

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Escola de Veterinária**

**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

Débora Fernandes de Paula Vieira

**USO DE MILHO REIDRATADO COM INOCULANTE (*Rhodotorula mucilaginosa* +  
*Trichoderma longibrachiatum*) NA ALIMENTAÇÃO DE CORDEIROS EM  
TERMINAÇÃO RECEBENDO VOLUMOSO DE BAIXA QUALIDADE**

Belo Horizonte

2023

Débora Fernandes de Paula Vieira

**USO DE MILHO REIDRATADO COM INOCULANTE (*Rhodotorula mucilaginosa* +  
*Trichoderma longibrachiatum*) NA ALIMENTAÇÃO DE CORDEIROS EM  
TERMINAÇÃO RECEBENDO VOLUMOSO DE BAIXA QUALIDADE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em zootecnia.

Prof. Orientador: Dr. Luciano Soares de Lima

Belo Horizonte

2023

V658u Vieira, Débora Fernandes de Paula, 1997 -  
Uso de milho reidratado com inoculante (*Rhodotorula mucilaginosa* *Trichoderma longibrachiatum*) na alimentação de cordeiros em terminação recebendo volumoso de baixa qualidade / Débora Fernandes de Paula Vieira . - 2023.  
48 f.

Orientador: Luciano Soares de Lima  
Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.  
Área de concentração: Produção de Ruminantes.  
Inclui bibliografia.

1. Cordeiro – Alimentação e rações - Teses - 2. Digestibilidade - Teses – 3. Dieta em Veterinária - Teses – I. Lima, Luciano Soares de - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

**CDD – 636.085**



Escola de Veterinária  
UFMG

ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA  
Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 30123-970 - Belo Horizonte - MG  
TELEFONE (31) 3409-2173

www.set.ufmg.br/academico/pos-graduacao  
E-mail: cpgzootec@vet.ufmg.br

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DÉBORA FERNANDES DE PAULA VIEIRA

As 14:00 horas do dia 01 de fevereiro de 2023, reuniu-se a Comissão Examinadora de dissertação, aprovada em reunião ordinária no dia 14/12/2022, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada: **Uso de milho reidratado com inoculante (*Rhodotorula mucilaginosa* + *Trichoderma longibrachiatum*) na alimentação de cordeiros em terminação recebendo volumoso de baixa qualidade**, como requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia, área de concentração **Produção de ruminantes**

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Luciano Soares de Lima, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de dissertação, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Profa. Dra. Iraides Ferreira Furucho Garcia	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Profa. Dra. Hemilly Cristina Menezes de Sá	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Luciano Soares de Lima	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

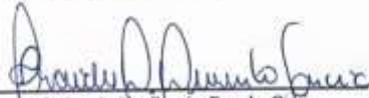
Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a):  Aprovado (a)  
 Reprovado (a)

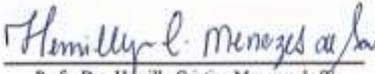
Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar 03 volumes encadernados da versão final da dissertação acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data defesa.

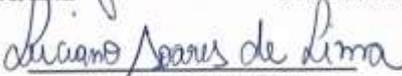
O resultado final, foi comunicado publicamente ao (a) candidato (a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora e encaminhada juntamente com um exemplar da dissertação apresentada para defesa.

Belo Horizonte, 01 de fevereiro de 2023

Assinatura dos membros da banca:

  
Profa. Dra. Iraides Ferreira Furucho Garcia  
Universidade Federal de Lavras

  
Profa. Dra. Hemilly Cristina Menezes de Sá  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Prof. Dr. Luciano Soares de Lima  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Orientador

***Dedicatória:***

*Á Deus, por me fortalecer dia após dia,  
aos meus pais Charles e Flávia, meu  
esposo Matheus e meus irmãos  
Mariana, Ana e Isaac que sempre  
acreditaram em mim. Dedico também  
ao meu primo Davi por me ensinar a  
ser forte dia após dia!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por ser meu guia, meu porto seguro, por me manter firme até alcançar meu objetivo.

Agradeço aos meus pais, Charles e Flávia, meus primeiros professores, por ter me ensinado a ser quem eu sou, por todo amor, apoio, investimento, sou muito grata.

Ao meu esposo Matheus, por me apoiar me incentivar e não me deixar desistir, por maior que fosse a dificuldade, nunca saiu do meu lado.

Agradeço aos meus irmãos, Mariana, Ana Luiza e Isaac por acreditarem em mim, pelo tempo de qualidade que sempre deixava o ambiente mais leve.

Agradeço a minha família por todo apoio, incentivo e força me dado dia após dia durante minha jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Soares de lima por todo aconselhamento, aprendizado, paciência, risadas e pelos lenços de papel que já deixava guardado para me ajudar em momentos de desânimo.

Agradeço à professora Dr. Hemilly Cristina por todo auxílio, paciência e dedicação, risadas e disposição em todo os momentos, serei eternamente grata.

Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Robson por todo investimento, e todo direcionamento para realização desse projeto.

Agradeço as minhas colegas Nathália e Evellyn pela paciência, desabafos, risadas, abraços e por todo apoio ao longo dessa caminhada.

Agradeço a toda equipe da fazenda “Santa Terezinha” do grupo Carapreta, especialmente ao Dr. Geraldo Jorge, pelo grande auxílio via disponibilização dos animais para realização da pesquisa.

Agradeço a todos os participantes do grupo FEED e NEPPER da

UFMG por todo apoio na execução do trabalho, e boas risadas.

Agradeço a todos os amigos que fiz durante essa etapa, pelo apoio, cumplicidade e lanches compartilhados.

Ao Colegiado de pós graduação em zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais, agradeço todo direcionamento dado nessa jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da minha bolsa de estudos.

A todos minha eterna gratidão!

## RESUMO

VIEIRA, D.F.P. Universidade Federal de Minas Gerais, Fevereiro de 2023. 48p. **Uso de milho reidratado com inoculante (*Rhodotorula mucilaginosa* + *Trichoderma longibrachiatum*) na alimentação de cordeiros em terminação recebendo volumoso de baixa qualidade.** Orientador: Luciano Soares de Lima. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).

É bem estabelecido na literatura científica que forragens tropicais são caracterizadas por baixa proporções de carboidratos solúveis e alta proporção de parede celular contendo lignina. A alimentação de ruminantes com forragens de baixa qualidade impacta negativamente no desempenho produtivo animal e estimula os esforços para melhorar o aproveitamento dos nutrientes presentes nesses volumosos. Neste sentido, o uso microrganismos vivos na alimentação pode beneficiar a nutrição e a saúde animal pela modificação da ecologia microbiana do trato gastrointestinal. Desta forma, fungos e leveduras têm sido apontadas na literatura como capazes de influenciar positivamente os parâmetros ruminais. Além da suplementação direta, estudos têm demonstrado que alguns microrganismos em inoculantes utilizados na confecção de silagens podem permanecer ativos no rúmen após a ingestão pelo animal. Sendo assim, a presente proposta foi realizada com o objetivo principal de avaliar os efeitos do uso da silagem de milho moído reidratado como veículo, para o fornecimento do inoculante composto por fungo e levedura (*Rhodotorula mucilaginosa* + *Trichoderma longibrachiatum*) isolados do conteúdo gastrointestinal de ovinos sobre o desempenho produtivo de cordeiros confinados. O experimento foi conduzido no Laboratório de Metabolismo Animal do Departamento de Zootecnia, pertencente à Universidade Federal de Minas Gerais. Foram utilizados 22 cordeiros Dorper × Santa Inês machos inteiros ( $14,20 \pm 1,74$  kg de peso corporal, aproximadamente três meses de idade) oriundos de um mesmo lote distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos. O período experimental foi composto de 63 dias (dividido em três períodos de 21 dias). Os animais foram previamente adaptados às dietas e instalações por 15 dias. Os tratamentos experimentais foram: 1) ração controle contendo milho moído reidratado e ensilado sem inoculante (CTL); 2) ração contendo milho reidratado e ensilado com inoculante de microrganismos autóctones (INO). A dose experimental da associação dos microrganismos foi de  $1 \times 10^9$  UFC/kg de milho reidratado (Diaz et al 2018 a; Martins Junior, 2022; Magaço et al 2020; Júnior et al 2022). Ao longo do período experimental foram realizados três ensaios de digestibilidade com cinco dias de duração: 1) 9º ao 13º dia, 2) 29º ao 33º dia e 3) 50º ao 54º dia. Nesse período foi coletado amostras de

fezes, urina, sobras e fornecido. Para avaliação microbiológica do material ensilado, foram confeccionados mini silos de PVC com 0,10 m de diâmetro e 0,40 m de altura. Não foi observada interação entre tratamento e período ( $P > 0,05$ ) para a ingestão de matéria seca e dos nutrientes. Os cordeiros alimentados com o tratamento INO apresentaram menor ingestão de MS ( $P = 0,002$ ), MO ( $P = 0,002$ ), PB ( $P = 0,003$ ) e FDN ( $P < 0,00$ ) em relação ao grupo controle. Em contrapartida, o desempenho dos cordeiros do grupo controle e inoculante, foram semelhantes. O milho moído reidratado ensilado e inoculado com as cepas em estudo, apresentou menor quantidade de fibra em detergente neutro (89,9g/kg MS) ao ser comparado com o milho ofertado ao grupo controle (134,8g/kg MS). Mesmo não obtendo diferenças estatísticas para eficiência alimentar ( $P = 0,91$ ), o sinergismo do fungo e da levedura contribuiu para a atividade fibrolítica no processo de ensilagem. Dessa forma, foi ofertado ao animal uma silagem com menor teor de fração fibrosa insolúvel resultando em um melhor aproveitamento dietético. Os silos experimentais também demonstraram a qualidade do material ofertado aos animais. Apresentaram inicialmente uma população de bactérias formadoras ácido lático nos dois tratamentos e períodos estudados (0 – 56 dias). Essas bactérias fazem parte da microflora endógena e são essenciais para o processo fermentativo pois promovem a conversão de carboidratos, seu principal substrato, em ácidos orgânicos, geralmente ácido acético e ácido lático. Em nosso estudo, o grupo tratado consumiu 9,6% a menos que o grupo controle, apresentando o mesmo desempenho. Conclui-se que a suplementação de cordeiros em terminação com *Rhodotorula mucilaginosa* + *Trichoderma longibrachiatum* apresenta potencial para uso como inoculantes em dietas baseadas em volumosos de baixa qualidade.

**Palavras chave:** dieta; eficiência; fibras; fungos; inoculante; leveduras; ruminantes.

## ABSTRACT

VIEIRA, D.F.P. Federal University of Minas Gerais, February 2023. 48p. **Use of rehydrated corn with inoculant (*Rhodotorula mucilaginosa* + *Trichoderma longibrachiatum*) in the feeding of finishing lambs receiving low quality roughage.** Advisor: Luciano Soares de Lima. Dissertation (Master in Animal Science).

It is well established in the scientific literature that tropical forages are characterized by low proportions of soluble carbohydrates and a high proportion of cell wall containing lignin. Feeding ruminants with low quality forages has a negative impact on the animal's productive performance and encourages efforts to improve the use of nutrients present in these roughages. In this sense, the use of live microorganisms in food can benefit animal nutrition and health by modifying the microbial ecology of the gastrointestinal tract. Thus, fungi and yeasts have been identified in the literature as capable of positively influencing ruminal parameters. In addition to direct supplementation, studies have shown that some microorganisms in inoculants used to make silage can remain active in the rumen after ingestion by the animal. Therefore, the present proposal was carried out with the main objective of evaluating the effects of using rehydrated ground corn silage as a vehicle, for the supply of the inoculant composed of fungus and yeast (*Rhodotorula mucilaginosa* + *Trichoderma longibrachiatum*) isolated from the gastrointestinal contents of sheep, on the productive performance of feedlot lambs. The experiment was carried out at the Laboratory of Animal Metabolism of the Department of Animal Science, belonging to the Federal University of Minas Gerais. Twenty-two uncastrated male Dorper × Santa Inês lambs ( $14.20 \pm 1.74$  kg of body weight, approximately three months old) from the same batch were randomly distributed into two treatments. The experimental period consisted of 63 days (divided into three periods of 21 days). The animals were previously adapted to the diets and facilities for 15 days. The experimental treatments were: 1) control diet containing rehydrated and ensiled ground corn without inoculant (CTL); 2) diet containing rehydrated and ensiled corn with inoculant of autochthonous microorganisms (INO). The experimental dose of the association of microorganisms was  $1 \times 10^9$  CFU/kg of rehydrated corn (Diaz et al 2018a; Martins Junior, 2022; Magaço et al 2020; Júnior et al 2022). During the experimental period, three digestibility tests were carried out with five days duration: 1) 9th to 13th day, 2) 29th to 33rd day and 3) 50th to 54th day. During this period, samples of feces, urine, leftovers were collected and provided. For microbiological evaluation of the ensiled material, mini PVC silos

with 0.10 m in diameter and 0.40 m in height were made. No interaction was observed between treatment and period ( $P>0.05$ ) for dry matter and nutrient intake. Lambs fed with the INO treatment had lower intake of DM ( $P = 0.002$ ), MO ( $P = 0.002$ ), CP ( $P = 0.003$ ) and NDF ( $P<0.00$ ) compared to the control group. On the other hand, the performance of lambs in the control and inoculant groups were similar. rehydrated ground corn ensiled and inoculated with the strains under study showed a lower amount of neutral detergent fiber (89.9g/kg DM) when compared to the corn offered to the control group (134.8g/kg DM). Even without obtaining statistical differences for feed efficiency ( $P=0.91$ ), the fungus and yeast synergism contributed to the fibrolytic activity in the ensiling process. In this way, the animal was offered a silage with a lower content of insoluble fibrous fraction resulting in a better dietary use. The experimental silos also demonstrated the quality of the material offered to the animals. They initially presented a population of lactic acid-forming bacteria in the two treatments and periods studied (0 - 56 days). These bacteria are part of the endogenous microflora and are essential for the fermentation process as they promote the conversion of carbohydrates, their main substrate, into organic acids, usually acetic acid and lactic acid. In our study, the treated group consumed 9.6% less than the control group, presenting the same performance. It is concluded that the supplementation of finishing lambs with *Rhodotorula mucilaginosa* + *Trichoderma longibrachiatum* has potential for use as inoculants in diets based on low quality roughage.

**Keywords:** diet; efficiency; fibers; fungi; inoculant; ruminants; yeasts.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ingredientes e composição química das rações .....	27
Tabela 2 - Análise bromatológica dos alimentos que compõe as rações experimentais	28
Tabela 3 – Ingestão diária de matéria seca e nutrientes (g/kg PV <sup>0,75</sup> ) em cordeiros Dorper alimentados com rações contendo milho reidratado com ou sem inoculantes de microrganismos autóctones. ....	30
Tabela 4 – Digestibilidade aparente do trato total (g/kg) em cordeiros Dorper alimentados com rações contendo milho reidratado com ou sem inoculantes de microrganismos autóctones. ....	31
Tabela 5 – Balanço de nitrogênio em cordeiros Dorper alimentados com rações contendo milho reidratado com ou sem inoculantes de microrganismos autóctones. ....	31
Tabela 6 – Desempenho de cordeiros Dorper alimentados com rações contendo milho reidratado com ou sem inoculantes de microrganismos autóctones. ....	32
Tabela 7 – Contagem de microrganismos por grama de silagem (UFC <sub>log</sub> /g) e pH da silagem de milho reidratado com ou sem inoculantes de microrganismos autóctones no tempo inicial e aos 56 dias após a abertura .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV	Ácidos graxos voláteis
CLT	Controle
EE	Extrato etéreo
EPM	Erro padrão da média
FDN	Fibra em detergente neutro
GMD	Ganho médio diário
INO	Inoculante
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
N	Nitrogênio
PB	Proteína bruta
PV <sup>0,75</sup>	Peso vivo metabólico
UFC	Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>13</b>
<b>2. Revisão de literatura.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Ambiente ruminal .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1.1 Fungos e leveduras ruminais .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Volumoso de baixa qualidade .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Uso de microrganismos na dieta.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Milho reidratado.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.1 Milho reidratado como veículo para inoculação.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Material e métodos.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Animais, dietas e procedimentos amostrais.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Análises laboratoriais .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Análises microbiológicas dos silinhos experimentais.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4 Análises estatísticas.....</b>	<b>29</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>29</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>33</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>38</b>
<b>Referências bibliográficas. ....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Adaptações morfológicas e o sistema digestório conferem ao ruminante a capacidade utilização de alimentos fibrosos em sua dieta. Assim, a partir do fornecimento de alimentos que não poderiam ser utilizados por outras espécies, o ruminante é capaz de produzir carne, leite e lã.

É bem estabelecido na literatura científica que forragens tropicais são caracterizadas por baixa proporções de carboidratos solúveis e alta proporção de parede celular contendo lignina (Van Soest, 1994). Adicionalmente, forrageiras tropicais são sujeitas a redução acentuada na qualidade nutricional em função de fatores como temperatura, luminosidade e estágio de crescimento, fazendo com que a oferta de volumosos de baixa qualidade seja bastante comum, mesmo quando se realiza um bom manejo da cultura da forragem. A alimentação de ruminantes com forragens de baixa qualidade impacta negativamente no desempenho produtivo animal e estimula os esforços para melhorar o aproveitamento dos nutrientes presentes nesses volumosos.

O rúmen atua como uma câmara fermentativa, promovendo um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos, nos quais possuem relação simbiótica com o seu hospedeiro. A microbiota que irá compor o ecossistema ruminal é modulada de acordo com o tipo de substrato disponível (Kamra, 2005). Neste sentido, o uso microrganismos vivos na alimentação pode beneficiar a nutrição e a saúde animal pela modificação da ecologia microbiana do trato gastrintestinal (Brashears et al., 2005).

Desta forma, leveduras têm sido apontadas na literatura como capazes de influenciar positivamente os parâmetros ruminais. Estudos de suplementação direta com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram efeitos positivos sobre o pH, atividade de bactérias e fungos celulolíticos, degradação da fibra, produção de metano e perda de nitrogênio no rúmen (Chaucheyras-Durand et al., 2012).

Em estudos preliminares, a suplementação direta de cordeiros com outra levedura a *Rhodotorula mucilaginosa* isolada do líquido ruminal de ovino aumentou a ingestão de matéria seca de dietas contendo volumoso de baixa qualidade (Martins Junior, 2020). Neste estudo os parâmetros de fermentação não foram avaliados. Em outra pesquisa, Magaço et al. (2020) avaliaram o desempenho produtivo de cordeiros alimentados com feno de baixa qualidade e suplementados diretamente com uma cepa do fungo *Trichoderma longibrachiatum* isolada do trato gastrintestinal de ovino. Os autores concluíram que o desempenho produtivo foi

melhorado com a suplementação por 42 dias de confinamento. Ainda não é conhecido os efeitos a inoculação em conjunto desses dois microrganismos em dietas de ovinos possibilitando um possível sinergismo.

Além da suplementação direta, estudos têm demonstrado que alguns microrganismos em inoculantes utilizados na confecção de silagens podem permanecer ativos no rúmen após a ingestão pelo animal (Weinberg et al., 2016). Duniere et al. (2015) produziram silagem de milho usando as leveduras *S. cerevisiae* e *S. paradoxos* como inoculantes e relataram que ambas as populações aumentaram durante a exposição aeróbia, demonstrando que a densidade de leveduras aumenta entre a retirada do silo e a alimentação. Resultados similares foram observados por Xu et al. (2019) que relataram que a exposição aeróbia poderia aumentar a abundância de *S. cerevisiae* com propriedades probióticas na silagem de milho para a alimentação.

A ensilagem de grão de milho reidratado é uma técnica que apresenta vantagens para armazenamento desse cereal nas propriedades e seu uso tem sido crescente na alimentação de ruminantes. Assim, como a silagem de planta inteira, a silagem de grão milho reidratado também poderia ser utilizada como veículo para o fornecimento de microrganismos com potencial probiótico para ruminantes.

Sendo assim, a presente proposta foi realizada com o objetivo principal de avaliar os efeitos do uso da silagem de milho moído reidratado como veículo, para o fornecimento do inoculante composto por fungo e levedura (*Rhodotorula mucilaginosa* + *Trichoderma longibrachiatum*) isolados do conteúdo gastrintestinal de ovinos sobre o desempenho produtivo de cordeiros confinados.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Ambiente ruminal**

O ruminante possui características fisiológicas e anatômicas em seu trato gastrintestinal que os difere do outros animais, devido aos pré estômagos (rúmen, retículo e omaso) e ao estômago verdadeiro (abomaso). Essas particularidades o torna capaz de utilizar carboidratos fibrosos como fonte de energia e nitrogênio não proteico como fonte de proteína através da bioconversão da celulose, hemicelulose e amônia, produzindo principalmente os ácidos graxos voláteis (AGV), aminoácidos e vitaminas. A concentração dos produtos finais da fermentação varia em função do perfil da dieta (Kozloski, 2011; Mogaço et al., 2020). Quando volumosos de baixa qualidade são utilizados, o aproveitamento será ainda mais dependente da ação dos

microrganismos que promovem a hidrólise da parede celular das plantas (Martins Junior et al., 2020; Mogaço et al., 2020). O conceito de substrato para a fermentação é devido ao fornecimento de energia e carbono que são um dos principais determinantes do crescimento microbiano (Dijkstra et al., 1997).

Entre os microrganismos ruminais, a população bacteriana é a de maior concentração (60 a 90%). São classificadas de acordo com o substrato em que ocorre sua atuação. Sendo celulolíticos, hemicelulolíticos, pectinolíticos, amilolíticos, ureolíticos, sacarolíticos, acetolíticos, proteolíticos, lipolíticos, amoniogênicos e metanogênicos (Dehority, 2004; Kamra, 2005; Arcuri et al., 2006). Arcuri et al. (2011) observaram que as bactérias celulolíticas são mais eficientes no momento em que realiza a fermentação de carboidratos estruturais, nesse processo ocorre a liberação de acetato para o meio. Já as bactérias fermentadoras de carboidratos não estruturais liberam propionato e butirato (importante fonte de energia para os animais) além de lactato e hidrogênio. As bactérias metanogênicas utilizam o hidrogênio e o gás carbônico com o objetivo de modular o pH ruminal garantindo a sobrevivência das cepas sensíveis (Dehority, 2004; Kamra, 2005; Arcuri et al., 2006).

Qiu et al. (2023) relataram que o perfil do substrato no rúmen irá selecionar a população bacteriana atuante. Esses microrganismos são indispensáveis na degradação dos alimentos, produção de energia e proteína microbiana que será absorvida no intestino delgado. Também são capazes de modular a fermentação ruminal além de auxiliarem no aproveitamento de compostos que podem ser tóxicos ao animal, como a amônia (Dutta et al., 2009; Kozloski, 2011; Qiu et al., 2023). Dutta et al. (2009) relataram uma redução (10 a 35%) na concentração de amônia ruminal *in vitro* associados a adição de leveduras na dieta de ruminantes. Welkie et al. (2010) pontuaram a importância da população de bactérias no ambiente ruminal devido a sua quantidade e atividade metabólica no processo fermentativo.

Além da relação simbiótica do animal e microrganismos residentes, ocorre também interações entre as diversas espécies microbianas no ambiente ruminal. Essa dinâmica de atuações envolve predação, antibiose, competição e mutualismo, ocorre durante todo o processo fermentativo e pode influenciar o ecossistema ruminal. Para desempenhar suas funções, esses microrganismos dependem de um ambiente favorável, por mais que sejam adaptáveis, possuem um limiar de estabilidade aceitável para sua atuação e/ou sobrevivência. No geral, necessita-se de um pH ideal (entre 6 e 7), substrato para a fermentação, temperatura ideal (38 a 42°C), umidade (80-90%), anaerobiose, emissão de gases oriundos da fermentação, potencial redutor e taxa de passagem da digesta (Berchielli et al., 2006; Welkie et al., 2010; Kozloski, 2011).

Wang et al. (2021) observaram que o pH do fluido ruminal é responsável por refletir a saúde do rúmen e o grau de fermentação. Outros autores já relataram a sensibilidade, por exemplo, das bactérias celulolíticas em um meio de baixo pH. Essa instabilidade gera um ambiente tóxico para esses microrganismos e compromete a digestão da celulose (Dehority, 2004; Kamra, 2005).

A pequena população de protozoários possui sua relevância no ambiente ruminal. Segundo Abrão et al. (2018<sub>a</sub>) a quantidade de protozoários ruminais é proporcional a digestibilidade da dieta. Possuem a capacidade de realizar o engolfamento de bactérias para utilizar os seus aminoácidos e ácidos nucleicos, auxiliando na estabilização do equilíbrio do ecossistema ruminal. Também participam do metabolismo do nitrogênio e possuem atividade celulolítica, pois realizam o engolfamento dos grânulos do amido. Assim como as bactérias celulolíticas, são sensíveis ao pH mais baixo (Dehority, 1998; Arcuri et al., 2011; Kozłowski, 2011; Abrão et al., 2018<sub>a</sub>).

### **2.1.1 Fungos e leveduras ruminais**

Sabe-se que leveduras são fungos unicelulares que possuem formas de crescimento mais simples comparadas aos fungos multicelulares. Segundo Abrão et al. (2014) a população fúngica do rúmen está relacionada com a idade, sexo e categoria dos animais. De maneira geral, os fungos possuem a capacidade de penetrar a parede celular da célula vegetal, invadindo o xilema das bainha das folhas. Eles também podem penetrar o anel de esclerênquima das hastes ou quebrar a barreira cuticular das folhas (Bauchop, 1979; Chaucheyras-Durand; Fonty, 2002; Puniya et al., 2015). Essas características são essenciais quando se pensa na inoculação desses microrganismos.

Os fungos anaeróbios do rúmen pertencem a classe *Chytridiomycetos*. Eles iniciam suas atividades no rúmen a partir da sua colonização, normalmente pelo contato direto com outros animais (Bauchop, 1979; Lee et al., 2000; Puniya et al., 2015). A colonização tem início no momento em que ocorre a adesão do zoósporo aos materiais vegetais que chegam ao rúmen, com objetivo de degradá-lo, através da ação de enzimas. Essa adesão promove o crescimento de micélios que auxiliam no processo de assimilação, fixação e crescimento da espécie. Porém, se ocorre uma diminuição superior ao limiar de estabilidade do pH ruminal, o crescimento dos zoósporos pode ser comprometido. Estes microrganismos também são sensíveis a presença de oxigênio e não conseguem sobreviver em ambientes diferentes do trato gastrointestinal (Bauchop, 1979; Berchielli et al., 2006; Puniya et al., 2015).

Grigoletto et al. (2021) relataram que a levedura na alimentação tem a capacidade de aumentar o pH do rúmen em 0,03. Outro ponto levantado pelos autores foi a capacidade desse microrganismo de melhorar o ambiente ruminal e estimular o crescimento de bactérias gram-negativas. Com isso, pode ser observado aumento na produção de ácidos graxos voláteis (AGV) utilizando o ácido láctico como substrato.

Outra população fungica importante no processo fermentativo é a anaeróbios facultativos do rúmen, representada pelos fungos micelianos e leveduras. Embora participe da fermentação ruminal, esse grupo não é restrito ao rúmen e possuem potencial biotecnológico, como para produção de enzimas (celulolíticas, hemicelulolíticas e fibrolíticas) que potencializam a fermentação. Tais enzimas solubilizam as fibras vegetais e, conseqüentemente, aumentam a disponibilização de energia para o crescimento microbiano ruminal. Assim como os fungos anaeróbicos estritos, esses microrganismos colonizam o rúmen logo nas primeiras semanas de vida dos animais. Em contrapartida, possuem a capacidade de utilizar o oxigênio como aceptor de elétrons da cadeia respiratória. Sendo assim, tornam-se capazes de sobreviver em vários ambientes (Bauchop, 1979; Madingan et al., 2010; Puniya et al., 2015; Megaço et al., 2020).

Chaucheyras-Durand e Fonty (2002) avaliaram um aditivo alimentar composto por cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, e observaram que o inóculo tendeu a estimular a colônia de bactérias celulolíticas e a melhorar a fermentação. Também observaram aumento na população de protozoários, que auxiliou na estabilização do pH ruminal. Os protozoários são importantes para o ambiente ruminal, principalmente em relação ao nitrogênio proveniente da fermentação (Kamara, 2005).

Outros autores já observaram os benefícios da suplementação por fungos e leveduras. Dutta et al. (2009) relataram um aumento do propionato e redução do acetato, proporcionalmente, na suplementação com leveduras. Com isso, ocorre uma maior disponibilidade de glicose para o aproveitamento do animal. Abrão et al. (2014) relataram o potencial dos fungos ruminais em produzirem enzimas lignicelulolíticas. Essa característica maximiza a utilização da fibra na dieta, além de auxiliar no atendimento das demandas energéticas dos animais (Adesogan et al., 2014).

Caton et al. (1993) avaliaram os efeitos da suplementação com extrato de *Aspergillus oryzae* no consumo de forragens *in situ*. Relataram o aumento da digestibilidade *in vitro* da matéria seca. Semelhantemente, Lee et al. (2000) observaram que a administração de culturas fúngicas melhorou a digestibilidade *in vitro*, *in situ* e *in vivo* dos nutrientes. Também observaram uma melhora no padrão fermentativo ruminal de ovelhas. Além disso, relataram

um aumento na retenção do nitrogênio e nas populações microbianas e enzimas celulolíticas. Sehgal et al. (2008) também observaram aumento na digestibilidade, taxa de crescimento e eficiência alimentar através da inoculação de *Neocallimastix sp.* na dieta de bezerros de búfalos.

Chaucheyras-Durand e Fonty (2002) avaliaram a inoculação de *Saccharomyces cerevisiae* em função do ecossistema ruminal de cordeiros recém-nascidos. Relataram o crescimento da população de bactérias celulolíticas. Também observaram que as cepas de protozoários colonizaram o rúmen mais rápido em relação ao grupo controle. Ao início da alimentação sólida, perceberam melhores parâmetros fermentativos sugerindo que o uso dos inoculantes microbianos podem potencializar a fermentação ruminal, auxiliando no crescimento desses animais e em um melhor aproveitamento dietético (Chaucheyras-Durand et al., 2008).

Júnior et al. (2022) relataram os efeitos da adição da levedura (*Rhodotorula mucilaginosa*) isolada do fluido ruminal de ovinos, na dieta de cordeiros Santa Inês x Dorper na concentração de  $10^7$  unidade formadora de colônias/ml (UFC/ml) misturados a 100g do concentrado. Observaram maior peso vivo final dos cordeiros tratados e maior consumo entre 21 e 24 dias do período experimental.

## **2.2 Volumoso de baixa qualidade**

Ao analisar os sistemas de produção de ruminantes percebe-se que grande parte das exigências nutricionais são atendidas por meio dos alimentos volumosos. Porém, a produtividade desses animais é proporcional a disponibilização de energia dada através da dieta consumida. Dessa forma é importante destacar o termo digestibilidade, que é a característica do alimento em fornecer nutrientes que serão mais ou menos aproveitados no trato gastrointestinal (Pina et al., 2006; Martins et al., 2006; Berchielli et al., 2006).

Volumoso de baixa qualidade possuem um alto teor de fibra, sendo assim, a fibra em detergente neutro (FDN) é uma medida do conteúdo total de fibra insolúvel do alimento. Esse parâmetro interfere na qualidade dos alimentos, pois o processo da digestão da fibra consiste na hidrólise dos polissacarídeos e a conversão dos monossacarídeos resultantes em ácidos graxos voláteis (AGV), gases da fermentação e calor. Em contrapartida, a taxa de hidrólise é limitada pela ação de enzimas no complexo ligninopolissacarídeos, que degradam a parede celular (Van Soest, 1994; Berchielli et al., 2006).

Existe uma variação na qualidade nutricional dos volumoso em função das estações do ano. Abrão et al. (2014) afirmaram que a estação seca é a fase de menor qualidade devido ao

efeito fisiológico de lignificação da parede celular da forragem, resultando no comprometimento da digestibilidade desses alimentos. A consequência é uma menor produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) e de proteína microbiana, principalmente, ambos provenientes da fermentação microbiana (Abrão et al., 2014).

A lignina é um polímero que possui um grande peso molecular, funciona como uma barreira estrutural nas plantas que atrapalha a hidrólise. Dessa forma, compromete a degradabilidade dos polissacarídeos presentes na parede das células vegetais. Quanto maior o processo de lignificação das forragens, menor é a capacidade de degradar esse material (Abrão et al., 2014; Adesogan et al., 2014).

A estrutura da parede celular das forrageiras pode ser subdividida em parede celular primária e secundária. A primária é composta principalmente pela celulose, hemicelulose e pectina. Ela se desenvolve no momento em que ocorre o crescimento celular, e é responsável por auxiliar na estabilidade e expansão celular durante o processo. Já a parede celular secundária, confere proteção a célula mais madura, também consiste em celulose e hemicelulose, porém ocorre o processo de lignificação. Com o crescimento da forrageira, pode-se observar uma queda na digestibilidade, devido ao aumento da lignina na parede celular. Considerando que a folha é mais nutritiva que o caule, junto com a maturidade da planta ocorre uma redução na relação folha:caule, diminuindo a qualidade da forrageira (Van Soest, 1994; Taiz; Zieger, 2002; Abrão et al., 2014; Adesogan et al., 2014).

Forragens de baixa qualidade, devido ao comprometimento da disponibilidade de nutrientes que serão aproveitados pelos animais, são capazes de reduzir o potencial da fermentação ruminal. Dessa forma, a prioridade dos microrganismos fermentadores é a manutenção, interferindo na atividade fibrolítica, e como resposta, queda na produção dos animais, devido à menor disponibilidade de energia (Van Soest, 1994; Abrão et al., 2014; Adesogan et al., 2014). Obeidat et al. (2019) observaram que cordeiros alimentados com forragens de baixa qualidade apresentam menor desempenho de crescimento, digestibilidade da MS e nutrientes e balanço de nitrogênio, resultantes de um menor aproveitamento da forrageira. Vale destacar que existem exigências quanto aos compostos nitrogenados dos microrganismos ruminantes para serem atendidas em níveis dietéticos. Valores de proteína bruta inferiores a 6-8%, podem comprometer a utilização dos substratos energéticos disponíveis (Van Soest, 1994).

Mediante a isso, o uso de aditivos na dieta tem sido estudado com objetivo de melhorar a eficiência alimentar e contribuir com a atividade microbiana (Martins Junior, 2020). Entende-se por uma melhora na eficiência alimentar um menor consumo em relação a um maior ganho de peso. Ou seja, no ambiente ruminal ocorre uma potencialização fermentativa que culmina

com um maior aproveitamento do substrato disponível por meio dos microrganismos ruminais, disponibilizando energia o suficiente para o desenvolvimento e reprodução animal (Archer, 1999).

### 2.3 Uso de microrganismos na dieta

O uso de microrganismos na dieta de ruminantes é apontado como uma alternativa para aumentar a eficiência na produção. Fungos autóctones possuem potencial de solubilizar a parede celular das células das plantas no ambiente ruminal (Chaucheyras-Durand et al., 2012; Puniya et al., 2015).

Abrão et al. (2014) observaram que fungos isolados do fluido ruminal adaptados previamente a condições do semiárido, podem ser utilizados como suplemento probiótico. Também relataram que a inoculação reduziu o período de adaptação da forragem na estação seca que culminou com o aumento na produtividade animal. Outros autores já observaram que adição de fungos e leveduras na dieta de cordeiros, podem modular a microbiota ruminal, melhorando a digestão e fermentação (Dias et al., 2018 b; Magaço et al., 2020).

Chaucheyras-Durand et al. (2012) relataram os efeitos da leveduras vivas em relação a população de bactérias metabolizadoras de lactato in vitro. Pontuaram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* aproveitou melhor o açúcar disponível comparado a bactéria *Streptococcus bovis*, que é capaz de fermentar a glicose em lactato. Concluíram que devido ao fato de a levedura apresentar afinidade com as células de açúcares, ocorreu uma redução na quantidade de substrato fermentável disponível para o crescimento bacteriano que limitou a quantidade de lactato produzido, que poderia diminuir o pH acentuando a acidose ruminal. Devido ao ambiente ruminal ser dinâmico, várias hipóteses de interações microbianas são estudadas (Dehority, 1998). Já foram observados que a suplementação com leveduras pode modular o crescimento de bactérias produtoras de toxinas (Chaucheyras-Durand et al., 2010).

Megaço et al. (2020) através da inoculação de *Trichoderma longibrachiatum* em cordeiros, observaram um aumento de 15,05% no ganho médio diário comparado ao grupo controle. Neumann et al. (2016) suplementaram novilhos com *Saccharomyces cerevisiae* e não observaram aumento de ganho médio diário. Por mais que fungos e suas enzimas têm sido utilizados como aditivos na dieta de ruminantes, principalmente por seu potencial no aproveitamento da fibra de baixa qualidade, há inconsistência nos resultados. Essas diferenças são justificadas devido ao tipo de microrganismo, a forma de suplementação, espécie trabalhada e tipo de dieta (Megaço et al., 2020).

Diaz et al. (2018<sub>b</sub>) não observaram diferenças em relação ao desempenho. Porém, concluíram que bovinos de corte alimentados com dietas de alto teor de concentrado, ao serem suplementados com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) promoveram um aumento do pH ruminal, conseqüentemente, reduzindo a inflamação. Ou seja, a inoculação melhorou o ambiente ruminal em bovinos susceptíveis a acidose devido ao perfil dietético. Dias et al. (2018<sub>a</sub>) observaram que a suplementação com leveduras da mesma cepa, em cordeiros alimentados com dietas ricas em grãos, também reduziram a inflamação ruminal.

Abrão et al. (2017) relataram que cepas de *Aspergillus spp.* isolados do rúmen bovino possuem potencial para produção de celulases, xilanases e fenoloxidasas. Essas enzimas, são importantes na degradação da lignina. Também notaram o potencial das cepas *Aspergillus terreus* e *A. fumigatus*, provenientes do fluido ruminal, como probióticos para bovinos alimentados com pastagens lignificadas. Desnoyers et al. (2009) realizaram uma meta-análise de 157 experimentos e 110 artigos, concluíram que a suplementação com leveduras têm potencial de aumentar o consumo de matéria seca, o pH ruminal e a concentração de ácidos graxos voláteis. Relataram também que a suplementação dietética de leveduras em ruminantes tende a diminuir a concentração de ácido láctico ruminal.

Chaucheyras-Durand et al. (2010) avaliaram a suplementação com leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e o seu potencial como probiótico na dieta de ruminantes. Concluíram que essas leveduras promoveram uma redução de microrganismos patogênicos (*Escherichia coli*) no ambiente ruminal.

Martins et al. (2022) estudaram os efeitos da suplementação de vacas com enzimas exógenas de *Aspergillus spp.*, observaram que a ingestão e a digestibilidade total dos nutrientes da dieta não foram afetados pelo tratamento. Porém, também observaram uma melhora no desempenho lactacional em relação ao grupo controle.

Outros estudos concluíram que a adição de cepas de leveduras e fungos podem potencializar o ganho de peso e a produção, melhorando a eficiência alimentar. Se tratando de vacas leiteiras, já foi observado uma melhora na produção de leite. Estima-se que de maneira geral a produtividade dos ruminantes pode melhorar de 7 a 8%, o que o torna um grande aliado pensando em viabilidade econômica (Wallace, 1994; Chaucheyras-Durand et al., 2005; Chaucheyras-Durand et al., 2010).

## **2.4 Milho reidratado**

O animal depende do consumo de nutrientes para atender as exigências de manutenção,

produção e reprodução para desempenhar todo o seu potencial genético. Para isso, formula-se dietas com o objetivo de otimizar a digestibilidade e o consumo dos nutrientes (Paes, 2006; Mourão et al., 2007). O milho se destaca como uma fonte considerável de energia na dieta de ruminantes, além de ser um importante alimento para a economia brasileira. Rico em amido, caracterizado por ser um polissacarídeo de alto valor biológico (Paes, 2006).

Segundo Carvalho-Estrada et al. (2020) no Brasil os grãos de milho mais utilizados são os híbridos flint e semi-flint. Porém, caracterizam-se por uma alta proporção de endosperma vítreo, caracterizado pelos seus grânulos de amidos estabelecidos em uma densa matriz proteica. Essa matriz possui corpos proteicos que em altas concentrações protege o amido da degradação enzimática (Sullins; Rooney, 1975). Outros autores já relataram que grãos de milho seco possui uma menor digestibilidade ruminal, conseqüentemente, menor aproveitamento do amido. Sendo assim, o uso do milho na forma de grão seco vem reduzindo, ganhando espaço técnicas de processamento com o objetivo de potencializar a qualidade desse produto tão rico (Mourão et al., 2007; Farraretto et al., 2013).

Os principais fatores que podem afetar a degradabilidade do amido pelos microrganismos ruminais são o método de armazenamento, a forma em que se processa o grão, o tamanho da partícula e o tipo de endosperma (Carvalho-Estrada et al., 2020). Para potencialização do aproveitamento do amido e conseqüentemente a produção da proteína microbiana, pode-se utilizar a técnica de reidratação do grão seco. Esse método promove a produção de ácidos orgânicos e proteases bacterianas que auxiliaram na exposição do amido através da solubilização das prolaminas. Consiste na utilização do grão seco que passa pelo processo de reidratação, onde foi devolvido ao grão a umidade necessária para sua ensilagem. Esse processamento melhora o valor nutritivo do alimento (Mourão et al., 2007; Hoffman et al., 2011; Carvalho-Estrada et al., 2020).

O processo de ensilagem promove a proteólise, ou seja, a degradação da matriz proteica que envolve os grânulos de amido. Isso ocorre devido aos microrganismos residentes na silagem, que prepara o alimento para ação dos microrganismos ruminais. Devido a isso, pode se observar o aumento na digestibilidade do amido no rúmen (Hoffman et al., 2011). Bolson et al. (2020) observaram que dietas para cordeiros, composta por silagem de milho reidratado foram responsáveis por melhorar a digestibilidade da matéria seca, sem afetar a digestibilidade da fibra. Outro ponto observado pelos autores foi em relação as perdas de nitrogênio. Não foram observadas perdas significativas, levantando a hipótese de que o uso do milho reidratado promoveu o uso eficiente dos nutrientes da dieta (Bolson et al., 2020).

### 2.4.1 Milho reidratado como veículo para inoculação

A ensilagem de grão de milho reidratado apresenta vantagens para armazenamento desse cereal nas propriedades, assim como potencializa o aproveitamento do amido na alimentação de ruminantes. Além disso, pesquisas têm analisado os efeitos da utilização de grão milho reidratado como veículo para o fornecimento de microrganismos com potencial probiótico à ruminantes (Bolson et al., 2020; Carvalho-Estrada et al., 2020).

Weinberg et al. (2016) relataram que o consumo de silagens inoculadas pode ter efeitos sobre o desempenho animal, relacionados a ingestão de matéria seca, ganho médio diário, produção animal, devido a um possível efeito probiótico. Observaram que alguns microrganismos em inoculantes utilizados na confecção de silagens podem permanecer ativos no rúmen após a ingestão pelo animal.

Dunier et al. (2015) consideraram que a inoculação com leveduras (*Saccharomyces*), não prejudicou a estabilidade aeróbica da silagem de milho. Ao contrário, os autores observaram, no momento da exposição anaeróbica, aumento de UFC dos microrganismos que haviam sido inoculados, o que pode proporcionar um efeito probiótico da silagem. Francisco et al. (2010) relataram que silagens suplementadas com inóculos microbianos reduziram o pH e promoveram a produção de ácido lático.

Rodrigues e colaboradores (2008) não observaram efeitos satisfatórios com a inoculação de enzimas bacterianas oriundas das cepas de *Streptococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactic* na silagem de sorgo. Concluíram que o inoculante não melhorou o valor nutritivo ao ser comparado com a silagem inoculada. Sanderson (1993), semelhantemente, não observou diferenças na deterioração aeróbica e digestibilidade da fibra nas silagens de milho e sorgo inoculadas com bactérias (*Lactobacillus plantarum* e *Streptococcus faecium*).

Agarussi et al. (2022) avaliaram os efeitos de um inoculante composto por bactérias (*Lactobacillus plantarum*) na silagem de milho e na silagem de sorgo. Relataram que o inoculante promoveu um crescimento acentuado de *Lactobacillus spp.* e auxiliou na manutenção da estabilidade da comunidade bacteriana durante o período de armazenagem de ambas silagem em estudo.

Farrareto et al. (2015) testaram a digestibilidade in vitro do amido e o perfil fermentativo da silagem de milho reidratado inoculado com enzimas proteolíticas oriundas da cepa *Bacillus licheniformis*. Os autores observaram que a adição da enzima aumentou a digestibilidade do amido da silagem reidratada, comparando com o milho reidratado não ensilado. Kitamoto e colaboradores (1999) observaram que a adição da levedura *Kluyveromyces lactis*, modificada

geneticamente, prolongou a estabilidade aeróbica da silagem de milho.

Vários autores já relataram os efeitos dos fungos celulolíticos anaeróbios facultativos no rúmen, assim como seu potencial de produção de enzimas, como as celulases e xilanases, em relação às forragens com alto teor de fibra. Também ressaltaram a importância de utilização de cepas que não produzem micotoxinas (Abrão et al., 2014; Martins Junior, 2020; Megaço et al., 2020). Nadeau et al. (2000) utilizaram enzimas fungicas (*Trichoderma longibrachiarum*) em silagens, observaram que os silos tratados apresentaram menor pH e menor concentração de ácido acético e amônia. Além disso, relataram que a fermentação das silagens inoculadas foram melhores e tinha maiores concentrações de ácido lático. Martins et al. (2009) avaliaram os efeitos da adição de enzimas fibrolíticas provenientes dos fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum* na silagem de milho. Estes autores observaram que a fração solúvel da matéria seca e proteína bruta aumentaram na silagem inoculada.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os animais foram manejados de acordo com as normas do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (nº 251/2021).

#### 3.1 Animais, dietas e procedimentos experimentais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Metabolismo Animal do Departamento de Zootecnia, pertencente à Universidade Federal de Minas Gerais. Foram utilizados 22 cordeiros Dorper × Santa Inês machos inteiros ( $14,20 \pm 1,74$  kg de peso corporal, aproximadamente três meses de idade) oriundos de um mesmo lote distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos. O período experimental foi composto de 63 dias (dividido em três períodos de 21 dias). Os animais foram previamente adaptados às dietas e instalações por 15 dias.

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em galpão de alvenaria coberto equipado com exaustores e ventiladores. Os animais foram contidos em gaiolas metabólicas individuais ( $1,0 \times 2,0$  m) equipadas com comedouros, bebedouros e funil para canalização das excretas. No início do experimento, os cordeiros foram identificados, pesados (sob jejum de 16 h), vermifugados (Ivermectina 1%, Vallée, Minas Gerais, Brasil; Aldazol, Vallée, Minas Gerais, Brasil; Isocox, Ouro fino, São Paulo, Brasil) e vacinados contra clostridioses (Poli-Start Vallée, Minas Gerais, Brasil).

Os tratamentos experimentais foram: 1) ração controle contendo milho moído reidratado

e ensilado sem inoculante (CTL); 2) ração contendo milho reidratado e ensilado com inoculante de microrganismos autóctones (INO). As rações foram balanceadas para atender as exigências nutricionais de cordeiros em fase de terminação de acordo com o NRC (2007) e foram compostas por feno de Tifton, milho reidratado (com ou sem inoculante), farelo de soja e suplemento mineral (Tabela 1). A composição bromatológica dos ingredientes estão descritos na tabela 2. O inoculante utilizado foi composto por duas espécies de microrganismos, *Rhodotorula mucilaginosa* (levedura) e *Trichoderma longibrachiatum* (fungo, GenBank KX463453.1). Ambos foram isolados do líquido ruminal de ovinos hípidos alimentados com forragens tropicais (Freitas et al. 2012; Magaço et al 2020; Martins Junior, 2020). A dose experimental da associação dos microrganismos foi de  $1 \times 10^9$  UFC/kg de milho reidratado (Diaz et al 2018<sub>a</sub>; Martins Junior, 2022; Magaço et al 2020; Júnior et al 2022).

O milho utilizado nos dois tratamentos foi moído em moinho tipo martelo equipado com peneiras com crivos de 2 mm. Nos tratamentos CTL e INO, a reidratação foi feita com água e água + inoculante, respectivamente, de forma a alcançar 35% de umidade. A reidratação foi realizada em ambos tratamentos com água não clorada. O milho foi ensilado 45 dias antes do início do experimento. O processo de ensilagem foi realizado por meio de sacos de polietileno semi-virgem (200 micras, 51x110 cm) com auxílio de uma ensacadora e compactadora de silagem elétrica (Do campo agrícola, Rio Grande do Sul, Brasil) para atingir uma densidade de 925 kg/m<sup>3</sup>. Após a ensilagem, os sacos foram mantidos em área coberta em temperatura ambiente até sua utilização na alimentação dos animais.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (8:00 h e 16:00 h) com ração total misturada para ingestão *ad libitum* (20% de sobras). As sobras e o fornecido foram pesados e registrados diariamente para cálculo do consumo. Os animais foram pesados a cada sete dias para acompanhamento do ganho de peso e ajuste de fornecimento de ração. No 63º dia do período experimental os animais foram pesados após jejum de sólidos de 16 horas para determinação do peso vivo final.

Ao longo do período experimental foram realizados três ensaios de digestibilidade com cinco dias de duração: 1) 9º ao 13º dia, 2) 29º ao 33º dia e 3) 50º ao 54º dia. Em todos os períodos, as fezes de cada animal foram recolhidas em caixa plástica, colocadas na parte inferior de cada gaiola metabólica. As fezes produzidas em 24h foram colhidas no período da manhã (7h:30 min.), durante os cinco dias. O total de fezes foi pesado, homogeneizado e então subamostras (10% do peso total) foram colhidas e ao final de cada período foram misturadas para obtenção de uma amostra composta por animal em cada período.

A urina de cada animal, também amostrada nesse período, foi depositada em balde

plástico (colocado dentro da caixa coletora de fezes) com boca em bisel e telada para a separação das fezes. Em cada balde foram adicionados 10 mL de ácido clorídrico (1:1 v:v) para manter o pH da urina próximo de 2. A produção diária de urina, observada para o mesmo horário das fezes, foi mensurada utilizando uma proveta graduada, 10% do total foi amostrado e armazenado em frascos plásticos devidamente identificados por período, tratamento e animal. Todas as amostras de fezes e urina foram armazenadas -20 °C para posteriores análises. Amostras de sobras e do fornecido diário também foram colhidas em sacos plásticos devidamente identificados por ensaio de digestibilidade, tratamento e animal e armazenadas a -20 °C para posteriores análises.

Para avaliação microbiológica do material ensilado, foram confeccionados mini silos de PVC com 0,10 m de diâmetro e 0,40 m de altura, com o objetivo de atingir a densidade de 925kg/m<sup>3</sup>. Os silos foram distribuídos aleatoriamente em esquema fatorial 2 × 2 com seis repetições, utilizando os dois tratamentos em estudo (*Rhodotorula mucilaginosa* + *Trichoderma longibrachiatum*) e dois tempo de abertura (0 e 56 dias após ensilagem). Um "Bunsen" tipo válvula, foi anexado na tampa do silo para permitir a liberação dos gases resultantes da fermentação. Os silos experimentais foram mantidos em temperatura ambiente em local coberto e arejado. Para prevenir contaminações com o efluente produzido pela fermentação da silagem, areia previamente seca em estufa foi armazenada em sacos de tecido não tecido e adicionados ao fundo dos mini silos. Esses sacos foram mantidos em estufa a 55°C até o momento da ensilagem.

As amostras dos mini silos foram recolhidas no dia 0 e 56 dias após a ensilagem para análise microbiológica, após a aferição do pH. À coleta foi realizada com auxílio do Bico de Bunsen e material estéril. As amostras foram depositadas em potes de plásticos previamente autoclavados para controle da contaminação. Foi realizada a amostragem de aproximadamente 200g do material para armazenamento à -20°C.

Tabela1. Ingredientes e composição química das rações experimentais

Item	Tratamentos	
	Controle	Inoculante
Ingrediente (g/kg MS)		
Feno de Tifton	500,4	500,4
Milho reidratado	248,7	248,7
Farelo de soja	220,8	220,8
Suplemento mineral <sup>1</sup>	15,0	15,0
Calcário	12,6	12,6
Fosfato bicálcico	2,5	2,5
Composição química		
Matéria seca (g/kg)	808,6	812,4
Matéria orgânica (g/kg MS)	907,3	906,5
Proteína bruta (g/kg MS)	186,8	186,9
Extrato etéreo (g/kg MS)	27,5	26,6
Fibra em detergente neutro da ração total (g/kg MS)	458,7	447,6
Nutrientes digestíveis totais (g/kg MS) <sup>2</sup>	660,0	660,0

<sup>1</sup>Composição (por kg de MN): Sódio (147 g/kg), Cálcio (110 g/kg), Fósforo (87 g/kg), Enxofre (18 g/kg), Zinco (3.800 mg/kg), Manganês (2.000 mg/kg), Flúor (870 mg/kg), Cobre (590 mg/kg), Molibdênio (300 mg/kg), Iodo (50 mg/kg), Selênio (20 mg/kg), Cromo (20 mg/kg), Cobalto (15 mg/kg).

<sup>2</sup>Estimado usando valores de alimentos publicados no NRC (2007).

Tabela 2. Análise bromatológica dos alimentos das rações experimentais

Ingrediente	MS	MM	MO	PB	EE	FDN
	(g/kg)	(g/kg MS)				
Feno Tifton	901,4	87,5	912,5	92,6	29,0	785,3
Farelo de soja	875,9	71,2	928,8	525,9	10,7	146,0
Milho (controle)	622,8	12,5	987,5	97,9	42,8	134,8
Milho (inoculante)	631,9	15,8	984,2	98,0	38,9	89,9

MS = matéria seca; MM = matéria mineral; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro.

### 3.2 Análises laboratoriais

A matéria seca das rações, sobras e fezes foi determinada de acordo com o método 934.01 da AOAC (1990). A matéria orgânica foi determinada por combustão de acordo com o método 942.05 da AOAC (1998). O nitrogênio total foi determinado no aparelho Tecnal TE-036/1 (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brazil) seguindo o método 988.05 da AOAC (1998) e a proteína bruta foi estimada como  $N \times 6,25$ .

O extrato etéreo foi determinado no aparelho Tecnal TE-044/1 de acordo com o método 920.39 de AOAC (1998). A fibra em detergente neutro foi determinada conforme a técnica descrita por (Mertens, 2002) adaptada para utilização de um Ankom200 Fiber Analyzer (Ankom Technology Corp., Fairport, New York, USA) usando  $\alpha$ -amilase e sulfito de sódio.

### 3.3 Análises microbiológicas dos silinhos experimentais

Imediatamente após a abertura dos silos em seus determinados períodos o pH foi aferido utilizando um pHmetro de bancada (Edge®, Limena, Itália). Para as análises microbiológicas do milho reidratado, uma amostra de 3 gramas do material ensilado foi diluída em 27 mL de água salina estéril. A mistura foi agitada por 5 minutos em vórtex, e posteriormente, alíquotas de 10 $\mu$ l das diluições de 10<sup>1</sup> a 10<sup>6</sup> foram inoculadas em placas de petri estéreis. As placas continham o meio ágar MRS (Merck KGaA®, Darmstadt, Alemanha) para o crescimento de bactérias lácticas, o meio ágar MacConkey (KASVI®, Terámo, Itália), para o crescimento de enterobactérias e o meio ágar Sabourod Dextrose (KASVI®, Terámo, Itália) contendo 1,5% de solução de cloranfenicol (10%/v) para o crescimento de fungos.

As placas de MRS foram incubadas a 37 °C por 48 horas em jarras de anaerobiose com reatores de CO<sub>2</sub> (Permutation ®, Curitiba, PR, Brasil). As placas de MacConkey e Agar Potato

Dextrose foram incubadas a 37°C em estufa BOD, com refrigeração e controle de umidade e monitoradas por dois até sete dias respectivamente. As unidades formadoras de colônia de cada meio de cultura, MRS, MacConkey e Sabourod Dextrose foram quantificadas e diferenciadas conforme as estruturas morfológicas, considerando a coloração, tamanho e forma da colônia com o auxílio de um contador de colônias.

### 3.4 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R (Core Team, 2021). Para todas as análises os pressupostos estatísticos de normalidade e homocedasticidade foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Os dados de desempenho foram analisados como delineamento inteiramente ao acaso, de acordo com o seguinte modelo:

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

em que  $Y_{ij}$  é a variável dependente,  $\mu$  é a média geral,  $T_i$  é efeito fixo de tratamento ( $i = 1$  a  $2$ ) e  $\epsilon_{ij}$  é o erro aleatório do resíduo. Os resultados foram apresentados como médias e erro padrão da média. Os dados de ingestão, digestibilidade e os silos experimentais foram analisados como delineamento inteiramente ao acaso em parcelas subdividas no tempo (parcela = tratamento e subparcela = período), de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \epsilon_{ik} + P_j + TP_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

em que  $Y_{ijk}$  é a variável dependente,  $\mu$  é a média geral,  $T_i$  é efeito fixo de tratamento ( $i = 1$  e  $2$ ),  $\epsilon_{ik}$  é o erro aleatório da parcela,  $P_j$  é o efeito fixo de período ( $j = 1, 2$  e  $3$ ) e  $\epsilon_{ijk}$  é o erro aleatório da subparcela. Os dados de microbiologia dos silinhos foram transformados para base logarítmica.

As médias foram comparadas via teste Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$  e tendências quando  $0,05 > P \geq 0,10$ .

## 4 RESULTADOS

Não foi observada interação entre tratamento e período ( $P > 0,05$ ) para a ingestão de matéria seca e dos nutrientes (Tabela 2). Os cordeiros alimentados com o tratamento INO apresentaram menor ingestão de MS ( $P = 0,002$ ), MO ( $P = 0,002$ ), PB ( $P = 0,003$ ) e FDN ( $P < 0,00$ ) em relação ao grupo controle. No período 1 houve diferença estatística na ingestão de MS e MO considerando os dois tratamentos em estudo ( $P < 0,00$ ). Já o período 2 e o período 3 foram semelhantes estatisticamente. O consumo de PB foi diferente em todos os período estudados nos dois tratamentos ( $P < 0,00$ ). Em relação a FDN, somente o P3 obteve diferença

estatística ( $P < 0,05$ ).

Os resultados referentes a digestibilidade aparente do trato total (Tabela 3) não apresentou interação entre tratamento e período ( $P > 0,05$ ). Em relação ao tratamento, os dois grupos não apresentaram diferenças estatísticas quanto à digestibilidade da MS ( $P = 0,257$ ), MO ( $P = 0,276$ ), PB ( $P = 0,449$ ) e FDN ( $P = 0,387$ ). Já os períodos foram diferentes com os dois tratamentos se comportando de forma semelhante, apresentando um aumento a cada período estudado ( $P < 0,05$ ).

Em relação ao nitrogênio absorvido, N retido e balanço de N, descritos na Tabela 4, não apresentaram interações entre tratamento e período ( $P > 0,05$ ). Do mesmo modo, os tratamentos não se diferiram entre si nas variáveis de N absorvido ( $P = 0,127$ ), N retido ( $P = 0,134$ ) e balanço de N ( $P = 0,320$ ). Em contrapartida, pode-se observar diferenças estatísticas em entre os períodos das variáveis de N absorvido e N retido ( $P < 0,00$ ). Quanto ao balanço de N, somente no período 3 se diferiu dos outros períodos experimentais ( $P < 0,05$ ).

Tabela 3. Ingestão diária de matéria seca e nutrientes (g/kg PV<sup>0,75</sup>) em cordeiros Dorper alimentados com rações contendo milho reidratado com ou sem inoculantes de microrganismos autóctones

Item	Tratamentos		EPM	P-Valor		
	Controle	Inoculante		Tratamento	Período	T x P
<b>Matéria Seca</b>						
Período 1	95,3 <sub>Ab</sub>	86,2 <sub>Bb</sub>				
Período 2	107,7 <sub>Aa</sub>	94,5 <sub>Ba</sub>	28,33	0,003	$P < 0,00$	0,626
Período 3	104,5 <sub>Aa</sub>	94,6 <sub>Ba</sub>				
<b>Matéria Orgânica</b>						
Período 1	86,6 <sub>Ab</sub>	78,2 <sub>Bb</sub>				
Período 2	101,4 <sub>Aa</sub>	88,0 <sub>Ba</sub>	27,30	0,002	$P < 0,00$	0,475
Período 3	103,7 <sub>Aa</sub>	94,0 <sub>Ba</sub>				
<b>Proteína Bruta</b>						
Período 1	179,4 <sub>Aa</sub>	162,2 <sub>Ba</sub>				
Período 2	198,6 <sub>Ab</sub>	175,5 <sub>Bb</sub>	5,55	0,004	$P < 0,00$	0,780
Período 3	217,6 <sub>Ac</sub>	196,8 <sub>Bc</sub>				
<b>Fibra em Detergente Neutro</b>						
Período 1	43,299 <sub>Aa</sub>	37,957 <sub>Ba</sub>				
Período 2	50,789 <sub>Aa</sub>	43,155 <sub>Ba</sub>	13,38	0,000	$P < 0,00$	0,512
Período 3	52,178 <sub>Ab</sub>	46,181 <sub>Bb</sub>				

EPM = Erro Padrão da média.

Letra maiúscula (linha) tratamento e as minúsculas (coluna) período.

Tabela 4. Digestibilidade aparente do trato total (g/kg) em cordeiros Dorper alimentados contendo milho reidratado com ou sem inoculantes de microrganismos autóctones

Item	Tratamentos		EPM	P - Valor		
	Controle	Inoculante		Tratamento	Período	T x P
<b>Matéria Seca</b>						
Período 1	65,6Aa	65,7Aa				
Período 2	68,0Aab	70,0Aab	10,75	0,257	0,003	0,542
Período 3	66,4Ab	68,1Ab				
<b>Matéria Orgânica</b>						
Período 1	66,9Aa	67,1Aa				
Período 2	69,3Aab	71,4Aab	10,63	0,276	0,003	0,562
Período 3	67,8Ab	69,2Ab				
<b>Proteína Bruta</b>						
Período 1	74,9Aa	74,4Aa				
Período 2	77,0Aa	78,3Aa	8,62	0,449	P<0,00	0,329
Período 3	77,4Ab	78,6Ab				
<b>Fibra em Detergente Neutro</b>						
Período 1	51,8Aa	51,3Aa				
Período 2	54,0Aab	55,5Aab	17,40	0,387	0,016	0,527
Período 3	48,3Ab	51,5Ab				

EMP = erro padrão da média.

Letra maiúscula (linha) tratamento e as minúsculas (coluna) período.

O desempenho dos cordeiros do grupo controle e inoculante (Tabela 5), foram semelhantes. Ao final do experimento, obtiveram ganho de peso total (P=0,105), ganho médio diário 0 a 21 dias (P=0,316), GMD 0 a 42 dias (P=0,218) e GMD de 0 a 63 dias (P=0,107) sem diferenças estatísticas. Não houve diferença significativa para a variável de eficiência alimentar dos dois grupos experimentais (P=0,91).

Tabela 5. Balanço de nitrogênio em Cordeiros Dorper alimentados com rações contendo milho reidratado com ou sem inoculantes de microrganismos autóctone

Item	Tratamentos		EPM	P - Valor		
	Controle	Inoculante		Tratamento	Período	T x P
<b>Nitrogênio Absorvido (g/d)</b>						
Período 1	184,8Aa	168,0Aa				
Período 2	263,9Ab	235,2Ab	13,33	0,127	P<0,00	0,554
Período 3	334,2Ac	301,3Ac				
<b>Nitrogênio Retido (g/d)</b>						
Período 1	91,7Aa	88,4Aa				
Período 2	160,0Ab	140,0Ab	11,92	0,134	P<0,00	0,115
Período 3	216,5Ac	176,2Ac				
<b>Balanço de Nitrogênio (%)</b>						
Período 1	48,7Aa	48,5Aa				
Período 2	59,8Aa	60,6Aa	31,54	0,320	P<0,00	0,360
Período 3	64,3Ab	58,7Ab				

EPM = erro padrão da média.

Letra maiúscula (linha) tratamento e as minúsculas (coluna) período.

Tabela 6. Desempenho de Cordeiros Dorper alimentados com rações contendo milho reidratado com ou sem inoculantes de microrganismos autóctone

Item	Controle	Inoculante	EPM	P - Valor
Peso vivo inicial (kg)	15,90	16,50	0,859	0,61
Peso vivo final (kg)	31,39	30,50	1,423	0,66
GMD - 0 ~ 21 (kg/dia)	0,236	0,216	0,014	0,32
GMD - 0 ~ 42 (kg/dia)	0,270	0,246	0,013	0,22
GMD - 0 ~ 63 (kg/dia)	0,246	0,226	0,009	0,11
Ganho de peso total (kg)	15,52	14,22	0,056	0,10
Eficiência alimentar (kg/dia)	0,219	0,218	0,069	0,91

EPM = erro padrão da média.

GMD = ganho médio diário.

Quanto as unidades formadoras de colônias (UFC log) por grama de silagem dos silos experimentais, não foram observadas interações entre período e tratamento ( $P > 0,05$ ) em nenhum dos microrganismos estudados (Tabela 6). Pode se notar um crescimento semelhante nos dois tratamentos ( $P > 0,05$ ) de bactérias formadoras de ácido lático como nos dois períodos de observação (0 e 56 dias). Diferentemente, o crescimento das enterobactérias fermentadoras de lactose apresentou diferença entre os períodos. No tempo zero foi observada uma população nos dois tratamentos, porém aos 56 dias a colônia não estava mais presente no material ensilado ( $P > 0,05$ ). O mesmo comportamento foi observado para enterobactérias não fermentadoras de lactose e na população total de enterobactérias ( $P > 0,05$ ). As colônias de *Rhodotorula mucilaginosa* e de *Trichoderma longibrachiatum* estavam presentes somente no grupo de silos com inoculante ( $P < 0,00$ ), sem diferença estatística entre os dois períodos ( $P > 0,05$ ). Não só leveduras da cepa *Rhodotorula mucilaginosa* foram observadas, outras leveduras colonizaram os silos nos dois tratamentos sem diferença significativa assim como entre os períodos ( $P > 0,05$ ). O valor total de leveduras não apresentou relevância estatística entre tratamentos e períodos ( $P > 0,05$ ).

Também foi contabilizado o total de fungos e outros fungos micelianos não pertencentes a cepa de *Trichoderma longibrachiatum*. Foi observado no grupo controle maior quantidade outros fungos, diferentes do estudado (*Trichoderma longibrachiatum*) comparando com o grupo tratado ( $P = 0,04$ ). Porém, a quantidade total de fungos micelianos não foi diferente entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). Em relação ao pH não foi observado diferença entre os tratamentos ( $P = 0,31$ ), mas houve diferença entre os períodos. No período 1 foi observado pH mais alto em relação ao último período devido ao processo fermentativo ( $P < 0,00$ ).

Tabela 7: Contagem de microrganismos por grama de silagem ( $UFC_{log/g}$ ) e pH da silagem de milho reidratado com ou sem inoculantes de microrganismos autóctones no tempo inicial e aos 56 dias após a abertura

Item	Período inicial				Após 56 dias				Trat	P-valor	
	CTL	EPM	INO	EPM	CTL	EPM	INO	EPM		Per	T × P
Bactérias formadoras de ácido láctico	6,32	0,100	6,67	0,128	6,39	0,067	6,66	0,092	>0,5	>0,5	>0,5
Enterobacteria Lac <sup>+1</sup>	5,44	0,122	5,28	0,086	0,00	0,000	0,00	0,000	>0,5	0,00	>0,5
Enterobacteria Lac <sup>-2</sup>	5,26	0,089	5,41	0,069	0,00	0,000	0,00	0,000	>0,5	0,00	>0,5
Total de Enterobacterias	5,64	0,090	5,68	0,070	0,00	0,000	0,00	0,000	>0,5	0,00	>0,5
Levedura <i>Rhodotorula</i>	0,00	0,000	6,32	0,029	0,00	0,000	6,30	0,047	0,00	>0,5	>0,5
Outras leveduras	6,70	0,030	6,42	0,067	6,43	0,090	6,38	0,040	>0,5	>0,5	>0,5
Total de leveduras	6,70	0,030	6,69	0,049	6,43	0,090	6,65	0,039	>0,5	>0,5	>0,5
<i>Trichoderma</i>	0,00	0,000	5,20	0,104	0,00	0,000	5,62	0,026	0,00	>0,5	>0,5
Outros fungos micelianos	6,03	0,080	4,04	0,525	5,62	0,113	3,22	0,598	0,04	>0,5	>0,5
Total de fungos micelianos	6,03	0,080	5,81	0,123	5,62	0,113	6,11	0,128	>0,5	>0,5	>0,5
Total de fungos	6,82	0,033	6,75	0,056	6,48	0,089	6,73	0,035	>0,5	>0,5	>0,5
pH	5,2	0,020	5,2	0,027	3,9	0,015	4,0	0,015	>0,5	0,00	>0,5

<sup>1</sup>Enterobactérias fermentadoras de lactose.

<sup>2</sup>Enterobactérias não fermentadoras de lactose.

EPM: erro padrão da média.

## 5 DISCUSSÃO

O uso de microrganismos vivos na dieta de ruminantes pode melhorar o aproveitamento da fibra, pesquisas procuram compreender o efeito modulatório no ecossistema ruminal promovido por meio da inoculação (Martins Junior, 2020). No presente estudo, os animais que consumiram a ração com o inóculo, apresentaram menor consumo de MS e dos nutrientes, em relação ao grupo controle, porém, os dois grupos obtiveram desempenhos produtivos semelhantes. Além disso, o milho moído reidratado ensilado e inoculado com as cepas em estudo, apresentou menor quantidade de fibra em detergente neutro (89,9g/kg MS) ao ser comparado com o milho ofertado ao grupo controle (134,8g/kg MS).

Mesmo não obtendo diferenças estatísticas para eficiência alimentar ( $P=0,91$ ), o sinergismo do fungo e da levedura contribuiu para a atividade fibrolítica no processo de ensilagem. Dessa forma, foi ofertado ao animal uma silagem com menor teor de fração fibrosa

insolúvel resultando em um melhor aproveitamento dietético. A *Rhodotorula mucilaginosa* e o *Trichoderma longibrachiatum* auxiliou na degradação dos carboidratos estruturais e não estruturais a partir da ensilagem desse material. Com isso, mesmo consumindo menos que o grupo controle, o tratamento com o inoculante permitiu uma melhor eficiência de ganho de peso.

Semelhantemente, Lee et al. (2015) observaram uma redução significativa no conteúdo de fibra em detergente neutro e melhora na qualidade da silagem de palha de arroz inoculada com fungos anaeróbicos que tem atividade celulolítica. Wang et al. (2019<sub>a</sub>) relataram que ao inocular o fungo *Piromyces sp.* proveniente do ambiente ruminal na silagem de milho, ocorreu uma melhora na qualidade da silagem e na taxa de degradação da fibra em relação á silagem do grupo controle.

Megaço et al. (2020) através da inoculação na dieta de cordeiros Santa Inês x Dooper, com a dose experiemntal  $10^9$  UFC/mL, sendo 30 mL do meio de cultura contendo a cepa fúngica *Trichoderma longibrachiatum*, isolados do trato digestório de ovinos, misturado à 100 g do concentrado, encontraram um aumento no ganho médio diário sem associação significativa ao consumo de matéria seca. Semelhante a esse estudo, Diaz et al. (2018<sub>a</sub>) suplementando bovinos holandeses com a cepa *Saccharomyces cerevisiae*,  $10^{10}$  UFC/g (1,5g/kg de MS), também não observaram diferenças estatísticas para consumo de matéria seca do grupo suplementado. Júnior et al. (2022) ao suplementarem via “top dress” na dieta de cordeiros mestiços a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ( $10^7$  UFC/ml misturados a 100g de concentrado) observaram maior peso vivo final e maior consumo entre 21 e 24 dias do período experimental em comparação com o grupo controle.

Os silos experimentais também demonstraram a qualidade do material ofertado aos animais. Apresentaram inicialmente uma população de bactérias formadoras ácido láctico nos dois tratamentos e períodos estudados (0 – 56 dias). Essas bactérias fazem parte da microflora endógena e são essenciais para o processo fermentativo pois promovem a conversão de carboidratos, seu principal substrato, em ácidos orgânicos, geralmente ácido acético e ácido láctico. Com isso, ocorre uma maior recuperação de energia para o alimento ensilado devido ao crescimento anaeróbico desses microrganismos realizando a fermentação láctica que potencializa o valor nutricional do alimento. Os produtos finais dessa fermentação auxilia na diminuição do pH que irá inibir o crescimento de outros microrganismos, inclusive os patogênicos, mantendo o valor nutricional do alimento por um período maior (McDonald et al., 1991; Meeske; Basson, 1998; Duniere et al., 2017; Liu et al., 2020).

A estabilidade aeróbica da silagem é baseada na velocidade do aumento do pH em condições aeróbias. Quanto mais rápido ocorre esse aumento, menor é a estabilidade da silagem.

A instabilidade tem impacto negativo no valor nutricional do alimento e aumenta o crescimento de microrganismos indesejáveis (McDonald et al., 1991; Meeske; Basson, 1998). Nos silos experimentais ocorreu à queda do pH nos dois tratamentos sem diferenças estatísticas. O pH alto no processo de ensilagem favorece o crescimento de bactérias patogênicas que vão competir por substrato com as bactérias formadoras de ácido láctico, diminuindo a qualidade do alimento (McDonald et al., 1991; Duniere et al., 2017; Liu et al., 2020). Kung & Kleinschmit (2006) relataram que valores entre 3,8 a 4,2 unidades de pH no tempo de abertura dos silos, podem ser considerados indicativos de uma boa conservação da massa ensilada. McDonald (1991) também pontuou que o pH ideal da silagem deve estar abaixo de 4,2. Em nosso estudo, o grupo controle no momento de abertura apresentou o pH de 3,9 e o grupo silos tratados o pH de 4,0 demonstrando uma boa conservação do alimento.

Enterobactérias fermentadoras de lactose e não fermentadoras de lactose estavam presentes somente no período 1. Esse resultado é importante pois, a presença de *Enterobacteriaceae* na silagem pode promover uma competição por substrato com as bactérias formadoras de ácido láctico. Sem a produção desse ácido, a queda do pH não ocorre corretamente comprometendo a qualidade nutricional e microbiológica desse alimento (McDonald et al., 1991; Wang et al., 2019<sub>b</sub>). Li et al. (2018) ao inocularem o fungo *Trichoderma reesei* na silagem de *Pennisetum sinense*, observaram redução do pH da silagem e constataram teores de fibra em detergente neutro, hemicelulose e celulose inferiores ao grupo não inoculado. Concluíram que a silagem tratada foi preservada adequadamente.

Somente nas silagens inoculadas com a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* e o fungo *Trichoderma longibrachiatum* apresentaram UFC nos dois períodos de coleta. Silva et al. (2020) relataram que cepas de leveduras em silagens poderia prejudicar a fermentação por competirem com as bactérias formadoras de ácido láctico. Porém esse resultado não foi observado em nosso estudo, devido a presença de bactérias formadoras de ácido láctico nos dois períodos e tratamentos. Xu et al. (2019) relataram que somente o uso de levedura nas silagens pode não ser vantajoso. Mas, observaram que o seu efeito combinado com outros microrganismos, pode auxiliar tanto na fermentação quanto na estabilidade aeróbia.

Sabe-se que a utilização de fungos em silagens é controversa devido ao potencial de deterioração de algumas espécies fúngicas produtoras de micotoxinas. Porém, pesquisas mostram o potencial de cepas de fungos celulolíticos do ambiente ruminal e o seu potencial probiótico para confecção de silagens. Estudos utilizando enzimas fúngicas relataram que os silos tratados apresentaram menor pH, menor concentração de amônia e ácido acético além de maiores concentrações de ácido láctico. Além disso, pesquisadores relataram aumento na

fração solúvel da matéria seca e proteína bruta nas silagens inoculadas (Nadeau et al., 2000; Martins et al., 2009).

Assim como ocorreu com a população de outras leveduras, outros fungos micelianos diferentes da cepa em estudo também foram identificados nos silos dos dois tratamentos. Porém, somente em relação aos fungos, ocorreu diferença estatística comparando os tratamentos. Os silos do grupo controle apresentaram maior número de UFC de outros fungos ( $P=0,04$ ) em relação ao grupo tratado, mas sem diferenças em relação a contagem fungos totais ( $P>0,05$ ). O *Trichoderma longibrachiatum* competiu por substrato com outros fungos a partir de sua inoculação. Abrão et al. (2014) mostraram em seus estudos que a cepa de *Trichoderma longibrachiatum* isolados do trato gastrointestinal não produzem micotoxinas. Dessa forma, a ocorrência dessa competição favoreceu o material ensilado melhorando a sua qualidade a partir da seleção do de um fungo autóctone ruminal.

Os fungos autóctones do trato digestório de ruminantes são capazes de solubilizar a parede celular das células das plantas no ambiente ruminal (Chaucheyras-Durand et al., 2012; Puniya et al., 2015). Dessa forma, o uso desses microrganismos como aditivos no processo de ensilagem se justifica frente aos possíveis benefícios que podem ser alcançados tanto para a qualidade da silagem, quanto para a saúde dos animais (Abrão et al., 2014; Abrão et al., 2017). Esses fungos residentes do trato gastrointestinal possuem a característica de utilizarem o oxigênio do meio e produzirem enzimas de degradação fibrosa vegetal, sendo assim, torna-se um aliado para qualidade da silagem (Wang et al., 2019; Silva et al., 2020; Liu et al., 2020). Outros autores já relataram a importância da inoculação dos fungos para a degradação fibrosa na produção de silagens (Duniere et al., 2015; Liu et al., 2020).

Por mais que o ácido lático seja importante para o processo de ensilagem, não é interessante esse composto no ambiente ruminal. Pesquisas apontam que a elevação na concentração de ácido lático no rúmen, além de diminuir o pH, aumenta a osmolaridade do meio, tornando-o hipertônico em relação ao plasma. Essa alteração metabólica causa uma sobrecarga ruminal podendo levar o animal a óbito (Juhász & Szegedi, 1968; Dougherty et al., 1975; Braun et al., 2010). Autores relataram que ao expor o material ensilado ao oxigênio, a concentração de leveduras aumenta nesse material promovendo o consumo desse ácido. Eles também observaram um aumento do pH no alimento no momento de exposição aeróbica, além do seu potencial probiótico devido a uma maior densidade dos fungos e leveduras no momento da exposição aeróbica. Sendo assim, a sobrevivência dessas bactérias formadoras de ácido lático torna-se inviável (Duniere et al., 2015; Duniere et al., 2017).

No presente estudo não foi avaliado a atividade microbiana ruminal, porém, diante dos

resultados apresentados espera-se que a inoculação desses microrganismos tenha contribuído para o favorecimento da população de bactérias celulolíticas e utilizadoras de lactato, que irão participar da degradação fibrosa e estabilizar o pH ruminal (Chaucheyras et al., 1995; Abrão et al., 2018<sub>b</sub>). Uma vez que eles produzem enzimas importantes para a digestão e produção de energia, a inoculação com fungos e leveduras nas silagens torna-se um grande aliado para o aproveitamento dietético (Patrizi et al., 2004). Outra vantagem da utilização desses microrganismos está relacionada a fisiologia dos fungos, pois além de sua participação no processo de ensilagem, no ambiente anaeróbico ruminal participam da degradação da fibra vegetal. A presença de leveduras no rúmen pode estar associado a germinação de zoósporos fungicos. Esses, por sua vez, irão aderir aos materiais vegetais que chegam ao rúmen, com objetivo de degrada-lo, através da ação enzimática (Mutsvangwa et al., 1992; Firkins et al., 1998; Chaucheyras-Durand et al., 2012).

No ambiente ruminal, o tratamento com o inoculante pode ter contribuído por uma possível maior síntese de proteína microbiana, resultando em maior aporte de nutrientes para o animal, propiciando maior eficiência de ganho de peso. Pesquisadores afirmam que tanto a levedura quanto o fungo possuem a capacidade de afetar o fluxo proteico, que estão relacionados à mudanças nas atividades dos microrganismos ruminais. Devido a capacidade da levedura de capturar o oxigênio que interfere negativamente no crescimento bacteriano, e dos fungos de participar no processo de degradação de carboidratos estruturais das plantas, a suplementação pode ter aumentado a taxa de fermentação ruminal e conseqüentemente propiciado o aumento da população bacteriana (Williams et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Diaz et al., 2018<sub>a</sub>; Júnior et al., 2022).

Diaz et al. (2018<sub>b</sub>) utilizaram cordeiros Dorper x Santa Inês, suplementados via “top dress” na concentração de  $10^{10}$  UFC/g (2g/kg MS) de levedura viva, *Saccharomyces cerevisiae*, observou maior captação de nitrogênio ruminal, conseqüentemente, maior fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado. O aumento de N disponível no rúmen, aumenta o fluxo da proteína microbiana que será absorvida ao longo do trato gastro intestinal (Williams et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Abrão et al., 2018). Diferentemente do observado no presente estudo, pois não foi observado diferenças estatística entre os dois tratamentos para balanço de N, N absorvido e N retido. Semelhante a esses resultados, Erasmus et al. (1992) relataram em vacas holandesas suplementadas com uma cultura a base de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) uma ingestão de N entre os tratamentos também semelhantes. Mas mesmo assim, o consumo de matéria seca foi maior e a produção de leite tendeu a ser maior para as vacas suplementadas com cultura de levedura, mas a composição do leite não foi afetada. Os pesquisadores também observaram que

o perfil de aminoácidos duodenal foram significativamente afetados pela suplementação da cultura de levedura, sugerindo que a cultura da levedura pode alterar o perfil de aminoácidos da proteína microbiana, mesmo sem afetar o fluxo de nitrogênio.

A digestibilidade aparente do trato total da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e fibra em detergente neutro não foi afetada pelo tratamento, porém nos períodos 2 e 3 tendeu a ser maior na dieta com inoculante, considerando todos os nutrientes e a MS. A digestibilidade, é baseada na fermentação e no tempo de permanência do alimento no trato gastrointestinal. Após a deglutição, ocorre o processo fermentativo no rúmen, para posterior absorção no intestino delgado (Pina et al., 2006; Martins et al., 2006; Berchielli et al., 2006).

Martins et al. (2022) consideraram que a taxa de passagem é inversamente relacionada a digestibilidade, sendo assim, pode-se supor que, com uma melhor degradação fibrosa, devido a ação do inoculante, poderia acarretar em uma diminuição na partícula do alimento ofertado e, conseqüentemente, no tempo em que o alimento ficaria retido no rúmen. Com isso, o valor de digestibilidade não teria interferências com a ação do inoculante em estudo. Em contrapartida, Nawaz et al. (2016) inocularam na dieta de bezerros enzimas de *Trichoderma reesei*, observou um aumento na digestibilidade de MS e PB conseqüentemente no ganho de peso médio diário. Essas desigualdades de resultados encontrados podem estar relacionados a cepa utilizada, a dose experimental, a forma da suplementação, a sinergia entre os microrganismos e ao ambiente ruminal que se caracteriza por ser bastante dinâmico (Berchielli et al., 2006; Pina et al., 2006).

Considerando o alto impacto econômico da nutrição em uma propriedade, uma melhor eficiência alimentar poderia reduzir os custos totais da alimentação. Megaço et al. (2020) observaram uma redução de 13,35% no custo/kg de peso corporal utilizando *Trichoderma longibrachiatum* na dieta de cordeiros. Em nosso estudo, o grupo tratado consumiu 9,6% a menos que o grupo controle, apresentando o mesmo desempenho.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação de cordeiros em terminação com *Rhodotorula mucilaginosa* + *Trichoderma longibrachiatum* apresenta potencial para uso como inoculantes em dietas baseadas em volumosos de baixa qualidade. Visto que a inoculação reduziu o consumo de matéria seca e proporcionou desempenho semelhante do grupo controle, além de reduzirem o teor da fibra em detergente neutro da silagem de milho. Contudo, espera-se novos estudos para que se possa compreender as diferentes doses e veículos possíveis para utilização dos inóculos na suplementação de ovinos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, F.O.; DUARTE, E.R.; FREITAS, C.E.; VIEIRA, E.A.; GERASEEV, L.C.; DA SILVA-HUGHES, A.F.; ROSA, C.A., RODRIGUES, N.M. *Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures*. Current Microbiology, 69(5):649-59, doi: 10.1007/s00284-014-0633-5, 2014.

ABRÃO, F.O.; DIJKSTRA, D.; FABINO, N.R.; CURCINO, B.L.H.; ROBSON, D.E. *Efeito do processamento do grão sobre a população de protozoários ruminais de ovinos Santa Inês*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 67(260):518-524, 2018<sub>a</sub>.

ABRÃO, F.O.; DUARTE, E.R.; PESSOA, M.S.; SANTOS, V.L.; RODRIGUEZ, N.M. *Inocuidade micotóxica e viabilidade de Aspergillus spp. com potencial probiótico provenientes do trato digestório bovino*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 70(6):1833-1839, 2018<sub>b</sub>.

ADESOGAN, A. T.; MA, Z.; ROMERO, J.J.; ARRIOLA, K. *Ruminant nutrition symposium: Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes*. Journal of Animal Science, 92: 1317-1330, doi: 10.2527/jas.2013-7273, 2014.

AGARUSSI, M.C.N.; PEREIRA, O.G.; PIMENTEL, F.E.; AZEVEDO, C.F.; DA SILVA, V.P.; SILVA, F.F. *Microbiome of rehydrated corn and sorghum grain silages treated with microbial inoculants in different fermentation periods*. Scientific Reports, 12(1):16864, doi: 10.1038/s41598-022-21461-4, 2022.

AOAC. Official Methods of Analysis. In A. of O. A. C.- AOAC (Ed.), *Association of Official Agricultural Chemists - AOAC*. Association of Official Agricultural Chemists, 16: 1041 -1141, 1990.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. *Microbiologia do rúmen*. Nutrição de ruminantes, 2: 115 – 1602, 2011.

ARCHER, J.A.; RICHARDSON, E. C.; HERD, R.M.; ARTHUR, P.F. *Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: A review*. Australian Journal of Agricultural Research, 50: 147-161, doi: 10.1071/A98075, 1999.

BAUCHOP, P. *The rumen anaerobic fungi: colonizers of plant fibre*. Annals of Veterinary Research, 10 (2): 246-248. PMID: 533150, 1979.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. *Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2006.

BOLSON, D.C.; PEREIRA, D.H.; DOS SANTOS, P. D.; XAVIER, I.M.; BARBOSA, P.L.; PEDREIRA, B.C.; MOMBACH, M.A. *Corn silage rehydrated with crude glycerin in lambs' diets*. Trop Animal Health Prod, 2020, 52(6):3307-3314. doi: 10.1007/s11250-020-02362-y

BRASHEARS, M.; AMEZQUITA, A.; JARONI, D. *Lactic acid bacteria and their uses in animal feeding to improve food safety*. Advances in Food and Nutrition Research, 50: 1–31. doi:10.1016/S1043-4526, 2005.

BRAUN, U.; RIHS, T.; SCHEFER, U. *Ruminal lactic acidosis in sheep and goats*. Veterinary Record, 130: 343-349, 1992.

CARVALHO-ESTRADA P.A., DE ANDRADE P.A.M., PAZIANI S.F., NUSSIO L.G., QUECINE M.C. *Rehydration of dry corn preserves the desirable bacterial community during ensiling*. FEMS Microbiol Lett, 1(17): 367, doi: 10.1093/femsle/fnaa139, 2020.

CATON, J. S.; ERICKSON, D. O.; CAREY, D. A.; ULMER, D. L. *Influence of Aspergillus oryzae fermentation extract on forage intake, site of digestion, in situ degradability, and duodenal amino acid flow in steers grazing cool-season pasture*. Journal Animal Science, 71: 779-787, 1993.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; FAQIR, F.; AMEILBONNE, A.; ROZAND, C.; MARTIN, C. *Fates of acid-resistant and non-acid-resistant shiga toxin-producing Escherichia coli Strains in ruminant digestive contents in the absence and presence of probiotics*. Applied and environmental microbiology, 76: 640–647, 2010.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; FONTY, G. *Influence of a probiotic yeast (Saccharomyces cerevisiae CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentations in the rumen of newborn lambs*. Microbial Ecology in Health and Disease, 30- 36, doi: 10.1080/089106002760002739, 2002.

CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G.; BERTIN, G.; GOUET, P. *Effects of live Saccharomyces cerevisiae cells on zoospore germination, growth, and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus, Neocallimastix frontalis MCH3*. Current Microbiology, 31: 201–205, doi: 10.1007/BF00298373, 1995.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; CHEVAUX, E.; MARTIN, C.; FORANO, E. *Use of Yeast Probiotics in Ruminants: Effects and Mechanisms of Action on Rumen pH, Fibre Degradation, and Microbiota According to the Diet*. Probiotic in Animal, doi: 10.5772/50192, 2012.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; WALKER, N. D.; BACH, A. *Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future*. Animal Feed Science and Technology, 145: 5–26, 2008.

CHOLEWIŃSKA, P.; CZYŻ, K.; NOWAKOWSKI, P.; WYROSTEK, A. *The microbiome of the digestive system of ruminants - a review*. Animal Health, 21(1):3-14. doi: 10.1017/S1466252319000069, 2020.

DEHORITY, B. A. *Microbial Interactions in the Rumen*. Revista de la Facultad de Agronomía, 15 (1): 69-86, 1998.

DEHORITY, B. A. *Rumen microbiology*. Nottingham: Nottingham University Press, 2: 372, 2004.

DIAZ, T. G.; BRANCO, A. F.; JACOVACI, F. A.; JOBIM, C. C.; DANIEL, J. L. P.; BUENO, A. V. I.; RIBEIRO, G. M. *Use of live yeast and mannanoligosaccharides in grain-based diets for cattle: Ruminal parameters, nutrient digestibility, and inflammatory response.* PLOS ONE, 13(11): 1-15, doi:10.1371/journal.pone.0207127, 2018 a.

DIAZ, T. G.; BRANCO, A. F.; JACOVACI, F. A.; JOBIM, C. C.; BOLSON, D. C.; DANIEL, J. L. P. *Inclusion of live yeast and mannan-oligosaccharides in high grain-based diets for sheep: Ruminal parameters, inflammatory response and rumen morphology.* PLOS ONE, 13(2): 1–12, doi: 10.1371/journal.pone.0193313, 2018b.

DIJKSTRA, J.; FRANCE, J.; DAVIES, D.R. *Different Mathematical Approaches to Estimating Microbial Protein Supply in Ruminants.* Journal of Animal Science, 81:3370–3384, 1998.

DOUGHERTY, R W.; RILEY, J.L.; COOK, H.M. Changes in motility and pH in the digestive tract of experimentally overfeed sheep. American Journal of Veterinary Research, 36: 827-829, 1975.

DUNIERE, L.; JIN, L.; SMILEY, B.; QI, M.; RUTHERFORD, W.; WANG, Y.; MCALLISTER, T. *Impact of adding Saccharomyces strains on fermentation, aerobic stability, nutritive value, and select lactobacilli populations in corn silage.* Journal of Animal Science, 93(5): 2322–2335, doi: 10.2527/jas.2014-8287, 2015.

DUNIERE, L.; XU, S.; LONG, J.; ELEKWACHI, C.; WANG, Y.; TURKINGTON, K.; FORSTER, R.; MCALLISTER, T.A. *Bacterial and fungal core microbiomes associated with small grain silages during ensiling and aerobic spoilage.* BMC Microbiology, 17(1):50, 2017.

DUTTA, T. K.; KUNDU, S. S.; KUMAR, M. *Potential of direct-fed-microbials on lactation performance in ruminants - a critical review.* Livestock Research for Rural Development, 21(10), 2009.

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, 75: 3056-3056, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(92)78069-2, 1992.

- FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P. M.; SHAVER, R. D. *Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis*. Journal of Dairy Science, 96 (1): 533–550 doi: 10.3168/jds.2012-5932, 2013.
- FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P. M.; SHAVER, R. D. *Effect of ensiling time and exogenous protease addition to whole-plant corn silage of various hybrids, maturities, and chop lengths on nitrogen fractions and ruminal in vitro starch digestibility*. Journal of Dairy Science, 98 (12): 8869–8881, 2015.
- FIRKINS, J.L.; ALLEN, M.S.; OLDICK, B.S.; ST-PIERRE, N.R. *Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum*. Journal of Dairy Science, 81(12):3350-69, doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75901-6, 1998.
- FREITAS, C.E.S.; ABRÃO, F.O.; SILVA, K.L.; ALMEIDA, P.N.M.; DUARTE, E.R. *Fungos aeróbios no intestino grosso de borregos e de ovelhas criados em pastagens tropicais*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 64: 225-227, 2012.
- GRIGOLETTO, N. T. S.; GHIZZI, L.G.; GHELLER, L. S.; DIAS, M.S.S.; NUNES, A.T.; SILVA, T. B.; SILVA, G. G.; SILVA, L. F. C.; LOBATO, D. N.; RENNÓ, F. P. *Effects of a blend of live yeast and organic minerals or monensin on performance of dairy cows during the hot season*. Journal of Animal Science, 104(11): 11634–11645, doi: 10.3168/jds.2021-20194, 2021.
- HAIBO, W.; ZHAOTAO, Y.; ZHIBIAO, G.; QIANWEN, L.; XINJUN, Q.; FEI, W.; TIANCI, G.; BINGHAI, C.; HUAWEI, S. *Effects of compound probiotics on growth performance, rumen fermentation, blood parameters, and health status of neonatal Holstein calves*. Journal of Animal Science, 105(3): 2190–2200, doi: 10.3168/jds.2021-20721, 2022.
- HOFFMAN, P. C.; ESSER, N. M.; SHAVER, R. D.; COBLENTZ, W. K.; SCOTT, M. P.; BODNAR, A. L.; SCHMIDT, R. J.; CHARLEY, R. C. *Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn*. Journal of Dairy Science, 94 (5): 2465–2474, doi: 10.3168/jds.2010-3562, 2011.

JUHÁSZ, B.; SZEGEDI, B. *Pathogenesis of rumen overload in sheep*. Acta Physiologica Hungary, 18: 63-80, 1968.

JÚNIOR, V.S.M.; FREITAS, C.E.S.; SANTOS, A.F.F.; SANTOS, L.F.X.; GERASEEV, L.C.; DUARTE, E.R.D.; MAGAÇO, F.S.; PEREIRA, M.L.A.; LIMA, L.S. *Performance of Weaned Lambs Fed with Diet Containing Yeast Autochthonous from the Ruminal Environment*. Kroton Educacional, 26 (3): 274-278, doi: 10.17921/1415-6938, 2022.

KAMARA, D. N. *Rumen Microbial Ecosystem*. Current Science, 89 (1): 125- 35, 2005.

KITAMOTO H.K., HASEBE A., OHMOMO S., SUTO E.G., MURAKI M., IIMURA Y. *Prevention of aerobic spoilage of maize silage by a genetically modified killer yeast, Kluyveromyces lactis, defective in the ability to grow on lactic acid*. Appl Environ Microbiol, 65(10):4697-700, doi: 10.1128/AEM.65.10.4697-4700, 1999.

KONG, F.; LU, N.; LIU, Y.; ZHANG, S.; JIANG, H.; WANG, H.; WANG, W.; LI, S. *Aspergillus oryzae and Aspergillus niger Co-Cultivation Extract Affects In Vitro Degradation, Fermentation Characteristics, and Bacterial Composition in a Diet-Specific Manner*. Animals, 11: 1248, doi: 10.3390/ani11051248, 2021.

KOZLOSKI, V. G. *Bioquímica dos ruminantes*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2: 2012, 2011.

KUNG, J.R.L.; KLEINSCHMIT, D.H. *A meta-analysis of the effects of lactobacillus buchneri on the fermentation and aerobic stability of corn and grass and small-grain silages*. Journal of Dairy Science, 89 (10): 4005-4013, 2006.

KUNG, JR. L.; SCHMIDT, R.J.; EBLING, T.E.; HU, W. *The Effect of Lactobacillus buchneri 40788 on the Fermentation and Aerobic Stability of Ground and Whole High-Moisture Corn*. Journal of Dairy Science, 90: 2309-2314, 2007.

LEE, S. M.; GUAN, L. L.; EUN, J. S.; KIM, C. H.; LEE, S. J.; KIM, E. T.; LEE, S. S. *The effect of anaerobic fungal inoculation on the fermentation characteristics of rice straw silages*. Journal of applied microbiology, 118(3): 565-573, doi: 10.1111/jam.12724, 2015.

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

LI, J.; YUAN, X.; DONG, Z.; MUGABE, W., SHAO, T. *The effects of fibrolytic enzymes, cellulolytic fungi and bacteria on the fermentation characteristics, structural carbohydrates degradation, and enzymatic conversion yields of Pennisetum sinense silage*. *Bioresource technology*, 264: 123-130, doi: 10.1016/j.biortech.2018.05.059, 2018.

LIU, B.; YANGS, Z.; HUAN, H.; GU, H.; XU, N.; DING, C. *Impact of molasses and microbial inoculants on fermentation quality, aerobic stability, and bacterial and fungal microbiomes of barley silage*. *Scientific Reports*, 10(1):1-10, 2020.

MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. *Artmed*, 12: 1160, 2010.

MAGAÇO, F. D. S.; FREITAS, C. E. S.; FREITAS, A. A. DE M.; JUNIOR, V. S. M.; SANTOS, A. F. F.; PEREIRA, M. L. A.; DUARTE, E. R. *Productive performance and economic profitable of weaned lambs supplemented with a Trichoderma longibrachiatum strain isolated from sheep*. *Journal Animal Science*, 1-6, 2020.

MARTINS, A. DE S.; VIEIRA, P. DE F.; BERCHIELLI, T. T.; PRADO, I. N. D. *Degradação ruminal da silagem de milho e da palha de arroz utilizando enzimas fibrolíticas exógenas*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 30(4): 435-442, doi: 10.4025/actascianimsci6462, 2009.

MARTINS, LF.; OH, J.; HARPER, M.; MELGAR, A.; RÄISÄNEN, S.E.; CHEN, X. *Effects of an exogenous enzyme preparation extracted from a mixed culture of Aspergillus spp. on lactational performance, metabolism, and digestibility in primiparous and multiparous cows*. *Journal of Dairy Science*, 105:7344-7353, doi: 10.3168/jds, 2022.

MEESKE, R.; BASSON, H.M. *The effect of a lactic acid bacterial inoculant on maize silage*. *Animal Feed Science Technology*, 70 (3): 239-247, 1998.

MERTENS, D. R. *Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study*. Journal of AOAC International, 85(6): 1217–1240, doi: /10.1093/jaoac, 2002.

MOURÃO, R. DE C.; PANCOTI, C. G.; MOURA, A. M.; FERREIRA, A. L.; BORGES, A. L. DA C. C.; REIS, R. R. *Processamento do milho na alimentação de ruminantes*. Pubvet, 6(5), doi: 10.22256/pubvet1292, 2017.

MUTSVANGWA, T.; EDWARDS, I.; TOPPS, J.; PATERSON, G. *Effect of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on ruminal fermentation patterns, feed intake and growth of intensively fed bulls*. Animal Science, 55 (1): 35-40. doi:10.1017/S0003356100037247, 1992.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. *The biochemistry of silage*. Mallow Chalcombe Publications, 2: 340, 1991.

NADEAU, E.M.; RUSSELL, J.R.; BUXTON, D.R. *Intake, digestibility, and composition of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulase, inoculant, and formic acid fed to lambs*. Journal Animal Science, 78(11):2980, doi: 10.2527/2000.78112980, 2000.

NEWBOLD, C.J.; RAMOS-MORALES, E. *Review: Ruminal microbiome and microbial metabolome: effects of diet and ruminant host*. Animal, 14(1): 78-86, doi: 10.1017/S1751731119003252, 2020.

OBEIDAT, B.S.; SUBIH, H.S.; ATA, M. *Protein Supplementation Improves Performance of Lambs Fed Low-Quality Forage*. Animals (Basel), 10(1):51, doi: 10.3390/ani10010051, 2019.

PATRIZI, W.L.; MADRUGA, C.R.F.; MINETTO, T.P.; NOGUEIRA, E.; MORAIS, M.G. *Efeito de aditivos biológicos comerciais na silagem de capim-elefante (Pennisetum purpureum Schum)*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 56 (3): 392-397, 2004.

PAES, M. C. D. *Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho*. In Circular Técnica, 75: 1679-1150, 2006.

PUNIYA, A. K.; SALEM, A.Z.M.; KUMAR, S.; DAGAR, S.S.; GRIFFITH, G.W.; PUNIYA, M.; REVELLA, S.R.; KUMAR, N.; DHEWA, T.; KUMAR, R. *Role of Live Microbial Feed Supplements with Reference to Anaerobic Fungi in Ruminant Productivity: A review*. Journal of Integrative Agriculture, 14: 1201-1217, 2015.

QIU, Q.; ZHANG, J.; QU, M.; LI, Y.; ZHAO, X.; OUYANG, K. *Effect of Energy Provision Strategy on Rumen Fermentation Characteristics, Bacterial Diversity and Community Composition*. Bioengineering, 10: 107, doi: /10.3390/ bioengineering10010107, 2023.

RODRIGUES, P. H. M.; SENATORE, A. L.; LUCCHI, C. DE S.; ANDRADE, S. J. T.; LIMA, F. R.; MELOTTI, L. *Valor nutritivo da silagem de sorgo tratada com inoculantes enzimo-microbianos*. Acta Scientiarum. Animal Sciences, 24: 1141-1145, doi:/10.4025/actascianimsci.2580, 2008.

SANDERSON, M.A. *Aerobic stability and in vitro digestibility of microbially inoculated corn and sorghum silages*. Journal Animal Science, 71 (2): 505-514, doi: /10.2527/1993.712505x, 1993.

SEHGAL, J.P.; JIT, D.; PUNIYA, A.K.; SINGH, K. *Influence of anaerobic fungal administration on growth, rumen fermentation and nutrient digestion in female buffalo calves*. Journal of animal and Feed Sciences, 510–518, doi: 10.22358/jafs/66678/2008, 2008.

SULLINS, R. D.; ROONEY, L. W. *Light and scanning electron microscopy studies of waxy and nonwaxy endosperm sorghum varieties*. Cereal Chemistry, 52 (3): 361-366, 1975.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology*. Sunderland: Sinauer Associates, 3<sup>nd</sup> ed, 1975.

VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press, 2<sup>nd</sup> ed, 1994.

WANG, D.; ZHAO, C.; LIU, S.; ZHANG, T.; YAO, J.; CAO, Y. *Effects of Piromyces sp. CN6 CGMCC 14449 on fermentation quality, nutrient composition and the in vitro degradation rate of whole crop maize silage*. AMB Express, 9(1): 121, doi: /10.1186/s13568-019-0846-x, 2019<sup>a</sup>.

WANG, Y.; HE, L.; XING, Y.; ZHENG, Y.; ZHOU, W.; PIAN, R.; YANG, F.; CHEN, X.; ZHANG, Q. *Dynamics of Bacterial Community and Fermentation Quality during Ensiling of Wilted and Unwilted Moringa oleifera Leaf Silage with or without Lactic Acid Bacterial Inoculants*. Msphere, 2019, v.4(4), <https://doi.org/10.1128/mSphere.00341-19>, 2019b.

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

WEINBERG, Z. G.; CHEN, Y.; VOLCHINSKI, V.; SELA, S.; OGUNADE, I. M.; ADESOGAN, A. *An in vitro model to study interactions between Escherichia coli and lactic acid bacterial inoculants for silage in rumen fluid*. Letters in Applied Microbiology, 63(1): 60–65. doi: /10.1111/LAM.12587, 2016.

WELKIE, D.G.; STEVENSON, D.M.; WEIMER, P.J. *ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle*. Anaerobe, 6(2):94-100, doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.07.002, 2010.

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, 69:3016, 1991.

XU, S.; YANG, J.; QI, M.; SMILEY, B.; RUTHERFORD, W.; WANG, Y.; MCALLISTER, T. A. *Impact of Saccharomyces cerevisiae and Lactobacillus buchneri on microbial communities during ensiling and aerobic spoilage of corn silage*. Journal of Animal Science, 97(3): 1273–1285, doi: /10.1093/JAS/SKZ021, 2019.