enquanto a utilização na monocultura de *Saccharomyces cerevisiae* ocorreu em 15 minutos. A rápida capacidade de consumo de carboidratos pelas leveduras poderia reduzir a disponibilidade de substrato para crescimento de *S. bovis*, potencialmente capaz de reduzir a ocorrência de acidose ruminal aguda, caracterizada por consumo de quantidade “tóxica” de carboidratos rapidamente fermentáveis e produção de ácido láctico (Barker et al., 1995).

O ácido láctico não é utilizado como substrato pelo *Saccharomyces cerevisiae* (Panchal et al., 1984); entretanto, a suplementação de leveduras parece ser capaz de reduzir a concentração de lactato no rúmen (Williams et al., 1991), talvez pela estimulação de bactérias utilizadoras de lactato ou pela limitação da produção de lactato por bactérias produtoras de ácido láctico, através da competição por substrato (Nisbet & Martin, 1991; Chaucheyras et al. 1996).

2.3.4 pH ruminal

Tem sido também postulado que leveduras atuam mantendo o pH ruminal mais estável ao longo do dia (Martin & Nisbet, 1992). Bach et al. (2007) observaram que o pH ruminal médio, mensurado a cada quinze minutos por oito dias, foi 6,02 em vacas lactantes suplementadas com 5 g de leveduras vivas (Levucell SC, 1×10^{10} ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077; Lallemand, Toulouse, França) e 5,51 nos animais não suplementados. Os animais foram alimentados com uma mistura de forragens e concentrados *ad libitum* e mais 3 kg de concentrado nas duas ordenhas diárias. A queda no pH observada entre as ordenhas foi maior nos animais não suplementados, bem como o tempo diário de pH ruminal abaixo de 5,6 e 6,0. A suplementação com leveduras também aumentou a frequência diária de refeições.

Erasmus et al. (1992) observaram que a suplementação de vacas leiteiras com 10 g de leveduras (Yea-Sacc, $2,04 \times 10^9$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026; Alltech, Nicholasville, EUA) induziu aumento numérico no pH ruminal mensurado a cada oito horas durante quatro dias. O tratamento com levedura também reduziu a concentração média de ácido láctico no rúmen e induziu um menor pico no teor de lactato. Os animais, alimentados duas vezes ao dia, receberam uma dieta com 25% de palha de trigo, 10% de feno de alfafa, 10% de sorgo moído, 32,8% de milho moído e 5% de farinha de peixe. Williams et al. (1991) também relataram que a suplementação com Yea-Sacc na dosagem de 7,5 g/d aumentou o pH ruminal de garrotes e atribuíram esse resultado a uma menor concentração de lactato no fluido ruminal (1,43 vs. 3,55 mM). Os animais, pesando cerca de 200 kg de peso vivo, foram alimentados com 2 kg de cevada e 2 kg de feno de gramínea fornecidos em conjunto em duas alimentações diárias.

Brossard et al. (2004) alimentaram cordeiros com uma dieta contendo 40% de feno de alfafa e 60% de trigo, com teor de amido de 41% na matéria seca. Os animais foram suplementados com 2 g/d de cultura de levedura (Levucell SC, 4×10^{10} ufc de *Saccharomyces cerevisiae*, Lallemand, Toulouse, França). A suplementação com levedura induziu aumento na população de protozoários no rúmen e no pH ruminal. Não houve diferença entre tratamentos no número de bactérias utilizadoras de lactato e nem na concentração ruminal de lactato. Os autores argumentaram que o efeito estabilizador do pH ruminal do *Saccharomyces cerevisiae* foi mediado pela estimulação dos protozoários, capazes de fagocitar grânulos de amido, competindo com as bactérias amilolíticas por substrato e tornando a degradação deste substrato mais lenta no rúmen (Bonhomme, 1990). Plata et al. (1994) também observaram aumento no número total de protozoários quando garrotes foram suplementados com 10 g de leveduras (Procreatin-7, $1,5 \times 10^{10}$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*/g; SAF AGRI, Quincy, IL).

Entretanto, a suplementação com 50 g de premix contendo 0,5 g de *Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077 (6×10^8 ufc/g de premix) para vacas leiteiras consumindo dieta composta por 60% de silagem de alfafa e 40% de concentrados não induziu aumento na população de protozoários e não afetou o pH ruminal (Doreau & Jouany, 1998). Newbold et al. (1995) também obtiveram resposta similar quando suplementaram ovinos com 2 g de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026 (Yea-Sacc, Alltech, Nicholasville, EUA) em dieta composta por feno de gramínea e concentrados.

Apesar da possibilidade da ação positiva da suplementação com leveduras sobre o pH ruminal, este achado não tem sido uma constante na literatura (Wiedmeier et al., 1987; Kung Jr. et al, 1997; Robinson & Garret, 1999). Diferenças entre dietas e no manejo alimentar dos animais seriam uma explicação plausível para a ausência de resposta unânime nesta variável.

2.3.5 Proteólise e concentração ruminal de amônia

Quando a velocidade de desaminação da proteína dietética no rúmen excede a velocidade de incorporação na proteína microbiana da amônia gerada, ocorre acúmulo ruminal deste composto (Broderick & Craig, 1983). Chaucheyras-Durand et al. (2005) demonstraram que a atividade proteolítica de *Prevotella albensis*, *Streptococcus bovis* e *Butyrivibrio fibrisolvens* foi reduzida pelo cultivo simultâneo com leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077). Os microorganismos foram incubados em meio contendo glicose e caseína como substratos. Foi observada diminuição na população de *S. bovis* na presença de levedura, provavelmente resultado da competição por substrato. Entretanto, não foi observado efeito da levedura viva sobre o crescimento de *P. albensis* e *B. fibrisolvens*. A adição de leveduras mortas reduziu a proteólise por estes microorganismos, sugerindo que houve efeito direto das leveduras mortas sobre as peptidases bacterianas.

Harrison et al. (1988) observaram que a concentração ruminal de amônia tendeu a ser menor em vacas leiteiras suplementadas com 114 g/dia de leveduras mortas (Diamond V XP, $2,4 \times 10^6$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*, Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA). Os animais consumiram uma dieta contendo 40% de silagem de milho e 60% de concentrado, fornecida duas vezes ao dia. Como a suplementação com leveduras aumentou tanto o número total de bactérias anaeróbicas quanto o número de bactérias celulolíticas no fluido ruminal, a redução na concentração de amônia no rúmen pode ter sido resultado da maior incorporação deste metabólito à proteína microbiana.

Erasmus et al. (1992) também observaram que a suplementação de vacas leiteiras com 10 g/dia de cultura de levedura (Yea-Sacc, 5×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026; Alltech, Nicholasville, EUA) diminuiu em

cerca de 10% a concentração de amônia no rúmen. Porém, não foi detectado aumento no número de microorganismos ruminais.

Putnam et al. (1997) trabalharam com vacas primíparas em início de lactação, suplementadas ou não com 10 g de cultura de levedura (Yea-Sacc, 5 x 10⁹ ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026, Alltech, Nicholasville, EUA), em arranjo fatorial de tratamentos com o teor de proteína na dieta igual a 16,1% ou a 18,8%. Não houve efeito de tratamento sobre a concentração ruminal de amônia, mas a suplementação com leveduras tendeu a aumentar o fluxo de N alimentar não degradado no rúmen e a ingestão de N nos dois teores de proteína da dieta, sugerindo que as leveduras limitaram a degradação ruminal da proteína nos alimentos.

O mecanismo pelo qual leveduras induziriam queda na concentração ruminal de amônia pode variar. Mecanismos propostos são o maior crescimento microbiano e assimilação de nitrogênio pelas bactérias ou a inibição das peptidases bacterianas pela presença das leveduras no fluido ruminal.

2.3.6 Consumo de elétrons e metanogênese

A remoção de elétrons do fluido ruminal é um constante desafio para a fermentação (Hobson, 1997). O fluido ruminal é um ambiente reduzido, com potencial redox ao redor de -0,35 mV. A oxidação de carreadores de elétrons reduzidos é necessária para a continuidade da fermentação. O crescimento das bactérias metanogênicas e a conseqüente síntese de metano a partir de hidrogênio são uma maneira de liberar elétrons do fluido ruminal; entretanto este processo representa uma perda da energia contida nos alimentos e é uma questão ambiental importante por contribuir diretamente para o aquecimento global (Cotton & Pielke, 1995). Como a produção de propionato como produto de fermentação ruminal contribui para a eliminação de elétrons da câmara de

fermentação, fermentações com alta proporção deste ácido graxo reduzem a necessidade de eliminação de elétrons via metano, o contrário do observado quando ocorre aumento na proporção de acetato. Alta relação entre acetato e propionato reduz a eficiência na conversão da energia digerida em energia metabolizável por induzir maior perda de metano por unidade de energia digestível.

Bactérias acetogênicas hidrogeniotróficas são microorganismos estritamente anaeróbicos capazes de transformar hidrogênio em acetato e presentes em diferentes ecossistemas anaeróbicos como pântanos, esgotos e trato gastrointestinal de ratos, coelhos e em alguns insetos (Madigan, 1997). Estes microorganismos têm sido isolados do rúmen de bezerros recém-nascidos, antes do estabelecimento da metanogênese (Morvan et al., 1994), e em bovinos alimentados com dietas com baixo teor de forragem (Leedle & Greening, 1988). Estas bactérias são capazes de metabolizar CO_2 e hidrogênio a acetato pela via do acetil-CoA ou via de Wood Ljungdahl (Wood, 1991). Esta rota envolve a redução direta de duas moléculas de CO_2 a acetil-CoA, tendo hidrogênio como doador de elétrons (FIGURA 1). Uma molécula de CO_2 é reduzida ao grupo metil do acetato, enquanto a outra molécula é reduzida ao grupo carbonil. A enzima chave na via do acetil-CoA é a monóxido de carbono desidrogenase (CODH). A CODH é um complexo enzimático que requer níquel, zinco e ferro como cofatores e catalisa a redução de CO_2 a monóxido de carbono: $\text{CO}_2 + \text{H}_2 \leftrightarrow \text{CO} + \text{H}_2\text{O}$.

O monóxido de carbono formado nesta reação dá origem ao grupo carbonil do acetato. O grupo metil do acetato se origina da redução do CO_2 por uma série de reações enzimáticas envolvendo a coenzima tetrahydrofolato. O CO_2 é primeiramente reduzido a ácido fórmico que, por sua vez, é convertido a formil tetrahydrofolato. A adição de mais dois pares de elétrons ao formil tetrahydrofolato produz metil tetrahydrofolato. O grupo metil do metil

tetrahidrofolato é, então, transferido para uma enzima que contém vitamina B₁₂ como cofator. Na síntese final do acetato, o grupo CH₃ se une a um átomo de níquel e o monóxido de carbono, a um átomo de ferro da enzima CODH. Neste ponto, a coenzima A é adicionada e a CODH, então, catalisa a formação do produto final, o acetil-CoA a partir do qual se originará o acetato.

Chaucheyras et al. (1995) avaliaram o efeito da adição de *Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077 (10⁸ células/ml de fluido ruminal *in vitro*) sobre a utilização de H₂ por bactérias acetogênicas e metanogênicas. Depois de cinco dias de incubação, e na ausência de *Saccharomyces cerevisiae*, as bactérias acetogênicas usaram 156,7 ± 25,5 µmol de H₂. A adição de leveduras vivas estimulou a utilização de hidrogênio (821,5 ± 34,5 µmol) e a produção de acetato pelas bactérias. A adição de leveduras autoclavadas promoveu estimulação semelhante no metabolismo acetogênico. Na monocultura de bactérias metanogênicas, o consumo de H₂ foi maior que no meio contendo bactérias acetogênicas sem a adição de leveduras. Quando leveduras vivas foram adicionadas ao meio contendo metanogênicas, a utilização de hidrogênio foi estimulada, mas não houve aumento da produção de metano. No cultivo simultâneo de bactérias acetogênicas e metanogênicas sem a presença de *Saccharomyces cerevisiae*, o consumo de hidrogênio e a produção de metano foram muito próximos ao observado na cultura pura de bactérias metanogênicas, sendo que 19% do hidrogênio foi incorporado ao acetato e 72%, ao metano. Todavia, na presença de leveduras vivas, a concentração de acetato aumentou significativamente, indicando que as bactérias acetogênicas foram estimuladas, com 70% do hidrogênio sendo usado para síntese de acetato. O *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de estimular as bactérias acetogênicas, inclusive na presença de metanogênicas. Talvez o fornecimento de nutrientes pelas leveduras mortas tenha desempenhado algum papel estimulante destes microorganismos,

similarmente ao observado na co-cultura de leveduras com *Selenomonas ruminantium* (Nisbet & Martin, 1991).

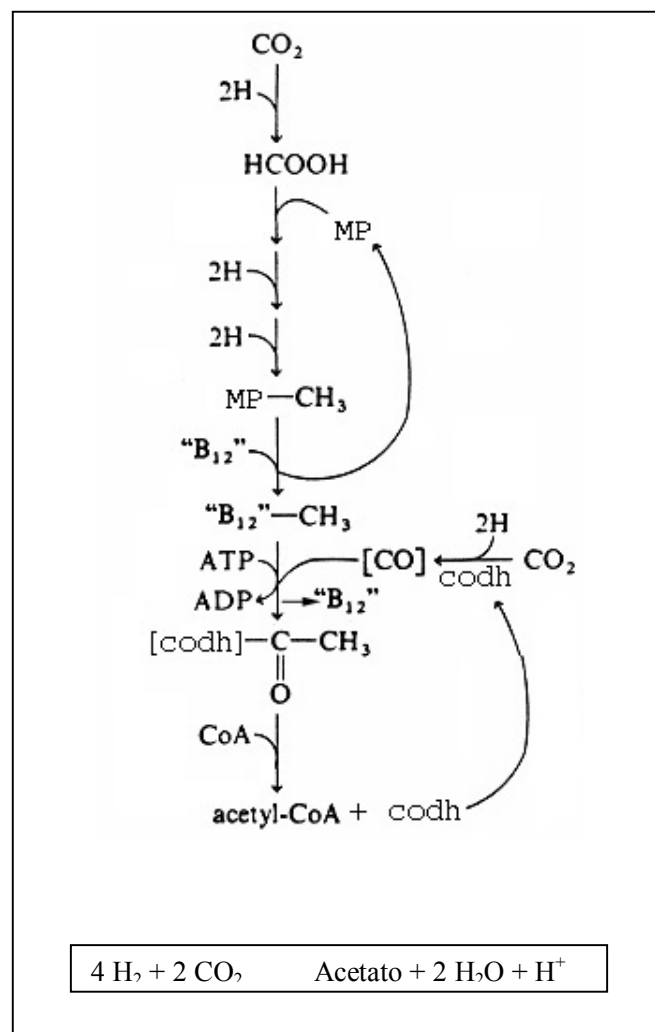


Figura 1. Reações da via do acetyl-CoA (Adaptado de Madigan, 1997). CODH = monóxido de carbono desidrogenase; HCOOH = ácido fórmico; MP - CH₃ = metil tetrahidrofolase; B₁₂ - CH₃ = metil B₁₂.

Devido à baixa afinidade da reação da via do acetil-CoA por hidrogênio livre, relativamente à produção de metano, a importância desta rota metabólica em ruminantes funcionais é pequena. O uso de leveduras poderia estimular as bactérias acetogênicas hidrogeniotróficas, reduzindo a perda de energia na forma de metano sem, no entanto, induzir queda na relação entre acetato e propionato, própria dos ionóforos (Schelling, 1984).

Lila et al. (2004) avaliaram uma preparação de leveduras vivas contendo *Saccharomyces cerevisiae* cepas 8417 e 1026 (Yea-Sacc Twin Strain, Bussan Biotech Co. Ltd., Tóquio, Japão). Houve pequena redução na concentração de metano no fluido ruminal *in vitro* quando as leveduras foram adicionadas ao meio de cultura contendo 60,5% de feno de gramínea e 39,5% de concentrados como substrato. Entretanto, não houve efeito da levedura quando os substratos foram amidos de milho ou de batata. De maneira semelhante, Lynch & Martin (2002), ao adicionarem células vivas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* PMX70SBK, Saf Agri, Quincy, EUA) aos substratos milho moído, amido solúvel, feno de alfafa ou feno de capim bermuda, observaram que a concentração de metano no fluido após 24 horas de incubação *in vitro* diminuiu apenas quando o substrato foi feno de alfafa. Estes resultados sugerem que o efeito benéfico de leveduras sobre a eficiência energética de ruminantes seria evidenciado em dietas com alto teor de forrageiras. Entretanto, Sullivan & Martin (1999) não detectaram efeito da adição de *Saccharomyces cerevisiae* (Diamond V XP, $2,4 \times 10^6$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*; Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA) sobre a produção de metano *in vitro* quando o substrato foi milho moído, capim bermuda ou alfafa.

McGinn et al. (2004) avaliaram o efeito da suplementação de duas culturas de leveduras, Procreatin-7 (4 g/d; $1,5 \times 10^{10}$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*/g; Saf Agri, Quincy, EUA) e Levucell SC (1 g/d; 2×10^{10} ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077/g; Lallemand, Toulouse, França),

sobre a emissão de metano de garrotes alimentados com uma dieta composta por 75% de silagem de cevada, 20% de cevada e 1,52% de farelo de colza. O Procreatin-7 reduziu em 3% a perda de energia na forma de metano. De forma semelhante, também foi observada redução pequena e não significativa estatisticamente na relação entre acetato e propionato em resposta à suplementação com Procreatin. Apesar de a queda na relação entre estes ácidos ser coerente com a redução na excreção de metano, o mecanismo não condiz com o suposto efeito das leveduras sobre a acetogênese a partir de hidrogênio (Chaucheyras et al., 1995).

2.3.7 Digestibilidade da fibra

Wallace & Newbold (2007) argumentam que o aumento no número total de bactérias ruminais é a principal resposta à suplementação com leveduras, e que este aumento na população bacteriana seria capaz de induzir ganhos na digestão da fibra. Williams et al. (1991) sugerem, ainda, que o efeito positivo das leveduras sobre a digestibilidade da fibra seria mais pronunciado em dietas ou sistemas de alimentação capazes de comprometer a celulólise, como em dietas com alta inclusão de alimentos concentrados.

Dawson et al. (1990), utilizando simuladores da fermentação ruminal, observaram que a concentração de microorganismos celulolíticos foi cinco vezes maior nas culturas suplementadas com leveduras vivas (Yea-Sacc, 5×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026; Alltech, Nicholasville, EUA) do que naquelas que não receberam suplementação. Entretanto, os autores relataram que o efeito positivo da suplementação sobre o número de bactérias celulolíticas foi nulo quando as leveduras foram inativadas por temperatura de 121°C por 15 minutos, sugerindo que apenas culturas vivas estimulariam o crescimento de microorganismos.

Entretanto, tem sido detectado efeito de leveduras mortas sobre a atividade celulolítica. Portanto, o mecanismo pelo qual as leveduras estimulariam o crescimento microbiano no rúmen pode não estar necessariamente vinculado ao fato de as mesmas apresentarem alguma atividade metabólica no fluido ruminal. Callaway & Martin (1997) observaram que a adição de filtrado de *Saccharomyces cerevisiae* (Diamond V XP, $2,4 \times 10^6$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*, Diamond V Mills, Indianápolis, EUA) em meio de cultura contendo celobiose estimulou o crescimento da população de *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus albus*. A suplementação com leveduras aumentou em 11% a degradação da celulose em até 24 horas de incubação. No entanto, não houve diferença no desaparecimento da celulose após 48 ou 72 horas de incubação, sugerindo que a levedura estimulou a velocidade inicial de degradação da celulose, mas não determinou a degradabilidade potencial. Estes resultados sugerem que a utilização de levedura pode ter atuado sobre o tempo necessário para colonização microbiana da fibra, o lag time.

Harrison et al. (1988) também observaram que a suplementação diária com 114 g de cultura de levedura morta (Diamond V XP, $2,4 \times 10^6$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*, Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA) tendeu a aumentar o número de bactérias anaeróbicas e aumentou significativamente o número de celulolíticas no rúmen de vacas leiteiras alimentadas com dieta contendo 40% de silagem de milho e 60% de concentrado. Sullivan & Martin (1999) avaliaram a degradabilidade *in vitro* da matéria seca dos fenos de alfafa e de capim bermuda e observaram aumento em ambos na presença de *Saccharomyces cerevisiae* (Diamond V XP, Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA).

Wohlt et al. (1998) observaram que a suplementação de vacas Holandesas em início de lactação com 10 ou 20 g de leveduras (Biomate Yeast

Plus, 5×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae*/g, Chr. Hansen's Laboratory, Inc., Milwaukee, EUA) por 18 semanas aumentou a digestibilidade aparente da fibra no trato digestivo total. Neste estudo utilizou-se uma dieta com 50% de silagem de milho e 50% de concentrados, além da inclusão de 0,9 kg de feno por dia. Wiedmeier et al. (1987), utilizando vacas não lactantes fistuladas no rúmen, detectaram ganho de 6,5% na digestibilidade da hemicelulose quando 90 g de cultura de levedura (Diamond V XP, $2,4 \times 10^6$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*; Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA) foram suplementadas em uma dieta com 33,4% de feno de alfafa, 15,0% de palha de cevada e 51,6% de concentrados. O resultado obtido por estes autores foi aparentemente explicado pelo aumento no número de microorganismos celulolíticos nos animais suplementados (39,8 vs. 25×10^8 /ml de fluido). Similarmente, Erasmus et al. (1992), ao suplementarem 10 g de cultura de leveduras (Yea-Sacc, 5×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026; Alltech, Nicholasville, EUA) para vacas leiteiras consumindo uma dieta com 65% de concentrados, relataram tendência de aumento na digestibilidade da fibra.

Entretanto, Arambel & Kent (1990), ao utilizarem a mesma levedura (Diamond V XP) do estudo conduzido por Wiedmeier et al. (1987), não observaram efeito da adição das mesmas 90 g do produto sobre a digestibilidade da fibra. Neste experimento foram utilizadas 20 vacas Holandesas em início de lactação, que receberam uma dieta com 50% de concentrados e 50% de forragem composta por feno de alfafa e silagem de milho. A ausência de resposta ao tratamento, comparativamente aos trabalhos nos quais se evidenciou resposta positiva, é de difícil interpretação. Qualquer comentário com intuito conclusivo seria mera especulação.

2.3.8 Fluxo de proteína microbiana do rúmen

Erasmus et al. (1992) mensuraram o fluxo ruminal de proteína microbiana em vacas leiteiras com cânula duodenal. Os animais, suplementados ou não com 10 g de leveduras (Yea-Sacc, $2,04 \times 10^9$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026; Alltech, Nicholasville, EUA), foram alimentados com dieta contendo 35% de forragem, 25% oriundos de palha de trigo e 10%, de feno de alfafa. Apesar de não significativo estatisticamente, o fluxo de N não-amoniacal foi 9,4% maior nos animais suplementados. O fluxo de N microbiano representou 56% e 47% do N ingerido nas dietas suplementada e controle, respectivamente. O aumento no fluxo de N não-amoniacal para o duodeno nos animais suplementados foi atribuído ao aumento na eficiência de síntese microbiana. A concentração de aminoácidos na digesta duodenal dos animais suplementados foi maior para quatro dos 17 aminoácidos mensurados, incluindo metionina, sugerindo que o tratamento induziu mudança no perfil de aminoácidos da proteína microbiana ou na degradabilidade ruminal da proteína dietética. Os autores argumentam que a levedura pode ter seletivamente estimulado o crescimento de certas bactérias anaeróbicas.

Newbold et al. (1995), ao suplementarem 4 g de cultura de leveduras (Yea-Sacc, $2,04 \times 10^9$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026; Alltech, Nicholasville, EUA) para ovelhas consumindo 0,85 kg de cevada e 0,55 kg de feno de gramínea, relataram aumento não significativo de 9% no fluxo de N microbiano para o duodeno, estimado pela excreção de derivados purínicos na urina. O aumento na população bacteriana ($1,53 \times 10^8$ vs. $2,18 \times 10^8$ por ml de fluido) no presente estudo parece ser uma explicação plausível para o maior fluxo de proteína do rúmen. Entretanto, Putnam et al. (1997) não detectaram efeito da suplementação com leveduras sobre o fluxo de N para o intestino delgado. Estes autores trabalharam com vacas primíparas em início de lactação

suplementadas ou não com 10 g de cultura de leveduras (Yea-Sacc, 5×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026, Alltech, Nicholasville, EUA).

2.3.9 Perfil de fermentação

Piva et al. (1993) observaram aumento na proporção molar de acetato e na relação entre acetato e propionato quando 10 g de leveduras (Thepax Dry, *Saccharomyces cerevisiae*, Dox-Al, Correzzana, Itália) foram suplementadas para vacas em meio de lactação, consumindo dieta com 30% de silagem de milho, 22% de feno de alfafa e 48% de concentrados. Wiedmeier et al. (1987) relataram tendência semelhante ao suplementarem 90 g de cultura de levedura (Diamond V XP, $2,4 \times 10^6$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*; Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA) para vacas não lactantes. Os animais foram alimentados com uma dieta contendo 50% de concentrado e 50% de forragem composta por feno de alfafa e silagem de milho.

Entretanto, respostas contrárias têm sido relatadas. Williams et al. (1991) avaliaram a proporção molar de ácidos graxos voláteis no rúmen de garrotes com cânula ruminal, alimentados com dieta baseada em cevada e feno de gramíneas e suplementados ou não com 7,5 g de leveduras (Yea-Sacc, 5×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026, Alltech, Nicholasville, EUA). A relação entre acetato e propionato foi reduzida de 3,3 para 2,8 nos animais suplementados. Erasmus et al. (1992) também detectaram queda, apesar de não significativa estatisticamente, na relação entre acetato e propionato em vacas leiteiras suplementadas ou não com 10 g de cultura de levedura (Yea-Sacc, $2,04 \times 10^9$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026; Alltech, Nicholasville, EUA) e consumindo uma dieta com 65% de concentrados. A relação foi 2,28 e 2,04 nos tratamentos controle e suplementado, respectivamente. De maneira semelhante, Erasmus et al. (2005) observaram queda na relação entre acetato e

propionato quando vacas leiteiras alimentadas com dieta composta por 38,3% de feno de alfafa e 61,7% de concentrados foram suplementadas com 2500 ppm de leveduras (Diamond V XP, $2,4 \times 10^6$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*; Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA).

Já Doreau & Jouany (1998), ao suplementarem 50 g de premix contendo 0,5 g de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077) para vacas Holandesas em início de lactação, não detectaram efeito da suplementação sobre a concentração de ácidos graxos voláteis e a relação entre acetato e propionato no rúmen. A dieta basal foi composta por 60% de silagem de milho e 40% de concentrado.

Os efeitos do *Saccharomyces cerevisiae* sobre a proporção de ácidos graxos voláteis no rúmen têm sido variáveis. A possibilidade de efeito favorável das leveduras sobre a acetogênese ruminal a partir de hidrogênio (Chaucheyras et al., 1995) deveria resultar em aumento na relação entre acetato e propionato. Maior relação entre estes ácidos também seria uma resposta esperada à maior atividade dos microorganismos fibrolíticos, supostamente ligada à maior digestibilidade da fibra em dietas suplementadas com leveduras (Wiedmeier et al., 1987; Harrison et al., 1988). É pertinente avaliar a frequência com a qual aumentos na relação entre acetato e propionato estariam vinculados a aumento na excreção de metano. Entretanto, existem relatos de queda na relação entre os ácidos acético e propiônico quando ruminantes são suplementados com leveduras (Williams et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Erasmus et al., 2005). O mecanismo para este achado é obscuro.

2.4 Resposta animal

2.4.1 Consumo de matéria seca

Em sete experimentos revisados, a suplementação com leveduras aumentou o consumo de matéria seca (Williams et al., 1991; Wohlt et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Putman et al., 1997; Wohlt et al., 1998; Robinson & Garret, 1999; Dann et al., 2000), enquanto, em quatro, não foi detectada resposta nesta variável (Arambel & Kent, 1990; Piva et al., 1993; Swartz et al., 1994; Soder & Holden, 1999). Já em estudo conduzido por Schingoethe et al. (2004), a suplementação com leveduras induziu queda no consumo.

Wohlt et al. (1998) avaliaram a suplementação diária com 0, 10 ou 20 g de leveduras (Biomate Plus, 5×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae*/g, Chr. Hansen's Laboratory, Inc., Milwaukee, EUA) em dieta com 44,3% de silagem de milho, 3,3% de feno de gramíneas e 55,7% de concentrado composto por milho moído, farelo e casca de soja e resíduo de destilaria para vacas em início de lactação. O consumo diário dos animais suplementados foi 24,5 kg e dos não suplementados, 22,5 kg. Apesar de o consumo ter sido maior nos animais que receberam 20 g de levedura, a diferença não foi significativa entre os dois níveis de suplementação. A melhoria observada na digestibilidade da fibra pode ter contribuído para o maior consumo nos animais suplementados.

Robinson & Garret (1999) obtiveram resultados semelhantes. Vinte e seis vacas multíparas e 18 primíparas foram ou não suplementadas com 57 g de cultura de levedura morta (Diamond V XP, 4×10^7 ufc de *Saccharomyces cerevisiae*/g, Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA) do 23º dia pré-parto até o 56º dia pós-parto. Todas as dietas foram baseadas em silagem de milho, silagem de gramínea e concentrado composto por milho, cevada, farinha de sangue, farelo de soja e glúten de milho. Não houve efeito da suplementação

com leveduras sobre o consumo pré-parto. No pós-parto, o consumo foi maior nos animais suplementados (15,4 kg *vs.* 14,3 kg nas primíparas e 20,8 kg *vs.* 19,5 kg nas múltíparas). A suplementação também resultou em menor perda de peso após o parto e aumento na frequência diária de refeições.

Williams et al. (1991) relataram aumento de 1,2 kg no consumo de matéria seca em resposta à suplementação de 10 g de cultura de levedura (Yea-Sacc, 5×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026, Alltech, Nicholasville, EUA) para vacas em estágio intermediário da lactação. A dieta foi composta por palha de trigo, feno de gramínea, farelo de soja, cevada e farinha de peixe. Duas relações entre forragens e concentrados foram avaliadas simultaneamente à suplementação com leveduras, 50:50 ou 40:60. Não foi detectada interação entre o teor de forragem na dieta e a suplementação com levedura. Erasmus et al. (1992) também observaram tendência de aumento no consumo ao adicionarem 10 g de leveduras (Yea-Sacc, $2,04 \times 10^9$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026; Alltech, Nicholasville, EUA) a uma dieta com 65% de concentrado e 35% de forragem composta de palha de trigo e feno de alfafa. Em ambos os trabalhos, o aumento do consumo foi associado à maior digestibilidade das dietas.

Arambel & Kent (1990) avaliaram o efeito da suplementação diária com 90 g de cultura de levedura (Diamond V XP, $2,4 \times 10^6$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*; Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA) para vacas em início e meio da lactação. A dieta consistia de 56,3% de forragens compostas por silagens de milho e alfafa e feno e 43,7% de concentrados. Estes autores não observaram efeito da suplementação sobre o consumo.

Schingoethe et al. (2004) suplementaram 60 g de leveduras (Diamond V XP, 4×10^7 ufc de *Saccharomyces cerevisiae*/g, Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA) para vacas em meio de lactação sob estresse calórico. A dieta fornecida na forma de mistura completa foi composta de 28% de silagem

de milho, 21% de feno de alfafa e 51% de concentrados. O consumo foi 22,1 kg nos animais suplementados e 23,1 kg no controle. Não houve efeito da suplementação sobre a produção de leite. A eficiência alimentar, medida como a energia líquida no leite dividida pela ingestão de matéria seca, aumentou em 7% nos animais suplementados.

Efeitos positivos da suplementação com leveduras sobre o consumo de vacas leiteiras foram normalmente acompanhados por ganho na digestibilidade das dietas. A resposta tem sido observada tanto em vacas em início de lactação quanto em vacas lactando por estádios mais avançados. Não existe evidência suficiente para suportar o efeito positivo da suplementação sobre o consumo pré-parto e nem a possibilidade de resposta mais acentuada em determinado tipo de dieta, caracterizada pela relação entre forragens e concentrados ou tipo das forragens ou dos concentrados utilizados. Em um trabalho no qual foi detectada resposta negativa da suplementação sobre o consumo, ocorreu aumento na eficiência de conversão do consumido em energia do leite (Schingoethe et al., 2004).

2.4.2 Produção de leite

Dentre 16 experimentos oriundos de 13 trabalhos publicados (Arambel & Kent, 1990; Williams et al., 1991; Wohlt et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Piva et al., 1993; Swartz et al., 1994; Kamalamma et al., 1996; Kung Jr. et al., 1997; Putman et al., 1997; Wohlt et al., 1998; Soder & Holden, 1999; Dann et al., 2000; Chevaux et al., 2002; Schingoethe et al., 2004; Sniffen et al., 2004), a suplementação com leveduras induziu aumento da produção de leite em sete (Williams et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Piva et al., 1993; Kung Jr. et al., 1997; Wohlt et al., 1998; Chevaux et al., 2002; Sniffen et al., 2004).

Kung Jr. et al. (1997) não detectaram efeito da suplementação com leveduras sobre a produção de leite de vacas com 150 ± 20 dias em lactação e produção diária ao redor de 33 kg. Os animais receberam 10 g de leveduras (Biomate Plus, $3,5 \times 10^9$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*/g, Chr. Hansen's Laboratory, Inc., Milwaukee, EUA) por um período de 63 dias e consumiram uma dieta constituída por silagem de milho, feno de alfafa e 50% de concentrado peletizado. Estes mesmos autores conduziram um segundo experimento utilizando 18 vacas com 75 ± 25 dias em lactação no início do período experimental, em delineamento do tipo Quadrado Latino 3x3, com períodos de 28 dias. Os tratamentos foram 0, 10 ou 20 g da mesma levedura e a dieta foi similar à adotada no experimento anterior. A produção diária de leite das vacas não suplementadas foi de 36,4 kg; nas suplementadas com 10 g, de 39,3 kg; e nas suplementadas com 20 g, de 38,0 kg. Estes resultados sugerem que a resposta em produção de leite é maior em vacas com menos dias em lactação, apesar de não ser possível a comprovação desta hipótese pelo delineamento experimental adotado.

Resultados semelhantes foram obtidos por Wohlt et al. (1991) ao suplementarem vacas primíparas com 10 g de leveduras (Biomate Plus, $3,5 \times 10^9$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*/g, Chr. Hansen's Laboratory, Inc., Milwaukee, EUA) de 30 dias antes do parto até a 18ª semana da lactação. Os animais consumiram dieta composta por 50% de silagem de milho e 50% de concentrado, acrescidos de 0,9 kg de feno por dia. A dieta foi oferecida em quantidade restrita no pré-parto e *ad libitum* no pós-parto. A suplementação com leveduras aumentou a produção diária de leite de 26,0 para 27,2 kg. O pico da lactação ocorreu na 7ª semana pós-parto, foi de 29,5 kg nos animais recebendo levedura e ocorreu na 11ª semana e foi de 28,7 kg no tratamento controle. A maior produção de leite foi atribuída ao maior consumo de matéria seca observado nos animais suplementados. Dann et al. (2000) também observaram

que vacas Jersey suplementadas com 60 g de cultura de levedura (Diamond V XP, 4×10^7 ufc de *Saccharomyces cerevisiae*/g, Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA) do 14º dia pré-parto até o 140º dia pós-parto alcançaram pico de produção mais cedo, no entanto não apresentaram maior produção de leite em 140 dias de lactação.

Williams et al. (1991) suplementaram 10 g de cultura de levedura (Yea-Sacc, 5×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026, Alltech, Nicholasville, EUA) para vacas com produção de leite ao redor de 20 kg. A dieta foi composta por palha de trigo, feno de gramínea, farelo de soja, cevada e farinha de peixe. A suplementação com leveduras aumentou 1,4 kg/d na produção de leite na dieta com 40% de forragem e não exerceu efeito na dieta com 50% de forragem, sugerindo que o efeito da levedura foi mais marcado na dieta com maior potencial de ser acidificante do ambiente ruminal.

Kamamma et al. (1996) não observaram efeito da suplementação de leveduras sobre a produção de leite de vacas mestiças, com produção de leite ao redor de 9 kg por dia. Os animais receberam 10 g de leveduras (Yea-Sacc, *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026, Vetcare-Alltech, Bangalore, Índia) por um período de sete semanas e foram mantidos em pastagem de gramínea com suplementação concentrada.

A resposta de vacas leiteiras à suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077 tem sido positiva. Chevaux et al. (2002) utilizaram sessenta e duas vacas Holandesas bloqueadas por ordem de parto e produção de leite e distribuídas aleatoriamente a uma de duas possíveis seqüências de dois tratamentos em delineamento de reversão simples (cross-over): Controle ou 0,5 g de Levucell (1×10^{10} ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077, Lallemand, Tolousse, França). A produção de leite foi 29,9 kg no controle e 31,2 kg nos animais suplementados, mostrando que este baixo nível de suplementação com esta levedura foi efetivo para induzir resposta em

leite. Em uma síntese de 14 experimentos, envolvendo 193 observações, a resposta média em produção de leite foi de 1,45 litros (Sniffen et al., 2004). Ocorreu também um leve aumento na produção de gordura e de proteína no leite. Nos estudos que mensuraram o consumo diário de matéria seca houve aumento médio de 0,53 kg.

2.4.3 Secreção de sólidos do leite

A suplementação com leveduras não afetou a produção dos componentes do leite em nove experimentos (Arambel & Kent, 1990; Williams et al., 1991; Wohlt et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Swartz et al., 1994; Kung Jr. et al., 1997; Wohlt et al., 1998; Soder & Holden, 1999; Dann et al., 2000), mas aumentou a produção de proteína e gordura em três trabalhos (Piva et al., 1993; Putnam et al., 1997; Wang et al., 2001).

Putnam et al. (1997) trabalharam com vacas primíparas em início de lactação suplementadas ou não com 10 g de cultura de levedura (Yea-Sacc, 5×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026, Alltech, Nicholasville, EUA). O delineamento experimental foi do tipo Quadrado Latino 4 x 4, em arranjo fatorial de tratamentos com o teor de proteína na dieta, 16,1% ou 18,8%. Leveduras aumentaram a produção de gordura, proteína e leite somente quando adicionadas à dieta com baixo teor de proteína. As respostas observadas podem ter sido mediadas pelo aumento na ingestão de matéria seca na dieta com 16% de PB.

Piva et al. (1993) relataram aumento no teor e na produção de gordura do leite com a suplementação por 6 semanas de 10 g de leveduras (Thepax Dry, *Saccharomyces cerevisiae*, Dox-Al, Correzzana, Itália) para vacas em meio de lactação. A dieta basal consistia de 30% de silagem de milho, 28% de feno de alfafa e 48% de concentrados. A tendência de aumento no teor de gordura

(3,54% vs 3,25%, $P>0,10$) e o pequeno, mas significativo, aumento na produção de leite, resultou em aumento na produção diária de gordura (0,90 vs. 0,78 kg; $P<0,04$).

Sessenta vacas Holandesas em início de lactação foram alocadas a um de cinco possíveis tratamentos por um período de 140 dias (Wang et al., 2001). Os tratamentos foram: 1) 21% de FDN de forragem (FDNF) sem leveduras; 2) 21% de FDNF com leveduras; 3) 17% de FDNF sem leveduras; 4) 17% de FDNF com leveduras; e 5) 25% de FDNF com leveduras por 30 dias, e em seguida 17% de FDNF com leveduras por 110 dias. A cultura de levedura utilizada foi Diamond V XP ($2,4 \times 10^6$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*; Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA) na dosagem de 60 g/d. Houve aumento no teor de gordura do leite apenas nas dietas com 21% de FDNF, havendo interação entre leveduras e % de FDNF. A composição das dietas com 17 e 21% de FDNF foi, respectivamente, 23,4 e 29,1% de silagem de milho, 15,6 e 19,1% de silagem de alfafa, 17,8 e 25,0% de milho inteiro, 20,83 e 2,81% de casca de soja, 13,56 e 17,15% de farelo de soja, 2,25 e 0,29% de glúten de milho e 1,92% de farinha de sangue em ambos os teores de FDNF. As dietas com 21% de FDNF continham maiores teores de CNF do que as dietas com 17% de FDNF (42,0 e 37,6%, respectivamente), o que poderia resultar em efeito associativo negativo sobre a digestão da fibra, sugerindo que o efeito positivo das leveduras parece ser mais pronunciado em dietas ou sistemas de alimentação com alta inclusão de alimentos concentrados.

Diferenças no sistema alimentar (dieta completa ou forragem e concentrados ofertados separadamente), na relação entre forragens e concentrados, no tipo das forragens e dos concentrados utilizados, fatores relacionados à presença de outros aditivos nas dietas e ao estágio da lactação e capacidade de resposta das unidades experimentais são de difícil interpretação, e certamente interagem com a inclusão de levedura, podendo explicar a

inconsistência na resposta em desempenho à suplementação com *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, diferenças entre os diversos suplementos comerciais de leveduras podem induzir variação na resposta animal. Devido ao seu mecanismo de ação, é de se esperar maior resposta à suplementação com leveduras em formulações e manejos alimentares capazes de induzir maior acidificação do ambiente ruminal. Entretanto, a análise crítica da literatura não sugere que respostas positivas estejam restritas a um determinado padrão alimentar.

2.5 Outras respostas à suplementação de *Saccharomyces cerevisiae*

2.5.1 Resposta Imune

A suplementação com levedura tem sido utilizada em monogástricos para induzir melhoria da função imune, tanto entérica quanto sistêmica (Davis et al., 2004). Oliveira et al. (2007), ao suplementarem 10 g de leveduras (Levumilk, 2×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500; Kera Nutrição Animal, RS) para vacas Holandesas em lactação, observaram diminuição na contagem de células somáticas do leite (190 vs. 302 x 1000 células/ml, $P=0,02$). Estes resultados evidenciam que a suplementação com leveduras pode induzir respostas sobre o sistema imune de ruminantes semelhantes à observada em monogástricos.

Derivados solúveis da levedura, como as glucanas, podem passar do trato gastrointestinal para a circulação dos animais (Rice et al., 2005), possuindo capacidade imunoestimulante. A resposta na contagem de células somáticas pode ser mediada pelo sistema comum de mucosas. Por este mecanismo, a resposta imune em mucosas induz a migração de células do sistema imune não

apenas para o órgão onde ocorreu o estímulo, mas também para outros locais como trato respiratório, urogenital e glândula mamária (Perdigón et al., 1999).

2.5.2 Desenvolvimento ruminal em bezerros

O estabelecimento dos protozoários ciliados em bezerros não pode ocorrer antes que fungos e bactérias já tenham previamente colonizado o rúmen. Quando se suplementou 0,2 g/dia de leveduras (Levucell SC, 1×10^{10} ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077, Lallemand, Toulouse, França) para cordeiros recém-nascidos, o estabelecimento da população de bactérias celulolíticas ocorreu mais cedo e de forma mais estável do que no grupo controle e a colonização por protozoários ciliados foi mais rápida (Chaucheyras-Durand & Fonty, 2002), sugerindo que a maturação do ecossistema microbiano é acelerada na presença de leveduras.

A regulação do pH ruminal e a redução da produção de ácido láctico podem ser interessantes no rúmen em desenvolvimento. A adição de 2% de cultura de levedura (Diamond V XP, $2,4 \times 10^6$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*; Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA) à ração inicial de bezerros aumentou significativamente o consumo e o ganho diário de peso (Lesmeister et al., 2004). Aparentemente a suplementação também acelerou o desenvolvimento do rúmen.

Juchem et al. (2003) adicionaram leveduras vivas (Levucell SC, *Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077, Lallemand, Toulouse, França) à dieta inicial de bezerros que não receberam colostragem, do nascimento aos 90 dias de idade. O consumo antes da desmama foi maior nos animais suplementados e tendeu a ser maior também no pós-desmama. A suplementação com levedura melhorou significativamente o ganho de peso antes da desmama (298 vs. 464 g/d; $P < 0,05$), mas não afetou o ganho após a desmama (907 vs. 1037; $P > 0,10$). O número de dias com diarreia durante a fase de aleitamento também foi menor nos bezerros suplementados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Fazenda São Francisco, município de Ijaci – MG, no período de setembro a novembro. Vinte vacas Holandesas multíparas, com $143 \pm 48,8$ dias em lactação no início do período experimental, foram bloqueadas em 10 grupos de dois animais com base na produção diária de leite. Dentro de cada bloco, os animais foram aleatoriamente alocados a uma de duas possíveis seqüências de tratamentos, em delineamento de Reversão Simples (Cross-over), com períodos de 28 dias. Os tratamentos foram: 10 g do produto Natucell® (Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, SP) ou 10 g de veículo inerte. O produto era composto pela cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 (Lallemand SC, Tollouse, França) homogeneizada a veículo inerte em diluição capaz de propiciar um consumo mínimo diário de 1×10^{10} ufc de microorganismos por vaca. Mensurações foram realizadas na quarta semana de cada período experimental. Entre os dois períodos experimentais foi adotado um período de “washout” de 14 dias, no qual os animais receberam a dieta controle.

A contagem da população de leveduras foi realizada por meio do plaqueamento em superfície, utilizando o meio YEPG contendo 0.3% extrato de levedura (Merck), 0.3% extrato de malte (Merck), 0.5% peptona (Himedia), 1.0% glicose (Merck), 2.0% ágar (Merck), adicionados a 1000 ml de água contendo 100 mg chloranfenicol (Sigma, St. Louis, USA) para inibir o crescimento de bactérias. Após o espalhamento, as placas foram incubadas a 28°C por 24-72h. Após o crescimento, foi escolhida uma diluição cuja contagem estivesse entre 30-300 colônias para se fazer a contagem, sendo o resultado dado em unidades formadoras de colônia (UFC)/g de produto.

As vacas foram alimentadas individualmente, duas vezes ao dia, em confinamento total. A mistura de todos os ingredientes dietéticos foi

realizada duas vezes por dia em quantidade suficiente para prover 15% do oferecido como sobra diária (TABELA 1). A quantidade de dieta oferecida e as sobras alimentares de cada vaca foram mensuradas diariamente. Entre os dias 23 e 27 de cada período, amostras da silagem de milho de cada ingrediente do concentrado e das sobras alimentares de cada vaca foram coletadas diariamente e congeladas. Uma amostra composta de cada período foi formada com base em quantidades idênticas de matéria natural. Estas amostras foram pré-secas em estufa ventilada por 72 horas a 55°C, trituradas em peneira de 1 mm em moinho do tipo Thomas-Willey, e uma sub-amostra foi desidratada a 100°C por 24 horas para determinação do teor de matéria seca. A proteína bruta foi analisada por um destilador a vapor do tipo Microkjeldhal (A.O.A.C., 1975). As análises de extrato etéreo foram realizadas segundo o A.O.A.C. (1990). As cinzas foram determinadas por incineração da amostra a 550°C por 8 horas. O teor de FDN foi determinado por um ANKON[®] Fiber Analyser (ANKON Technology Corporation, Fairport, EUA).

As vacas foram ordenhadas duas vezes por dia. Amostras de seis ordenhas consecutivas foram obtidas nos dias 23 a 25 de cada período para determinação do teor de proteína, gordura, lactose, uréia e contagem de células somáticas (Clínica do Leite, Piracicaba, SP). A produção diária de leite e de sólidos entre os dias 22 e 25 de cada período foi utilizada para comparar tratamentos. A secreção diária de energia no leite foi calculada pela equação: $[(0,0929 \times \% \text{ gordura}) + (0,0547 \times \% \text{ de proteína}) + (0,0395 \times \% \text{ de lactose})] \times \text{kg de leite}$ (NRC, 2001). A CCS foi transformada em uma escala linear de 0 a 9 (CCS linear), sendo o ponto médio de cada score linear representado pelos seguintes valores de CCS ($\times 1.000 \text{ células ml}^{-1}$): 12,5 para CCS linear 0; 25 para CCS linear 1; 50 para CCS linear 2; 100 para CCS linear 3; 200 para CCS linear

4; 400 para CCS linear 5; 800 para CCS linear 6; 1.600 para CCS linear 7; 3.200 para CCS linear 8 e 6.400 para CCS linear 9.

TABELA 1. Composição das dietas oferecidas em ingredientes e das dietas consumidas em nutrientes.

	% da MS
Silagem de milho	43,9
Feno de tifton	2,0
Farelo de soja	21,7
Polpa de citros	16,9
Milho floculado	14,4
Calcário calcítico	0,4
NaCl	0,3
Minerais e vitaminas ¹	0,3
Proteína bruta	16,8
FDN total	30,9
FDN oriundo de silagem de milho ²	20,8
FDN oriundo de tifton ²	1,5
Extrato etéreo	5,4
Cinzas	5,9
CNF ³	41,0
	% da MN
Matéria seca	52,4

¹ Minerais e Vitaminas: 18,5% de Ca; 15% de P; 3,0% de Mg; 3,0% de S; 240 ppm de Co; 3000 ppm de Cu; 8000 ppm de Mn; 12000 ppm de Zn; 90 ppm de Se; 180 ppm de I; 1.000.000 UI/kg Vit. A; 250.000 UI/kg Vit. D; 6.250 UI/kg Vit E.

² Estimados a partir da composição original da dieta

³ CNF = Carboidratos não fibrosos = 100 – (PB + FDN + EE + Cinzas)

O peso vivo e a condição corporal de cada vaca foram mensurados no dia 27 de cada período. A condição corporal foi avaliada visualmente em escala de 1 a 5, sendo 1 representativo de magra e 5 representativo de gorda (Wildman et al., 1982). A condição corporal foi avaliada por três avaliadores independentes e o escore médio de cada vaca foi utilizado.

No dia 22 de cada período, amostras de sangue para dosagem de uréia foram obtidas dos vasos coccígeos. As amostras foram obtidas imediatamente antes da alimentação e duas horas após o fornecimento matinal de alimentos. O sangue foi colhido em tubos de vidro vacuolizados contendo 0,2 ml de Gristab, acondicionados sob refrigeração. Em seguida, as amostras de sangue foram centrifugadas a 1000 x g por 15 minutos e o plasma foi congelado a -20°C para posterior análise por kit laboratorial (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Cat. 27).

A digestibilidade aparente no trato digestivo total da matéria seca, da matéria orgânica, da FDN e da matéria orgânica não-FDN foi determinada por mensuração da produção fecal por coleta total de fezes realizada por 8 horas ininterruptas nos dias 25 a 27 de cada período. A coleta de fezes em cada dia foi iniciada com 8 horas de atraso com relação ao dia anterior, visando obter uma amostragem representativa das 24 horas do dia, sem causar distúrbio no consumo de alimentos e na produção de leite dos animais. As fezes de cada vaca foram congeladas após cada dia de coleta e formaram uma amostra composta ao final de cada período. Os compostos fecais foram desidratados e o teor de FDN e cinzas foi determinado como previamente descrito.

O consumo diário de matéria orgânica digestível foi calculado multiplicando o consumo de matéria orgânica mensurado entre os dias 23 a 27 de cada período pela digestibilidade da matéria orgânica mensurada entre os dias 25 a 27. A eficiência alimentar foi calculada pela relação entre a produção de leite e o consumo de matéria seca (Eficiência 1). A eficiência de utilização energética foi avaliada dividindo a secreção diária de energia no leite pelos consumos diários de matéria seca (Eficiência 2) e de matéria orgânica digestível (Eficiência 3).

No dia 27 de cada período foram obtidas amostras de fluido ruminal através de sonda flexível oro-gástrica, com auxílio de uma bomba de sucção a

vácuo acoplada a um Kitassato (Rosemberger, 1983). As amostras foram obtidas 12 horas após o fornecimento matinal de alimentos, sendo os animais amostrados aleatoriamente dentro de bloco. O pH ruminal foi mensurado imediatamente (pH metro Digimed DM20, Datamed Instrumentos Científicos e Médicos LTDA, Belo Horizonte, MG). O fluido ruminal coletado de cada animal foi dividido em duas sub-amostras. Uma amostra teve a fermentação inibida por congelamento imediato em nitrogênio líquido a -196°C e foi armazenada sob congelamento para posterior análise de ácidos graxos voláteis por cromatografia gás-líquida (CP 3800 Gas Chromatography Varian, Varian Chromatography Systems, Califórnia, EUA). Outra amostra foi homogeneizada, fixada e conservada, empregando-se a diluição 1:2 entre fluido ruminal e formaldeído, para posterior contagem de protozoários (Dehority, 1984). A contagem dos protozoários foi realizada em microscópio óptico, utilizando amostras de 1,0 ml do fluido formalizado alocadas em câmara de Neubauer com 0,1 mm de profundidade (Warner, 1962). A enumeração obtida a partir da média da leitura de dois campos foi expressa como o número de células ml^{-1} .

No dia 28 de cada período foi avaliada a atividade mastigatória por observação visual da atividade bucal de cada animal, a cada cinco minutos do dia, por 24 horas contínuas. As atividades bucais consideradas foram de ingestão de alimento, de ingestão de água, de ruminação e de ócio. O tempo de mastigação em minutos por dia foi definido como a soma dos tempos de ingestão de alimento e de ruminação. Os tempos de mastigação, ingestão e ruminação por unidade de matéria seca consumida foram calculados utilizando-se o consumo de matéria seca mensurado no dia da determinação da atividade mastigatória.

A concentração de derivados purínicos na urina foi mensurada para estimar a produção de proteína microbiana no rúmen. Uma amostra de urina foi coletada no início e no final de cada um dos três períodos de oito horas de coleta

total de fezes, nos dias 25 a 27 de cada período. Ao volume de urina coletado foi imediatamente adicionado 10% de ácido sulfúrico a 10% e a amostra foi armazenada a 4°C. Uma amostra composta foi formada para cada vaca no final de cada período. As amostras compostas foram diluídas com água destilada na proporção 1:3 entre urina e água e congeladas a -20°C até a realização das análises de alantoína e creatinina. Para a análise de alantoína, o procedimento adotado foi semelhante ao sugerido por Chen & Gomes (1995). Para a análise de creatinina foi utilizado kit de análise laboratorial (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Cat. 35-100).

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do SAS (1985), com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + V_{j(i)} + P_k + T_l + e_{ijkl}$$

Onde:

μ = Média geral

B_i = Efeito de bloco ($i = 1$ a 10)

$V_{j(i)}$ = Efeito de vaca dentro de bloco ($j = 1$ a 20)

P_k = Efeito de período ($k = 1$ ou 2)

T_l = Efeito de tratamento ($l = \text{Natucell, Controle}$)

e_{ijkl} = erro experimental, assumido independente e identicamente distribuído em uma distribuição normal com média zero e variância σ^2 .

A frequência de pH ruminal acima ou abaixo de 6,2 e a de CCS linear acima ou abaixo de 4 foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado, utilizando o procedimento FREQ do SAS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suplementação com leveduras tendeu a induzir aumento no consumo (TABELA 2) e na digestibilidade de nutrientes (TABELA 3), aumentando o CMOD (TABELA 2). O maior CMOD é uma explicação plausível para o ganho induzido por este tratamento sobre as produções de leite, proteína e lactose (TABELA 2). Os resultados sugerem que a cepa avaliada foi capaz de induzir resposta positiva nestas vacas em estágio mediano da lactação, e em espaço de tempo curto relativamente ao início da suplementação.

Resposta positiva em consumo e produção de leite à suplementação com leveduras vivas tem sido observada experimentalmente, associada a ganho em digestibilidade de nutrientes (Williams et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Wohlt et al., 1998). Em uma síntese de 14 experimentos, envolvendo 193 observações, a resposta média em produção de leite à suplementação com leveduras foi 1,45 litros (Sniffen et al., 2004). Nos estudos revisados que mensuraram o consumo diário de matéria seca houve aumento médio de 0,53 kg.

É pertinente considerar que apesar de o conteúdo de forragem e fibra na dieta oferecida ter sido adequado para atender a exigência mínima de vacas leiteiras por carboidratos fibrosos (NRC, 2001), o milho do concentrado sofreu processamento térmico industrial, capaz de aumentar a digestibilidade do amido (Theurer et al., 1999), e a dieta não foi suplementada com tamponantes ou outros manipuladores da fermentação ruminal (TABELA 1). A dieta também teve altos teores de silagem de milho de híbrido com amido oriundo de endosperma farináceo (Corrêa et al., 2002) e polpa cítrica (Miron et al., 2001), rapidamente fermentáveis no rúmen. Este perfil dietético pode ter contribuído para evidenciar a resposta à levedura. Tem sido postulado que o potencial de resposta à

suplementação com leveduras aumenta em dietas capazes de induzir maior acidez no ambiente ruminal (Williams et al., 1991).

TABELA 2. Desempenho de vacas leiteiras suplementadas (NatuCell®) ou não (Controle) com leveduras vivas.

	NatuCell®	Controle	EPM ¹	P Trat
	kg d ⁻¹			
CMS ²	21,4	20,7	0,32	0,11
CMO ²	20,2	19,4	0,30	0,10
CMOD ²	14,9	14,1	0,32	0,07
Leite	29,4	28,5	0,36	0,11
Gordura	0,910	0,896	0,0150	0,53
Proteína	0,919	0,884	0,0116	0,05
Lactose	1,265	1,212	0,0188	0,06
	%			
Gordura	3,24	3,31	0,044	0,26
Proteína	3,23	3,24	0,009	0,59
Lactose	4,43	4,40	0,022	0,39
	x 1.000 células ml ⁻¹			
CCS ³	374	513	162	0,55
CCS linear	3,85	3,81	0,204	0,90
	kg			
Peso vivo	651	648	1,5	0,19
	1 a 5 (Magra a gorda)			
Condição corporal	3,39	3,36	0,028	0,53
	mg dl ⁻¹			
Uréia no leite	14,6	14,3	0,25	0,43
	Mcal d ⁻¹			
Energia do leite	19,1	18,7	0,24	0,29
	Mcal kg ⁻¹			
Eficiência 1 ⁴	1,37	1,39	0,022	0,60
Eficiência 2 ⁴	0,89	0,91	0,015	0,31
Eficiência 3 ⁴	1,28	1,35	0,036	0,16

¹ EPM = Erro padrão da média.

² CMS = Consumo de matéria seca. CMO = Consumo de matéria orgânica.

CMOD = Consumo de matéria orgânica digestível.

³ CCS = Contagem de células somáticas.

⁴ Eficiência 1 = Leite/CMS. Eficiência 2 = Energia do leite/CMS. Eficiência 3 = Energia do leite/CMOD.

A tendência de aumento na digestibilidade da FDN quando leveduras foram suplementadas (TABELA 3) sugere que o aumento no CMOD pode ter sido mediado pelo ganho na digestão da fibra. A redução numérica na atividade mastigatória por unidade de CMS também sugere que a digestibilidade da fibra respondeu positivamente à suplementação com levedura (TABELA 4). O efeito benéfico das leveduras sobre a digestibilidade da fibra tem sido demonstrado *in vivo* (Wiedmeier et al., 1987; Erasmus et al., 1992; Wohlt et al., 1998). Vários mecanismos têm sido propostos como determinantes desta resposta (Wallace, 1994). Wallace & Newbold (2007) argumentam que o aumento no número total de bactérias ruminais, principalmente fibrolíticas, seria a principal rota pela qual a suplementação com leveduras poderia induzir ganho na digestão fibrosa.

TABELA 3. Digestibilidade aparente dos nutrientes no trato digestivo total de vacas leiteiras suplementadas (Natucell®) ou não (Controle) com leveduras vivas.

	Natucell®	Controle	EPM ¹	P Trat
	% do ingerido			
DMS ²	71,9	69,9	0,91	0,12
DMO ²	74,1	72,4	0,88	0,20
DFDN ²	48,1	43,2	1,86	0,08
DMOnFDN ²	86,7	86,7	0,68	0,95

¹ EPM = Erro padrão da média.

² DMS = Digestibilidade da matéria seca. DMO = Digestibilidade da matéria orgânica. DFDN = Digestibilidade da FDN. DMOnFDN = Digestibilidade da matéria orgânica não-FDN.

A síntese de proteína microbiana, estimada pela relação entre os teores de alantoína e creatinina na urina, foi maior quando as vacas foram suplementadas com levedura, apesar da falta de poder estatístico para dar suporte à diferença (TABELA 5). O crescimento microbiano pode ter sido estimulado pelas leveduras (Harrison et al., 1988; Newbold et al., 1995), o que

aumentaria o fluxo de proteína microbiana para o duodeno (Erasmus et al., 1992), coerente com o aumento induzido pela suplementação sobre a secreção diária de proteína no leite (TABELA 2).

TABELA 4: Atividade mastigatória de vacas leiteiras suplementadas (Natucell®) ou não (Controle) com leveduras vivas.

	Natucell®	Controle	EPM ¹	P Trat
	min/d			
Ruminação	414	417	12,0	0,86
Ingestão	263	253	6,8	0,31
Mastigação ²	678	671	15,5	0,75
	min/kg de CMS ³			
Ruminação	19,6	21,2	0,90	0,22
Ingestão	12,4	12,8	0,53	0,59
Mastigação	32,0	34,0	1,34	0,30

¹ EPM = Erro padrão da média.

² Mastigação = Ruminação + Ingestão.

³ Atividade mastigatória em minutos por kg de consumo de matéria seca (CMS).

Um possível mecanismo pelo qual leveduras induziriam aumento na população microbiana do rúmen seria por indução de maior pH (Nisbet & Martin; 1991; Chaucheyras et al., 1996;). Bach et al. (2007) observaram que a suplementação de vacas leiteiras com a cepa CNCM I-1077 foi capaz de induzir aumento no pH ruminal médio e redução no tempo diário de pH abaixo de 5,6 e 6,0. O pH ruminal mensurado 12 horas após a primeira alimentação do dia foi numericamente maior quando os animais foram suplementadas com levedura (TABELA 6), coerente com a tendência observada de aumento na digestão fibrosa (TABELA 3) por ser teoricamente menos inibidor dos microorganismos ruminais fibrolíticos (Mertens & Loften, 1980). Entretanto, a frequência de pH ruminal abaixo de 6,2 não diferiu entre tratamentos ($P=1,0$ para Qui-Quadrado), evidenciando que uma possível resposta em pH ruminal não pôde ser detectada neste experimento. As amostras aqui obtidas representaram o fluido ruminal

amostrado em apenas um momento do dia, o que reduz a possibilidade de encontrar diferenças entre tratamentos, comparativamente a amostras de fluido obtidas ao longo de vários dias em animais com cânula ruminal (Erasmus et al., 1992; Bach et al., 2007).

TABELA 5. Concentração de derivados purínicos na urina de vacas leiteiras suplementadas (NatuCell®) ou não (Controle) com leveduras vivas.

	NatuCell®	Controle	EPM ¹	P Trat
	mM			
Alantoína	20,76	17,93	1,482	0,20
Creatinina	8,06	7,54	1,774	0,84
Alan/Creat	6,32	5,05	1,035	0,40

¹ EPM = Erro padrão da média

Brossard et al. (2004) sugerem que o efeito estabilizador do pH ruminal do *Saccharomyces cerevisiae* poderia ser mediado pela estimulação dos protozoários ruminais, capazes de fagocitar grânulos de amido, competindo com as bactérias amilolíticas por substrato e tornando a degradação deste substrato mais lenta no rúmen (Bonhomme, 1990). Estes autores detectaram aumento na população de protozoários e no pH ruminal de cordeiros suplementados com a mesma cepa de levedura utilizada neste experimento. Entretanto, não foi detectado efeito de tratamento sobre a concentração de protozoários no fluido ruminal (TABELA 6). O mecanismo pelo qual as leveduras induziram aumento na digestão fibrosa não pôde ser elucidado.

Não foi evidenciado o efeito da suplementação com levedura sobre a eficiência de conversão do consumido em leite ou sobre a eficiência de conversão da energia digerida em energia no leite (TABELA 2). O uso de leveduras como manipulador da eficiência energética de ruminantes não pôde ser suportado por estes dados. Leveduras poderiam estimular bactérias

acetogênicas hidrogeniotróficas presentes no rúmen (Chaucheyras et al., 1995), reduzindo a perda de energia na forma de metano, sem, no entanto, induzir queda na relação entre acetato e propionato, própria dos ionóforos (Schelling, 1984).

TABELA 6. Perfil de fermentação ruminal de vacas leiteiras suplementadas (Natucell®) ou não (Controle) com leveduras vivas.

	Natucell®	Controle	EPM ¹	P Trat
	mM			
Acetato	86,3	89,5	2,89	0,44
Propionato	28,7	29,4	0,71	0,51
Butirato	14,5	15,8	0,77	0,26
AGV total ²	129,5	134,7	4,03	0,38
	% do AGV Total			
Acetato	66,4	66,5	0,57	0,94
Propionato	22,3	21,8	0,38	0,36
Butirato	11,2	11,8	0,33	0,36
Acetato/Propionato	2,99	3,06	0,073	0,54
	x 10 ⁴ organismos ml ⁻¹			
Protozoários	11,1	12,1	1,48	0,62
Ph	6,50	6,43	0,052	0,35

¹ EPM = Erro padrão da média

² AGV total = Acetato + Propionato + Butirato

Pode ser que a capacidade de estimular acetogênese a partir de dióxido de carbono e hidrogênio (Wood, 1991) não seja uma propriedade do produto utilizado neste experimento. Schingoethe et al. (2004) observaram que a suplementação de vacas leiteiras com leveduras mortas aumentou a eficiência de conversão da matéria seca consumida em energia no leite, similarmente ao estímulo observado sobre o metabolismo acetogênico quando leveduras autoclavadas foram adicionadas ao fluido ruminal *in vitro* (Chaucheyras et al., 1995). Estes resultados sugerem que este mecanismo não requer a

suplementação com células viáveis (Nisbet & Martin, 1991; Newbold et al., 1996), mas pode exigir quantidade de levedura suplementar superior à aqui utilizada (Nisbet & Martin, 1991).

É postulado que as diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* diferem na sua habilidade de induzir mudanças na fermentação ruminal (Newbold et al., 1995). Não foi detectado efeito da cepa CNCM I-1077 sobre o perfil de fermentação ruminal, avaliado pela relação entre os ácidos acético e propiônico (TABELA 6). Este resultado está de acordo com o observado por Doreau & Jouany (1998), utilizando a mesma cepa e na mesma dosagem utilizada neste experimento.

Os efeitos do *Saccharomyces cerevisiae* sobre a proporção de ácidos graxos voláteis no rúmen têm sido variáveis (Wiedmeier et al., 1987; Williams et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Piva et al., 1993; Doreau & Jouany, 1998; Erasmus et al., 2005). A possibilidade de efeito favorável das leveduras sobre a acetogênese ruminal a partir de hidrogênio (Chaucheyras et al., 1995) deveria resultar em aumento na relação entre acetato e propionato. Maior relação entre estes ácidos também seria uma resposta esperada à maior atividade dos microorganismos fibrolíticos, supostamente ligada à maior digestibilidade da fibra em dietas suplementadas com leveduras (Wiedmeier et al., 1987; Wohlt et al., 1998). É pertinente avaliar a frequência na qual a suplementação com leveduras poderia induzir aumento na relação entre acetato e propionato, não vinculada a aumento na excreção de metano. Entretanto, existem relatos de queda na relação entre os ácidos acético e propiônico quando ruminantes são suplementados com leveduras (Williams et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Erasmus et al., 2005). O mecanismo para este achado não é claro.

Não foi evidenciado efeito da levedura sobre o metabolismo ruminal de nitrogênio, evidenciado pela similaridade nas concentrações de nitrogênio uréico no leite (TABELA 2) e no plasma (TABELA 7) entre tratamentos. Mecanismos

propostos para a queda induzida por leveduras na concentração ruminal de amônia seriam o maior crescimento microbiano e assimilação de nitrogênio pelas bactérias (Harrison et al., 1988) ou a inibição das peptidases bacterianas pela presença das leveduras no fluido ruminal (Putnam et al., 1997; Chaucheyras-Durand et al., 2005).

TABELA 7. Uréia no plasma de vacas leiteiras suplementadas (NatuCell®) ou não (Controle) com leveduras vivas.

	NatuCell®	Controle	EPM ¹	P Trat
	mg dl ⁻¹			
Antes da alimentação	15,4	14,5	1,40	0,66
Duas horas após alimentação	17,7	18,1	2,06	0,91

¹ EPM = Erro padrão da média

A suplementação com leveduras tem sido utilizada em monogástricos para induzir melhoria da função imune, tanto entérica quanto sistêmica (Davis et al., 2004). Derivados solúveis da levedura, como as glucanas, podem passar do trato gastrointestinal para a circulação dos animais (Rice et al., 2005), possuindo capacidade imunoestimulante. A resposta na contagem de células somáticas pode ser mediada pelo sistema comum de mucosas (Perdigón et al., 1999). Por este mecanismo, a resposta imune em mucosas induz a migração de células do sistema imune não apenas para o órgão em que ocorreu o estímulo, mas também para outros locais como trato respiratório, urogenital e glândula mamária. Entretanto, a suplementação com levedura não foi capaz de atuar sobre a CCS do leite neste experimento (TABELA 2). A frequência de CCS linear abaixo de 4,0 também não foi diferente entre tratamentos ($P=0,51$ para Qui-Quadrado).

5 CONCLUSÕES

A suplementação de vacas leiteiras com 1×10^{10} ufc de células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 aumentou as produções de proteína e lactose de vacas leiteiras em estágio mediano da lactação e consumindo dieta baseada em silagem de milho e alto teor de polpa cítrica peletizada.

A resposta positiva em desempenho foi aparentemente mediada pelo maior consumo de energia dos animais suplementados, aparentemente ditado pela maior digestibilidade aparente da fibra no trato digestivo total. Entretanto, o mecanismo para o ganho em digestibilidade fibrosa não pôde ser elucidado.

O aumento numérico na excreção urinária de derivados purínicos sugere que a suplementação com levedura pode ter induzido maior síntese ruminal de proteína microbiana.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAMBEL, M. J.; KENT, B. A. Effect of yeast culture on nutrient digestibility and milk yield response in early- to midlactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, p. 1560-1563, 1990.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. **Official Publication 1997**, Association of American feed control officials. 1997. 185 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12^a ed. v. 1, Washington, D.C., 1975. 1094 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15^a ed., vol.1, Virgínia, Arlington, 1990. 1117 p.

BACH, A.; IGLESIAS, C.; DEVANT, M. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. **Animal Feed Science and Technology**, Shannon, v. 136, p. 146-153, 2007.

BARKER, I. K.; VAN DREUMEL, A. A.; PALMER, N. The alimentary system. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4^a ed. Academic Press, Inc, San Diego, 1995. v. 2.

BONHOMME, A. Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. **Animal Feed Science and Technology**, Shannon, v. 30, p. 203-266, 1990.

BRODERICK, G. A.; CRAIG, W. M. Mechanism of protein degradation by rumen microbes. **Feeding Procedures**, v. 42, p. 532, 1983.

BROSSARD, L.; MARTIN, C.; CHAUCHEYRAS, D. F. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 44, p. 44, 2004.

CALDWELL, D. R.; BRYANT, M. P. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 14, p. 794, 1966.

CALLAWAY, E. S.; MARTIN, S. A. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 2035-2044, 1997.

CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G.; BERTIN, G.; GOUET, P. *In vitro* H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archae methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3466-3467, 1995.

CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G.; BERTIN, G.; SALMON, J. M.; GOUET, P. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatchewan, v. 42, p. 927-933, 1996.

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

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; FONTY, G. Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentation in the rumen of newborn lambs. **Microbiology Ecology Health**, London, v. 14, p. 30-36, 2002.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; FONTY, G.; BERTIN, G.; THEVENIOT, M.; GOUET, P. Fate of Levucell SC I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 38, p. 275-280, 1998.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; MASSEGLIA, S.; FONTY, G. Effect of microbial feed additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 on protein and peptide degrading activities of rumen bacteria grown *in vitro*. **Current Microbiology**, New York, v. 50, p. 96-101, 2005

CHEN, X. B.; GOMES, J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – An overview of the technical details**. International Feed Resources Unit. Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, UK. 1995. 20 p.

CHEVAUX, E.; HAIMOUD-LEKHAL, D. A. Effect of Levucell SC CNCM I-1077 supplementation in dairy cow feed on milk production and milk composition. In: **Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants**, Paris, France, v. 10, p. 391, 2002.

CORREA, C. E.; SHAVER, R. D.; PEREIRA, M. N.; LAUER, J.G.; KOHN, K. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 3088-3012, 2002.

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

DANN, H. M.; DRACKLEY, J. K.; McCOY, G. C.; HUTJENS, M. F.; GARRET, J. E. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 123-127, 2000.

DAVIS, M. E.; MAXWELL, C. V.; ERF, G. F.; BROWN, D. C.; WISTUBA, T. J. Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 1882-1891, 2004.

DAWSON, K. A.; NEWMAN, K. E.; BOLING, J. A. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, p. 3392-3398, 1990.

DEHORITY, B. Evaluating of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, p. 182-185, 1984.

DOREAU, M.; JOUANY, J. P. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 3214-3221, 1998.

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

ERASMUS, L. J.; ROBINSON, P. H.; AHMADI, A.; HINDERS, R.; GARRETT, J. E. Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Shannon, v. 122, p. 219-239, 2005.

FULLER, R. A review: probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 66, p. 365-378, 1989.

HARRISON, G. A.; HEMKEN, R. W.; DAWSON, K. A.; HARMON, R. J. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, p. 2967-2975, 1988.

HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. 2^a ed. London: Black Academic & Professional. 1997. 719 p.

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

JUCHEM, S. O.; COSCIONI, A.; VILLASENOR, M.; SISCHA, W. M.; SANTOS, P. G.; NUNES, P. G.; PINTO, C. J. Effect of feeding a live yeast product (*Saccharomyces cerevisiae*) to bull calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 343, 2003 (Abstract).

KAMALAMMA, KRISHNAORTHY, U.; KRISHNAPPA, P. Effect of feeding yeast culture (Yea-sacc ¹⁰²⁶) on rumen fermentation *in vitro* and production performance in crossbreed dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Shannon, v. 57, p. 247-256, 1996.

KREHBIEL, C. R.; RUST, S. R.; ZHANG, G.; GILLILAND, S. E. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. 120-132, 2003.

KUNG, Jr. E.; KRECK, E. M.; TUNG, R. S.; HESSION, A. O.; SHEPERD, A. C.; COHEN, M. A.; SWAIN, H. E.; LEEDLE, J. A. Z. Effects of a live yeast culture and enzymes on *in vitro* ruminal fermentation and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 2045-2051, 1997.

KUNG, L. HUBER, J. T.; KRUMMREY, J. D.; ALLISON, L. COOK, R. M. Influence of adding malic acid to dairy cattle rations on milk production, rumen volatile acids, digestibility, and nitrogen utilization. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, p. 1170-1174, 1982.

LEEDLE, J. A. Z.; GREENING, R. C. Postprandial changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumens of steers fed high- or low-forage diets once daily. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 502-506, 1988.

LESMEISTER, K. E.; HEINRICHS, A. J.; GABLER, M. T. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 1832-1839, 2004.

LILA, Z. A.; MOHAMMED, N.; YASUI, T.; KUROKAWA, Y.; KANDA, S.; ITABASHI, H. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 1847-1854, 2004.

LINEHAN, B.; SCHEIFINGER, C. C.; WOLIN, M. J. Nutritional requirements of *Selenomonas ruminantium* for growth on lactate, glycerol, or glucose. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 35, p. 317-322, 1978.

LUND, A. Yeasts and moulds in the bovine rumen. **Journal of General Microbiology**, Spencers Wood, v. 81, p. 453-462, 1974.

LYNCH, H. A.; MARTIN, S. A. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 2603-2608, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 8^a ed. Prentice Hall, Inc. 1997. 986 p.

MARTIN, S. A.; NISBET, D. J. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, p. 1736-1744, 1992.

MARTIN, S. A.; PARK, C. M. Effect of extracellular hydrogen on organic acid utilization by ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **Current Microbiology**, New York, v. 32, p. 327-331, 1996.

MARTIN, S. A.; STREETER, M. N. Effect of malate on in vitro mixed ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 2141-2145, 1995.

MCGINN, S. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; COATES, T.; COLOMBATTO, D. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 3346-3356, 2004.

MELVILLE, S. B.; MICHEL, T. A. MACY, J. M. Pathway and sites for energy conservation in the metabolism of glucose by *Selenomonas ruminantium*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 5298-5304, 1988.

MERTENS, D. R.; LOFTEN, J. R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, p. 1437-1446, 1980.

MICHALET-DOREAU, B.; MORAND, D. Effect of yeast culture, *Saccharomyces cerevisiae* SC CNCM I-1077, on ruminal fermentation during adaptation to high-concentrate feeding. In: **Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants**, Paris, France, v. 4, p. 121, 1997.

MICHALET-DOREAU, B.; MORAND, D.; MARTIN, C. Effect of the microbial additive Levucell SC CNCM I-1077 on microbial activity in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diet. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, EE5, Suppl 1-88, p. 82, 1997.

MIRON, J.; YOSEF, E.; BEN-GHEDALIA, D. Composition and *in vitro* digestibility of monosaccharide constituents of selected byproduct feeds. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 2322-2326, 2001.

MORVAN, B.; DORÉ, J.; RIEU-LESME, F.; FOUCAT, L.; FONTY, G.; GOUET, P. Establishment of hydrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb. **FEMS Microbiology Letters**, London, v. 125, p. 77-82, 1994.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7 ed. rev. Washington DC: National Academy Press, 2001. 381 p.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; CHEN, X. B.; McINTOSH, F. M. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 1811-1818, 1995.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; McINTOSH, F. M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 76, p. 249-261, 1996.

NISBET, D. J.; MARTIN, S. A. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 4628-4633, 1991.

OLIVEIRA, B. M. L.; BITENCOURT, L. L.; SILVA, J. R. M.; PEREIRA, M. N. Suplementação de vacas leiteiras com *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500. In: **XVI Congresso de Pós-Graduação da Universidade Federal de Lavras**, 2007, Lavras: Anais... Lavras, 2007.

PANCHAL, C. J.; RUSSELL, L.; SILLS, A. M.; STEWART, G. G. Genetic manipulation of brewing and related yeast strains. **Food Technology**, Chicago, v. 99, p. 111, 1984.

PERDIGÓN, G., VINTIÑI, E., ALVAREZ, S., MEDINA, M., MEDICI, M. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 1108, 1999.

PEREIRA, M. N. Morfologia e fisiologia ruminais. In: **Seminário de Integridade Digestiva**, Itatiba. Anais... São Paulo, Elanco Saúde Animal, 2005, p. 1-10.

PIVA, G.; BELLADONA, S.; FUSCONI, G.; SICBALDI, F. Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 2717-2722, 1993.

PLATA, P. F.; MENDOZA, M. G. D.; BÁRCENA-GAMA, J. R.; GONZÁLEZ, M. S. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. **Animal Feed Science and Technology**, Shannon, v. 49, p. 203, 1994 (Abstract).

PUTNAM, D. E.; SCHWAB, C. G.; SOCHA, M. T.; WHITEHOUSE, N. L.; KIERSTEAD, N. A.; GARTHWAITE, B. D. Effect of yeast culture in the diets of early lactation dairy cows on ruminal fermentation and passage of nitrogen fractions and amino acids to the small intestine. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 374-384, 1997.

RICE, P.J., ADAMS, E.L., WILLIAMS, D.L. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 314, p. 1079-1086, 2005.

ROBINSON, P. H.; GARRET, J. E. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to postpartum diets and on lactational performance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 988-999, 1999.

ROGER, V.; FONTY, G.; KOMISARCZUK, B. S.; GOUET, P. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the rumen bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 3081-3087, 1990.

ROSE, A. H. Yeast culture, a micro-organism for all species: a theoretical look at its mode of action. In: **Biotechnology in the feed industry**, p. 113-118, Nicholasville, Kentucky: Alltech Technical Publications, 1987.

ROSEMBERG, G. **Exame clínico dos bovinos** 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419 p.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. 1 ed. Ithaca, New York, 2002. 119 p.

SAS Institute. **SAS[®] user's guide: statistics**. 5 ed. Cary, 1985. 1290 p.

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

SCHINGOETHE, D. J.; LINKE, K. N.; KALSCHEUR, K. F.; HIPPEN, A. R.; RENNICH, D. R.; YOON, I. Feed efficiency of mid-lactation dairy cows fed yeast culture during summer. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p. 4178-4181, 2004.

SCOTT, R. I.; YARLETT, N.; HILLMAN, K.; WILLIAMS, T. N.; WILLIAMS, A. G.; LLOYD, D. The presence of oxygen in rumen liquor and its effects on methanogenesis. **Journal of Applied Bacteriology**, Bedford, v. 55, p. 143-149, 1983.

SNIFFEN, C. J.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; ONDARZA, M. B.; DONALDSON, G. Predicting the impact of a live yeast strain (Levucell SC CNCM I-1077) on rumen kinetics and ration formulation. In: **Proceedings of South West Nutrition Conference**, Phoenix, Arizona, USA. 2004.

SODER, K. J.; HOLDEN, L. A. Dry matter intake and milk yield and composition of cows fed yeast prepartum and postpartum. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 605-610, 1999.

SULLIVAN, H. M.; MARTIN, S. A. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 2011-2016, 1999.

SWARTZ, D. L.; MULLER, L. D.; ROGERS, G. W.; VARGA, G. A. Effect of yeast culture on performance of lactating dairy cows: A field study. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, p. 3073-3080, 1994.

THEURER, C. B.; HUBER, J. T.; DELGADO ELORDUY, A.; WANDERLEY, R. Invited review: summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 1950-1959, 1999.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition**, Berlin, v. 40, p. 543-551, 1990.

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

WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. **Microbial feed additives for ruminants**. Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, UK. Disponível em: http://www.old-herbornuniversity.de/literature/books/OHUni_book_8_article_9.pdf Acesso em: 18 nov. 2007.

WANG, Z.; EASTRIDGE, M. L.; QIU, X. Effects of forage neutral detergent fiber and yeast culture on performance of cows during early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 204-212, 2001.

WARNER, A. C. I. Enumeration of rumen microorganisms. **Journal of General Microbiology**, Spencers Wood, v. 28, p. 119-128, Janeiro 1962.

WEIMER, P. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological Perspective. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, p. 3114-3122, 1988.

WIEDMEIER, R. D.; ARAMBEL, M. J.; WALTERS, J. L. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, p. 2063-2068, 1987.

WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E.; BOMAN, R. L.; TROUTT Jr., H. F.; LESCH, T. N. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, p. 495-501, Marco 1982.

WILLIAMS, P. E. V.; TAIT, C. A. G.; INNES, G. M.; NEWBOLD, C. J. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, p. 3016-3026, 1991.

WOHLT, J. E.; CORCIONE, T. T.; ZAJAC, P. K. Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 1345-1352, 1998.

WOHLT, J. E.; FINKELSTEIN, A. D.; CHUNG, C. H. Yeast culture to improve intake, nutrient digestibility, and performance by dairy cattle during early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 1395-1400, 1991.

WOOD, H. G. Life with CO or CO₂ and H₂ as a source of carbon and energy. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 5, p. 156-163, 1991.