

# 4. Melhoria da eficiência ruminal: Inoculação de bactérias

*Heloisa Carneiro<sup>1\*</sup>, PhD - CRMV-MG ZO512*

*Marcio Roberto Silva<sup>1</sup>, Dr. - CRMV-MG 5558*

*Ernesto Vega Canizares<sup>2</sup>, Dr. Veterinário*

*Letícia Scafutto de Faria<sup>3</sup>*

*Gabrielle Dantas Sampedro<sup>3</sup>*

*\* Email para contato: [heloisa.carneiro@embrapa.br](mailto:heloisa.carneiro@embrapa.br)*

*<sup>1</sup> Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite*

*<sup>2</sup> Pesquisador do Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Mayabeque, CUBA*

*<sup>3</sup> Estagiária da Embrapa Gado de Leite*

## 1. Introdução

Atualmente, a medição dos gases causadores do efeito estufa, como gás metano ( $\text{CH}_4$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e óxido nítrico ( $\text{N}_2\text{O}$ ), é uma prática usual em várias regiões do mundo. O uso intensivo dos solos, a queima

de resíduos agrícolas, o cultivo de arroz em campos inundados e a criação de ruminantes em larga escala são exemplos de atividades agrícolas que contribuem para as emissões antrópicas de gases de efeito estufa. Os microrganismos existentes no estômago de ruminantes degradam os alimentos da dieta para

---

*O CH<sub>4</sub> é um dos  
coprodutos da fermentação  
da dieta no estômago  
desses animais.*

---

a sua sobrevivência e multiplicação. O CH<sub>4</sub> é um dos coprodutos da fermentação da dieta no estômago desses animais. Estudos sobre

o CH<sub>4</sub> expelido da respiração de bovinos, ovinos e caprinos têm sido considerados de suma importância pelos governos dos países desenvolvidos, porque os ruminantes são responsáveis por aproximadamente 90% do CH<sub>4</sub> emitido para a biosfera<sup>1,2</sup>. Conseqüentemente, os países que aderiram ao protocolo de Kyoto estão procurando estudar formas de manipular dietas de ruminantes para reduzir essa emissão de metano<sup>3,4,5</sup>. No Brasil, poucas informações locais existem sobre o potencial de emissão de metano dos nossos rebanhos, principalmente daqueles formados predominantemente por animais mestiços Holandês-Zebu, que são a base da maioria dos rebanhos leiteiros nacionais. Recentes esforços têm sido despendidos pela Embrapa Gado de Leite em parceria com Universidades, Institutos estaduais de pesquisa e com o apoio da EPA – Environmental Protection Agency, do governo americano, para medir a emissão de metano por bovinos em condições tropicais<sup>6</sup>, e juntos trabalham na busca por soluções para a mitigação do metano entérico, na tentativa de amenizar os problemas ambientais. Os valores médios gerados desses estudos mostram uma variação de 0,41 a

0,74g CH<sub>4</sub>/dia/kg de peso vivo (PV), e valores anuais de 51 a 140 kg de CH<sub>4</sub>/cabeça, dependendo da raça, da categoria

animal, da estação do ano e do tipo de alimentação. O processo fermentativo dos ruminantes, através da degradação da matéria orgânica, produz o CH<sub>4</sub>, que é considerado responsável por grande parte da perda de energia durante o processo de digestão. Desenvolver dietas e estratégias para evitar tais perdas é o grande desafio nos sistemas produtivos de ruminantes, pois, além de significar maior eficiência produtiva, ainda reduz a contribuição negativa da pecuária para o aquecimento global. CH<sub>4</sub> entérico, produzido em grandes quantidades por sistemas de produção de ruminantes, representa simultaneamente um atributo importante para estimar a quantidade de gases com efeito de estufa ou as perdas de energia pelo animal. Esse metano é produzido por um grupo especializado de microrganismos, as *Archaea metanogênicas*, que desenvolveram muitas interações com vários outros grupos de microrganismos no rúmen. A produção de hidrogênio e sua utilização tem um papel central nessas interações. Várias estratégias estão sendo desenvolvidas para controlar a produção de CH<sub>4</sub> ruminal: primeiro, visam ao controle das *Archaea metanogênicas*; segundo, ao controle dos protozoários que são

produtores de hidrogênio que será utilizado pelas *Archaea metanogênicas* ou outros grupos microbianos envolvidos no metabolismo de hidrogênio. Tais estratégias incluem a composição da dieta, o uso de suplementos alimentares, aditivos e biotecnologias. Neste artigo serão apresentados os efeitos da adição de microrganismos e seus efeitos sobre a eficiência ruminal e redução da emissão de gás carbônico.

## 2. A pecuária e o problema ambiental

A criação de ruminantes torna-se cada vez mais crescente, e o Brasil, por deter o maior rebanho comercial bovino, vem sendo alvo de críticas relacionadas ao aquecimento global, uma vez que a má qualidade das pastagens, geralmente degradadas, influencia no potencial de produção desses animais e no aumento de produção desses gases de efeito estufa, como o gás metano ( $\text{CH}_4$ ) e o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). Esses gases são resultado do processo fermentativo dos ruminantes, sendo esse processo essencial para a degradação da matéria orgânica, e sabe-se que o  $\text{CH}_4$  é considerado responsável por grande parte da perda de energia durante o processo metabólico. Por isso, o

desafio no sistema produtivo de ruminantes é desenvolver dietas ou estratégias de manejo que minimizem a produção relativa desses gases, possibilitando maior eficiência produtiva e redução da contribuição negativa da pecuária para o aquecimento global. O  $\text{CH}_4$  representa entre 30 e 50% do total dos gases de efeito estufa (GEE)<sup>7</sup> emitidos a partir de animais, principalmente de sistemas extensivos de produção, que representam a fonte mais importante, sendo responsáveis por cerca de 80% das emissões de metano do setor<sup>8</sup>. A produção de  $\text{CH}_4$  representa também uma perda de energia significativa para a produção animal que varia de 2 a 12% do consumo de energia bruta<sup>9</sup>. Assim, diminuir a produção de  $\text{CH}_4$  entérico de ruminantes, sem alterar a produção animal, é uma

estratégia desejável tanto para redução das emissões globais de gases de efeito estufa quanto para a melhoria da eficiência da conversão alimentar.

A FAO previu, em 2006, que a demanda mundial de carne e leite irá dobrar até 2050<sup>10</sup>.

Portanto, é necessário

identificar tecnologias que ajudem a mitigar as emissões de  $\text{CH}_4$  sem diminuir o número de ruminantes ou sua produtividade. O  $\text{CH}_4$  produzido no rúmen pertence a um grupo especializado de

---

*Qualidade das pastagens, geralmente degradadas, influencia no potencial de produção desses animais e no aumento de produção desses gases de efeito estufa, como o gás metano ( $\text{CH}_4$ ) e o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ).*

---

microrganismos que pertencem ao domínio Archaea<sup>11</sup>. No entanto, a microbiota ruminal é complexa e diversa, e muitos outros microrganismos podem interferir na produção desse CH<sub>4</sub>, quer seja através da promoção de um

ambiente inadequado para o desenvolvimento das *Archaea metanogênicas* ou através da introdução de microrganismos que aumentam a eficiência ruminal e reduzem a emissão desses gases.

Este artigo mostra alguns resultados da introdução de microrganismos que aumentam a eficiência ruminal e reduzem a emissão de gás carbono.

### 3. O rúmen e sua microbiota

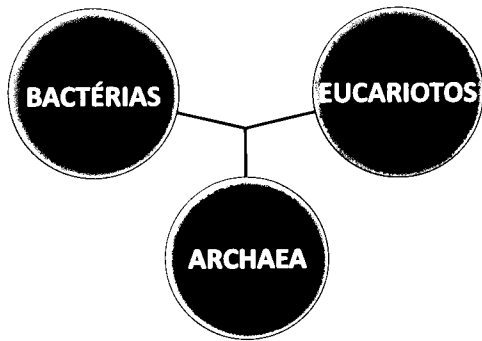


Figura 1. Esquema mostrando a divisão da população microbiana do rúmen nos três domínios da vida: Bactéria, Archaea e Eucariotos.

A população microbiana no rúmen possui um papel importante para os ruminantes utilizarem os substratos fi-

---

*A população microbiana no rúmen possui um papel importante para os ruminantes utilizarem os substratos fibrosos, entretanto a fermentação do rúmen tem um potencial deletério ao meio ambiente.*

---

broso, entretanto a fermentação do rúmen tem um potencial deletério ao meio ambiente como resultado da quebra de nutrientes proteicos que leva à excreção de compostos através das fezes e urina. Devido à gran-

de emissão desses gases resultantes da quebra dos nutrientes proteicos, algumas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca de manipular esse complexo ecossistema.

O rúmen compreende uma população muito densa e diversificada de micróbios que abrange os três domínios da vida: Bactéria, Archaea e Eucariotos, mostrados na Figura 1. Existe grande diversificação de bactérias, protozoários, fungos e archaea no rúmen adulto. As bactérias são predominantes, e contêm de 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> células bacterianas/mL do conteúdo do rúmen ou 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> células/mL, 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>/mL de protozoário e pelo menos seis gêneros de fungos anaeróbicos, representando 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> células/mL<sup>12</sup>. Os eucariotos incluem protozoários e fungos que podem representar uma parte importante da biomassa microbiana do rúmen. Esses microrganismos degradam e fermentam os alimentos ingeridos produzindo como produtos finais os ácidos graxos voláteis (AGV) e CO<sub>2</sub>. As *Archaea* são essencialmente metanogênicas e utilizam

principalmente  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  produzidos por outros micróbios para sintetizar o  $\text{CH}_4$ . Os microrganismos ruminais desenvolveram diversas interações para assegurar um funcionamento eficaz que permite a transformação microbiana dos componentes das plantas em produtos úteis para o animal hospedeiro (AGV), o que significa cerca de 70 a 80% do total das necessidades calóricas do animal hospedeiro por energia, devido à eficiente degradação dos carboidratos pelos microrganismos do rúmen, que utilizam o N para seu desenvolvimento. Os ruminantes têm a habilidade única de subsistir e produzir sem fonte de proteína dietética devido à síntese dos microrganismos do rúmen; geralmente contém entre 20 a 60% de sua matéria seca como proteína bruta que provém dos micróbios

ruminais que passam para o intestino e ali são aproveitados. Fontes externas de nutrientes, tais como carboidratos e proteínas, são parcialmente degradados no rúmen e resultam na produção de energia e nitrogênio para o animal, mostrado na Figura 2. A celulose e outros polissacarídeos, presentes na parede celular de vegetais, representam a maior fonte de energia para os animais herbívoros. A degradação da parede celular pelos ruminantes é consequência da simbiose entre muitos microrganismos anaeróbios presentes no rúmen, conforme ilustração.

As espécies bacterianas no rúmen foram inicialmente identificadas por isolamento de cultura, seguido por métodos moleculares que mais recentemente foram incluídos na abordagem *metaenoma*<sup>13,14</sup>.

## Plantas: polissacarídios

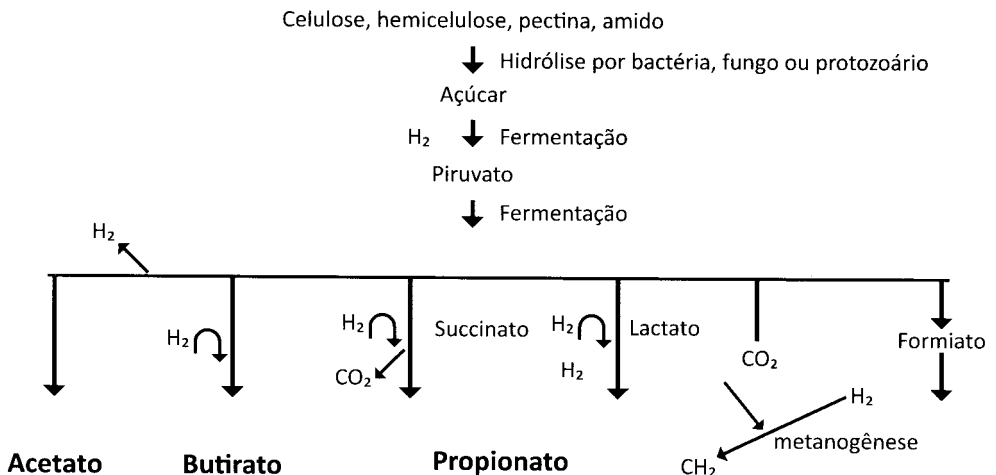


Figura 2. Degradação dos polissacarídeos no rúmen.

O número total de espécies é estimado atualmente em mais de 5.000, com base no 16S rDNA de diversidade, embora muitos deles não tenham sido cultivados ainda<sup>15</sup>. Protozoários e fungos foram estimados por meio da contagem de  $10^6$  e  $10^5$  células ou zoósporos/g do conteúdo do rúmen, respectivamente. A classificação morfológica identifica mais de 250 espécies de ciliados no rúmen<sup>16</sup>, e seis gêneros de fungos anaeróbios (Neocallimastigales ordem) tendo sido descrita, mas esse número foi recentemente estendido<sup>17</sup>. O número total de gêneros e espécies de eucariotos presentes no rúmen são ainda subestimados. Através dos métodos de cultura dependentes, estimou-se a população *Archaea metanogênica* entre  $10^6$  e  $10^9$  células/g de conteúdo ruminal<sup>18,19</sup>, porém os métodos moleculares têm frequentemente encontrado densidades metanogênicas de  $10^9$  ou superior<sup>20</sup>. Cerca de 0,3 a 3,3% de sequências recuperadas de rDNA (16S e 18S), a partir do rúmen, pertenciam ao domínio *Archaea*<sup>21,22</sup>, e a maioria era *Archaea metanogênicas*<sup>23</sup>, com baixa densidade e diversidade. As técnicas moleculares, tais como impressões digitais DGGE, mostraram um número limitado de bandas (<15) para cada animal, para rúmen de bovinos e ovinos<sup>24,25,26,27,28</sup>. Além disso, apenas sete espécies foram isoladas pela cultura.

---

**O número total de espécies é estimado atualmente em mais de 5.000.**

---

Uma revisão feita<sup>11</sup> a partir de 14 estudos identificou archaea através das sequências de rDNA, incluindo

ovinos e bovinos em diferentes estágios fisiológicos e recebendo diferentes dietas. Esses autores encontraram 92,3% dos metanogênicos em três subtipos principais: Methanobrevibacter (61,6% das sequências), Rumen Cluster C, também conhecida como linhagem C, Thermoplasmales-associada (15,8% das sequências) e Methanomicrobium (14,9% das sequências). Mas essa regra está longe de ser sem exceções. Sequências de novas espécies ainda não cultivadas foram mais abundantes no rúmen de caprinos<sup>28</sup> ou ovelhas<sup>29</sup>. Em outros estudos com ovelhas, as metanogênicas predominantes pertenciam ao gênero Methanosphaera<sup>30</sup>. Vários fatores, tais como a espécie animal e a dieta, afetam a quantidade e a diversidade das archaea do rúmen, além de outros fatores, tais como o meio ambiente, estágio fisiológico e idade do animal.

#### **4. Como inicia o processo de colonização do rúmen de recém-nascidos?**

Ao nascer, o trato digestivo do recém-nascido é estéril, mas é rapidamente colonizado por uma microbiota complexa, e essa colonização segue várias sucessões de ecologia microbiana. A colonização do rúmen tem sido estuda-

da principalmente através de técnicas de culturas<sup>31</sup>, e as abordagens moleculares só recentemente foram aplicadas<sup>32,33</sup>. Por conseguinte, a diversidade taxonômica e funcional da microbiota ruminal dos pré-ruminantes, bem como os fatores que controlam a sua criação ecológica, não são bem conhecidos. Bactérias celulolíticas cultiváveis aparecem durante os primeiros dias de vida e atingem  $10^7$ - $10^8$  células/mL no sétimo dia<sup>31</sup>, estando, assim, presentes em níveis populacionais bem antes do desmame. *Archaea metanogênicas* também foram detectados por métodos de cultura durante os três primeiros dias de vida em cordeiros, e o seu estabelecimento, seguido das B. celulolíticas<sup>34</sup>. Trabalhos recentes mostraram que *Archaea* já estavam presentes nos cordeiros nas primeiras 15 horas de vida, mas não puderam ser cultivadas nas condições testadas<sup>32</sup>. Da mesma forma que os adultos, *M. ruminantium* foi a espécie dominante nas primeiras horas de vida<sup>19,32</sup>. Assim, os autores sugeriram que as metanogênicas adquiridas após o nascimento são mantidas durante todo o desenvolvimento do rúmen e da vida.

Bactérias hidrogenotróficas são capazes de utilizar o hidrogênio como um agente redutor, ou seja, homoacetogênicas e sulfato-redutoras são rapidamente colonizadas no rúmen do recém-nascido, sugerindo que a produção de

hidrogênio é eficaz nas primeiras horas de vida. No entanto, o seu número diminuiu enquanto aumentavam as *Archaea metanogênicas*, o que indica que eles não podem autocompetir por  $H_2$  com as metanogênicas  $H_2$  para limpeza<sup>34</sup>. Observou-se o aparecimento de fungos no rúmen durante a primeira semana de vida em cordeiros<sup>35</sup>. Os protozoários são os últimos a colonizar o rúmen, pois requerem de antemão que a microbiota bacteriana já esteja bem estabelecida<sup>36</sup>. Os protozoários *Entodinium* foram os primeiros a colonizar e permaneceram como gênero dominante na maioria dos animais<sup>36</sup>.

## 5. Como funcionam as interações entre as metanogênicas e outras populações microbianas no rúmen?

O metano, no rúmen, é formado principalmente pelas *Archaea hidrogenotróficas* que ainda reduzem o  $CO_2$ , utilizando  $H_2$  e, em certa medida, como formiato de doadores de elétrons.<sup>37</sup> Hungate demonstrou que cerca de 18% de metano no rúmen é formado a partir

de formiato, e a maior parte do restante é formado a partir de  $H_2$ . As outras duas vias metanogênicas (acetoclástica e metilotrófica) podem ocorrer no rúmen,

---

*O metano, no rúmen, é formado principalmente pelas Archaea hidrogenotróficas que ainda reduzem o  $CO_2$  utilizando  $H_2$ .*

---

mas a sua contribuição para a produção de metano é menor<sup>38</sup>. Metanogênese é, portanto, dependente da disponibilidade de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> no rúmen. Uma interação positiva foi observada entre os microrganismos produtores de H<sub>2</sub> e *Archaea metanogênicas*.

## 6. Como funciona a transferência de hidrogênio entre as *Archaea metanogênicas*, protozoários e fungos?

As *Archaea metanogênicas* associadas com protozoários podem representar até 25% do metano produzido no rúmen<sup>39</sup>. Diversos mecanismos podem explicar a contribuição de protozoários e a metanogênese: eles são altos produtores de hidrogênio e servem como hospedeiros das *Archaea metanogênicas* e as protegem da toxicidade do oxigênio. O hidrogênio é um subproduto da fermentação, que é produzida em grandes quantidades pelos protozoários em uma equivalente organela especializada para a mitocôndria dos eucariotas aeróbios:

o hidrogenossoma. Esse hidrogênio é utilizado pelos metanógenos endo e ecto simbiótico<sup>40,41</sup>. Essa interação é um exemplo típico de transferência de hidrogênio inter-espécies, que favorece

tanto os metanogênicos como os protozoários<sup>42</sup>. A remoção de hidrogênio permite a fermentação de matéria orgânica, principalmente, para formar o acetato e o CO<sub>2</sub> à custa da produção de butirato e lactato, resultando na produção de ATP mais eficiente pelo protozoário hospedeiro. Segundo Tokura *et al.* (1997)<sup>43</sup>, os protozoários também produzem uma quantidade considerável de formiato que também pode ser utilizado, em parte, como um substrato para a produção de metano. Os fungos ruminais também possuem hidrogenossomas específicos para a produção de H<sub>2</sub>, e co-cultura de fungos e os metanógenos levaram a uma mudança nos produtos finais da fermentação, bem como no aumento na degradação da celulose pelos fungos. Isso indica uma transferência eficaz benéfica de H<sub>2</sub> para ambos os microrganismos<sup>44</sup>.

Os protozoários do rúmen não são essenciais para o animal, pois animais defaunados (remoção de protozoários do rúmen) usam uma grande variedade de técnicas químicas e físicas, e têm sido amplamente utilizados para estudar o papel de protozoários ciliados ruminais

---

*As Archaea metanogênicas associadas com protozoários podem representar até 25% do metano produzido no rúmen.*

---

e suas funções, e em particular o seu envolvimento na produção de metano. Uma diminuição média de 10% de metano é observada após defaunação, mas esse valor pode variar dependendo da



dieta<sup>45</sup>. Segundo Eugène *et al.* (2004)<sup>46</sup>, algumas alterações na estrutura da comunidade metanogênica e na orientação da fermentação no rúmen estão associadas à eliminação dos protozoários e frequentemente com um aumento na proporção de propionato à custa de acetato e butirato. No estudo de Takenaka e Itabashi (1995)<sup>47</sup>, o número de b. metanogênicos diminuíram 10 vezes após a defaunação. No entanto, esse resultado não foi confirmado em outros estudos. O número de genes archaea por ml de conteúdo de rúmen foi dobrado após a defaunação em ovinos<sup>48</sup>, sem qualquer alteração na quantidade de metano produzido. Consistentemente, um aumento no número de cópias do gene *mcrA* foi observado em ovelhas defaunadas durante 3 meses<sup>49</sup> (Popova *et al.*, 2011b) ou 2 anos<sup>50</sup>. Demonstrou-se que a menor disponibilidade de H<sub>2</sub> no rúmen dos carneiros defaunados afeta a metanogênese, reduzindo a expressão do gene funcional *mcrA*<sup>49</sup>. Na ausência de protozoários, a produção de metano diminuiu e a população metanogênica foi 2,5 vezes menos ativa do que na presença de protozoários. Por conseguinte, afigura-se que a remoção de protozoários do rúmen diminui a metanogênese, afetando a atividade metanogênica e a diversidade em vez de o seu número. Assim, a redução do

número de protozoários constitui uma estratégia válida para mitigar metanogênese do rúmen.

## 7. Como funcionam as interações entre *Archaea metanogênicas* e as bactérias celulolíticas?

Os microrganismos que degradam as fibras, e as bactérias celulolíticas em particular, têm um papel importante no ecossistema ruminal. Eles são essenciais para o animal, que não pode degradar as paredes celulares dos polissacarídeos das plantas.

A maioria das bactérias celulolíticas produz hidrogênio como um produto final de fermentação, que sob condições fisiológicas normais, poderá ser rapidamente utilizado pelas *Archaea metanogênicas*. Essa transferência de hidrogênio inter-espécies (bactérias celulolíticas e *Archaea metanogênica*) foi demonstrada como sendo fundamental para o funcionamento dos ecossistemas anaeróbicos do rúmen<sup>50</sup>. Se essa transferência for afetada, a acumulação de hidrogênio no rúmen

inibe a reoxidação de coenzimas envolvidas em reações redoxes no interior das células bacterianas, que, em última análise, acaba deprimindo os processos de fermentação. Essa é a razão pela

---

*Os microrganismos que degradam as fibras, e as bactérias celulolíticas em particular, têm um papel importante no ecossistema ruminal. Eles são essenciais para o animal.*

---

qual a metanogênese está intimamente ligada à degradação da fibra vegetal no rúmen.

## 8. Como funciona as interações entre as comunidades fibrolíticas e as *Archaea* metanogênicas?

O efeito da composição da comunidade fibrolítica na produção de metano também tem sido investigado. Incubações *in vitro* de conteúdo de rúmen de cordeiros isolados com uma flora controlada compararam tanto os produtores de hidrogênio (Ruminococci e fungos) ou não produtores de hidrogênio (Fibrobacter) e microrganismos fibrolíticos metanogênicos. Os resultados demonstraram que o metano era produzido em quantidades mais elevadas do inóculo contendo a microbiota que produzia hidrogênio através da celulose<sup>51</sup>. Esses resultados sugerem que a composição da comunidade fibrolítica (produtores ou não produtores de hidrogênio) pode ter um impacto sobre a acumulação de hidrogênio e a produção de metano subsequente. Assim, a promoção dos microrganismos fibrolíticos produtores de hidrogênio,

como *F. succinogenes*, pode ser uma alternativa para diminuir as emissões de metano no rúmen, sem prejudicar a degradação da fibra.

## 9. Estratégias de mitigação de Metano entérico

São muitas as tentativas feitas para diminuir a produção de metano entérico no rúmen, uma série de estratégias tem sido utilizada, incluindo alterações na composição da dieta, utilização de produtos químicos, aditivos e extratos naturais de plantas. Infelizmente a maioria dessas estratégias ainda não é amplamente utilizada devido à baixa eficiência e seletividade, além da toxicidade

dos produtos químicos normalmente utilizados para com o animal, ou o desenvolvimento de resistência microbiana aos anti-metanogênicos compostos ou mesmo valor econômico muito elevado. Várias revisões de literatura recentes estão à disposição do leitor, como

exemplo: Martin *et al.* (2010), Attwood *et al.* (2011), Buddle *et al.* (2011), Wright e Klieve (2011), Goel e Makkar (2012) e Wang *et al.* (2012)<sup>52,53,54,55,56,57</sup>.

Uma dessas estratégias de mitigação envolve a introdução de microrganismos para aumentar a eficiência ruminal

---

*Uma dessas estratégias de mitigação envolve a introdução de microrganismos para aumentar a eficiência ruminal e reduzir a emissão de gases de efeito estufa, como o metano e o gás carbônico.*

---

e reduzir a emissão de gases de efeito estufa, como o metano e o gás carbônico. Essas interações de microrganismos serão mais detalhadas no tópico a seguir.

## 10. A introdução de probióticos e prebióticos na tentativa de aumentar a eficiência ruminal e reduzir a emissão de gás carbônico e metano

**Probióticos** - O termo probiótico surgiu na década de 1960 para descrever substâncias produzidas por organismo que estimulava outro indivíduo. Newbold, em 1996<sup>58</sup>, cita Parker (1974) como o primeiro a utilizar o termo para descrever aditivos alimentares que apresentavam efeito indireto e benefício ao hospedeiro, por atuar na microbiota do trato digestivo.

Em ruminantes, a fermentação microbiana que ocorre no rúmen desempenha um papel muito importante na

capacidade desses animais em utilizar substratos fibrosos. No entanto, a fermentação ruminal também causa consequências ambientais deletérias, como a emissão de gases de efeito estufa e degradação de proteína dietética, levando à excreção excessiva de N em fezes e urina. Uma série de aditivos está sendo investigada, e a tendência é concentrar-se em extratos de plantas e probióticos como manipuladores de rúmen. Um levantamento da literatura nas últimas duas décadas mostrou que as doses administradas variaram de 0,5 a 80g/cabeça/dia de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* mostradas na Tabela 1.

As respostas ao uso de leveduras têm sido bastante variáveis e pequenas, dependendo do processamento, da cepa, da dose suplementada e da dieta. Os resultados encontrados demonstraram diminuição não significativa de 3 a 5 % ou nenhum efeito na produção de metano como uma porcentagem da matéria seca ingerida. No entanto, com

**Tabela 1. Doses versus fonte da suplementação com *Saccharomyces cerevisiae***

Doses (g/MS)	Material utilizado	Fontes
10	YC; <i>S. Cerevisiae</i>	Willians <i>et al.</i> , 1991 <sup>59</sup>
2,5	Levedura <i>S. cerevisiar</i>	Fiems <i>et al.</i> , 1993 <sup>60</sup>
0, 6 e 60	<i>S. cerevisiae</i>	Fiems <i>et al.</i> , 1995 <sup>61</sup>
2, 4, 6, 8 e 10	<i>S. cerevisiae</i>	Dolezal <i>et al.</i> , 2005 <sup>62</sup>
20 e 80	<i>S. cerevisiae</i>	Dobieki <i>et al.</i> , 2007 <sup>63</sup>
0, 10, 20 e 30	<i>S. cerevisiae</i>	Lomas e Pupiales, 2007 <sup>64</sup>
10	Levedura cepa KA 500	Menezes, 2008 <sup>65</sup>
0,10 e 30	<i>S. cerevisiae</i>	Ribeiro, 2012 <sup>66</sup>
0,5 e 50	<i>S. cerevisiae</i>	Pinloche <i>et al.</i> , 2013 <sup>67</sup>

o aumento do conhecimento dos mecanismos de ação das leveduras, poderá ser possível prever em que condições dietéticas estas serão mais benéficas. Num estudo compararam os efeitos da suplementação com duas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* em vacas leiteiras e, embora as estirpes influenciassem os perfis de AGV do rúmen de uma maneira diferente, nenhuma alteração significativa na produção de metano foi observada<sup>75</sup>. Alguns estudos mostraram que *Saccharomyces cerevisiae* pode estimular a produção de propionato à custa de acetato<sup>51,69</sup>, ao passo que sugeriram que essa levedura possa estimular o crescimento de bactérias acetogênicas, consumindo H<sub>2</sub> no rúmen<sup>51</sup>. Esses autores mostraram previamente que o consumo de H<sub>2</sub> por uma bactéria acetogênica em co-cultura com uma estirpe metanogênica foi estimulado por *Saccharomyces cerevisiae*, mas o consumo de H<sub>2</sub> e a produção de metano pelas metanogênicas não foram afetadas<sup>70</sup>.

Culturas de leveduras com base em *Saccharomyces cerevisiae* são amplamente utilizadas em dietas de ruminantes. Os produtos disponíveis variam amplamente, como a cepa de *S. cerevisiae* utilizada e o número e viabilidade de células de levedura presentes. Observaram que nem todas as cepas de levedura são capazes de estimular a digestão no rúmen<sup>39,71</sup>.

Certas cepas de *S. cerevisiae* podem ajudar a prevenir a diminuição do pH

ruminal associado alimentando uma dieta à base de cereais e esta parece estar associada com uma diminuição na concentração de lactato ruminal<sup>72</sup>.

O pH ruminal é um dos mais importantes determinantes da função ruminal, particularmente para as bactérias (rúmen), fator que deixam de crescer em pH 6,0 e abaixo<sup>73</sup>. O pH do rúmen cai como resultado da fermentação reforçada devido ao aumento de concentrado na dieta. Essa queda inibe a degradação dos componentes fibrosos da dieta e é a causa, em parte pelo menos, dos efeitos associativos negativos entre forragens e concentrados. Tem sido sugerido que os aditivos com base em *S. cerevisiae* poderiam ajudar a atenuar essa queda pós alimentação do pH ruminal<sup>59</sup>, resultando em uma fermentação ruminal mais estável<sup>74</sup>.

Enfim, culturas vivas de *S. cerevisiae* podem ajudar a evitar uma queda no pH pós alimentação em animais alimentados com dietas de concentrado, reduzindo assim a provável acidose clínica e subclínica. Isso parece ser devido à capacidade de a levedura seletivamente estimular o crescimento de lactato utilizando *Megasphaera* e *Selenomonas* no rúmen.

O uso de técnicas moleculares modernas tem mostrado que leveduras não só estimulam a atividade bacteriana no rúmen, mas também alteram a composição da população bacteriana. Estamos agora usando as técnicas descritas para

investigar o uso de leveduras, probióticos e extratos de plantas para manipular a população microbiana no rúmen, a fim de melhorar a produtividade e reduzir a emissão de gases de efeito estufa.

**Prebióticos** - O yacon (*Smallanthus sonchifolius*), uma planta que produz raízes tuberosas semelhantes à batata-doce, está sendo estudada por sua capacidade prebiótica<sup>75,76,77</sup>. A planta produz raízes tuberosas que armazenam FOS, em vez de amido, como energia. A raiz contém 0,3-3,7% proteína e 70-80% de matéria seca em sacarídeos, principalmente FOS com grau de polimerização de 09:57 (trissacarídeos-decasaccharides)<sup>78</sup>. Ao contrário de outras fontes comerciais de FOS, yacon é tão rica nesse ingrediente prebiótico que uma dose eficaz pode ser assegurada por consumir uma quantidade moderada de raiz. Outra característica importante é que o rendimento de yacon no campo é superior a outras fontes convencionais<sup>75</sup>. Folhas e raízes dessa cultura possuem uma gama de compostos bioativos e alguns com propriedades antioxidantes, antiglicêmica, antibacteriana e antifúngica.

Recentemente, o yacon tem sido testado como mitigador de metano. Porém a sua administração não tem contribuído para o decréscimo da produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>, comum forma de perda de energia por degradação ruminal resultante da quebra de polissacarídeos no rúmen. O controle comparado com o tratamento contendo até 70% do

yacon em dietas com capim elefante e capim braquiária aumentou a produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>, não funcionando como mitigador de metano. Esse foi um estudo preliminar *in vitro* que abordou o potencial de prebiótico na mitigação de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>, e uma avaliação mais aprofundada *in vivo* está sendo recomendada<sup>79</sup>. Recentemente a mesma equipe, trabalhando em ensaios *in vitro* com a adição de *Lactobacillus acidophilus* em doses crescentes na MS, não encontraram decréscimo na produção de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

**Vacinas:** Várias vacinas foram formuladas até esta data<sup>80</sup>, mas os resultados não se mostraram eficientes na redução das emissões de metano<sup>54</sup>. As razões foram, provavelmente, que as vacinas não atingiram o alvo de todas as espécies metanogênicas presentes no rúmen. Pode-se especular que uma melhor proporção da população levaria a uma maior redução das emissões de metano. No entanto, a diversidade de *A. metanogenicas* está sujeita a alterações com o regime alimentar do animal hospedeiro, que faz com que a formulação de uma vacina seja eficaz. Por outro lado, a adaptação de flora metanogênica é de se esperar, e deve ser considerando a fim de prever a eficácia da vacina ao longo do tempo<sup>53</sup>.

## 11. Considerações finais

Há uma urgência em encontrar maneiras para reduzir as emissões de meta-

no por ruminantes, sem alterar a produção animal. Várias estratégias têm sido testadas, inclusive utilizando estratégias nutricionais e vários aditivos. Essas estratégias têm o alvo na inibição das *Archaea metanogênicas*, na redução de protozoários (produtores de H<sub>2</sub>), na estimulação de outras vias que consomem H<sub>2</sub> disponível no ambiente ruminal ou na utilização de várias destas simultaneamente.

---

*Essas estratégias têm o alvo na inibição das Archaea metanogênicas, na redução de protozoários (produtores de H<sub>2</sub>), na estimulação de outras vias que consomem H<sub>2</sub> disponível no ambiente ruminal*

---

O desenvolvimento de novas abordagens exige esforços consideráveis para aumentar o conhecimento sobre o ecossistema ruminal e principalmente das *Archaea metanogênicas*, microrganismos que produzem metano.

Assim, a fim de diminuir a atividade metanogênica, mais pesquisas são necessárias para caracterizar e entender plenamente essa comunidade microbiana. A introdução recente das tecnologias de sequenciamento permitirão a caracterização de microbiomas ruminais e conduzirão à melhor identificação das *Archaea* e outros microrganismos.

Estudos de reconstrução do genoma de *Archaea* a partir de dados do metagenoma, bem como o sequenciamento do genoma de estirpes recentemente isoladas, seriam também particularmente úteis para uma melhor compreensão do metabolismo, fisiologia e função

desses microrganismos no ecossistema ruminal.

Independentemente das estratégias utilizadas para mitigação de gases de efeito estufa, elas deverão levar em conta aspectos ambientais, sociais, econômicos e de saúde pública.

## Referências bibliográfica

1. CLARK, H, ULYATT, M. J (2002): A Recalculation of Enteric Methane Emissions from New Zealand Ruminants 1990-2000 with Updated Emission Predictions for 2010. A report prepared for the Ministry of Agriculture and Forestry. June 2001.
2. MARTIN, C.; MORGAVI, D.P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, v. 4, p. 351–365, 2010.
3. GOVERDE, M.; BAZIN, A.; SHYKOFF, J.A. et al. Influence of leaf chemistry of *Lotus corniculatus* (Fabaceae) on larval development of *Polyommatus icarus* (Lepidoptera, Lycaenidae): effects of elevated CO<sub>2</sub> and plant genotype. *Functional Ecology*, v. 13, p. 801-10, 1999.
4. O' HARA, P.; FRENEY, J.; ULYATT, M. J. Abatement of agricultural non-carbon dioxide greenhouse gas emissions. A study of research requirements. A report prepared for the Ministry of Agriculture and Forestry. Ministry of Agriculture and Forestry, Wellington., 2003, 171p.
5. KEBREAB, E.; STRATHE, A.; FADEL, J. et al. Impact of dietary manipulation on nutrient flows and greenhouse gas emissions in cattle. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 39, p. 458-64, 2010.
6. LIMA, M. A.; PRIMAVESI, O.; DEMARCHI, J. J.A. A. Inventory improvements for methane emissions from ruminants in Brasil. Jaguariúna, SP: Embrapa, June 2005. 17p. (EPA Grant n.X-82926201-0. Final Report).

7. STEINFELD, H.; GERBER, P.; WASSENAAR, T. et al. Livestock's long shadow environmental issues and options, FAO, 2006 p. 390.
8. GILL, M.; SMITH, P.; WILKINSON, J.M. Mitigating climate change: the role of domestic livestock. *Animal*, v. 4, p. 323-333, 2010.
9. JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* v. 73, p. 2483-2492, 1995.
10. FAO, 2006. World agriculture: towards 2030/2050. Interim Report, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Global Perspective Studies Unit, Rome.
11. JANSSEN, P.H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 74, p. 3619-3625, 2008.
12. HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed). The rumen microbial ecosystem. Reino Unido, 1997. 719p.
13. BRULC, J.M.; ANTONOPOULOS, D.A.; MILLER, M.E., et al. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 106, p. 1948-1953, 2009.
14. HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R., et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science*, v. 331, p. 463-467, 2011.
15. KIM, M.; MORRISON, M.; YU, Z. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 76, p. 49-63, 2011.
16. WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S., 1992. The rumen protozoa. Springer-Verlag New York Inc., New York.
17. KITTELMANN, S.; NAYLOR, G.E.; KOOLAARD, J.P., et al. A proposed taxonomy of anaerobic fungi (class neocallimastigomycetes) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. *PLOS One* 7, e36866, 2012.
18. MORVAN, B.; BONNEMOY, F.; FONTY, G., et al. Quantitative determination of H<sub>2</sub>-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. *Current Microbiology*, v. 32, p. 129-133, 1996.
19. SKILLMAN, L.C.; EVANS, P.N.; NAYLOR, G.E., et al. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe*, v. 10, p. 277-285, 2004.
20. DENMAN, S.E.; TOMKINS, N.W.; MCSWEENEY, C.S. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 62, p. 313-322, 2007.
21. LIN, C.; RASKIN, L.; STAHL, D.A. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 22, p. 281-294, 1997.
22. SHARP, R.; ZIEMER, C.J.; STERN, M.D., et al. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 26, p. 71-78, 1998.
23. YANAGITA, K.; KAMAGATA, Y.; KAWAHARASAKI, M., et al. Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of *Methanomicrobium mobile* by fluorescence in situ hybridization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 64, p. 1737-1742, 2000.
24. WRIGHT, A.-D.; MA, X.; OBISPO, N. Methanobrevibacter Phylotypes are the Dominant Methanogens in Sheep from Venezuela. *Microbiol. Ecol.*, v. 56, p. 390-394, 2008.
25. POPOVA, M.; MARTIN, C.; EUGÈNE, M., et al. Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Animal Feed Science and Technology* v. 166-167, p. 113-121, 2011a.
26. ZHOU, M.; HERNANDEZ-SANABRIA, E.; GUAN, L.L. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Appl. Environ.*

- Microbiol.*, v. 76, p. 3776-3788, 2010.
27. DESNOYERS, M.; GIGER-REVERDIN, S.; BERTIN, G et al. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.*, v. 92, p. 1620-1632, 2009.
  28. CHENG, Y.F.; MAO, S.Y.; LIU, J.X., et al. Molecular diversity analysis of rumen methanogenic *Archaea* from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs. *Letters in Applied Microbiology*, v. 48, p. 585-592, 2009.
  29. WRIGHT, A.-D.G.; TOOVEY, A.F.; PIMM, C.L. Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe*, v. 12, p. 134-139, 2006.
  30. WRIGHT, A.-D.G.; WILLIAMS, A.J.; WINDER, B., et al. Molecular Diversity of Rumen Methanogens from Sheep in Western Australia. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, p. 1263-1270, 2004.
  31. FONTY, G.; GOUET, P. Establishment of microbial populations in the rumen. Utilization of an animal model to study the role of the different cellulolytic micro-organisms *in vivo*. In *The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion*, Armidale NSW, 1989. p.39-49.
  32. GAGEN, E.J.; MOSONI, P.; DENMAN, S.E., et al. Methanogen colonization does not significantly alter acetogen diversity in lambs isolated 17 h after birth and raised aseptically. *Microbial Ecology*, 2012.
  33. LI, R.W.; CONNOR, E.E.; LI, C., et al. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environmental Microbiology*, v. 14, p. 129-139, 2012.
  34. MORVAN, B.; DORE, J.; RIEU-LESME, F., et al. Establishment of hydrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb. *FEMS Microbiology Letters*, v. 117, p. 249-256, 1994.
  35. FONTY, G.; GOUET, P.; JOUANY, J.P., et al. Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *Journal of General Microbiology*, v. 133, p. 1835-1843, 1987.
  36. FONTY, G.; SENAUD, J.; JOUANY, J.P., et al. Establishment of ciliate protozoa in the rumen of conventional and conventionalized lambs: influence of diet and management conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 235-241, 1988.
  37. HUNGATE, R.E.; SMITH, W.; BAUCHOP, T., et al. Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *Journal of Bacteriology*, v. 102, p. 389-397, 1970.
  38. OPPERMANN, R.A.; NELSON, W.O.; BROWN, R.E. In vivo studies of methanogenesis in the bovine rumen: dissimilation of acetate. *Journal of General Microbiology*, v. 25, p. 103-111, 1961.
  39. NEWBOLD, C.J.; LASSALAS, B.; JOUANY, J.P. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 21, p. 230-234, 1995.
  40. STUMM, C.K.; GIJZEN, H.J.; VOGELS, G.D. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *British Journal of Nutrition*, v. 47, p. 95-99, 1982.
  41. FINLAY, B.J.; ESTEBAN, G.; CLARKE, K.J., et al. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters*, v. 117, p. 157-162, 1994.
  42. USHIDA, K.; NEWBOLD, C.J.; JOUANY, J.P. Interspecies hydrogen transfer between the rumen ciliate *Polyplastron multivesiculatum* and *Methanosarcina barkeri*. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 43, p. 129-131, 1997.
  43. TOKURA, M.; USHIDA, K.; MIYAZAKI, K., et al. Methanogens associated with rumen ciliates. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 22, p. 137-143, 1997.
  44. BAUCHOP, T.; MOUNTFORT, D.O. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen-methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 42, p. 1103-1110, 1981.
  45. MORGAVI, D.P.; FORANO, E.; MARTIN, C., et al. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, v. 4, p. 1024-1036, 2010.



46. EUGÈNE, M.; ARCHIMÈDE, H.; SAUVANT, D. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livestock Production Science*, v. 85, p. 81-97, 2004.
47. TAKENAKA, A.; ITABASHI, H. Changes in the population of some functional groups of rumen bacteria including methanogenic bacteria by changing the rumen ciliates in calves. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 41, p. 377-387, 1995.
48. MACHMÜLLER, A.; SOLIVA, C.R.; KREUZER, M. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reproduction Nutrition Development*, v. 43, p. 41-55, 2003.
49. POPOVA, M.; MORGAVI, D.P.; DOREAU, M., et al. Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen. *INRA Productions Animales*, v. 24, p. 447-460, 2011b.
50. WOLIN, M.; MILLER, T.; STEWART, C., 1997. Microbe-microbe interactions, In: Hobson, P., Stewart, C. (Eds.), *The Rumen Microbial Ecosystem*, Chapman & Hall, London, pp. 467-491.
51. CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; MASSEGLIA, S.; FONTY, G., et al. Influence of the composition of the cellulolytic flora on the development of hydrogenotrophic microorganisms, hydrogen utilization, and methane production in the rumens of gnotobiotically reared lambs. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.76, p. 7931-7937, 2010.
52. MARTIN, C.; MORGAVI, D.P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*, v. 4, p. 351-365, 2010.
53. ATTWOOD, G.T.; ALTERMANN, E.; KELLY, W.J., et al. Exploring rumen methanogen genomes to identify targets for methane mitigation strategies. *Animal Feed Science and Technology*, 166-167, 65-75, 2011.
54. BUDDLE, B.M.; DENIS, M.; ATTWOOD, G.T., et al. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*, v. 188, p. 11-17, 2011.
55. WRIGHT, A.-D.G.; KLIEVE, A.V. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation? *Animal Feed Science and Technology* 166-167, 248-253, 2011.
56. GOEL, G.; MAKKAR, H.P. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical animal health and production*, v. 44, p. 729-739, 2012.
57. WANG, J.K.; YE, J.A.; LIU, J.X. Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance a review. *Tropical animal health and production*, v. 44, p. 697-706, 2012.
58. PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health* v.29, p.4-8, 1974.
59. WILLIAMS, P.E.; TAIT, C.A.; INNES, G.M., et al. 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 Anim Sci*, v. 69, p. 3016-3026, 1991.
60. FIEMS, L.O.; COTTYN, B.G.; DUSSERT, L.; VANACKE, J.M. Effect of a viable yeast culture on digestibility and rumen fermentation in sheep fed different types of diets. *Reprod Nutr Dev*, v.33, p.43-49, 1993
61. FIEMS, L.O.; COTTYN, B.G.; BOUCQUÉ, CH.V. Effect of yeast supplementation on health, performance and rumen fermentation in beef bulls. *Archiv für Tierernaehrung*, v.47, n.3, p.295-300, 1995.
62. DOLEZAL, P.; DOLEZAL, J.; TRINACTY, J. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation in dairy cows. *Czech J. Anim. Sci*, v.50, p.503-510, 2005.
63. DOBICKI, A.; PREŠ, J.; ZACHWIEJA, A. et al. Influence of yeast preparations on chosen biochemical blood parameters and the composition of cow milk. *Medycyna weterynaryjna*, v.63, p.951-954, 2007
64. LOMAS, E.; PUPIALES, M.L. Efectos de cuatro niveles de *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo alimenticio en vacas del tropico para mejorar la produccion lechera en la Provincia de Imbabura, Canton Cotacachi, sector San Jose de Magdalena. Informe Final de Tesis, Previo a la obtención del Título de Ingeniería Agropecuaria, 2007. 177p.

65. MENEZES, B. Suplementação de vacas leiteiras com *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)– Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008. 52p.
66. Ribeiro, D. Resposta digestiva de bovinos a doses de levedura autolisada. Dissertação Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2012. 58p.
67. PINLOCHE, E.; MC, E.; MARDEN, J.P; et al. The effect of a probiotic Yeast on the bacterial diversity and population structure in the Rumen of cattle. *Plos one*, v.8, p.1-10, 2013.
68. CHUNG, Y.H.; WALKER, N.D.; MCGINN, S.M., et al. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 2431-2439, 2011.
69. NEWBOLD, C.J.; RODE, L.M. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. *International Congress Series* 1293, p. 138-147, 2006.
70. CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G.; BERTIN, G., et al. In vitro H<sub>2</sub> utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 3466-3467, 1995.
71. NEWBOLD, C.J.; FRUMHOLTZ, P.P.; WALLACE, R.J. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on rumen fermentation and blood constituents in sheep given diets of grass hay and barley. *Journal of Agricultural Science*, v.119, p.423-427, 1992.
72. NEWBOLD, C.J. et al. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. *Journal of Animal Science*, v.73, p.1811-1818, 1995.
73. STEWART, C.S Factors Affecting the Cellulolytic Activity of Rumen Contents. *Appl Environ Microbiol.*, vol.33, n.3 p.497–502,1977.
74. HARRISON, G.A. et al. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating dairy cows on ruminal fermentation and microbial populations. *Journal of Dairy Science.*, v.71, p.2967-2975, 1988.
75. OJANSIVU, I, FERREIRA, C.L.L.F., Salminen J Seppo YACON, A NEW SOURCE OF PREBIOTIC OLIGOSACCHARIDES WITH A HISTORY OF SAFE USE. *Trends in Food Science & Technology*, v.22, p.40-46, 2010.
76. RODRIGUES, K.L , CAPUTO, L.R.G, CARVALHO, J.C.T. et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents.*, v.25, n. 5, p.404-408, 2005.
77. RODRIGUES F.C, CASTRO A.S, RODRIGUES, OLIVEIRA V.C et al. Yacon flour and bifidobacterium longum nodulate bone health in rats. *Journal of Medicinal Food.*, v.xx, p.1-7, 2012.
78. GOTO, S.; BONO, H.; OGATA, H. et al. Organizing and computing metabolic pathway data in terms of binary relations. eds Altman R.B., Dunker K., Hunter L., Klein T.E. (World Scientific, Singapore), p. 175–186, 1996.
79. CARNEIRO, H, LIMA N.R, ARAÚJO R.C.C. et al. O uso de yacon como mitigador de metano. Anais de Congresso, Brasília, Sociedade Brasileira de Zootecnia : A produção animal no mundo em transformação, pp1-3. 2012.
80. WILLIAMS, Y.J.; POPOVSKI, S.; REA, S.M., et al. A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, p. 1860-1866, 2009.