

Arthur Henrique Carvalho Patrus Bello

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS COM
BACTÉRIAS E LEVEDURAS**

Dissertação apresentada à Escola de
Veterinária da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Zootecnia

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Ronaldo Braga Reis

Belo Horizonte MG
Escola de Veterinária da UFMG

2014

Sumário

| | |
|--|----|
| Lista de tabelas | 5 |
| Resumo | 6 |
| 1. Introdução..... | 7 |
| 2. Revisão de Literatura | 8 |
| 2.1. Aditivos microbianos de inclusão direta (DFM) na dieta de vacas leiteiras | 9 |
| 2.1. 1. Ação dos DFM no rúmem | 10 |
| 2.1.2. Efeitos da utilização de DFM sobre o pH ruminal..... | 10 |
| 2.1.3. Efeitos da utilização de DFM sobre a concentração de ácidos graxos voláteis.... | 11 |
| 2.1.4. Efeitos da utilização de DFM sobre a digestibilidade de matéria seca | 12 |
| 2.2. Resposta animal à utilização de DFM..... | 14 |
| 2.2.1. Efeitos da utilização de DFM sobre o consumo de matéria seca | 15 |
| 2.2.2. Efeitos da utilização de DFM sobre a produção de leite | 16 |
| 2.2.3. Efeitos da utilização de DFM sobre a composição do leite | 17 |
| 2.3. Outras respostas à suplementação de DFM | 19 |
| 2.3.1. Resposta imune | 19 |
| 3. Materiais e métodos | 20 |
| 4. Resultados e Discussão | 25 |
| 5. Conclusões..... | 30 |
| Referências Bibliográficas | 31 |

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição das dietas oferecidas (ingredientes) e das consumidas (nutrientes), de vacas em lactação suplementadas com bactérias (Bact), bactérias e leveduras (Bact+Lev) ou controle.....21

Tabela 2: Consumo de matéria seca (CMS), produção e composição de leite, contagem de células somáticas (CCS), nitrogênio ureico no leite (NUL) e eficiência alimentar de vacas em lactação suplementadas com bactérias (Bact), bactérias e leveduras (Bact+Lev) ou controle.....26

Tabela 3: Atividade mastigatória, alantoína (Ala) e pH ruminal de vacas em lactação suplementadas com bactérias (Bact), bactérias e leveduras (Bact+Lev) ou controle.....28

Tabela 4: Digestibilidade aparente no trato digestivo total da matéria seca (DMS), da matéria orgânica (DMO), da fibra em detergente neutro (DFDN), e da matéria orgânica não FDN (DMOnFDN) e consumo de matéria orgânica digestível (CMOD) de vacas em lactação suplementadas com bactérias (Bact), bactérias e leveduras (Bact+Lev) ou controle.....29

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a inclusão de aditivos à base de bactérias ruminais ou bactérias ruminais associadas a leveduras em dietas de vacas em lactação, sobre a fermentação ruminal, produção e composição do leite. Quinze vacas da raça Holandês, com 156 ± 53 dias em lactação, produção diária média $31,4 \pm 0,5$ kg e peso corporal médio de 665 ± 16 kg formaram cinco grupos de três animais com base na ordem de parto e produção diária de leite. As vacas foram alocadas em delineamento Quadrado Latino 3×3 , com períodos de 35 dias. Os tratamentos foram: Bact - 10g (*Ruminobacter amylophilum*, *Ruminobacter succinogenes*, *Succinovibro dextrinsolvens*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* em carbonato de cálcio); Bact+Lev - 10g (Bactérias e veículo inerte associado a 6×10^9 /g de células vivas e 2×10^8 /g de células mortas de *Sacharomyces cerevisiae*) ou Controle - 10g de carbonato de cálcio. Os tratamentos foram ofertados a cada vaca em cápsulas por ingestão forçada duas vezes por dia. Não houve diferença no consumo de matéria seca (CMS) entre as dietas experimentais e a média geral foi de $20,5 \pm 0,2$ kg. Também não foram observadas diferenças para a média de produção ($P=0,66$) e composição do leite. A suplementação de vacas em lactação com bactérias tendeu a reduzir o pH ruminal ($P=0,08$). No entanto, associação de bactérias com leveduras tendeu a reduzir o teor de nitrogênio ureico do leite (NUL, $P=0,12$). A suplementação com leveduras aumentou o tempo diário de mastigação ($P=0,02$) e a mastigação por unidade de CMS ($P=0,06$). Não houve diferença entre tratamentos, nas digestibilidades da matéria seca (DMS), da matéria orgânica (DMO), da fibra detergente neutro(FDN) e da matéria orgânica não FDN(DMONFDN). Portanto, o uso de aditivos microbianos para inclusão direta (DFM) nesse estudo não evidenciou resposta em desempenho e digestibilidade, em animais em balanço energético positivo e sem grandes desafios.

Palavra-chave: nutrição, microrganismos, rumen.

1. INTRODUÇÃO

O avanço genético dos animais para produção leiteira, tem possibilitado grandes produções. Com isso, a demanda por dietas com alta inclusão de concentrados, alta densidade energética e proteica, gera maior desafio ao equilíbrio da fermentação ruminal.

O rúmen é um ecossistema aberto, com inserção constante de alimentos e posteriores transformações em ácidos graxos voláteis (AGV) e massa microbiana, que são as principais fontes de energia e proteína para o ruminante. Para vacas de alto desempenho, o uso de estratégias alimentares que possam atender a demanda de nutrientes, é um desafio à microflora ruminal (Pereira, 2005).

Os aditivos microbianos tem sido utilizados em dietas de vacas leiteiras de alta produção, como forma de melhoria do ambiente ruminal e consequente maximização da eficiência produtiva.

O principal mecanismo pelo qual esses microrganismos exercem efeito positivo sobre o desempenho animal parece estar associado à atuação sobre a função ruminal (Dawson et al., 1990), principalmente estabilidade no pH ruminal, concentração de AGV, consumo de matéria seca (CMS), digestibilidade da matéria seca, produção e composição do leite.

A utilização de microrganismos como aditivos nas dietas de vacas leiteiras de alta produção, possui potencial para se tornar uma boa opção no manejo nutricional das propriedades leiteiras, melhorando a saúde e a eficiência dos animais. Poucos trabalhos foram desenvolvidos até agora na tentativa de elucidar os mecanismos de ação e possíveis efeitos de sua suplementação. Além disso, devido à utilização de diferentes cepas de microrganismos e em diferentes condições, têm-se obtido resultados conflitantes.

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho e a digestibilidade de vacas leiteiras em lactação suplementadas com aditivos à base de bactérias ruminais (*Ruminobacter amylophilum*, *Ruminobacter succinogenes*, *Succinovibro dextrin solvens*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*) ou bactérias ruminais associadas a leveduras (Bactérias e veículo inerte associado a 6×10^9 /g de células vivas e 2×10^8 /g de células mortas de *Sacharomyces cerevisiae*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aditivos microbianos de inclusão direta (DFM) na dieta de vacas leiteiras

Em 1989, o Food and Drug Administration (FDA) norte-americano recomendou que a utilização do termo “direct-fed microbial” (DFM) fosse aplicado aos aditivos microbianos. O FDA define como DFM uma fonte viva (viável) de microorganismos de ocorrência natural (Martin & Nisbet, 1992). Os microorganismos utilizados como DFM para ruminantes incluem fungos e bactérias. Entretanto, as leveduras comerciais nem sempre são fonte viva de microorganismos.

A utilização de DFM na alimentação de animais de produção foi inicialmente baseada na possibilidade de efeito benéfico sobre o trato digestivo inferior, por favorecer o estabelecimento de microflora intestinal mais desejável, capaz de prevenir a sua colonização por microorganismos patogênicos (Krehbiel, 2003). No entanto, pesquisas demonstraram que certos DFM também possuem efeitos benéficos no ambiente ruminal. Nocek et al. (2002) relataram diminuição do risco de acidose em vacas leiteiras que receberam a inclusão na dieta de *Lactobacillus* e *Enterococcus*. Segundo Nocek et al. (2003), a adição de DFM com microrganismos produtores de ácido lático forneceria quantidade constante de ácido lático no ambiente ruminal, que manteria a população de microrganismos utilizadores de ácido lático metabolicamente ativa. Logo, em momentos de maior concentração de ácido, ocorreria maior sequestro de ácido lático do ambiente ruminal por esses microrganismos.

Os principais aditivos microbianos comerciais para ruminantes incluem bactérias do gênero *Lactobacilli*, como o *Lactobacillus acidophilus* e várias espécies de *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Bacillus* e ainda leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *boulardii* (Souza et al., 2007).

Os possíveis mecanismos de ação ruminal dos DFM, tem sido relacionados com mudanças no padrão de fermentação ruminal, maior estabilidade do pH ruminal, maior digestão de fibras, aumento no CMS e conseqüente aumento na produção de leite (Nocek et al., 2002; Nocek et al., 2003; Nocek e Kautz, 2006).

Mais especificamente com as leveduras, vários mecanismos são propostos para explicar os efeitos dos produtos no desempenho de bovinos. Os principais deles ocorrem pela modificação do ambiente ruminal. De maneira geral, há aumento na população bacteriana ruminal, estabilização de pH, seguidos também por aumento nas populações de bactérias celulolíticas e utilizadoras de ácido lático (Newbold et al., 1996).

Contudo, vários fatores podem interferir nas respostas de vacas leiteiras à suplementação com DFM, como estágio de lactação, tipo de forragem, manejo alimentar e proporção volumoso:concentrado (Dann et al., 2000).

2.1.1. Ação de DFM no rúmen

Alguns mecanismos de ação têm sido descritos para explicar os efeitos que os DFM exercem sobre a microbiota do rúmen e a produção animal. Sugere-se que a resposta em consumo e desempenho animal induzida por DFM são mediadas por alterações na fermentação ruminal e na digestão, além de algum efeito sobre resposta imune (Souza et al., 2007).

2.1.2. Efeitos da utilização de DFM sobre o pH ruminal

Vários estudos tem avaliado e atribuído o valor de pH ruminal como principal fator responsável pela saúde do rúmen. Estrategicamente, algumas amostras específicas de microrganismos, quando devidamente selecionadas e combinadas, poderiam manipular e regular o valor de pH ruminal (Nocek et al., 2002).

O balanço dos microrganismos que produzem e utilizam ácido lático é fundamental para manter o ambiente ruminal estável. Alguns microrganismos do rúmen são classificados em produtores de lactato ou utilizadores de lactato. Os principais utilizadores de lactato são *Propionibacteria shermanii*, *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*. Em condições normais de rúmen, o principal produtor de ácido lático é o *Streptococcus bovis*. O balanço entre esses grupos de microrganismos determina a quantidade de lactato acumulado no rúmen (Russell e Hino, 1985).

Owens et al. (1998) sugeriram que a suplementação de ácido láctico na dieta ou a inclusão de algum ingrediente com alto teor desse ácido, poderia melhorar a habilidade do rúmem em adaptar-se às condições que levariam ao aumento rápido da concentração de ácido láctico. Contudo, Dawson (1990) já havia sugerido que a utilização de leveduras na dieta de vacas leiteiras, em determinadas condições, poderia estimular a utilização de ácido láctico no rúmem.

Como forma de atuação, tem sido postulado, que as culturas de *S. cerevisiae* estimulam o crescimento de bactérias utilizadoras de ácido láctico, principalmente a *Selenomonas ruminantium* e a *Megasphaera elsdenii* (Chaucheyras et al., 1996). No mesmo estudo, foi observado que a suplementação com *S. cerevisiae* ao meio de cultivo bacteriano reduziu a disponibilidade de glicose para o uso por *Streptococcus bovis*, assim como a produção de ácido láctico pela bactéria.

Bach et al. (2007), observaram que o pH ruminal médio, em vacas lactantes suplementadas com 5g de leveduras vivas (*Levucell SC*, *S. cerevisiae* cepa CNCM I-1077), foi de 6,02, em comparação com a média de 5,51 nos animais não suplementados. Os animais foram alimentados com dieta contendo 60% de forragem (silagem de azevém, 35% FDN) e 3kg de concentrado (21% FDN). O tempo diário com pH ruminal inferior a 6,0 e 5,6, foi maior nos animais sem suplementação de leveduras, resultando em menor pH médio. A suplementação com leveduras também aumentou a frequência diária de refeições.

Nocek et al. (2002) observaram que o pH ruminal de animais que receberam DFM composto da associação de *S. Cerevisiae*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus plantarum* apresentaram menores variações de pH ao longo do dia, mantendo-se com valor médio acima de 6,0. Em outro estudo, com vacas em período de transição, Nocek et al. (2003), também obtiveram menores variações no pH ruminal.

Diminuições bruscas no pH ruminal podem inibir severamente a digestão da celulose por diminuir a atividade e/ou o número dos microrganismos celulolíticos. Com a queda do pH ocorre aumento no número de *Streptococcus bovis*, seguido de elevação na produção de ácido láctico e de redução no número de bactérias utilizadoras como *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*. *Megasphaera elsdenii* utiliza 60 a 80% do ácido láctico e corresponde a aproximadamente 20% das bactérias utilizadoras de lactato no rúmen de animais alimentados com grandes quantidades de concentrado.

Quando o pH ruminal é mantido acima de 5,5 ocorre equilíbrio entre bactérias utilizadoras e produtoras de ácido lático, impedindo o acúmulo do mesmo (Nocek, 1997).

A detecção e a prevenção de acidose subclínica nos rebanhos leiteiros representa um desafio, pois os únicos sintomas apresentados são a queda ou consumo irregular de matéria seca, diminuição do teor de gordura do leite e diminuição da eficiência na produção de leite. Muitas vezes estas ocorrências são confundidas com baixa qualidade da forragem ou manejo nutricional inadequado (Nocek, 1997).

2.1.3. Efeitos da utilização de DFM sobre a concentração de ácidos graxos voláteis

As alterações no ambiente ruminal resultantes da utilização de DFM incluem efeitos sobre a proporção de AGV. Callaway e Martin (1997) observaram aumento nas concentrações de acetato e AGV totais quando adicionaram filtrados de cultura de leveduras em culturas de *Selonomonas ruminantium*. Tanto *Selonomonas ruminantium* quanto *Megasphaera elsdenii* produzem primariamente acetato e propionato quando utilizam lactato como substrato.

Devido ao efeito positivo das leveduras sobre as bactérias celulolíticas do rúmen, é de se esperar aumento na relação entre acetato e propionato no fluido. Wiedmeier et al. (1987) relataram que o aumento observado na digestibilidade da fibra, em vacas não lactantes suplementadas com 90 g de cultura de levedura (Diamond V XP®, 2,4 x 10⁶ unidades formadoras de colônia (ufc) de *Saccharomyces cerevisiae*; Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA), foi associado à tendência de aumento na relação entre acetato e propionato no fluido ruminal. Resultados semelhantes foram obtidos por Piva et al. (1993), ao detectarem tendência de aumento na concentração ruminal de acetato e na relação entre acetato e propionato (2,82 vs. 2,55), quando suplementaram vacas leiteiras em estágio intermediário da lactação, consumindo dieta com 52% de forragem e 48% de concentrados, com 10 g de levedura (Thepax Dry®, 10 x 10⁹ ufc/g de *Saccharomyces cerevisiae*; Dox-AI, Correzzana, Itália)

Por outro lado, Robinson e Garret (1999) não observaram alterações no padrão de fermentação ruminal quando utilizaram leveduras em dietas de vacas leiteiras no

período de transição. Erasmus et al. (1992) detectaram queda, apesar de não significativa, na relação entre acetato e propionato (2,28 vs 2,04) em vacas leiteiras suplementadas ou não com 10 g de cultura de levedura (Yea-Sacc, $2,04 \times 10^9$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026; Alltech, Nicholasville, EUA) e consumindo dieta com 65% de concentrados. De maneira semelhante, Erasmus et al. (2005) observaram queda na relação entre acetato e propionato quando vacas leiteiras alimentadas com dieta composta por 38,3% de feno de alfafa e 61,7% de concentrados foram suplementadas com 2500 ppm de leveduras (Diamond V XP, $2,4 \times 10^6$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*; Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA).

2.1.4. Efeitos da utilização de DFM sobre a digestibilidade da matéria seca

Os carboidratos da parede celular das forragens consumidas pelos ruminantes suprem a maior parte de seus requisitos energéticos. No entanto, estes componentes representam a maior limitação do aproveitamento da forragem pelos animais (Van Soest, 1994). A digestão destes carboidratos no rúmen depende inicialmente da adesão das células microbianas à fibra.

Embora os fatores de adesão não sejam ainda exatamente conhecidos, parece que a presença de polissacarídeos ou glicoproteínas na superfície externa das bactérias as quais, possivelmente, interagem quimicamente por interações iônicas com a superfície das partículas, seja um dos fatores mais relevantes (Chen et al., 1977). Sendo assim, variações no pH poderiam modificar estas interações e interferir na adesão bacteriana.

Em vários estudos foi observado que a taxa e a extensão da degradação da fibra reduziu com a redução do pH ruminal, e que este efeito é potencializado pela presença de carboidratos prontamente fermentáveis (Grant e Mertens, 1992).

François et al. (2006) avaliaram, in vitro, o efeito de diferentes valores de pH do meio e tempo de incubação sobre o grau de aderência bacteriana em amostras de gramíneas forrageiras C₄ e C₃. As amostras foram incubadas em pH de 5,5; 6,0; 6,5; ou 7,0 durante 6; 12; 24 ou 48 horas. O pH não afetou a aderência microbiana em nenhuma das amostras testadas até 48 horas, no entanto, foi mais alto no resíduo de forrageira C₃. Independente do tipo de amostra, a aderência foi afetada pelo tempo, sendo máxima

após 24 horas de incubação. Nesse tempo, o grau de aderência sobre o resíduo das amostras de gramínea C₃ não foi afetado, mas aumentou linearmente ($P < 0,05$) em gramíneas C₄ com aumento de pH do meio de incubação.

A degradabilidade da celulose pode ser comprometida à medida que o pH ruminal diminui. Isto se deve principalmente ao fato das bactérias celulolíticas serem incapazes de se desenvolverem em pH intracelular baixo. A queda do pH resulta em toxicidade dos anions de AGV para as bactérias, pela dificuldade das mesmas em exportá-los (Russel e Wilson, 1996). Nocek et al. (2002) observaram maior estabilidade do pH ruminal em animais que receberam suplementação com DFM composto de microrganismos produtores de ácido lático.

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

Chaucheyras-Durand et al. (2008) propuseram que a adição de formas ativas de levedura viva melhora a colonização das partículas de alimentos, acelera o crescimento de bactérias celulolíticas e estimula o crescimento das utilizadoras de lactato. Estas respostas, de ambiente ruminal, culminariam com aumento de digestibilidade da fibra no rúmen. O aumento de digestibilidade da fibra no rúmen, levaria ao aumento na digestão da matéria orgânica em todo o trato digestivo (Desnoyers et al., 2009).

Em um estudo com vacas da raça Holandês, com média de 143 dias em lactação, Bitencourt et al. (2011) demonstraram que a adição de levedura viva (cepa CNCM I-1077 (Lallemand SAS, França), à uma dieta contendo 30% de FDN, originário basicamente de silagem de milho, capim Tifton e polpa de citrus, aumentou ($P=0,08$) a digestibilidade da FDN em todo o trato digestivo. No entanto, tal resposta não resultou em mudança no comportamento alimentar dos animais.

2.2. Resposta animal à utilização de DFM

2.2.1. Efeitos da utilização de DFM sobre o consumo de matéria seca

O CMS é de fundamental importância, pois estabelece a quantidade de nutrientes disponíveis para a produção dos animais. A atividade microbiana e suas funções sobre processo digestivo podem ser modificadas pelo tipo de dieta. Quantidade excessiva de concentrados resulta em redução de pH ruminal, devido à intensa produção de AGV, que podem produzir grande impacto na digestão da fibra e reduzir o CMS (Pereira et al., 2001).

O aumento no CMS pode ser resultado do aumento na degradação da fibra. Callaway e Martin (1997) observaram em estudos *in vitro*, que a utilização de culturas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e extrato de fungos (*Aspergillus oryzae*) aumentou o número das bactérias *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*, gerando aumento de 11% na degradação de celulose após 24 horas de incubação. Resultados semelhantes foram obtidos por Dawson et al. (1990), que relataram concentração de cinco a 40 vezes maior de bactérias celulolíticas com suplementação de *Lactobacillus* e *Enterococcus*.

Williams et al. (1991) relataram aumento de 1,2 kg no consumo de matéria seca em resposta à suplementação de 10 g de cultura de levedura (Yea-Sacc, 5×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026, Alltech, Nicholasville, EUA) para vacas em estágio intermediário da lactação. A dieta foi composta por palha de trigo, feno de gramínea, farelo de soja, cevada e farinha de peixe. Duas relações entre forragens e concentrados foram avaliadas simultaneamente à suplementação com leveduras, 50:50 ou 40:60. Não foi detectada interação entre o teor de forragem na dieta e a suplementação com levedura. Dann et al. (2000) também observaram resposta positiva sobre o consumo, quando suplementaram leveduras para vacas leiteiras antes e após o parto (Diamond V XP®, $2,4 \times 10^6$ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*; Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA). Estes autores observaram aumento de 2,1 kg no consumo nos sete últimos dias de gestação e de 1,6 kg nos primeiros 42 dias da lactação. Um possível mecanismo para o maior consumo quando se suplementa leveduras seria por indução de ganho em digestão da fibra (Bitencourt et al., 2008).

Desnoyers et al. (2009), em estudo meta-analítico, demonstraram que a suplementação com produtos a base de *S. cerevisiae* aumentou o CMS em 44g/100kg de peso corpóreo (~280 g/dia para uma vaca de 650kg de peso vivo), a produção de leite em 1,2kg/dia, e ainda, tendência de aumento da gordura no leite em 0,05%. Também utilizando metodologia meta-analítica, Rabiee et al. (2008) utilizaram total de 32 estudos com vacas em lactação alimentadas ou não com um único produto comercial contendo cultura de *S. cerevisiae* (Diamond V) e concluíram que de maneira geral, a adição do produto resultou em aumento numérico no CMS (250g/dia; P=0,13).

Entretanto, Robison e Garret (1999) ao suplementarem vacas da raça Holandês com 57 g/cab/dia de culturas de leveduras durante 23 dias pré-parto e 56 dias pós-parto não encontraram diferenças no CMS durante o pré-parto. Durante os 56 dias pós-parto houve tendência (p= 0,09) de aumento no CMS. Houve também tendência (p= 0,07) de aumento na produção de leite dos animais com 25,36 e 27,81 kg/dia para primíparas e 38,6 e 40,35 kg/dia para múltíparas nos tratamentos controle e levedura, respectivamente.

Harris Jr. et al. (1992) trabalharam com 36 vacas em início e no meio de lactação, consumindo dieta composta por 50% de silagem de milho, 28% de milho, 11% de farelo de soja e 8% de soja grão. Foi observado queda no CMS de 22,9 kg para 22,0 kg, quando foram suplementadas 57 g de cultura de levedura (Diamond V XP®, 2,4 x 10⁶ ufc de *Saccharomyces cerevisiae*; Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA). Entretanto, o menor CMS não foi acompanhado por queda na produção de leite dos animais.

2.2.2. Efeitos da utilização de DFM sobre a produção de leite

Nocek et al. (2003) observaram que vacas suplementadas no pré e pós-parto com DFM composto de *Saccharomyces cerevisiae* e duas cepas de *Enterococcus*, obtiveram menor mobilização das reservas corporais, verificado devido às maiores concentrações plasmáticas de glicose e insulina nas duas primeiras semanas pós-parto e redução das concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e β -hidroxibutirato após a segunda semana pós-parto.

Estudos avaliando o efeito da suplementação com produtos à base de leveduras ativas no rúmen, normalmente demonstraram melhora numérica no desempenho lactacional de vacas leiteiras. Entretanto, como muitos dos aditivos alimentares, as respostas em CMS e produção de leite nem sempre demonstram efeito estatístico. Em uma síntese de 14 experimentos, envolvendo 193 observações, a resposta média em produção de leite à suplementação com leveduras foi 1,45 litros, sendo que nos estudos revisados que mensuraram o consumo diário de matéria seca houve aumento médio de 0,53kg (Sniffen et al., 2004).

Robinson e Erasmus (2009) avaliaram o desempenho lactacional de vacas leiteiras quando suplementadas com distintos produtos comerciais à base de *S. cerevisiae*. No total, 22 estudos foram avaliados, representando seis produtos comerciais diferentes. Quando os três produtos comerciais avaliados em maior frequência foram analisados, os autores observaram que as respostas em produção em relação ao grupo controle, dentro de cada estudo, foram semelhantes. A suplementação de vacas leiteiras com distintos produtos à base de *S. cerevisiae* aumentou a produção leiteira em praticamente 3%. Nos mesmos estudos avaliados pelos autores, a produção média de leite nos grupos controle foram 27,0; 35,6 e 35,6 nos estudos que utilizaram Alltech 1026, Chr. Hansen Biomate e Diamond V XP, respectivamente. Portanto, o aumento médio de 3% resultou numa melhora na produção de leite de aproximadamente 0,89kg/dia.

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

Em um estudo utilizando dois rebanhos com vacas entre 25 e 130 dias pós-parto, Bruno et al. (2009) avaliaram o desempenho produtivo de vacas da raça Holandês suplementadas com cultura de levedura durante os meses de estresse calórico. O CMS não foi alterado (26,0 vs. 25,8 kg/d para a dieta controle e para levedura

respectivamente), mas a produção de leite (42,2 vs. 43,4 kg/dia) foi aumentada com a inclusão de levedura na dieta.

É possível justificar o aumento em produção de leite observado em alguns ensaios de lactação devido às mudanças no microambiente ruminal, aumento na digestão da fibra e da matéria orgânica e ligeiro aumento no CMS. Entretanto, Dann et al. (2000) observaram que vacas Jersey suplementadas com 60 g de cultura de levedura (Diamond V XP, 4×10^7 ufc de *Saccharomyces cerevisiae*/g, Diamond V Mills, Inc, Indianápolis, EUA) do 14º dia pré-parto até o 14º dia pós-parto, alcançaram pico de produção mais cedo, porém não apresentaram maior produção de leite em 140 dias de lactação.

Robinson (1997), suplementando 20 vacas da raça Holandês com 57 g/dia de leveduras durante 14 dias pré-parto e 14 dias pós-parto, observou que o grupo suplementado perdeu menos condição corporal no pré-parto. Entretanto, não foram observadas diferenças no CMS no pré ou no pós-parto, bem como na produção e composição do leite.

No estudo conduzido por Swartz et al. (1994), envolvendo sete fazendas comerciais e 306 vacas em estágio inicial da lactação, não foi detectada resposta em produção de leite quando duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram suplementadas (Cell-con® e 2x-2-2-5®; Western Yeast Company, Chillicothe, EUA).

2.2.3. Efeitos da utilização de DFM sobre a composição do leite

A compreensão dos fatores que afetam a composição do leite pode ser uma ferramenta importante na avaliação nutricional da dieta, revelando informações valiosas sobre a eficiência de utilização dos nutrientes e suas interações no rúmen. O valor econômico da composição do leite produzido é importante tanto para os produtores, consumidores, quanto para a indústria beneficiadora.

A gordura é o componente do leite mais susceptível de variação por influência de vários fatores dietéticos como: quantidade e qualidade da fibra, proporção volumoso:concentrado, taxa de degradação do amido, composição de ácidos graxos, grau de proteção e digestibilidade dos suplementos ricos em gorduras (Jenkins, 1993).

Piva et al. (1993) relataram aumento no teor e na produção de gordura do leite com a suplementação por seis semanas de 10 g de leveduras (Thepax Dry, *Saccharomyces cerevisiae*, Dox-Al, Correzzana, Itália) para vacas no terço médio de lactação. A dieta basal consistia de 30% de silagem de milho, 28% de feno de alfafa e 48% de concentrados. A tendência de aumento no teor de gordura (3,54% VS 3,25%, $P < 0,10$) e o pequeno, mas significativo, aumento na produção de leite, resultou em aumento na produção diária de gordura (0,90 vs. 0,78 kg; $P < 0,04$).

A suplementação de vacas leiteiras com 10 gramas do produto (*Saccharomyces cerevisiae* cepa CNCM I-1077; Lallemand, Toulouse, França) resultou em elevação na produção diária de proteína de 0,884 para 0,919 kg e de lactose de 1,212 para 1,265 kg, no entanto não apresentou efeito sobre a produção diária de gordura (Bitencourt et al., 2008).

Nikkhah et al. (2004), utilizando diferentes quantidades de leveduras (três, seis e 12 g/dia) na dieta de vacas leiteiras, não verificaram alterações no CMS e produção de leite. Entretanto, a adição desses microrganismos na dieta promoveram aumento no teor de gordura, sólidos não gordurosos e sólidos totais do leite.

Wang et al. (2001) não observaram diferenças quando suplementaram 60 g/dia de cultura de leveduras para vacas leiteiras nos primeiros 30 dias pós-parto. Entretanto, encontraram tendência ($p < 0,10$) de aumento na produção de leite, gordura e IMS do 31º ao 140º dia pós-parto para o uso de leveduras em dietas com 21% de FDN de forragem. Este fato não foi observado em dieta com 17% de FDN da forragem.

Diferenças no sistema alimentar (ração completa (TMR) ou forragem e concentrados ofertados separadamente), na relação entre forragens e concentrados, no tipo das forragens e dos concentrados utilizados, fatores relacionados à presença de outros aditivos nas dietas, e ao estágio da lactação e capacidade de resposta das unidades experimentais são de difícil interpretação, e certamente interagem com a inclusão de DFM, podendo explicar a inconsistência na resposta em desempenho à suplementação com DFM. Além disso, diferenças entre os diversos suplementos comerciais de DFM podem induzir variação na resposta animal. Devido ao seu mecanismo de ação, é de se esperar maior resposta à suplementação com DFM em formulações e manejos alimentares capazes de induzir maior acidificação do ambiente

ruminal. Entretanto, a análise crítica da literatura não sugere que respostas positivas estejam restritas a um determinado padrão alimentar (Bitencourt et al., 2008).

2.3. Outras respostas à suplementação de DFM

2.3.1. Resposta imune

A suplementação com DFM, além dos benefícios no trato gastrointestinal, tem levado a alguns efeitos sobre a resposta imune dos animais.

Tem sido sugerido que componentes da parede celular da levedura seriam os responsáveis pela ação local e sistêmica das leveduras sobre o sistema imune. A parede celular é constituída por um conjunto de oligossacarídeos denominados genericamente de mananoligossacarídeos (MOS).

Muitas bactérias enteropatogênicas apresentam sítios de ligação em sua superfície chamados de lectinas, envolvidos diretamente na infecção gastrintestinal, pois são responsáveis pela aderência destas bactérias à fração rica em açúcares das células intestinais, conhecida como glicocálix. Os MOS atuam como uma fonte para adesão de bactérias patogênicas, que assim são divergidas da parede intestinal. Uma vez que os MOS não são degradados por enzimas digestivas de origem não microbiana, estes têm a capacidade de carrear microrganismos patogênicos ao longo das porções não fermentativas do trato digestivo (Newman, 1994).

Oliveira et al. (2007) ao suplementarem 10 g de leveduras (Levumilk, 2×10^9 ufc de *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500; Kera Nutrição Animal, RS) para vacas Holandesas em lactação, observaram diminuição na contagem de células somáticas do leite (302 vs. 190 x 1000 células/ml, $P=0,02$). Estes resultados evidenciam que a suplementação com leveduras pode induzir respostas sobre o sistema imune de ruminantes.

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

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

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Quinze vacas da raça Holandês, com 156 ± 53 dias em lactação, produção diária média $31,4 \pm 0,5$ kg e peso corporal médio de 665 ± 16 kg, formaram cinco grupos de três animais com base na ordem de parto e produção diária de leite. Dentro de cada grupo, os animais foram simultaneamente alocados a uma sequência de três tratamentos, em delineamento do tipo Quadrado Latino 3x3, com períodos de 35 dias e 27 dias de adaptação aos tratamentos, sendo que do dia 28 ao 35 foram realizadas coletas de materiais para posterior análise.

Tratamentos – Bact: 10g (*Ruminobacter amylophilum*, *Ruminobacter succinogenes*, *Succinovibro dextrin solvens*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* em carbonato de cálcio); Bact + Lev: 10g (Bactérias e veículo inerte associado a 6×10^9 /g de células vivas e 2×10^8 /g de células mortas de *Sacharomyces cerevisiae*) (Imeve Indústria de Medicamentos Veterinários Ltda, Jaboticabal, SP) e Cont: 10g de carbonato de cálcio. Os aditivos foram ofertados a cada vaca em cápsulas por ingestão forçada duas vezes por dia, após o fornecimento da alimentação da manhã e à tarde, seis e 15h respectivamente.

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

As vacas foram mantidas em confinamento total tipo “Tie-stall” com camas de areia e foram alimentadas as seis e 15 horas e ordenhadas duas vezes por dia. A mistura dos ingredientes dietéticos foi realizada em vagão misturador e as rações completas foram fornecidas em quantidade suficiente para prover no mínimo 5% do oferecido

como sobra diária. A proporção de silagens nas dietas foi ajustada semanalmente pela variação no teor de matéria seca (MS), determinado por secagem em aparelho Koster (Koster Moisture Tester, Medina, EUA) por 60min.

Entre os dias 28 e 32, uma amostra das sobras alimentares por animal e de cada alimento foi obtida diariamente e congelada. Uma amostra composta das sobras e dos alimentos foi formada por período, por mistura de quantidades idênticas de matéria natural das amostras diárias. Os compostos por período foram pré-secos em estufa ventilada por 72h a 55°C, triturados em peneira com crivo de 1 mm em moinho do tipo Thomas-Willey, e sub-amostras foram desidratadas a 100°C por 24h para determinação do teor de MS. A proteína bruta (PB) foi analisada por um destilador a vapor do tipo Microkjeldhal (A.O.A.C., 1975), o extrato etéreo (EE) segundo o A.O.A.C. (1990), e as cinzas por incineração da amostra a 550°C por oito horas. O teor de fibra detergente neutro (FDN) foi analisado por determinador de fibra TE-149 (Tecnal Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, SP), utilizando sulfito de sódio e amilase. A composição das dietas consumidas é relatada na tabela 1.

Tabela 1 : Composição das dietas oferecidas (ingredientes) e das consumidas (nutrientes), de vacas em lactação suplementadas com bactérias (Bact), bactérias e leveduras (Bact+Lev) ou controle

| | Tratamentos | | |
|--|-------------------|------|----------|
| | Cont | Bact | Bact+Lev |
| | % da matéria seca | | |
| Silagem de milho | 27,7 | 27,7 | 27,7 |
| Silagem de sorgo | 18,1 | 18,1 | 18,1 |
| Silagem de tifton | 3,3 | 3,3 | 3,3 |
| Farelo de soja | 20,2 | 20,2 | 20,2 |
| Milho reidratado e ensilado | 9,3 | 9,3 | 9,3 |
| Milho moído fino | 11,9 | 11,9 | 11,9 |
| Polpa de citros | 8,2 | 8,2 | 8,2 |
| Minerais e vitaminas ¹ | 1,3 | 1,3 | 1,3 |
| Proteína bruta | 18,2 | 18,1 | 18,1 |
| Fibra em detergente neutro (FDN) | 33,7 | 34,4 | 34,1 |
| FDN oriundo de forragem | 27,3 | 27,8 | 27,6 |
| Extrato etéreo | 3,8 | 3,8 | 3,8 |
| Cinzas | 5,0 | 5,1 | 5,1 |
| Carboidratos não-fibrosos ² | 39,9 | 38,7 | 38,9 |

¹Premix=55% calcário calcítico, 15% NaCl e 30% mineral comercial (18,5% Ca; 15,0% P; 3,0% Mg; 3,0% S; 240ppm Co; 3.000ppm Cu; 8.000ppm Mn; 12.000ppm Zn; 90ppm Se; 180ppm I; 8.000.000 UI/kg Vit.A; 2.000.000 UI/kg Vit.D; 50.000 UI/kg Vit.E). ²CNF=100 – (Proteína bruta + Extrato etéreo + FDN + Cinzas).

Dentre os ingredientes usados, descreve-se os conteúdos de FDN dos volumosos: Silagem de milho (58,9 % de FDN), Silagem de sorgo (60,7% de FDN) e Silagem de tifton (61,7% de FDN).

Oito ordenhas dos dias 28 a 31 foram amostradas para determinação de teores de proteína, gordura, lactose e nitrogênio ureico no leite. As amostras foram coletadas em frascos contendo o conservante 2-bromo-2-nitropropano-1-3-diol e foram analisadas no

Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH, Curitiba, PR). A secreção diária de energia no leite foi calculada pela equação (NRC, 2001): $[(0,0929 \times \% \text{ gordura}) + (0,0547 \times \% \text{ de proteína}) + (0,0395 \times \% \text{ de lactose})] \times \text{kg de leite}$. A produção de leite corrigida para energia (Leite E) foi calculada pela equação: $\text{Leite E} = \text{EnLeite}/0,70$, assumindo que o conteúdo de energia em leite com 3,7% de gordura, 3,2% de proteína e 4,6% de lactose é 0,70 Mcal/kg. A produção de leite corrigida para 4% de gordura foi calculada pela equação: $\text{Leite 4\%} = (0,4 + 15 \times \% \text{ de gordura}/100) \times \text{kg de leite}$. As eficiências alimentares foram calculadas: Eficiência 1 pela relação entre a produção de leite e o CMS e a Eficiência 2 pela relação entre Leite E e o CMS. No dia 34, o peso vivo dos animais foi mensurado após a ordenha da manhã, por pesagem em balança digital e a condição corporal foi avaliada visualmente em escala de 1 a 5, sendo 1 representativo de magra e 5 representativo de gorda (Wildman et al., 1982). A condição corporal foi avaliada por três avaliadores independentes e o escore médio de cada vaca foi utilizado para descrever as unidades experimentais.

As digestibilidades aparentes no trato digestivo total da matéria seca (MS), da matéria orgânica (MO), da FDN e da MO não-FDN foram determinadas por coleta total de fezes realizada por oito horas ininterruptas entre os dias 31 e 33. A coleta de fezes em cada dia foi iniciada com oito horas de atraso com relação ao dia anterior, visando obter amostragem representativa das 24 horas do dia sem causar distúrbio no consumo de alimentos e na produção de leite dos animais. As fezes foram continuamente congeladas durante o período de coleta e uma amostra composta foi formada para cada vaca por período. As amostras compostas de fezes foram desidratadas e o teor de FDN e Cinzas determinado. O consumo diário de matéria orgânica digestível (CMOD) foi calculado para estimar o consumo de energia.

Simultaneamente à coleta de fezes, foi realizada coleta total de urina para mensuração da excreção diária de alantoína, para representar a síntese relativa de proteína microbiana no rúmen. Ao volume de urina coletado foram imediatamente adicionados 10% de ácido sulfúrico a 20% e a amostra foi armazenada a 4°C. Uma amostra composta foi formada para cada vaca por período. As amostras compostas foram diluídas com solução de 4% de ácido sulfúrico na proporção 1:3 entre urina e

solução e congeladas a -20°C até a realização das análises. O teor de alantoína foi mensurado segundo Chen & Gomes (1995).

Simultaneamente à coleta de fezes e urina, foi avaliada a atividade mastigatória por observação visual da atividade bucal de cada animal a cada cinco minutos. As atividades bucais consideradas foram de ingestão de alimento, ingestão de água, ruminação e ócio. O tempo de mastigação em minutos por dia foi definido como a soma dos tempos de ingestão de alimento e de ruminação. Os tempos de mastigação, ingestão e ruminação por CMS foram calculados utilizando-se o consumo mensurado nos dias da avaliação.

No dia 35 foram obtidas amostras de fluido ruminal utilizando sonda flexível oro-gástrica com auxílio de uma bomba de sucção a vácuo acoplada a um Kitassato. As amostras foram obtidas $11,6 \pm 0,3$ horas após o fornecimento matinal de alimentos e ao acaso dentro de quadrado. O pH ruminal foi mensurado imediatamente após a coleta.

As variáveis foram analisadas pelo procedimento GLM do SAS (1985) com o seguinte modelo:

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

Em que: μ = média geral,

Q_i = efeito de quadrado ($i=1$ a 5),

$V_{j(i)}$ = efeito de vaca dentro de quadrado ($j=1$ a 15),

P_k = efeito de período ($k=1$ a 3),

T_l = efeito de tratamento (l =Cont, Bact, Bact+Lev),

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

Dois contraste pré-planejados compararam tratamentos: C1=Cont vs. Bact, C2=Cont vs. Bact+Lev. Valores de probabilidade abaixo de 0,05 foram considerados como significativos e acima de 0,05 mas abaixo de 0,15 como tendência.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A suplementação com Bactéria+Levedura induziu aumento numérico de 0,9L/d na produção diária de leite, entretanto a diferença não obteve suporte estatístico ($P=0,39$) (Tabela 2). Baseado na meta-análise de Desnoyer et al. (2009), esta é uma resposta de magnitude plausível à suplementação com leveduras. Estes autores quantificaram, com base na análise de 110 trabalhos envolvendo 157 experimentos com bovinos, ovinos, caprinos e búfalas em lactação, que a resposta esperada à suplementação com leveduras seria ao redor de +1,2g de leite/kg de peso vivo. Nestas vacas com peso médio de 665kg (Tabela 2), o ganho esperado em produção de leite por vaca seria de 798g/d, similar à resposta observada experimentalmente. Vale ressaltar que a resposta animal à suplementação com leveduras depende da dose suplementada (Gomide et al., 2012). Neste experimento, a dose mensurada de levedura viva foi de 6×10^{10} UFC/d, enquanto a dose de levedura total foi de $6,2 \times 10^{10}$ UFC/d. Não houve evidência numérica ou estatística para ganho em desempenho em resposta apenas à suplementação com Bactéria.

A suplementação com bactéria ou bactéria+levedura não afetou o consumo de matéria seca. O consumo médio foi 3,07% do peso vivo. A ingestão de matéria seca em vacas está relacionada diretamente ao conteúdo de parede celular e a densidade energética da dieta (Forbes, 1995). Os ingredientes utilizados e fornecidos para os respectivos tratamentos foram semelhantes, exceto os aditivos. A quantidade de FDN e carboidratos não fibrosos foram semelhantes. Portanto, se houvesse diferenças no consumo de matéria seca entre as dietas experimentais seria devido ao melhor aproveitamento dos nutrientes, resultado de melhora da fermentação ruminal por influência da inclusão de DFM.

É importante ressaltar que os animais utilizados nesse experimento apresentavam média de 156 ± 53 dias em lactação (DEL). Neste período, os animais possuem o ambiente ruminal mais estável. O grande desafio é no início da lactação, no qual ocorre mudança brusca de dieta. Os microrganismos têm que se adaptar ao novo ambiente e ainda associado a outros fatores que ocorrem no período de transição como balanço energético negativo, doenças metabólicas e estresse.

Não houve diferença entre os tratamentos para a produção e teor de gordura e proteína do leite.

Similarmente ao observado por Oliveira et al. (2010), houve tendência fraca ($P=0,14$) de queda na CCS do leite quando leveduras foram suplementadas (Tabela 2), sugerindo que houve efeito do probiótico sobre a imunidade. Leveduras podem se ligar a bactérias enteropatogênicas nos intestinos, estimular células do sistema imunológico e desencadear resposta de defesa em outras mucosas do corpo, além daquelas em que ocorreu o estímulo inicial. Esse mecanismo de migração de células para outros tecidos é conhecido como sistema imune comum de mucosas. É interessante constatar o curto intervalo de tempo entre o início da suplementação e a detecção da resposta, coerente com o relatado por outros autores.

Houve tendência ($P=0,10$) de aumento no teor de NUL no tratamento Bactéria (Tabela 2), sugerindo que pode ter ocorrido aumento na atividade proteolítica no rúmen, induzindo aumento na perda de amônia ruminal. Inversamente, a associação de bactérias com leveduras reduziu o teor de NUL ($P=0,12$). Leveduras podem ter fornecido fatores de crescimento para os microorganismos ruminais, aumentando a eficiência de síntese microbiana e a incorporação de amônia na proteína microbiana, o que é desejável nutricionalmente e ambientalmente. De acordo com Chaucheyras-Durand et al. (2002), a adição de formas ativas de leveduras vivas melhoram a colonização de partículas de alimentos, acelera o crescimento de bactérias, principalmente celulolíticas, tornando o ambiente ruminal mais propício para o crescimento bacteriano e maior eficiência de aproveitamento dos substratos alimentares.

Tabela 2: Consumo de matéria seca (CMS), produção e composição de leite, contagem de células somáticas (CCS), nitrogênio ureico no leite (NUL) e eficiência alimentar de vacas em lactação suplementadas com bactérias (Bact), bactérias e leveduras (Bact+Lev) ou controle

| | Cont | Bact | Bact+Lev | EPM ¹ | P Trat ² | P C1 ² | P C2 ² |
|-------------------------|-------|-------|----------|------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| | | kg/d | | | | | |
| CMS ³ | 20,5 | 20,2 | 20,7 | 0,37 | 0,61 | 0,51 | 0,75 |
| Leite | 31,1 | 31,3 | 32,0 | 0,70 | 0,66 | 0,87 | 0,39 |
| Leite 4% ⁴ | 28,7 | 28,7 | 29,5 | 0,73 | 0,70 | 0,99 | 0,46 |
| Leite E ⁵ | 30,5 | 30,6 | 31,3 | 0,79 | 0,77 | 0,99 | 0,53 |
| Gordura | 1,084 | 1,080 | 1,112 | 0,03 | 0,75 | 0,93 | 0,55 |
| Proteína | 1,030 | 1,036 | 1,042 | 0,02 | 0,95 | 0,88 | 0,75 |
| Lactose | 1,439 | 1,442 | 1,482 | 0,03 | 0,64 | 0,96 | 0,40 |
| Sólidos totais | 3,861 | 3,865 | 3,952 | 0,09 | 0,75 | 0,97 | 0,51 |
| | | % | | | | | |
| Gordura | 3,49 | 3,50 | 3,48 | 0,07 | 0,98 | 0,94 | 0,89 |
| Proteína | 3,32 | 3,34 | 3,28 | 0,02 | 0,34 | 0,59 | 0,35 |
| Lactose | 4,61 | 4,59 | 4,61 | 0,01 | 0,69 | 0,41 | 0,82 |
| Sólidos totais | 12,41 | 12,41 | 12,35 | 0,10 | 0,87 | 0,98 | 0,66 |
| | | 1 a 9 | | | | | |
| CCS Linear ⁶ | 4,21 | 3,82 | 3,71 | 0,02 | 0,29 | 0,24 | 0,14 |
| | | mg/dL | | | | | |
| NUL ⁷ | 16,6 | 17,3 | 16,1 | 0,26 | 0,01 | 0,10 | 0,12 |
| Efic 1 ⁸ | 1,52 | 1,55 | 1,55 | 0,04 | 0,89 | 0,65 | 0,72 |
| Efic 2 ⁹ | 1,49 | 1,52 | 1,51 | 0,04 | 0,92 | 0,69 | 0,79 |
| | | kg | | | | | |
| Peso vivo | 662 | 663 | 670 | 4,5 | 0,37 | 0,95 | 0,22 |
| | | 1 a 5 | | | | | |
| Condição corporal | 3,34 | 3,36 | 3,40 | 0,02 | 0,53 | 0,88 | 0,75 |

¹EPM=Erro padrão das médias. ²P=Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento, C1=Controle vs. Bactéria e C2=Controle vs. Bactéria+Levedura. ³Consumo de matéria seca. ⁴Leite ajustado para 4% de

gordura. ⁵Leite ajustado para energia. ⁶Contagem de células somáticas linear. ⁷Nitrogênio uréico do leite. ⁸Eficiência 1=Produção de leite/CMS. ⁹Eficiência 2=Leite E/CMS.

A suplementação com bactérias+leveduras aumentou o tempo diário de mastigação ($P=0,02$) e a mastigação por unidade de CMS ($P=0,06$) (Tabela 3). A resposta em atividade de mastigação foi induzida por aumento no tempo de ingestão, sendo a resposta em ruminação menos evidente. Apesar da ausência de suporte estatístico, o CMS foi numericamente maior no tratamento Bactéria+Levedura (Tabela 2), o que é coerente ao aumento observado na atividade mastigatória neste tratamento. Resposta positiva em consumo é uma resposta plausível à suplementação com leveduras (Desnoyer et al., 2009).

Houve tendência ($P=0,08$) de queda no pH ruminal no tratamento Bactéria (Tabela 3). Esta resposta é coerente à presença neste tratamento de bactérias produtoras de ácido lático, sem a associação com leveduras, as últimas teoricamente reguladoras do pH ruminal. Associado a isso, houve tendência fraca ($P=0,15$) de queda na Alantoína no tratamento Bactéria (Tabela 3), evidenciando uma menor síntese relativa de proteína no rumem, por associação com pH ruminal mais baixo, resultado de menor desenvolvimento de bactérias ruminais.

Bach et al. (2007), observaram que o pH ruminal médio, em vacas lactantes suplementadas com 5g de leveduras vivas (Levucell SC, *S. cerevisiae* cepa CNCM I-1077), foi de 6,02, em comparação com a média de 5,51 nos animais não suplementados. Os animais eram alimentados com uma dieta contendo 60% de forragem (silagem de azevém, 35% FDN) e cerca de 3kg de concentrado (21% FDN), fornecido nas ordenhas diárias. O tempo diário com pH ruminal abaixo de 6,0 e 5,6, foi maior nos animais sem suplementação de leveduras, sendo observado pH médio menor nos animais sem suplementação.

Tabela 3: Atividade mastigatória, alantoína (Ala) e pH ruminal de vacas em lactação suplementadas com bactérias (Bact), bactérias e leveduras (Bact+Lev) ou controle

| | Cont | Bact | Bact+Lev | EPM ¹ | P Trat ² | P C1 ² | P C2 ² |
|------------|------------|------|----------|------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| | min/d | | | | | | |
| Ingestão | 345 | 360 | 376 | 15,2 | 0,36 | 0,47 | 0,15 |
| Ruminação | 461 | 442 | 490 | 15,9 | 0,12 | 0,41 | 0,21 |
| Mastigação | 806 | 803 | 866 | 16,6 | 0,02 | 0,89 | 0,02 |
| | min/kg CMS | | | | | | |
| Ingestão | 17,1 | 18,0 | 18,4 | 0,77 | 0,49 | 0,43 | 0,24 |
| Ruminação | 22,8 | 22,1 | 24,0 | 0,83 | 0,29 | 0,52 | 0,35 |
| Mastigação | 39,9 | 40,0 | 42,3 | 0,88 | 0,11 | 0,93 | 0,06 |
| | mmoles/d | | | | | | |
| Alantoína | 305 | 257 | 284 | 19,9 | 0,24 | 0,15 | 0,46 |
| pH ruminal | 5,50 | 5,34 | 5,46 | 0,06 | 0,17 | 0,08 | 0,68 |

¹EPM=Erro padrão das médias. ²P=Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento, C1=Controle vs. Bactéria e C2=Controle vs. Bactéria+Levedura.

Nocek et al. (2002) observaram que o pH ruminal de animais que receberam DFM apresentaram menores variações de pH ao longo do dia, mantendo-se com valor médio acima de 6,0. Durante o período de transição, Nocek et al. (2003) também observaram que a inclusão de DFM na dieta de vacas leiteiras, ocasionou menores variações no pH ruminal, em animais com maior desafio que os enfrentados pelos animais deste estudo.

Houve tendência fraca (P=0,15) de queda na digestibilidade da MS no tratamento Bactéria (Tabela 4). A queda induzida por este tratamento no pH ruminal (Tabela 3) é uma explicação plausível para este achado, sendo coerente à queda numérica observada na digestibilidade da FDN. Bactérias fibrolíticas são reconhecidamente inibidas por baixo pH. Apesar da tendência de menor digestibilidade, não houve efeito detectável de tratamento sobre o consumo diário de energia, mensurado pelo CMOD (Tabela 4).

Tabela 4: Digestibilidade aparente no trato digestivo total da matéria seca (DMS), da matéria orgânica (DMO), da fibra em detergente neutro (DFDN), e da matéria orgânica não FDN (DMOnFDN) e consumo de matéria orgânica digestível (CMOD) de vacas em lactação suplementadas com bactérias (Bact), bactérias e leveduras (Bact+Lev) ou controle

| | Cont | Bact | Bact+Lev | EPM ¹ | P Trat ² | P C1 ² | P C2 ² |
|---------|---------------|------|----------|------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| | % do ingerido | | | | | | |
| DMS | 66,2 | 64,4 | 64,8 | 0,84 | 0,31 | 0,15 | 0,25 |
| DMO | 69,2 | 67,6 | 68,1 | 0,08 | 0,39 | 0,18 | 0,38 |
| DFDN | 26,5 | 23,9 | 25,5 | 3,25 | 0,84 | 0,56 | 0,81 |
| DMOnFDN | 93,4 | 93,4 | 92,2 | 0,83 | 0,51 | 0,95 | 0,30 |
| | kg/d | | | | | | |
| CMOD | 13,6 | 13,1 | 13,6 | 0,31 | 0,39 | 0,21 | 0,87 |

¹EPM=Erro padrão das médias. ²P=Valor de probabilidade para os efeitos de tratamento, C1=Controle vs. Bactéria e C2=Controle vs. Bactéria+Levedura.

5. CONCLUSÕES

A suplementação de vacas em lactação com bactérias ou bactérias+leveduras não induziu resposta detectável em desempenho, consumo e digestibilidade.

Houve redução na contagem de células somáticas do leite, mostrando que a inclusão de levedura atuou positivamente sobre o sistema imune.

O aumento da mastigação no tratamento bactéria+levedura, induzido pelo maior tempo de ingestão, resultou em alteração do comportamento alimentar e manutenção de maior pH ruminal.

A tendência de queda no pH ruminal e alantoína no tratamento bactéria, evidenciou uma menor síntese relativa de proteína no rumem, resultado de menor desenvolvimento de bactérias ruminais.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

BACH, A.; IGLESIAS, C.; DEVANT, M. Daily rumen pH pattern of loosehoused dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Anim. Feed Sci. Technol.* Shannon, v. 136, p. 146-153, 2007.

BITENCOURT, L. L.; PEREIRA, M. N.; OLIVEIRA, B. M. L.; SILVA, J. R. M.; DIAS JÚNIOR, G. S.; LOPES, F.; MELO, R. C. M.; SIÉCOLA JÚNIOR, S. Response of lactating cows to the supplementation with live yeast. *J. Dairy Sci* , v. 91, W208, Suppl. 1, p. 264, 2008.

BITTENCOURT, L.L., J.R.M. SILVA, B.M.L. OLIVEIRA, et al. Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. *Sci. Agric.* 68: 301-307, 2011

BRUNO, R.G.S., H. RUTIGLIANO, R.L. CERRI, et al. Effect of feeding yeast culture on performance of dairy cows during summer heat stress. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150:175-186, 2009

CALLAWAY, E. S.; MARTIN, S. A.; Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci*, v. 80, n. 9, p.2035-2044, 1997.

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

CHAUCHEYRAS-DURAND, F., N.D. WALKERA, and A. BACH. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 5-26, 2008

CHEN, X.B., AKIN, D. E.; COSTERTON, J. W. Rumen bacterial interaction with particulate dietary components and response to dietary variation. *Feed Production*, v.36, n.1, p. 193-197, 1977.

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

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

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

DESNOYERS M., S. GIGER-REVERDIN, G. BERTIN, C. DUVAUX-PONTER, et al. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92 :1620–1632, 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. *J. Dairy Sci*, v. 75, p. 3056-3065, 1992

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

FORBES, J. M. *Voluntary food intake and diet selection in farm animals*. Guildford, UK: Cab International, 1995. 532p.

FRANÇOIS, P.; LIMA, L. D.; CARDONI, R. L. et al. Aderência microbiana em forrageiras incubadas *in vitro* sobre diferentes pHs. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2006, João Pessoa. *Anais...* João Pessoa: PB, 2006. (CD-ROM).

GRANT, R. J.; MERTENS, D. R. Influence of buffer ph and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. *J. Dairy Sci*, v. 75, n. 4, p. 2762-2768, 1992.

GOMIDE, D. R. *Resposta digestiva de bovinos a doses de levedura*. 2012. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

HARRIS JR., B.; DORMINEY, D. E.; SMITH, W. A.; HORN, H. H. van; WILCOX, C. J. Effects of feather meal at two protein concentrations and yeast culture on production parameters in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci*, v. 75, p. 3524-3530, 1992.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci*, v.76, n.12, p. 3851-3863, 1993.

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

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7. ed. Washington: National Academy, 2001. 381 p

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

NEWMAN, K. Mannan-oligosaccharides: natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. In: ANNUAL SYMPOSIUM OF NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES, 10., 1994, Nicholasville. *Proceedings of Alltech's...* Nicholasville: Alltech Technical Publications, 1994. p. 167-174.

NIKKHAH, A.; DEHGHAN-BONADAKI, M.; ZALI, A. Effects of feeding yeast (*Saccharomices cerevisiae*) on productive performance of lactating Holstein dairy cow. *Iranian J. Agric. Sci.*, v. 35, n. 1, p. 53-60, 2004.

NOCEK, J. E. Bovine acidosis: implications on liminitis. *J. Dairy Sci*, v. 80, n. 5, p.1005-1028, 1997.

NOCEK, J. E.; KAUTZ W. P.; LEEDLE, J. A. Z.; ALLMAN, J. G. Ruminal supplementation of direct-fed microbial on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. *J. Dairy Sci*, v. 85, n. 1, p.429-433, 2002.

NOCEK, J. E.; KAUTZ, W.; P. LEEDLE, J. A. Z.; BLOCK, E. Direct-fed microbial supplementation of dairy cattle during the transition period. *J. Dairy Sci*, v. 86, n. 1, p.331-335, 2003.

NOCEK, J. E.; KAUTZ, W. P. Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. *J. Dairy Sci*, v. 89, n. 1, p.260-266, 2006.

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

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. Acidosis in cattle: a review. *J. Animal Sci.*, v. 76, n. 1, p. 179-181, 1998.

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

PEREIRA, E. S.; QUEIROZ, A. C.; PAULINO, M. F. et al. Fontes nitrogenadas e uso de *Saccharomyces cerevisiae* em dietas à base de cana-de-açúcar para novilhos : consumo, digestibilidade, balanço nitrogenado e parâmetros ruminais. *Revista Brasileira Zootecnia*, v.30, n. 2, p. 563-572, 2001.

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

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

RABIEE, A.R., I.J. LEAN, K.L. DORTON, et al. Effects of feeding Diamond V Yeast Culture™ on milk production and dry matter intake in lactating dairy cows: a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 91(E-suppl. 1): 589-590, 2008

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

ROBINSON, P.H. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to diets postpartum. *J. Dairy Sci*, v.80, n. 7, p.1119-1125, 1997.

ROBINSON, P. H.; GARRETT, J. E. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to postpartum diets and on lactation performance. *J. Animal Sci*, v. 77, n. 1, p.988-999, 1999.

ROBINSON, P.H., and ERASMUS, L.J. Effects of analyzable diet components on responses of lactating dairy cows to *Saccharomyces cerevisiae* based yeast products: A systematic review of the literature. *Livest. Sci.* 149:185-198, 2009

RUSSELL, J. B.; HINO, T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *J. Dairy Sci*, v. 68, n. 5, p. 1712-1723, 1985.

RUSSEL, J. B. WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest at low pH?, *J. Dairy Sci*, v. 79, n. 8, p.1503-1509, 1996.

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

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

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

SOUZA, R. C.; REIS, R. B. *Aditivos microbianos de inclusão direta em dietas de vacas leiteiras: Parâmetros de fermentação ruminal, produção e composição do leite*. 2007. p. 81. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de veterinária. 2007.

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

VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of ruminant*. 3 ed., Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

WALLACE, R. J. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. *J. Dairy Sci*, v. 72, p. 2992- 3003, 1994.

WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. **Microbial feed additives for ruminants**. Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, UK. Disponível em: http://www.oldherbornuniversity.de/literature/books/OHUni_book_8_article_9.pdf
Acesso em: 18 Jan. 2014.

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

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

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

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