

FLÁVIA OLIVEIRA ABRÃO

**FUNGOS DO RÚMEN DE BOVINOS E CAPRINOS DE CORTE NO NORTE
DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias.

Área de concentração: Agroecologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte

Montes Claros

2012

Abrão, Flávia Oliveira.

A158f Fungos do rúmen de bovinos e caprinos de corte no Norte de Minas
2012 Gerais / Flávia Oliveira Abrão. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2012.

76 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

Orientador: Prof. Eduardo Robson Duarte.

Banca examinadora: Norberto Mario Rodriguez, Wilian James Nogueira Lima, Luciana Castro Geraseev, Eduardo Robson Duarte.

Inclui bibliografia: f. 69-76.

1. Ecossistema ruminal. 2. Bovinocultura – Caprinocultura. 3. Semiárido. I. Duarte, Eduardo Robson. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 579

FLÁVIA OLIVEIRA ABRÃO

**FUNGOS DO RÚMEN DE BOVINOS E CAPRINOS DE CORTE NO NORTE
DE MINAS GERAIS**

Prof. Norberto Mário Rodriguez
(Escola de Veterinária – UFMG)

Prof. Wilian James Nogueira Lima
(Suplente / ICA-UFMG)

Prof. Eduardo Robson Duarte
(Orientador/ ICA – UFMG)

Prof^a. Luciana Castro Geraseev
(Coorientadora/ICA – UFMG)

Aprovada em 31 de janeiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois, sem ele, nenhuma realização seria possível.

Ao professor Eduardo Robson Duarte, todos esses anos de orientação e amizade. Vou ser eternamente grata a tudo o que ele me ensinou e me permitiu alcançar.

Ao Moisés o companheirismo e o amor!

À minha família, a ajuda constante e o amor incondicional. Em especial, à minha mãe, por me ensinar a não desanimar diante dos problemas que a vida oferece.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório: Cláudio, Kellerson, Edvaldo, Maria Luiza, Ana Carolina, Izabella e Patrícia. A colaboração de vocês foi determinante para a conclusão desta pesquisa. Espero que, em breve, estejamos todos juntos novamente.

À professora Luciana Castro Geraseev, a coorientação e por me mostrar o quanto pode ser interessante a Nutrição de ruminantes.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e à coordenação da Pós-graduação em Ciências Agrárias.

Aos professores do mestrado, em especial, Neide e Joana. Ao professor Norberto Mário Rodriguez, a ajuda valiosa na conquista do meu doutorado.

À professora Eloísa Saliba e ao professor Wilian, a imediata disponibilidade em avaliar este trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Agrárias (ICA).

A Capes, a bolsa concedida durante esses dois anos de pesquisa.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

RESUMO

Os fungos do rúmen podem assumir importância fundamental na digestão das forragens tropicais, pois possuem habilidades mecânicas e enzimáticas que auxiliam na degradação da celulose e hemicelulose lignificadas. Poucos estudos respaldam a variação da microbiota presente no rúmen em função da categoria e espécie animal e o perfil dessa população em animais criados em pastagens tropicais lignificadas ou em dietas sem volumosos. Nesta pesquisa, avaliou-se as características do fluido ruminal de diferentes categorias de bovinos mestiços Nelore criadas em pastagens lignificadas, de caprinos criados em mesmas condições e de novilhos arraçoados sem volumoso. O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado. Imediatamente após a coleta do fluido ruminal foram avaliadas características físico-químicas. Realizou-se exame micromorfológico do suco do rúmen, exame direto de fungos anaeróbios estritos e cultivo, quantificação, isolamento e identificação de fungos aeróbios do rúmen. Os isolados leveduriformes obtidos foram avaliados quanto à capacidade de assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Verificou-se que a população de fungos do rúmen difere conforme a idade dos bovinos de corte criados em pastagens tropicais, bem como entre a espécie bovina e caprina criadas extensivamente no Norte de Minas. O perfil bioquímico das leveduras no ambiente ruminal das categorias e espécies estudadas também difere entre si. Novilhos alimentados com e sem volumoso por até 71 dias apresentam diferenças na constituição de fungos ruminais.

Palavras-chave: Categorias. Ecossistema Ruminal. Espécie de Ruminantes. Alimentação Animal. Confinamento. Pastagem.

ABSTRACT

The rumen fungi can assume fundamental importance in the digestion of tropical forages because they have mechanical and enzymatic skills that help in the degradation of cellulose and hemicellulose lignified. Few studies support the variation of the mycobiota present in the rumen due to the animal category and species and the profile of this population in animals raised in lignified tropical pasture or roughage-free diets. In this research, evaluated the characteristics of the ruminal fluid of different categories of Nelore cattle raised on pasture lignified, goats raised in the same conditions and without bulky hand fed steers. The delineation of the experiment was completely randomized. Immediately after collecting the ruminal fluid were evaluated physical and chemical characteristics. Micromorphological examination was carried out of the rumen juice, direct examination of strict anaerobes fungi and cultivation, quantitation, isolation and identification of aerobic fungi in the rumen. The yeast isolates were evaluated for their ability to assimilate different sources of carbon and nitrogen. It was found that the population of the rumen fungi differs according to the age of beef cattle raised on tropical pastures, as well as between bovine and goat specie raised extensively in the North of Minas Gerais. The biochemical profile of yeast on rumen environment of categories and species studied also differs from each other. Steers fed with and without forage for up to 71 days at different stages in the formation of rumen fungi.

Keywords: Categories. Ruminal Ecosystem. Species of Ruminants.
Animal Nutrition. Confinement. Pasture.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Referencial Teórico.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 Microbiota ruminal.....	9
2.2 Fungos da microbiota ruminal.....	10
2.2.1 Fungos anaeróbios do rúmen.....	10
2.2.2 Fungos anaeróbios facultativos no rúmen.....	13
2.3 Participação de fungos no metabolismo ruminal.....	14
2.4 Suplementação de fungos em dietas de ruminantes.....	16
CAPÍTULO 2 - Caracterização físico-química e microbiológica do suco ruminal de vacas, de novilhos e de bezerros de corte alimentados com pastagens tropicais no período seco.....	18
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4 CONCLUSÃO.....	38

CAPÍTULO 3 - População de fungos e características físico-químicas do fluido ruminal de novilhos e de caprinos de corte criados em pastagens tropicais no período seco do ano.....	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT.....	40
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4 CONCLUSÃO.....	53
CAPÍTULO 4 - Perfil microbiológico e macroscópico do conteúdo ruminal de novilhos de corte alimentados com e sem volumoso.....	54
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
1 INTRODUÇÃO.....	56
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

A relação entre seres humanos e ruminantes é tão antiga que não se sabe ao certo quando e como se iniciou. Acredita-se que os nômades começaram a domesticar os ruminantes e a explorar o potencial fotossintético de gramíneas para a produção de proteína animal. Essa atividade permitiu o aumento e a manutenção de alimentos de grande valor nutricional, favorecendo a sobrevivência e o estabelecimento das primeiras comunidades primitivas (RUSSEL; RYCHLIK, 2001).

Como resultado do melhoramento no manejo nutricional de ruminantes, tem-se observado aumento nos índices de produção de carne e leite nos últimos 30 anos (NOORAE *et al.*, 2010). Atualmente, a bovinocultura é responsável pelo abastecimento da maior parte da demanda mundial de proteína animal. A carne e o leite bovinos possuem participação significativa na economia nacional, representando 8,4% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro. O rebanho bovino do Brasil é constituído aproximadamente por 219 milhões de cabeças, com a produção anual de 7,15 milhões de toneladas de carne e 24,5 bilhões de litros de leite (IBGE, 2010).

A notável capacidade de produção proteica nos ruminantes é atribuída ao sistema de pré-estômagos, que alberga um complexo ecossistema microbiano. Como os alimentos fibrosos são a base da alimentação dos ruminantes, esse ecossistema possui importância única, por ser responsável pela degradação da fibra vegetal, digerindo os polímeros da parede celular (STEWART, 1994). Essa interação simbiótica pode suprir os ruminantes quanto aos requisitos energéticos, proteicos e vitamínicos, contribuindo para o crescimento, a produção e a reprodução (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

O ecossistema ruminal é considerado estável, por possuir população microbiana bem estabelecida, capaz de produzir proteínas de alto valor nutricional a partir de compostos de qualidade inferior. Esse ecossistema também é dinâmico e pode ser fisiologicamente alterado em função da adaptação e da composição da dieta disponibilizada ao animal. A microbiota autóctone do rúmen foi selecionada e adaptada para sobreviver a determinadas flutuações presentes no ambiente ruminal. Microrganismos incapazes de sobreviver a essas variações são eliminados desse sítio (KAMRA, 2005).

Poucos estudos respaldam a variação da microbiota presente no rúmen em função da categoria animal e o perfil dessa população em animais criados em pastagens tropicais lignificadas. Estudos são ainda necessários para avaliar as características ruminais de diferentes espécies de animais de produção, bem como a interferência da dieta sobre os parâmetros fermentativos e microbianos. O conhecimento mais acurado dessas características permitirá a melhor manipulação ruminal com maximização do sistema de produção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota ruminal

O rúmen pode ser comparado a uma câmara fermentativa, com ambiente anaeróbio estrito, temperatura entre 38 e 42°C e pH entre seis e sete. Os ácidos produzidos durante a fermentação são prontamente tamponados pelo bicarbonato e pelo fosfato presentes na saliva. O ambiente ruminal adequado favorece a pressão da microbiota autóctone sobre os microrganismos do solo, água e alimentos ingeridos a todo instante pelos ruminantes (RUIZ-LACAZ *et al.*, 1992).

No interior do rúmen, há complexa mistura de fragmentos alimentares e de microrganismos. A população microbiana no rúmen geralmente está distribuída da seguinte forma: bactérias (10^{10} - 10^{11} $\text{m}\ell^{-1}$), protozoários ciliados (10^4 - 10^6 $\text{m}\ell^{-1}$), fungos anaeróbios (10^3 - 10^5 $\text{m}\ell^{-1}$), micoplasmas

(indeterminado) e bacteriófagos ($10^8 - 10^9 \text{ mL}^{-1}$), os quais estabelecem entre si diversas interações positivas ou negativas (RUIZ-LACAZ *et al.*, 1992; KAMRA, 2005). As populações microbianas podem sofrer flutuações de acordo com as estações do ano, o que pode estar associado aos níveis de ácidos graxos voláteis (AGV's) e de amônia (NH_3) disponibilizados no rúmen (MARTILLOTTI, 1994). Grandes populações de bactérias e fungos têm sido observadas quando altas concentrações de NH_3 e AGV's estão presentes no rúmen. O estabelecimento e a manutenção da estabilidade das populações microbianas no rúmen são dependentes principalmente, da dieta, da qualidade da alimentação e da frequência de distribuição, bem como das interações microbianas (DEHORITY, 1998).

Os microrganismos habitantes do rúmen possuem relação de simbiose com o hospedeiro. A microbiota ruminal atua sinergicamente para bioconverter substâncias menos aproveitáveis, como a celulose, a hemicelulose e a amônia, em compostos utilizáveis pelo ruminante, como os AGV's, os aminoácidos, as vitaminas e outras substâncias necessárias ao crescimento e à produção de carne, de leite e de lã (KAMRA, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

2.2 Fungos da microbiota ruminal

2.2.1 Fungos anaeróbios do rúmen

Os fungos anaeróbios do rúmen podem assumir importância fundamental na digestão das forragens tropicais, pois produzem enzimas capazes de acelerar a degradação da celulose e hemicelulose lignificadas (CERDÀ, 2003). Os rizoides desses fungos podem penetrar fibras lignificadas, desestruturar a parede celular e aumentar a área de superfície das partículas de alimentos, o que facilita a colonização de outros microrganismos (PAUL *et al.*, 2004). Bauchop (1979) admite que, para degradar a parede celular, os fungos podem utilizar três vias: invadir o xilema das bainhas das folhas, penetrar pelo anel de esclerênquima das hastes e

quebrar a barreira cuticular das folhas.

Nos animais alimentados com dieta rica em fibras, os fungos anaeróbios estritos do rúmen podem representar até 8% da biomassa microbiana e estão envolvidos na degradação de celulose e solubilização da lignina (AKIN, 1987). Esses microrganismos são cosmopolitas e já foram isolados de 31 espécies de herbívoros pré-fermentadores diferentes e de nove pós-fermentadores (TRINCI *et al.*, 1994).

Estruturas fúngicas podem ser observadas em todas as partes do trato digestório dos ruminantes, desde as secreções salivares até as porções finais do intestino grosso, o que sugere estágios de resistência no ciclo de vida desses microrganismos (DAVIES *et al.*, 1993). As fezes podem servir como rota de transferência entre os herbívoros. Apesar dos ruminantes não realizarem coprofagia, acidentalmente, há ingestão de fezes frescas ou secas contaminadas com formas de resistência e aerotolerantes (DAVIES *et al.*, 1993; TRINCI *et al.*, 1994).

Amostras de mesmas espécies de fungos apresentam diferenças na estrutura quando coletadas de diferentes partes do trato digestório, como intestino grosso e rúmen (GORDON; PHILLIPS, 1992).

Os fungos anaeróbios do rúmen são produtores de zoósporos e pertencem à classe dos Chytridiomycetos. Até o presente, esses são classificados na divisão Eumycota, subdivisão Mastigomycotina, classe Chytridiomycetos, ordem Neocallimastigales, família Neocallimasticacea e gêneros *Caecomyces*, *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Anaeromyces* e *Orpinomyces* (LI *et al.*, 1993).

São conhecidas 16 espécies que podem ser diferenciadas pela morfologia do talo (monocêntrico, policêntrico e filamentosos/bulboso) e pelo número de flagelos por zoósporo (uniflagelados ou poliflagelados) (HO; BARR, 1995). Os fungos anaeróbios do rúmen com ciclo policêntrico podem se multiplicar com a fragmentação do rizomicélio, não dependendo da formação de zoósporos para se perpetuarem no ambiente ruminal (TRINCI *et al.*, 1994).

A principal espécie encontrada em bovinos é *Neocallimastix variabilis*, de ciclo monocêntrico, com zoósporos poliflagelados e filamentos com

rizomicélio. Os zoósporos possuem 19 flagelos direcionados posteriormente. Esses esporos apresentam quimiotaxia positiva para fragmentos de plantas (HO *et al.*, 1993).

Neocallimastix frontalis, encontrado no interior do rúmen de ovinos, apresenta ciclo de vida alternado, com uma fase móvel e flagelada e outra vegetativa. Os zoósporos apresentam de sete a dez flagelos no gênero *Neocallimastix* e os cinetossomos, centríolos que se modificam para impulsionar o flagelo, permanecem junto aos flagelos (ORPIN, 1977).

A espécie *Anaeromyces elegans* é isolada no trato digestório bovino. Essa espécie é de ciclo policêntrico, com zoósporos uniflagelados e filamentos com rizomicélio. Após a incubação, os esporos formam uma germinação tipo rizoide. Os zoosporângios são formados em esporangióforos, produzidos pelo rizomicélio e podem ser intercalares ou terminais (HO *et al.*, 1993).

O gênero *Caecomyces* pode romper fisicamente as fibras vegetais quando ocorre a expansão dos bulbos dos rizoides dentro da estrutura vegetal. Essa habilidade mecânica e a grande atividade de suas polissacaridases justificam a melhor capacidade dos fungos para a utilização das fibras vegetais mais resistentes, quando comparados às diferentes espécies bacterianas do rúmen (TRINCI *et al.*, 1994).

Fungos *Neocallimastix* spp. e *Piromyces* spp. são mais eficientes que o *Caecomyces* spp., na degradação de porções mais resistentes dos vegetais. *Neocallimastix frontalis* é capaz de solubilizar pequenas quantidades de lignina da parede celular das plantas. Entretanto não há evidências da utilização desse composto como fonte de carbono (TRINCI *et al.*, 1994). A solubilização parcial da lignina permite melhor exposição e acessibilidade da celulose e hemicelulose, proporcionando a colonização de bactérias incapazes de aderir a paredes lignificadas de células vegetais (WUBAH *et al.*, 1991).

2.2.2 Fungos anaeróbios facultativos no rúmen

A ocorrência de fungos aeróbios no rúmen tem sido pouco descrita na literatura científica. Em estudo preliminar, realizado na região norte do estado de Minas Gerais, Brasil, foi avaliada a população de fungos aeróbios nos líquidos ruminais de vacas e de bezerras da raça Holandesa, recebendo diferentes volumosos. Os gêneros de fungos micelianos encontrados foram: *Aspergillus* (56%), *Rhizopus* (12,8%), *Trichophyton* (8,5%), *Paecilomyces* (7,1%) e *Scedosporium* (6,3%) (ALMEIDA, 2009).

Brewer e Taylor (1969) estudaram a população de fungos isolados aerobicamente do fluido ruminal de ovelhas criadas sob regime extensivo na Inglaterra. Esses pesquisadores observaram a presença de estruturas fúngicas típicas de *Aspergillus fumigatus* e *Sporomía* spp., no suco do rúmen desses animais, contudo o papel na digestão da fibra nesse ambiente ainda deve ser elucidado.

Pesquisas avaliando a prevalência de fungos aeróbios celulolíticos no fluido ruminal de cinco vacas, cinco ovelhas e cinco cabras, evidenciaram maior proporção desses microrganismos nas amostras provenientes das vacas. Os gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor* foram os mais prevalentes e apresentaram atividade celulolítica comprovada. Para as amostras isoladas especificamente a partir do suco ruminal das vacas, o gênero *Mucor* foi o mais prevalente, correspondendo a 42,9% dos isolados, seguido de *Aspergillus flavus*, que foi identificado em 28,6% dos isolados (OYELEKE; OKUSANMI, 2008).

A levedura *Candida krusei*, importante agente de micoses oportunistas em animais e humanos, foi relatada no rúmen de bovinos leiteiros criados no Norte de Minas Gerais. O papel ecológico ou patogênico dessa e de outras leveduras deve ser considerado, buscando uma melhor produtividade e saúde de ruminantes (ALMEIDA, 2009).

2.3 Participação de fungos no metabolismo ruminal

As propriedades enzimáticas, fisiológicas e metabólicas dos fungos do rúmen demonstram que esses microrganismos desenvolvem importante papel na digestão e no ecossistema do trato digestório de ruminantes. São encontrados em amostras provenientes de bovinos, de ovinos, de caprinos, de cervídeos e de equinos. Em ovinos, esse grupo de microrganismos está presente no ambiente ruminal desde as primeiras semanas de vida até a morte dos animais (FONTY; GOUET, 1994). A maior população fúngica no rúmen é observada em animais adultos e naqueles alimentados com maior proporção de fibras vegetais. Dietas com alta concentração ou com teores muito reduzidos de açúcares são desfavoráveis ao crescimento desses microrganismos (GRENET *et al.*, 1989).

A habilidade de colonizar fragmentos vegetais pode ser observada em microscopia eletrônica e a atividade celulolítica e hemicelulolítica pode ser demonstrada *in vitro* (GRENET *et al.*, 1989). Os fungos do rúmen possuem a surpreendente capacidade de degradar polímeros de carboidratos em tecidos lignificados. Essa degradação é observada *in vitro* em culturas isoladas ou em associação com outros microrganismos do rúmen que participam da degradação de polissacarídeos das plantas em produtos para a fermentação (FONTY; GOUET, 1994).

Culturas puras de fungos ruminais são capazes de solubilizar grandes proporções da parede celular vegetal, incluindo os fragmentos mais lignificados. Culturas mistas desses fungos podem degradar até 60% do material vegetal incubado (TRINCI *et al.*, 1994).

A remoção de polissacarídeos e de componentes lignificados compromete as propriedades estruturais dos fragmentos vegetais no rúmen. O crescimento dos fungos pode contribuir para a diminuição da tensão superficial das fibras vegetais. Em alguns cultivos fúngicos, em palha de trigo e de centeio, é observada grande redução no tamanho das partículas das forrageiras (TRINCI *et al.*, 1994).

Segundo Obispo e Dehority (2002), o número de fungos no rúmen é significativamente influenciado pela frequência de alimentação dos animais. Nas condições do experimento conduzido por esses autores, a maior população foi encontrada em animais alimentados seis vezes por dia, sendo observados $1,5 \times 10^5$ fungos por grama de conteúdo ruminal. Animais submetidos a uma única oferta de alimento e aqueles alimentados 24 vezes ao dia apresentaram $6,2$ a $6,4 \times 10^4$ fungos, por grama de conteúdo. Fatores reguladores de estímulo ou inibição do equilíbrio da população desses fungos no rúmen podem estar associados ao crescimento de algumas bactérias do rúmen. A frequência da alimentação nos animais altera a velocidade de passagem nos pré-estômagos; com isso, acredita-se em uma possível diluição de fatores inibitórios (OBISPO; DEHORITY, 2002).

Os fungos do rúmen são de grande interesse biotecnológico, em decorrência da notável capacidade produtiva de enzimas que degradam polissacarídeos. As hifas infectam os estômatos das plantas e podem romper a camada epitelial dos vegetais. A lignina pode ser solubilizada da parede celular vegetal somente após a ação de enzimas fúngicas despolarizantes. Entretanto, mesmo após a solubilização, essa substância não é degradada pelos fungos ou por outros microrganismos do rúmen (OP DEN CAMP *et al.*, 1994).

A produção de enzimas fúngicas depende do substrato disponibilizado. A degradação da celulose por fungos do rúmen requer a participação da endoglucanase, da exoglucanase e da β glicosidase. A exocelobiohidrolase é sugerida na degradação inicial da celulose (TEUNISSEN; OP DEN CAMP, 1993).

Fungos do rúmen são identificados como produtores de enzimas hemicelulolíticas com alta atividade específica. Essas possuem ausência de inibição pelos produtos, pH ótimo neutro, temperatura máxima com estabilidade mais elevada (41°C) e podem ser obtidas por cultivo em fermentadores. A melhor produtividade enzimática poderá ser alcançada, selecionando amostras com alta capacidade de secreção e por manipulação genética, com a implantação de novos genes (OP DEN CAMP *et al.*, 1994).

As celulasas microbianas são mundialmente estudadas por vários pesquisadores, com o objetivo de aumentar a liberação de glicose dos substratos, maximizando a fermentação e a produção de etanol. As enzimas provenientes de fungos do rúmen podem degradar a maior parte dos componentes estruturais da parede celular vegetal, tanto em sistemas *in vivo* como *in vitro*. Em um estudo, avaliou-se a capacidade de degradação de enzimas extracelulares de *Piromyces* sp. e *N. patriciarum* em diferentes tipos de substratos contendo lignina e celulose. As enzimas desses fungos converteram até 2% (p/v) de celulose cristalizada para glicose, indicando a atividade de endoglucanases, exoglucanases e β - glicosidases. Essas enzimas fúngicas foram estáveis até 40°C, mesmo quando armazenadas durante uma semana (REMBRANDT *et al.*, 1997).

2.4 Suplementação de fungos em dietas de ruminantes

Culturas microbianas vivas dos fungos exógenos *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae* e os seus respectivos extratos têm sido utilizados como suplementos alimentares na dieta dos animais. Esses aditivos microbianos podem melhorar a produtividade de ruminantes em aproximadamente 7 a 8% (MARTIN; NISBET, 1992; WALLACE, 1994).

A ação desses microrganismos no ambiente ruminal associa-se ao aumento da ingestão de matéria seca, sendo proporcionada por uma elevação significativa na taxa de degradação da fibra, especialmente em dietas ricas em concentrado. Há aumento expressivo no número total de bactérias anaeróbias e, entre elas, as celulolíticas e as utilizadoras de lactato. Tem sido observada maior estabilidade no ambiente ruminal, reduzindo-se variações de pH, de amônia e de ácidos graxos voláteis ao longo do dia (WALLACE, 1994).

Recente pesquisa indicou que a suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* em dieta de vacas lactantes sob estresse por calor ocasionou incremento na produção de leite e teores mais elevados de proteína, sólidos não gordurosos e lactose do leite (BRUNO *et al.*, 2009).

Poucos estudos na literatura avaliaram o efeito da administração de culturas com fungos da microbiota autóctone do rúmen na dieta dos bovinos. A adição de culturas viáveis de *P. communis*, um filtrado de sua cultura ou seu extrato autoclavado aumentou a produção de gás, a digestão da celulose, o número total de bactérias, de bactérias celulolíticas e de fungos anaeróbios no rúmen. Observou-se o aumento da atividade das enzimas carboximetilcelulase e xilanase, quando comparado com sistemas fermentativos controles não suplementados. A adição de produtos celulares do fungo, presentes nos filtrados e nos extratos autoclavados, demonstrou ser favorável ao crescimento de culturas mistas de microrganismos ruminais (LEE; CHENG, 2000).

A adição direta de *P. communis* no rúmen de ovinos melhorou a digestibilidade de nutrientes e a retenção de nitrogênio, aumentou o número de bactérias e fungos e, conseqüentemente, incrementou a produção de ácidos graxos voláteis (LEE; CHENG, 2000).

O efeito de um protuto comercial contendo *S. cerevisiae* foi avaliado, em função da colonização microbiana do rúmen de cordeiros recém-nascidos. Foi constatado que o aditivo tende a estimular o crescimento de bactérias celulolíticas. O estabelecimento de protozoários também ocorreu mais cedo no rúmen de cordeiros recebendo probiótico, diariamente. Durante a primeira semana de nascimento, os animais passaram a ingerir alimentos sólidos e os parâmetros físico-químicos e fermentativos foram alterados no rúmen de cordeiros que tinham recebido levedura, sugerindo processos de fermentação mais eficientes. Esses resultados representam bons argumentos para sugerir que a suplementação com aditivos microbianos pode ser capaz de acelerar a funcionalidade ruminal ou melhorar a estabilidade microbiana do rúmen em animais jovens (CHAUCHEYRAS-DURAND; FONTY, 2002).

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO SUCO RUMINAL DE VACAS, DE NOVILHOS E DE BEZERROS DE CORTE ALIMENTADOS COM PASTAGENS TROPICAIS NO PERÍODO SECO

RESUMO

Objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar as características do fluido ruminal e a micobiota do rúmen de três categorias de bovinos de corte criados extensivamente em pastagens lignificadas no Norte de Minas Gerais. Foram amostrados 50 novilhos, 50 vacas e 50 bezerros criados em pastagens tropicais lignificadas. O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado. Imediatamente após a coleta foram avaliadas características físico-químicas do fluido ruminal. Realizou-se exame micromorfológico do suco do rúmen, bem como exame direto de fungos anaeróbios estritos e cultivo, quantificação, isolamento e identificação de fungos aeróbios do rúmen. Os fluidos de todos os animais amostrados apresentaram-se aromáticos, espessos e com coloração castanha esverdeada. No exame direto, fungos anaeróbios do rúmen, monocêntricos e policêntricos foram detectados em proporções semelhantes ($P>0,05$) no rúmen de vacas e novilhos criados em pastagens tropicais no período seco. Entretanto estruturas desses microrganismos não foram identificadas em nenhuma das amostras provenientes de bezerros. A média de unidades formadoras de colônia de fungos aeróbios filamentosos por mL de líquido ruminal proveniente de vacas foi significativamente maior ($P<0,05$). Após microcultivo, o gênero *Aspergillus* foi o mais frequentemente identificado entre os isolados obtidos no cultivo de amostras provenientes das três categorias avaliadas.

Palavras-chave: Pecuária de corte. *Brachiaria* spp.. Fungos do rúmen.
Lignina. Micobiota.

CHAPTER 2 - PHYSICAL CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF RUMINAL JUICE OF COWS, CALVES AND STEERS FED WITH TROPICAL PASTURES THE DRY PERIOD

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the characteristics of rumen fluid and rumen mycobiota of three categories of beef cattle raised extensively in lignified pasture in the North of Minas Gerais. Were sampled 50 bulls, 50 cows and 50 calves raised in lignified tropical pastures. The delineation of the experiment was completely randomized. Immediately after the collection were evaluated physical and chemical characteristics of the ruminal fluid. Micromorphological examination was carried out of rumen juice, as well as direct examination of strict anaerobes fungi and culture, quantification, isolation and identification of aerobic fungi in the rumen. The fluids of all animals studied showed aromatic, thick with greenish brown coloration. On direct examination, anaerobic fungi of the rumen, monocentric and polycentric were detected in similar proportions ($P > 0.05$) in the rumen of cows and calves raised in tropical pastures during the dry season. However, structures of these microorganisms were not identified for any of the samples from calves. The average colony-forming units of aerobic filamentous by ml of ruminal fluid from cows was significantly higher ($P < 0.05$). After microculture, the gender *Aspergillus* was the most frequently identified among the isolates obtained in the cultivation of samples from the three categories assessed.

Keywords: Beef cattle. *Brachiaria* spp.. Fungi of the rumen. Lignin. Mycobiota.

1 INTRODUÇÃO

Em diferentes países, tem-se caracterizado a microbiota ruminal e registrado a importância de microrganismos na digestão, no equilíbrio do ecossistema ruminal e na saúde dos ruminantes (OYELEKE; OKUSANMI, 2008; SUNDSET *et al.*, 2009). Contudo são poucos os relatos na literatura científica sobre o isolamento e a identificação das populações microbianas presentes em animais criados sob condições extensivas, em pastagens tropicais com baixos valores nutricionais e frequentemente lignificadas.

Em regiões de clima semiárido, observa-se a escassez de forrageiras de boa qualidade ao longo de grande parte do ano. A quantidade de alimento disponível é comprometida, assim como a qualidade das pastagens persistentes à seca. A redução de digestibilidade dos tecidos vegetais ocorre por causa do processo fisiológico de lignificação da parede celular (DANTAS, 2006; CARVALHO; PIRES, 2008).

As pastagens tropicais, como as encontradas no Norte de Minas Gerais, apresentam-se lignificadas e com menor degradabilidade ruminal na maior parte do ano, limitando o aproveitamento de nutrientes pelos ruminantes, reduzindo o desempenho animal, principalmente no período seco.

Sabe-se que os fungos do rúmen possuem a surpreendente capacidade de degradar polímeros de carboidratos em tecidos lignificados (FONTY; GOUET, 1994). A habilidade de colonizar fragmentos vegetais por esses microrganismos pode ser observada em microscopia eletrônica e a atividade celulolítica e hemicelulolítica é comprovada *in vitro* (GRENET *et al.*, 1989).

Assim, a caracterização da microbiota ruminal de diferentes categorias de animais criados extensivamente em pastagens lignificadas e que apresentam bom desempenho em ganho de peso, poderá permitir a seleção de isolados fúngicos com produção superior de enzimas importantes na degradação da parede celular vegetal.

Em futuros estudos, isolados fúngicos com tais características e adaptados às condições tropicais poderão ser suplementados como probióticos para bezerros, principalmente após o desmame, e para as demais categorias de bovinos antes do período da seca. Essa suplementação poderá reduzir o período de adaptação para digestão de forragens de baixos valores nutricionais, aumentando a produtividade desses animais. Objetivou-se, com a presente pesquisa, avaliar as características do fluido ruminal e a micobiota do rúmen de três categorias de bovinos de corte criados extensivamente em pastagens lignificadas no Norte de Minas Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

A amostragem desse estudo foi constituída por 150 bovinos Nelores mestiços, sendo 50 vacas, 50 novilhos e 50 bezerros provenientes de propriedades do Norte do Estado de Minas Gerais e criados em sistema extensivo em pastagem de *Brachiaria* spp..

Os bezerros apresentavam entre seis a oito meses de idade e a análise das arcadas dentárias indicou que os novilhos apresentavam 24 a 40 meses de idade e as vacas possuíam idade superior a quatro anos.

A região do presente estudo localiza-se aproximadamente a 16°51' de latitude e 44°55' de longitude, apresenta temperatura média anual de 24,2°C, clima quente e seco e período de estiagem de abril a outubro. As propriedades de origem dos animais pertencem aos municípios de Montes Claros e Coração de Jesus. Os proprietários relataram que os animais eram suplementados somente com mistura mineral para gado de corte, de acordo com a categoria.

As coletas do suco do rúmen ocorreram entre o final de março e início de novembro dos anos de 2006 a 2010, correspondendo ao período seco da região. Durante esses anos, o índice pluviométrico médio, para o período amostrado nessa região, foi de 136,9 mm (dado obtido no 5° Distrito do

Instituto Nacional de Meteorologia - INMET, 2011).

Amostras de *Brachiaria* spp. provenientes de propriedades rurais dos municípios de Montes Claros e de Coração de Jesus foram coletadas simulando o hábito de pastejo dos animais criados sob essas condições. Posteriormente, essas amostras foram congeladas e enviadas para o Laboratório de Nutrição Animal da Escola de Veterinária da UFMG, para a realização das análises bromatológicas (AOAC, 2005). A composição nutricional das amostras de pastagens encontra-se descrita na TAB. 1.

TABELA 1

Composição bromatológica de forragens do gênero *Brachiaria* provenientes de propriedades rurais dos municípios de Montes Claros e de Coração de Jesus fornecidas aos animais desse experimento

Parâmetros	Montes Claros	Coração de Jesus
MS (% na MN)	67,75	54,65
FDN (% na MS)	74,42	80,18
FDA (% na MS)	39,20	45,93
Lignina (% na MS)	10,37	9,01
PB (% na MS)	2,61	5,51
EE (% na MS)	1,71	1,17
Minerais (% na MS)	8,68	5,70

Notas: MS: matéria seca; MN: matéria natural; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo.

2.2 Procedimentos de coleta

As coletas foram realizadas no período de 8:00 às 11:00 horas da manhã. Após prévio jejum, os bezerros foram imobilizados em brete de contenção e na parte ventral do abdômen esquerdo dos animais, abaixo da fossa paralombar e cranialmente à articulação do joelho, com aproximadamente cinco cm², foram realizadas a tricotomia e a assepsia, com solução de Polivinilpirrolidona-Iodo (Iodo-PVP) (1%) (DIRKSEN, 1993). Foram puncionados aproximadamente 15 ml de fluido ruminal, com o auxílio de cateter humano (Solidor®, 14,2, Bio Med health Care Products, Haryana - Índia), acoplado a seringas estéreis.

A punção ruminal nos novilhos e nas vacas, utilizando essa metodologia, mostrou-se ineficiente, uma vez que esses bovinos apresentavam maior espessura da parede abdominal. Por isso, amostras dos líquidos ruminais desses animais foram obtidas em abatedouro com inspeção municipal do Distrito de Montes Claros. Após jejum de 12 a 18 horas, esses bovinos foram abatidos por concussão cerebral e sangria. As amostras foram obtidas imediatamente após o abate, por incisão do saco ventral do rúmen e coleta de aproximadamente 15 ml de fluido, com o auxílio de pipetas estéreis, acopladas a peras de borrachas.

Todas as amostras foram transportadas em caixas isotérmicas e armazenadas por no máximo uma hora em tubos de ensaio vedados e estéreis. Todos os procedimentos realizados foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, pelo protocolo nº 156/05.

2.3 Exames macroscópicos e físico-químicos do fluido ruminal

A análise macroscópica do líquido coletado foi realizada imediatamente após a coleta, em um tubo de vidro contendo cinco ml do suco amostrado. Foram avaliados cor, odor e viscosidade (DIRKSEN, 1993).

Para avaliação da atividade microbiana no rúmen, utilizou-se o teste de redução do azul de metileno na concentração 0,03% (potencial redox). O pH

do líquido ruminal foi estimado, utilizando-se um potenciômetro digital (DIRKSEN, 1993).

2.4 Exames microbiológicos

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microscopia do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.

2.4.1 Exames diretos para detecção de bactérias e leveduras

As características micromorfológicas e tintoriais dos grupos bacterianos e leveduriformes predominantes no líquido coletado foram observadas após a realização de esfregaços secos, fixados e corados em lâmina de microscopia pelo método de Gram (DIRKSEN, 1993).

2.4.2 Exame direto para detecção de fungos anaeróbios ruminais

Após a coleta, dois mL do conteúdo ruminal foram recolhidos para a clarificação e transferidos para tubos de ensaio 15 x 2,5 cm, contendo 15 mL de solução de KOH a 10%. Esses tubos foram incubados durante uma hora em banho maria a 90°C. O sobrenadante foi removido e os resíduos neutralizados com 10mL da solução de HCL 0,02N, durante um a dois minutos. Após desprezar a solução ácida, os resíduos foram transferidos para tubos contendo seis mL da solução de azul de metileno a 0,05% e lactoglicerol, sendo incubados a 90°C, durante cinco minutos. Após desprezar o sobrenadante, o precipitado foi acondicionado em placa de petri, juntamente com 15 mL de lactoglicerol. O conteúdo foi inicialmente pesquisado em microscópio estereoscópico com o aumento de 400X. As partículas demonstrando a presença de estruturas de esporângios, hifas e rizoides de fungos foram transferidas e montadas em lâminas com azul de metileno. Posteriormente, as mesmas foram examinadas sob a luz da microscopia óptica, com o aumento de 1000 vezes (CHAUDHRY, 2000).

2.4.3 Cultivo, quantificação, isolamento e identificação de fungos micelianos e leveduras

Foi realizado o cultivo para avaliar a positividade de fungos micelianos e leveduras no rúmen para 20 novilhos, 50 vacas e 50 bezerros, totalizando 120 exames. O número de novilhos e vacas foi inferior em algumas etapas deste estudo uma vez que as amostragens iniciais não foram computadas, pois os procedimentos metodológicos estavam em fase de padronização.

Utilizou-se um *swab* estéril para inocular o suco ruminal em placas de petri (90 x150mm) contendo meio Ágar Sabouraud (Acumedia® Manufactures, Lansing, Michigan - EUA), acrescido de Cloranfenicol (150 mg/l). Após a inoculação por estriação, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e monitoradas para o crescimento de colônias fúngicas por até 21 dias (LACAZ *et al.*, 2002).

Foi realizado o cultivo para mensurar a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos micelianos e leveduras por ml de fluido no rúmen de 20 novilhos, 37 vacas e 50 bezerros. Para determinar a quantificação de fungos anaeróbios facultativos no suco ruminal, foram realizadas diluições decimais seriadas do líquido ruminal, em tubos contendo nove ml de solução salina estéril. Após cada diluição, os tubos foram homogeneizados durante três minutos e alíquotas de 100 microlitros das diluições decimais foram inoculadas em placas estéreis contendo o meio descrito acima. Os inóculos foram homogeneizados com alças de *Drigalski* estéreis (*Spread plate*) e as placas foram incubadas em estufa BOD a 37°C e monitoradas para o crescimento de colônias fúngicas por até 21 dias (KURTZMAN; FELL, 1998; LACAZ *et al.*, 2002).

Os isolados fúngicos foram previamente selecionados de acordo com as características de morfotipologia, de forma que um representante de cada morfotipo seguiu para o processo de identificação dos gêneros de fungos filamentosos. Foi realizado o microcultivo de 129 isolados e as características micromorfológicas, evidenciadas ao microscópio óptico, foram associadas àquelas descritas para fungos de interesse biotecnológico e médico-

veterinário (LACAZ *et al.*, 2002).

As leveduras obtidas em cultivo em meio Ágar Sabouraud foram agrupadas por testes micromorfológicos e bioquímicos, com avaliação da capacidade fermentativa e assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (glicose, galactose, L-sorbose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melezitose, inulina, amido solúvel, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-ramnose, etanol, glicerol, eritritol, adonitol, galactitol, D-manitol, D-glucitol, salicina, DL- lactato, succinato, citrato, m-inositol, metanol, hexadecano, xylitol, gluconato, isopropanol, etilacetato, acetona, N-acetilglucosamina, glicosamina, lisina, carbonato, nitrito, nitrato, 10% NaCl, ácido acético, ciclohexamida), segundo os procedimentos presentes em Kurtzman e Fell (1998).

2.5 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Após a análise exploratória, os dados obtidos da quantificação das colônias filamentosos foram transformados para $\log_{10}(X+10)$ e as médias foram comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, com nível de significância de 5%. Já as médias de quantificação de fungos leveduriformes, que não apresentaram distribuição normal, foram comparadas pelo teste não paramétrico de *Kruscall-Wallis* (5%). As taxas de positivities de fungos encontrados foram avaliadas, utilizando-se o teste do Qui-quadrado, considerando os valores de $P < 0,05$ (SAMPAIO, 1998).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Exames macroscópicos e físico-químicos do fluido ruminal

As amostras de líquidos ruminiais de todos os animais coletados apresentaram coloração castanho-esverdeada, viscosidade levemente espessa e odor aromático. Segundo Dirksen (1993), o suco ruminal com essas características apresentaria uma microbiota levemente ativa.

A redução do azul de metileno foi maior que seis minutos em 62%, 66% e 60% dos novilhos, das vacas e dos bezerras, respectivamente, o que indicou uma baixa atividade da microbiota ruminal para a maioria dos animais. A redução da atividade microbiana no ambiente ruminal pode ter ocorrido em função da dieta fornecida aos bovinos, que conforme composição bromatológica (TAB. 1), mostra-se pobre em proteína e NDT e com alto teor de lignina (DIRKSEN, 1993).

Estudos mostram que a dieta fornecida para os ruminantes influencia, diretamente, o potencial redox. Em conformidade com Rosenberg (1983), uma dieta com níveis elevados de concentrado resulta em um tempo de redução de apenas um minuto e uma ração constituída exclusivamente de feno pode levar a um tempo de redução de três a seis minutos. Por outro lado, o tempo de redução do azul de metileno prolonga-se para até mais de 15 minutos na inatividade simples da microbiota, em animais alimentados com dietas pobres em energia e proteína, ou em bovinos com inapetência prolongada. Além disso, o tempo de jejum aplicado para os animais poderia contribuir para elevar o tempo de redução do azul de metileno (DIRKSEN, 1993).

As análises indicaram que as médias de pH das diferentes categorias avaliadas não diferiram entre si ($P>0,05$) (TAB. 2). As médias de pH para todas as categorias avaliadas estão dentro ou próximas dos valores normais, segundo Dirksen (1993). O valor do pH do conteúdo ruminal oscila entre 5,5 e 7,4, de acordo com a alimentação administrada e o intervalo de tempo da última alimentação. Esse autor relata, ainda, que o aumento do valor do pH pode ocorrer em casos de jejum de mais de 24 horas ou quando a microbiota for alterada por outros motivos, como na intoxicação por ureia ou em processos de putrefação, que resultam em acentuada alcalose ruminal.

TABELA 2

Médias de pH ruminal das categorias: novilhos, vacas e bezerros criados em pastagens tropicais no Norte de Minas Gerais

Animais	Médias
Bezerros	7,41 a
Novilhos	7,43 a
Vacas	7,25 a

Notas: Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ($P > 0,05$). CV= 5,72%.

O ponto ótimo da digestão da fibra é dado quando valores de pH se encontram entre 6,7 e 7,1. Em situações em que o pH atinge níveis inferiores a 6,2, ocorre redução na digestibilidade da fibra, já que os microrganismos celulolíticos são sensíveis a baixos valores de pH (ORSKOV, 1995).

3.2 Análises microbiológicas

3.2.1 Exames diretos

Os resultados obtidos a partir dos espécimes provenientes das diferentes categorias avaliadas indicaram a presença de bactérias Gram positivas (+) e Gram negativas, em forma de bastonetes, cocos e cocobastonetes, sendo os bastonetes Gram negativos (+++) encontrados em maior proporção. Kamra (2005) admite que a maioria das bactérias ruminais é Gram negativa, porém o número de bactérias Gram positivas tende a se elevar em dietas com altos teores de energia na ração. Observou-se, também, a presença de leveduras (++) com hifas e pseudohifas, em formato oval e retangular. Para todas as amostras visualizadas, foi observada grande diversidade nas células microbianas.

Esses dados sugerem que, baseado na análise direta dos esfregaços,

o perfil da população de bactérias e de leveduras no rúmen de vacas, de novilhos e de bezerros alimentados com *Brachiaria* spp., não difere entre si, sendo observado o predomínio das bactérias Gram negativas, e expressiva diversidade microbiana. Segundo Kamra (2005), o ecossistema microbiano ruminal é complexo e formado por diferentes grupos, que vivem em relação simbiótica para bioconversão da celulose em ácidos graxos voláteis, que são fontes de energia para os ruminantes, evidenciando, dessa forma, a importância da diversidade microbiana no rúmen.

Após o exame micológico direto com Hidróxido de Potássio a 10%, foi observada a presença de estruturas fúngicas típicas de fungos anaeróbios do rúmen em 60% das amostras de 30 novilhos. Fungos policêntricos, como os dos gêneros *Orpinomyces* e *Anaeromyces* spp., foram detectados em 34% das amostras provenientes desses novilhos. Fungos monocêntricos (FIG. 1), como os do gênero *Neocallimastix* spp., foram detectados em 46 % (23) das amostras desses mesmos animais (TAB. 3). Não houve diferença significativa na taxa de detecção de monocêntricos e policêntricos ($P > 0,05$). Os resultados indicaram a presença concomitante de fungos monocêntricos e policêntricos para amostras de dez novilhos em pastagens tropicais, indicando a participação conjunta desses dois grupos fúngicos.

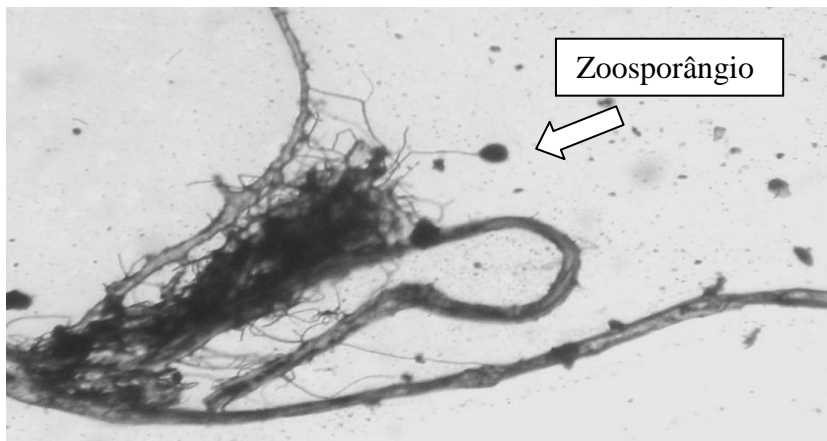


FIGURA 1 – Microscopia de fungo monocêntrico anaeróbico estrito do rúmen de novilho de corte mantido em pastagem tropical lignificada (Objetiva - 40X)
Fonte: Abrão *et al.* (2010).

TABELA 3

Detecção de fungos anaeróbios estritos de rúmen de vacas, novilhos e bezerros de corte criados em pastagens tropicais

Categorias	n	Monocêntricos		Policêntricos	
		positivos	%	positivos	%
Novilhos	50	23Aa	46	17Aa	34
Vacas	50	5Ba	10	3Ba	6
Bezerros	50	0Ba	0	0Ba	0

Notas: Letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado ($P < 0,05$). Letras minúsculas iguais na linha são semelhantes pelo teste de Qui-quadrado ($P > 0,05$).

Fungos anaeróbios do rúmen portadores de um único zoosporângio foram observados em cinco amostras (10%) provenientes de vacas de corte criadas em pastagens tropicais. Contudo estruturas fúngicas compatíveis com fungos policêntricos foram detectadas em três amostras (6%). Não houve diferença significativa na taxa de detecção de monocêntricos e de policêntricos ($P > 0,05$). Dois animais apresentaram ambos morfotipos. Nesta presente pesquisa, não foram detectados fungos anaeróbios ruminais em amostras obtidas de bezerros de corte criados extensivamente (TAB. 3).

As diferenças observadas podem ter ocorrido em função das categorias avaliadas, que poderiam apresentar maior ou menor estabilidade do ambiente ruminal, quando comparadas entre si. Sabe-se que os bezerros apresentam menor estabilidade do ambiente ruminal (CUNNINGHAM, 2008; RUIZ-LACAZ *et al.*, 1992), o que poderia não ter favorecido ainda a colonização dos fungos anaeróbios do rúmen.

Outro fator relevante é a possibilidade de ocorrência de “falsos negativos” no exame direto, uma vez que somente uma pequena parte do fluido ruminal é amostrada nessa técnica. A técnica de detecção de fungos ruminais, descrita por Chaudhry (2000) e utilizada nesse estudo, mostrou-se

prática e relativamente simples e pode ser utilizada como importante ferramenta para avaliar a presença desses microrganismos nos mais diferentes estudos de prevalência e ensaios de digestibilidade para ruminantes. Entretanto, apesar dessa metodologia ser bastante precisa quando há animais positivos, a mesma pode apresentar baixa acurácia para fornecer afirmativas sobre ausência de fungos no ecossistema microbiano ruminal.

Nesta pesquisa, esperava-se encontrar fungos anaeróbios em todos os grupos avaliados, uma vez que ambos estavam recebendo forragens com alta proporção de fibras, com lignina e composição nutricional semelhante. Arcuri e Mantovani (2006), em recente revisão, respaldam a importância desses microrganismos no consumo e na digestão de forragens de baixa qualidade para ruminantes.

Thareja *et al.* (2006) avaliaram o potencial de fungos anaeróbios provenientes de caprinos e ovinos para a degradação de fibras vegetais. Esta pesquisa encontrou resultados semelhantes aos de Thareja *et al.* (2006), os quais observaram a presença concomitante dos dois tipos de fungos. Foram identificadas amostras pertencentes aos gêneros *Anaeromyces*, *Orpinomyces*, *Piromyces* e *Neocallimastix*. Isolados desse último gênero demonstraram maior atividade *in vitro* de degradação de matéria seca e fibra em detergente ácido (THAREJA *et al.*, 2006).

3.2.2 Cultivos microbianos de fungos aeróbios

A positividade de colônias de fungos micelianos foi significativamente maior para vacas e bezerros ($P < 0,05$). Bezerros apresentam menor ocorrência de leveduras no rúmen, quando comparados às demais categorias (TAB. 4). Futuras investigações poderão elucidar as diferenças de ocorrência desses microrganismos observadas para as categorias avaliadas.

TABELA 4

Taxas de detecção de fungos aeróbios no rúmen de novilhos, de vacas e de bezerros de corte criados extensivamente em pastagens lignificadas

Categorias	n	<u>filamentosos</u>		<u>Leveduriformes</u>	
		positivos	%	positivos	%
Novilhos	20	17 b	85	5 a	25
Vacas	50	50 a	100	11 a	22
Bezerros	50	49 a	98	2 b	4

Nota: Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste não paramétrico de Qui-quadrado ($P < 0,05$).

Na quantificação, a análise dos dados obtidos demonstrou que a média de UFC de fungos micelianos/ml de líquido ruminal proveniente das vacas foi significativamente maior que a de bezerros. A população desses microrganismos foi significativamente menor para os novilhos ($P < 0,05$) (TAB. 5).

TABELA 5

Médias de unidades formadoras de colônia de fungos por ml de suco ruminal de diferentes categorias de bovinos de corte criados em pastagens tropicais no período seco

Categorias	Filamentosos	Leveduriformes
Vacas	$1,4 \times 10^4$ a	$1,1 \times 10^3$ A
Bezerros	3×10^3 b	4×10^1 B
Novilhos	6×10^2 c	2×10^1 B

Notas: Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste não paramétrico de *Kruscall-Wallis* ($P < 0,05$).

As diferenças observadas na contagem de fungos aeróbios poderiam ser elucidadas pelas diversas interações microbianas existentes no ecossistema ruminal de cada categoria. Dessa forma, a microbiota autóctone do rúmen e as condições do ambiente ruminal poderiam ter selecionado e favorecido uma maior população desses fungos para o grupo de vacas avaliadas. As interações microbianas podem ser estabelecidas por diferentes mecanismos. Alguns microrganismos ruminais dependem de outros para fornecer nutrientes essenciais específicos. Por outro lado, outros microrganismos podem secretar substâncias antagonistas que limitam o crescimento de outras espécies ou cepas (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A TAB. 6 ilustra a distribuição de gêneros de fungos micelianos isolados do rúmen de bovinos de corte, em função das três categorias avaliadas nesta pesquisa. Pôde-se observar menor diversidade na população de fungos filamentosos aeróbios no rúmen de novilhos de corte, uma vez que foram observados apenas dois gêneros.

TABELA 6

Distribuição dos gêneros de fungos, identificados por técnica de microcultivo, isolados do conteúdo ruminal de vacas, de novilhos e de bezerros de corte alimentados com *Brachiaria* spp., durante o período seco do ano

Gêneros	Vacas	Novilhos	Bezerros
<i>Aspergillus</i>	20*	13*	37*
<i>Penicillium</i>	1	0	2
<i>Onychocola</i>	11	2	6
<i>Trichophyton</i>	11	0	4
<i>Paecilomyces</i>	1	0	13
<i>Malbranchea</i>	0	0	1
<i>Fusarium</i>	0	0	1
<i>Rhizophus</i>	1	0	0
<i>Acremonium</i>	0	0	1
<i>Micélia isterina</i>	1	2	2
Total	45	17	67

Nota: *Gêneros fúngicos significativamente mais frequentes quando comparados pelo teste não paramétrico de Qui-quadrado, a 5% de significância.

O gênero *Aspergillus* (FIG. 2) predominou entre os isolados identificados e provenientes do rúmen de vacas, de novilhos e de bezerros ($P < 0,05$). Futuras pesquisas devem elucidar a maior ocorrência desse gênero no ambiente ruminal de bovinos de cortes, criados em pastagens tropicais, durante o período de estiagem. Entretanto a predominância desse fungo poderia ser justificada pela versatilidade e eficiência em catabolizar fontes de carbono solúveis tão bem quanto polímeros complexos conforme reportado por Flipphi *et al.* (2009).

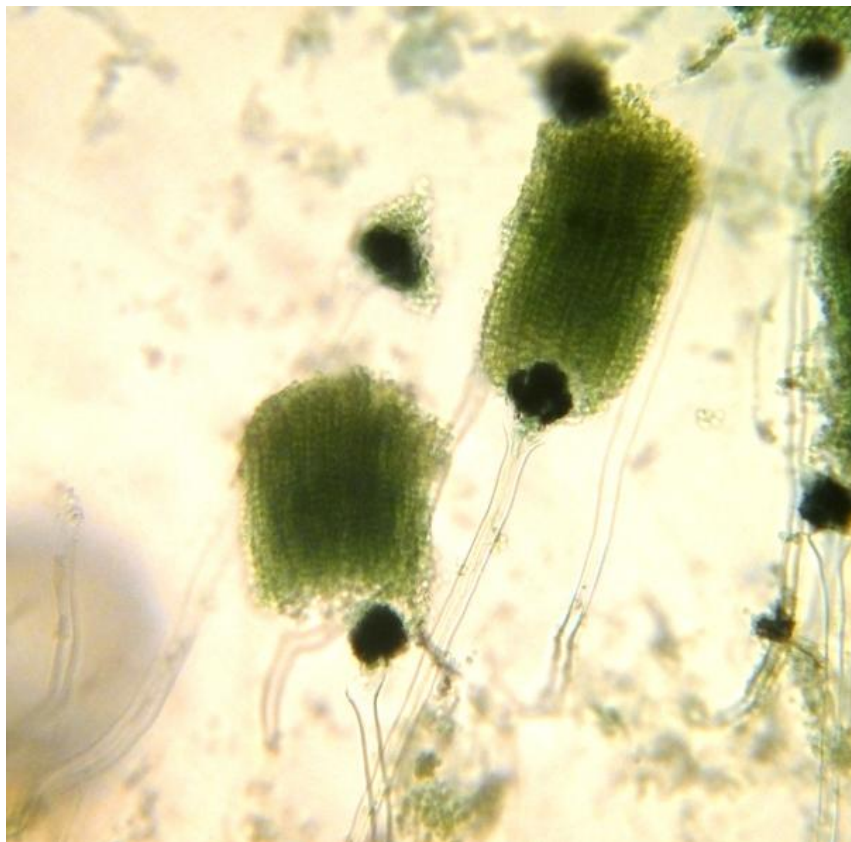


FIGURA 2 – Microscopia de *Aspergillus* spp. isolado do rúmen de novilho de corte (Objetiva - 40X)

Fonte: Arquivo da pesquisa, 2011.

3.2.3 Caracterização de leveduras do rúmen

Foram reisolados e caracterizados onze, cinco e duas amostras de leveduras do rúmen de vacas, de novilhos e de bezerros, respectivamente. O perfil de utilização das principais fontes de carbono e nitrogênio desses isolados está descrito na TAB. 7.

TABELA 7

Perfil catabólico de leveduras provenientes do rúmen de novilhos, de vacas e de bezerros de corte criados em pastagens tropicais no semiárido

Fonte de Carbono e Nitrogênio	Perfis bioquímicos de leveduras		
	Novilhos	Vacas	Bezerros
Galactose	1; 2	5; 6; 7	7
Maltose	1; 2	5; 6; 7	7
Cellobiose	1; 2	5; 6; 7	7
Lactose	1; 2	5; 6; 7	7
Amido solúvel	2	6; 7	7
D-xylose	1; 3	5; 6; 7	7
Etanol	3	5; 7; 8; 9	7; 10
Glicerol	1	5; 7; 8; 9	7; 10
Lactato	2; 3	5; 6; 7; 8; 9	7; 10
Succinato	1; 2; 3	7; 8; 9	7; 10
Metanol	1; 2; 3	5; 6; 7; 8	7
Nitrito	-	5	-
Nitrato	-	5	-
Lisina	1; 2	5; 6; 7; 8; 9	7; 10
Ácido acético	2; 3	8; 7	7; 10
Carbonato	2; 3; 4	-	-

Nota: números de 1 a 10 indicam a designação dos perfis caracterizados, onde a presença dos números na linha indica as fontes de carbono e nitrogênio utilizadas pelo perfil numérico.

Com base nos resultados obtidos, pôde-se observar a ocorrência de quatro diferentes perfis bioquímicos entre os cinco isolados dos novilhos. Entre as amostras provenientes das vacas, observaram-se cinco perfis distintos, enquanto, entre os isolados de bezerros, verificaram-se dois (TAB. 7).

Dois isolados de leveduras dos novilhos corresponderam ao perfil 4. Esses isolados só utilizaram como substratos glicose, rafinose e carbonato. Entre as amostras provenientes de vacas, duas corresponderam ao perfil 9 e seis ao perfil 8, indicando maior frequência no rúmen de vacas de corte alimentadas com pastagens lignificadas. O perfil 7 foi encontrado em vacas e em bezerros, indicando a possibilidade de ocorrência da mesma espécie ou cepa de levedura no rúmen de vacas e de bezerros de corte.

A capacidade de utilização da celobiose por parte dos isolados provenientes das três categorias de bovinos não permite afirmar que esses microrganismos possuem atividade celulolítica eficiente, já que a celulose é um polímero mais complexo. Bactérias ruminais, como *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola* e *Selenomonas ruminantium*, não possuem a habilidade em degradar a celulose, porém são capazes de degradar a celobiose (GOEUT *et al.*, 1995). Os isolados fúngicos que utilizaram celobiose, observados no presente trabalho, poderão auxiliar no processo fermentativo ruminal e, futuramente, deverão ser avaliados, quanto ao potencial de degradação da celulose.

De acordo com os dados obtidos, pôde-se verificar a ocorrência de espécies que utilizam o lactato e essa característica poderia contribuir na regulação do pH ruminal (GOES *et al.*, 2005). As leveduras que catabolizam o glicerol poderiam ser essenciais na utilização da glicerina, produzida na cadeia do biodiesel. Essa glicerina, em geral, contém cerca de 80% de glicerol, além de água, álcool e sais dissolvidos (VERONESE *et al.*, 2009), podendo ser utilizada na alimentação animal (ABDALLA *et al.*, 2008). Um estudo considera o glicerol como substância glicogênica para dietas de vacas com alta produção de leite. O glicerol melhorou o suprimento de energia e corroborou a prevenção de cetoses (SCHRÖDER; SÜDEKUM, 1999).

A utilização de lactose por essas leveduras no rúmen de bezerros evitaria a disponibilização desse substrato para *Escherichia coli*, agente patogênico que utiliza acetato, glicose e lactose como principais fontes de carbono (KRIEG; HOLT, 1984). A competição pelos mesmos substratos poderia reduzir a ocorrência dessa enterobacteriacea no rúmen de bezerros e, conseqüentemente, reduzir a incidência de diarreias e perdas econômicas

na produção de bovinos de corte e leite.

O perfil 5 de leveduras, provenientes das vacas, apresentou a capacidade de utilização de nitrato, contribuindo para uma possível detoxicação dos animais. Determinados alimentos, como o milho, a aveia, o trigo e a cevada acumulam nitrato, que quando em excesso, pode ser fatal para o animal. O nitrato que entra no rúmen é metabolizado para nitrito e absorvido para o sangue, oxidando as células carreadoras de oxigênio (KAMRA, 2005; OLIVEIRA et al., 2007). Um estudo reporta que cinco grupos de bactérias isoladas de ovinos foram descritas na literatura como adaptadas à utilização de nitrato (ALLISON; REDDY, 1984).

Cunha *et al.* (2009) descrevem a microbiota do rúmen como potencial fonte de enzimas, genes e novos produtos para aplicações industriais. A caracterização bioquímica das leveduras isoladas nesta presente pesquisa corroboram esse potencial, uma vez que se verificou grande diversidade na produção enzimática desses fungos.

Os resultados descritos nesta pesquisa reforçam a importância de futuros estudos da população de leveduras do rúmen, elucidando esse potencial biotecnológico para a produção de ruminantes e também possíveis implicações sanitárias para os animais e para a saúde pública.

4 CONCLUSÃO

A população de fungos do rúmen difere conforme a idade dos bovinos de corte criados em pastagens tropicais. Em exame direto, fungos anaeróbios estritos do rúmen são mais frequentes para novilhos. Vacas apresentam maior população de fungos aeróbios, enquanto que, para os novilhos, a concentração desses microrganismos é significativamente menor. No rúmen de vacas e de bezerros de corte, ocorre maior diversidade de gêneros de fungos filamentos aeróbios. O gênero *Aspergillus* foi o mais frequente entre os isolados de fungos micelianos para as três categorias avaliadas. Leveduras provenientes das vacas apresentam capacidade catabólica para maior diversidade de fontes de carbono e de nitrogênio.

CAPÍTULO 3 - POPULAÇÃO DE FUNGOS E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO FLUIDO RUMINAL DE NOVILHOS E DE CAPRINOS DE CORTE CRIADOS EM PASTAGENS TROPICAIS NO PERÍODO SECO DO ANO

RESUMO

Com o presente trabalho, objetivou-se avaliar a população de fungos no conteúdo ruminal de caprinos e de bovinos criados em pastagens no Norte de Minas Gerais. Foram amostrados 15ml do suco ruminal de 18 caprinos machos mestiços Anglonubianos e de 50 novilhos mestiços Nelore. Foram avaliadas as características físico-químicas e procedido o exame direto, cultivo e quantificação de fungos no líquido ruminal. As amostras avaliadas de todos os animais apresentaram características macroscópicas e físico-químicas compatíveis com as de ruminantes recebendo forragens lignificadas. Em exames diretos, fungos anaeróbios monocêntricos e policêntricos foram detectados em proporções semelhantes no rúmen de novilhos e de caprinos de corte ($P>0,05$). No cultivo de amostras dos novilhos, observou-se a presença de leveduras e de fungos micelianos aeróbios para 25% e 85% dos exames, respectivamente. Entretanto, para os caprinos, leveduras foram obtidas a partir do líquido ruminal de todas as amostras, em concentração média de $3,2 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias por mililitro de suco ruminal, e não foram observados fungos filamentosos. Futuros estudos devem elucidar as diferenças observadas na micobiota do rúmen desses dois ruminantes.

Palavras-chave: Micobiota. Norte de Minas Gerais. Pastagens. Ruminantes. Semiárido. Líquido Ruminal.

CHAPTER 3 - POPULATION OF FUNGI AND PHYSICAL CHEMICAL CHARACTERISTICS OF RUMINAL FLUID OF STEERS AND GOAT CUTTING BRED IN TROPICAL PASTURES IN THE DRY PERIOD OF THE YEAR

ABSTRACT

The present work aimed to evaluate the population of fungi in the rumen content of sheep and cattle raised on pasture in the North of Minas Gerais. Were sampled 15 ml of the ruminal fluid of 18 crossbred male goats Anglonubianos and 50 crossbred Nellore. Were evaluated the physico-chemical characteristics and proceeded direct examination, and culture and quantification of fungi in the ruminal fluid. The samples evaluated in all animals showed macroscopic and physicochemical characteristics compatible with those of ruminants receiving feed lignified. On direct examination, monocentric and polycentric anaerobic fungi were detected in similar proportions in the rumen of calves and goats cutting ($P > 0.05$). In the cultivation of the calves sample it was observed the presence of yeasts and fungi mycelial aerobic to 25% and 85% of exams, respectively. However, for goats, yeasts were obtained from the rumen of all samples, the average concentration of 3.2×10^5 colony forming units per ml ruminal fluid, and were not observed filamentous fungi. Future studies should elucidate the differences observed in the mycobiota of the rumen of these two ruminants.

Keywords: Mycobiota. North of Minas Gerais. Pastures. Ruminants.
Semiarid. Ruminal fluid.

1 INTRODUÇÃO

O rúmen apresenta populações microbianas estáveis e, ao mesmo tempo, dinâmicas, com interações entre fungos, protozoários e bactérias (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Em diferentes regiões do mundo, têm sido isolados fungos na microbiota autóctone do rúmen e registrada a importante participação desses microrganismos na digestão e no equilíbrio do ecossistema ruminal.

Os fungos anaeróbios estritos do rúmen estão envolvidos na degradação de parede celular vegetal lignificada (AKIN, 1987). Maiores populações desses fungos são observadas para animais adultos e que ingerem maior proporção de fibras vegetais (GRENET *et al.*, 1989). A participação de fungos anaeróbios estritos e anaeróbios facultativos na microbiota ruminal de caprinos tem sido pouco respaldada na literatura científica mundial.

Os caprinos são classificados como selecionadores intermediários e apresentam elevada taxa de passagem de alimento pelo trato digestivo. Apesar da menor capacidade para digestão da parede celular, esses ruminantes selecionam e ingerem maior quantidade de alimentos com melhor valor nutricional. Os bovinos são pastejadores obrigatórios e menos seletivos (HOFMANN, 1973).

Poucos estudos têm avaliado as diferenças existentes entre as populações de fungos no conteúdo ruminal dessas espécies de ruminantes. Dessa forma, objetivou-se com a presente pesquisa, avaliar a micobiota ruminal de caprinos e de novilhos de corte criados em região semiárida e alimentados em pastagem tropical no período seco.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Os animais amostrados neste estudo eram provenientes da zona rural do município de Montes Claros e Coração de Jesus, Norte de Minas Gerais, e foram criados em pastagens de *Brachiaria* spp., com composição bromatológica (AOAC, 2005) já descrita na página 24. O detalhamento da localização geográfica e as condições climáticas da região foram descritas no capítulo 2.

2.2 Procedimentos de coleta

Foram coletados 15ml do suco ruminal de 50 novilhos mestiços Nelore, com 24 a 40 meses de idade, diretamente do rúmen, após jejum de 12 a 18 horas, com o auxílio de pipetas estéreis. Nesses bovinos, a coleta foi realizada por incisão do rúmen, imediatamente após o abate dos animais, com a prévia concussão cerebral e sangria em um frigorífico com inspeção municipal, como reportado anteriormente. Os caprinos de corte avaliados (18 animais) eram machos mestiços Anglonubianos e com 18 a 22 meses de idade. A coleta foi realizada no momento da implantação cirúrgica de fístulas ruminais.

Todos os procedimentos com os animais estiveram de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo nº 156/2005. As amostras de suco do rúmen foram transportadas em caixas isotérmicas a 4°C e armazenadas por, no máximo, uma hora em tubos de ensaio vedados e estéreis.

2.3 Exames macroscópicos e físico químicos do suco do rúmen

Nos exames macroscópicos e físico-químicos do líquido, foram avaliados: cor, odor, viscosidade e tempo de redução do azul de metileno, como recomendado por Dirksen (1993). O pH do líquido ruminal foi

mensurado, utilizando-se um potenciômetro digital, imediatamente após a coleta.

2.4 Exames diretos para detecção de bactérias, de leveduras e de fungos anaeróbios estritos do rúmen

As características micromorfológicas e tintoriais dos grupos bacterianos e leveduriformes predominantes no fluido coletado foram observadas após método de coloração de Gram (DIRKSEN, 1993).

O líquido ruminal de todos os animais amostrados foi avaliado, conforme metodologia descrita por Chaudhry (2000). A descrição detalhada dessa metodologia foi anteriormente reportada no capítulo 2.

2.5 Cultivo e quantificação de fungos aeróbios ruminais

Foram realizados o cultivo e a quantificação de fungos micelianos e leveduras presentes no suco do rúmen de 20 novilhos e 18 caprinos criados a pasto, como descrito anteriormente. Provas bioquímicas e micromorfológicas foram realizadas para agrupar e caracterizar as leveduras isoladas (KURTZMAN; FELL, 1998).

2.6 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso. Para comparar as médias de pH entre as duas espécies estudadas, utilizou-se o teste t de *Student*. As taxas de detecção dos fungos foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado. Essas análises foram processadas no pacote estatístico do programa SAEG (Versão 9.1), considerando-se diferenças significativas aquelas com valores de $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises físico-químicas e macroscópicas

As amostras do líquido ruminal apresentaram-se castanhas esverdeadas (FIG.1), levemente espessas e aromáticas, tanto para bovinos quanto para o grupo dos caprinos.



FIGURA 1 – Fluidos ruminais de novilhos e de caprinos de corte criados extensivamente em pastagens tropicais

Fonte: Arquivo da pesquisa, 2010.

As características macroscópicas dos sucos encontrados neste estudo podem ter ocorrido em função da dieta (FIG. 2) a que os animais estavam submetidos. Sabe-se que um animal a pasto pode apresentar suco do rúmen com coloração variando de verde oliva a castanho esverdeado, dependendo da qualidade da forragem (DIRKSEN, 1993). Como os animais desta pesquisa alimentaram-se de pastagens lignificadas, o fluido ruminal apresentou-se com coloração mais escura.



FIGURA 2 - Pasto de *Brachiaria brizantha* durante o mês de setembro/2010 em uma propriedade rural da região norte do estado de Minas Gerais

Fonte: Arquivo da pesquisa, 2010.

Os novilhos apresentaram média de pH do líquido ruminal correspondendo a 7,43, que foi significativamente superior àquela observada para os caprinos (6,85), com coeficiente de variação igual a 6,65.

O potencial de redução do azul de metileno entre as espécies estudadas também diferiu significativamente. Apesar da forragem de baixa qualidade ofertada aos animais deste estudo, caprinos apresentaram uma microbiota ruminal ativa, uma vez que todos os animais deste tratamento apresentaram um tempo de redução do azul de metileno entre três e seis minutos. Sessenta e dois por cento dos novilhos amostrados apresentaram potencial redox maior que seis minutos, indicando baixa atividade da população microbiana no rúmen (DIRKSEN, 1993).

Esses dados sugerem que, mesmo com uma dieta restrita de nutrientes, a população microbiana de caprinos conseguiu se estabelecer melhor que a de bovinos e manteve melhor atividade. Diferenças fisiológicas das espécies de ruminantes estudadas poderiam influenciar essas alterações das atividades microbianas do rúmen. Conforme reportado por Hofmann

(1973), os caprinos são efetivos selecionadores intermediários e apresentam maior taxa de passagem de alimento pelo trato digestivo. Esses animais selecionam e ingerem alimentos de melhor qualidade, o que poderia estar favorecendo uma comunidade microbiana mais ativa.

3.2 Análises microbiológicas

3.2.1 Exames diretos

As análises das lâminas de amostras do líquido ruminal de todos os caprinos e novilhos avaliados neste experimento indicaram a presença de bactérias Gram positivas (+) e Gram negativas, em forma de bastonetes, cocos e cocobastonetes, sendo os bastonetes Gram negativos (+++) encontrados em maior proporção, leveduras (++) com hifas e pseudohifas, em formato oval e retangular. Para todas as amostras avaliadas, foi observada grande diversidade de células microbianas.

Para o exame direto de fungos anaeróbios do rúmen, estruturas fúngicas foram detectadas em 14 (77,8%) dos 18 caprinos amostrados e em 30 (60,0%) dos 50 novilhos. Esses dados demonstram altas e semelhantes taxas de detecção de estruturas compatíveis com as dos fungos anaeróbios do rúmen.

Foi possível verificar a presença concomitante de fungos monocêntricos e policêntricos para amostras de dez novilhos e de quatro caprinos em pastagens tropicais, indicando a participação conjunta desses dois grupos fúngicos.

Na TAB. 1, observa-se a proporção entre fungos monocêntricos e policêntricos para bovinos e caprinos. A taxa de detecção dos dois morfotipos não diferiu entre os ruminantes avaliados ($P > 0,05$).

TABELA 1

Taxas de detecção de fungos monocêntricos e policêntricos do rúmen de caprinos e de bovinos de corte criados em pastagens no norte do estado de Minas Gerais, durante o período seco do ano

Tipo de fungo	Bovino			Caprino		
	Detectado	%	Total	Detectado	%	Total
Monocêntrico	23Aa	46	50	9Aa	50	18
Policêntrico	17Aa	34	50	9Aa	50	18

Notas: Valores com letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado ($P>0,05$). Valores com letras minúsculas iguais na linha não diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado ($P>0,05$).

Estudos têm reportado redução significativa da produção de gás *in vitro* e da degradação de alimentos fibrosos na ausência dos fungos anaeróbios do rúmen. Dietas ricas em fibras estimulam o crescimento desses fungos em comparação com dietas contendo alta concentração de grãos (KAMRA, 2005). A alta ocorrência e a presença concomitante de fungos monocêntricos e policêntricos em caprinos e bovinos, observadas neste estudo, poderiam ter sido favorecidas pela dieta fibrosa, disponível nas pastagens do Norte de Minas Gerais no período seco do ano.

Os fungos anaeróbios do rúmen podem assumir fundamental importância na degradação de forragens tropicais na época de estiagem, pois produzem enzimas capazes de acelerar a degradação da celulose e hemicelulose lignificadas (CERDÀ, 2003). Os rizoides desses fungos podem penetrar fibras lignificadas, desestruturar a parede celular e aumentar a área de superfície das partículas de alimentos, favorecendo a colonização de outros microrganismos do rúmen (PAUL *et al.*, 2004).

3.2.2 Cultivo e quantificação de fungos aeróbios

Os resultados dos cultivos micológicos indicaram que fungos micelianos estavam ausentes no rúmen de caprinos. Entretanto, esses ruminantes apresentaram maior ocorrência de cultivos positivos para leveduras (TAB. 2; $P < 0,05$). Futuras pesquisas poderão elucidar essas diferenças observadas para esses dois tipos de fungos.

TABELA 2

Taxas de positividade para o cultivo de fungos aeróbios no rúmen de novilhos e de caprinos de corte criados extensivamente em pastagens lignificadas no Norte de Minas Gerais

Categorias	n	filamentosos		leveduriformes	
		positivos	%	positivos	%
Novilhos	20	17a	85	5 b	25
Caprinos	18	0b	0	18a	100

Nota: Letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado ($P < 0,05$).

Na quantificação, a análise dos dados indicou que a média de UFC de fungos micelianos e leveduras/mℓ de líquido ruminal provenientes dos novilhos foi respectivamente 6×10^2 e 2×10^1 . Entretanto leveduras foram obtidas a partir do líquido ruminal de todos os caprinos amostrados em concentração significativamente maior ($P < 0,05$), com média de $3,2 \times 10^5$ UFC/mℓ.

Até o presente momento, não se sabe o motivo da variação entre a microbiota fúngica de caprinos e de novilhos, já que ambos receberam dietas semelhantes, a coleta do suco do rúmen foi realizada no mesmo período do ano e os animais originaram-se de propriedades rurais de Montes Claros e Coração de Jesus. Esses resultados sugerem que fatores fisiológicos de cada espécie animal poderiam favorecer ou inibir as populações desses dois grupos de fungos. Futuros estudos poderão elucidar se o hábito alimentar mais seletivo dos caprinos, ingerindo forragem de melhor qualidade, favoreceria o crescimento de leveduras.

3.2.3 Caracterização bioquímica de leveduras do rúmen

Foram reisoladas 30 leveduras do rúmen de caprinos e as provas bioquímicas indicaram a ocorrência de dois perfis distintos. Para os novilhos foram avaliados cinco isolados de leveduras e foram observados quatro perfis bioquímicos distintos (TAB. 3).

TABELA 3

Perfil bioquímico de leveduras provenientes do rúmen de novilhos e de caprinos de corte criados em pastagens tropicais no norte de Minas Gerais, durante o período seco do ano

Fonte de Carbono e Nitrogênio	Novilhos	Caprinos
Galactose	1; 2	5; 6
Maltose	1; 2	5; 6
Cellobiose	1; 2	5; 6
Lactose	1; 2	5; 6
Amido solúvel	2	5; 6
D-xylose	1; 3	5; 6
Etanol	3	5; 6
Glicerol	1	5
Lactato	2; 3	5; 6
Succinato	1; 2; 3	5; 6
Metanol	1; 2; 3	5; 6
Nitrito	-	5
Nitrato	-	5
Lisina	1; 2	5; 6
Ácido acético	2; 3	5
Carbonato	2; 3; 4	-

Nota: Números de 1 a 6 indicam a designação dos perfis caracterizados dentro de cada espécie de ruminante.

Duas das cinco leveduras provenientes dos novilhos não utilizaram nenhuma das fontes descritas acima e corresponderam ao perfil 4. Esses microrganismos utilizaram somente rafinose, glicose e carbonato. Entre os 30 isolados provenientes de caprinos, 90% corresponderam ao perfil 5 e apenas 10% foram caracterizados como perfil 6 (TAB. 3).

Apesar da maior ocorrência de leveduras no rúmen de caprinos, a maioria desses microrganismos foi agrupada em um mesmo perfil. Futuras pesquisas permitirão esclarecer o predomínio e o papel desses microrganismos no rúmen de caprinos alimentados com forragens lignificadas. Possivelmente, esses isolados correspondam à mesma espécie leveduriforme. A utilização de técnicas de Biologia Molecular será fundamental para confirmar a identificação específica dessas leveduras.

A celulose é o mais abundante componente da parede celular dos vegetais e, por isso, os microrganismos celulolíticos são fundamentais à nutrição de ruminantes que ingerem dietas à base de forragens (GUIMARÃES-BEELEN et al., 2006). Contudo a capacidade de utilização da celobiose por parte dos isolados provenientes de bovinos e por todos obtidos de caprinos não permite afirmar que esses microrganismos possuem atividade celulolítica eficiente, já que esse composto é um dissacarídeo resultante da hidrólise incompleta da celulose, e essa, um polímero mais complexo. Essa característica fermentativa é verificada em algumas espécies de bactérias ruminais como: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola* e *Selenomonas ruminantium*. Sabe-se que esses microrganismos não possuem a capacidade de degradar a celulose; porém são capazes de degradar a celobiose (GOEUT et al., 1995).

Os isolados fúngicos que utilizaram celobiose, obtidos no presente trabalho, poderão auxiliar no processo fermentativo do rúmen e, futuramente, deverão ser avaliados, quanto ao potencial de degradação da celulose.

A capacidade hemicelulolítica, medida através da atividade de fermentação da xilose, indicou que todos isolados leveduriformes da espécie caprina e dois da espécie bovina são capazes de utilizar essa fonte de carbono para seu o desenvolvimento. Yan et al. (2009) respaldam que xilanases microbianas têm atraído, nos últimos anos, diversas pesquisas, devido ao seu potencial de aplicação em alimentos, em rações animais, em papel e em indústrias de celulose.

Observa-se que grande parte da população leveduriforme do rúmen de caprinos utiliza o nitrito e o nitrato como fonte de nitrogênio (TAB. 3). Esses isolados, que foram caracterizados no perfil 1, poderiam ser fundamentais no sistema de produção em que ruminantes são arraçoados com alto teor desses elementos. Contudo, no ambiente ruminal de novilhos de corte, alimentados com pastagens tropicais lignificadas, não foi observada a presença de leveduras com potencial utilização desses nutrientes.

Pontalti (2011) relata que a intoxicação aguda por nitrito e nitrato pode ocorrer quando os animais se alimentam com plantas com mais de 1% de nitratos ou bebam água com 1500 ppm de nitratos. Porém animais que recebem dietas ricas em carboidratos solúveis apresentam maior tolerância a nitratos e nitritos. Com o aumento da demanda por fontes de nitrogênio, as bactérias convertem o nitrato e o nitrito em amônia e proteína microbiana, tornando-se fonte proteica para o animal (FUKUSHIMA, 1996).

Medeiros *et al.* (2003) descreveram a primeira comprovação de intoxicação por nitratos e nitritos em bovinos no Brasil. As alterações foram associadas ao consumo das forragens *Echinochloa polystachya* (capim-mandante) e *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) cultivadas em região semiárida. Mais recentemente, Romão *et al.* (2011) relataram intoxicação por nitrito em bovinos que pastejaram *Cynodon nlemfuensis* *vr. Nlemfuensis* (grama estrela africana) e apontam como uma das causas o fato dos bovinos não possuírem uma microbiota ruminal adaptada à conversão do nitrito em amônia. Esses relatos corroboram a caracterização bioquímica das leveduras provenientes do rúmen dos novilhos avaliados no presente trabalho, uma vez que os fungos leveduriformes desses ruminantes não foram capazes de utilizar nitrito e nitrato.

4 CONCLUSÃO

Amostras do fluido ruminal de caprinos e de novilhos alimentados com forragens tropicais lignificadas apresentam características macroscópicas semelhantes. Entretanto a microbiota ruminal de caprinos é mais ativa que a de novilhos criados nas mesmas condições.

Fungos anaeróbios monocêntricos e policêntricos ocorrem na mesma proporção no rúmen de caprinos e de novilhos criados em pastagens tropicais no período seco do ano.

A microbiota ruminal aeróbia de caprinos e de novilhos de corte apresenta diferenças na constituição. A espécie caprina possui apenas fungos aeróbios leveduriformes e em maior concentração. A maioria das leveduras presentes no ambiente ruminal de caprinos apresenta o mesmo perfil catabólico, sugerindo o predomínio de uma única espécie ou cepa no ecossistema ruminal desse pequeno ruminante.

CAPÍTULO 4 - PERFIL MICROBIOLÓGICO E MACROSCÓPICO DO CONTEÚDO RUMINAL DE NOVILHOS DE CORTE ALIMENTADOS COM E SEM VOLUMOSO

RESUMO

Em bovinos alimentados com dietas sem volumosos, pode-se alterar o desenvolvimento de fungos e outros microrganismos no ambiente ruminal. Objetivou-se, com o presente estudo avaliar a população de fungos no rúmen de novilhos alimentados com e sem forragem. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo amostrados 50 novilhos criados em pastagens lignificadas e 20 novilhos alimentados somente com concentrado. Imediatamente após a coleta, foram avaliadas características físico-químicas do fluido ruminal. Posteriormente, realizou-se o exame micromorfológico do suco do rúmen, exame direto para detecção de fungos anaeróbios estritos e cultivo, quantificação, identificação de fungos aeróbios. No exame direto, fungos anaeróbios do rúmen, monocêntricos e policêntricos foram detectados em proporções semelhantes ($P > 0,05$) no rúmen de novilhos criados em pastagens tropicais no período seco. Entretanto estruturas desses microrganismos não foram identificadas em nenhuma das amostras provenientes de novilhos alimentados sem volumoso. A média de unidades formadoras de colônia de fungos aeróbios por ml de líquido ruminal proveniente de novilhos confinados foi significativamente maior que dos animais criados em pastagem ($P < 0,05$). Após o microcultivo, o gênero *Aspergillus* foi o mais frequentemente identificado entre os isolados obtidos no cultivo de amostras de ambos grupos de animais.

Palavras-chave: Pecuária de corte. Confinamento. Micobiota ruminal.
Nutrição de ruminantes.

CHAPTER 4 - MICROBIOLOGICAL AND MACROSCOPIC PROFILE OF THE CONTENT OF RUMINAL OF STEERS FED WITH AND WITHOUT BULKY

ABSTRACT

In cattle fed with diets without bulky can alter the development of fungi and other microorganisms in the rumen environment. The objective of this study was to evaluate the population of fungi in the rumen of steers fed with and without forage. The experimental design was completely randomized, 50 steers were randomly bred in lignified pasture and 20 steers fed with concentrate only. Immediately after the collection were evaluated physicochemical characteristics of the ruminal fluid. Later, there was micromorphological examination of the rumen juice, direct examination for the detection of strict anaerobes fungi and cultivation, quantitation, identification of aerobic fungi. On direct examination, anaerobic fungi of the rumen, monocentric and polycentric were detected in similar proportions ($P > 0.05$) in the rumen of calves raised in tropical pastures during the dry season. However, structures of these microorganisms were not identified for any of the samples obtained from steers fed without bulky. The average colony-forming units of aerobic fungi by ml of ruminal fluid from confined calves was significantly higher than that of animals raised on pasture ($P < 0.05$). After microculture, the gender *Aspergillus* was the most frequently identified among the isolates obtained in the cultivation of samples from both groups of animals.

Keywords: Livestock cutting. Confinement. Mycobiota ruminal.
Ruminant nutrition.

1 INTRODUÇÃO

A pecuária é uma das principais atividades econômicas do Brasil. Em 2011, o país apresentou produção de, aproximadamente, nove milhões de toneladas de carne e, atualmente, é o maior exportador de carne bovina, sendo também o segundo maior produtor e consumidor (EH, 2011; FOCUS, 2010; MINERVA, 2011). A alta demanda mundial por proteína animal requer do setor altos índices de produtividade, com novas alternativas de manejo nutricional.

Ruminantes e a microbiota ruminal possuem relação simbiótica que permite a digestão da fibra vegetal. Como os alimentos fibrosos são a base da alimentação dos ruminantes, o ecossistema microbiano passa a assumir fundamental importância (STEWART, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2007). A população microbiana no rúmen está distribuída em grupos de microrganismos, os quais estabelecem entre si diversas interações positivas ou negativas. Essa relação garante a utilização mais eficiente do alimento fornecido e, conseqüentemente, melhor desempenho animal (DEHORITY, 2003; KAMRA, 2005).

Fungos anaeróbios estritos do rúmen são diretamente influenciados pela dieta e frequência da alimentação. Uma pesquisa revelou uma maior população desses microrganismos em animais alimentados seis vezes ao dia, com concentração média de $1,5 \times 10^5$ fungos por grama de conteúdo ruminal (OBISPO; DEHORITY, 2002). Esses fungos são essenciais à digestão de forragens tropicais, pois produzem enzimas capazes de acelerar a degradação da celulose e hemicelulose lignificadas (CERDÀ, 2003). Além da ação enzimática, apresentam função mecânica, pois os rizoides dos fungos podem penetrar fibras lignificadas, desestruturar a parede celular vegetal e aumentar a área de superfície das partículas, o que favorece a ação de outros microrganismos (PAUL *et al.*, 2004).

Poucos estudos reportam a ocorrência de fungos no rúmen de bovinos criados em condições semiáridas, em pastagens tropicais lignificadas. A caracterização da microbiota desses animais, com bom desempenho a campo pode contribuir para a seleção de isolados fúngicos importantes na degradação da parede celular vegetal de forrageiras tropicais.

Pesquisas têm indicado culturas microbianas vivas dos fungos *Aspergillus oryzae* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e seus respectivos extratos como suplementos alimentares na dieta de ruminantes. Esses aditivos microbianos podem melhorar a produtividade de ruminantes em aproximadamente 7 a 8 % (GOES *et al.*, 2005; MARTIN; NISBET, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2008; WALLACE, 1994).

Entretanto bovinos em terminação, frequentemente, são alimentados com alto teor de grãos e pouca fibra. Nessas condições, os mecanismos fisiológicos de homeostase são rompidos, ocorre redução do pH ruminal, alteração da ecologia microbiana e o animal pode ficar mais suscetível a doenças metabólicas e infecciosas (RUSSELL; RYCHLICK, 2001). A influência dessas dietas na população de fungos no trato gastrointestinal (TGI) de ruminantes tem sido pouco respaldada na literatura científica. Dessa forma, objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar a população de fungos no rúmen de novilhos de corte alimentados com ou sem forragens tropicais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

A amostragem desta pesquisa foi constituída por 70 novilhos Nelore mestiços, com 30 a 40 meses de idade, provenientes de propriedades do Norte do Estado de Minas Gerais. Essa região localiza-se a 16°51'38" de latitude e 44°55'00" de longitude, apresenta temperatura média anual de 24,2°C, clima quente e seco, com período de estiagem de abril a outubro.

2.2 Tratamentos e dietas experimentais

O primeiro tratamento foi constituído por 50 novilhos mestiços Nelore criados em sistema extensivo, em pastagens tropicais lignificadas com suplementação mineral. As pastagens em que os animais se encontravam eram do gênero *Brachiaria*. As coletas do suco do rúmen ocorreram entre o final de março e início de novembro, correspondendo ao período seco da região, quando as pastagens encontravam-se mais lignificadas. A composição bromatológica da forragem disponibilizada para esse grupo de animais encontra-se descrita na TAB.1 do capítulo 2.

No segundo tratamento, foram avaliados 20 novilhos mestiços Nelore confinados durante 71 dias, sendo 11 dias para adaptação e 60 dias para período experimental. Antes da execução do experimento, esses animais estavam em pasto de *Brachiaria* spp. com suplementação mineral. Durante o período da pesquisa, receberam somente concentrado peletizado proteico, vitamínico e mineral (15% da dieta) e grãos de milho inteiros (85% da dieta), com dois tratos diários. O consumo médio por animal por dia foi de 8,58kg. O produto comercial, na forma de peletes, era constituído por fosfato bicálcio, farelo de algodão, carbonato de cálcio, casca de soja moída, farelo de soja, sulfato de cálcio, ureia pecuária, monensina sódica e *premix* mineral vitamínico, como reportado pelo fabricante. A amostragem desse grupo de novilhos foi realizada no mês de maio, período de abate dos animais.

A tabela abaixo (TAB. 1) apresenta valores nutricionais da dieta completa fornecida aos novilhos do segundo tratamento, conforme análise realizada no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (AOAC, 2005).

TABELA 1

Composição bromatológica da dieta sem volumoso fornecida para os novilhos durante 71 dias de confinamento

Parâmetros	Dieta completa (milho grão e concentrado peletizado)
MS (% na MN)	90,23
FDN (% na MS)	20,04
FDA (% na MS)	6,22
PB (% na MS)	17,85
EE (% na MS)	3,61
Minerais (% na MS)	8,00

Notas: MS: matéria seca; MN: matéria natural; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo.

2.3 Coleta

Para ambos os grupos, a coleta foi realizada por incisão do saco ventral do rúmen, imediatamente após jejum de 12 a 18 horas e abate dos animais com a prévia concussão cerebral e sangria em abatedouro com inspeção municipal ou federal. Os procedimentos adotados com os animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, por meio do protocolo n° 156/05.

Foram coletados aproximadamente 15mℓ do suco ruminal, com o auxílio de pipetas estéreis. As amostras coletadas foram transportadas em caixas isotérmicas a 4°C e armazenadas até uma hora em tubos de ensaio

vedados e estéreis.

2.4 Análises macroscópicas e físico-químicas

A análise macroscópica do líquido coletado foi realizada imediatamente após a coleta, em um tubo de vidro contendo cinco ml do suco amostrado. Foram avaliados cor, odor, viscosidade e tempo de redução do azul de metileno. O pH foi estimado, utilizando-se um potenciômetro digital (DIRKSEN, 1993).

2.5 Exames microbiológicos

2.5.1 Exames diretos

Para a avaliação micromorfológica dos grupos bacterianos e leveduriformes, foram realizados esfregaços com o auxílio de *swabs*, sendo fixados e corados em lâminas, conforme método de coloração de Gram (DIRKSEN, 1993).

Para a detecção de estruturas fúngicas correspondentes aos fungos anaeróbios estritos do conteúdo ruminal, foi adotada a metodologia de Chaudhry (2000), descrita no capítulo 2 desse trabalho.

2.5.2 Cultivo, quantificação e identificação de fungos aeróbios ruminais

Foi realizado o cultivo para avaliar a positividade de fungos micelianos e leveduras presentes no suco do rúmen de 20 novilhos criados a pasto e 20 novilhos confinados recebendo dieta com alta concentração de grãos e sem volumoso. Utilizou-se um *swab* estéril para inocular o suco ruminal em placas de petri (90 x150mm) contendo meio Ágar Dextrose Sabouraud (Acumedia® Manufactures, Lansing, Michigan - EUA), acrescido de Cloranfenicol (150 mg/l). Após a inoculação por estriação, as placas foram incubadas em estufa a 37° C e monitoradas para o crescimento de colônias fúngicas por até 21 dias (LACAZ *et al.*, 2002).

Para a quantificação de fungos aeróbios presentes no rúmen, foram preparadas diluições decimais seriadas do líquido ruminal. Alíquotas de 100 microlitros foram inoculadas no mesmo meio descrito acima, utilizando-se a técnica *Spread plate*. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa BOD a 37°C e monitoradas para o crescimento de colônias fúngicas por até 21 dias (LACAZ *et al.*, 2002). Após o crescimento microbiano, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) presentes por ml de fluido ruminal.

As colônias de fungos filamentosos desenvolvidas foram agrupadas por morfotipologia e foi procedida a identificação de um representante de cada morfotipo. As colônias isoladas foram identificadas pela técnica de microcultivo (LACAZ *et al.*, 2002).

2.6 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Após a análise exploratória (teste de *Lilliefors* e teste de *Cochran* e *Bartlett*) das variáveis, procedeu-se à transformação dos dados de quantificação de fungos para $\text{Log}_{10}(X+10)$. O teste t de *Student* foi aplicado para comparar as médias entre os grupos. As taxas de positividade entre os exames diretos e o cultivo dos principais gêneros de fungos isolados foram comparadas, utilizando-se o teste do Qui-quadrado (SAMPAIO, 1998). As análises foram processadas no pacote estatístico SAEG® – Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (2007), considerando diferenças significativas aquelas com valores de $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação macroscópica e físico-química do fluido ruminal

Em todos os novilhos alimentados com pastagens tropicais no período da seca observou-se coloração castanho-esverdeada no líquido ruminal coletado. Entretanto, para os animais confinados e alimentados somente com concentrado, observou-se fluido ruminal com coloração cinza leitosa. Dirksen (1993) relata que a cor do suco do rúmen é estabelecida de acordo com a alimentação ofertada ao animal. Animais a pasto apresentam fluido ruminal com coloração mais verde oliva ou castanho-esverdeado. Já o suco do rúmen branco a cinza leitosa sugere acidose ruminal (DIRKSEN, 1993).

Vieira *et al.* (2007), ao avaliarem as características do fluido do rúmen de ovinos Santa Inês, criados extensivamente em Pernambuco, observaram que a estação do ano influenciou diretamente as variáveis físico-químicas do suco. A coloração encontrada nesta pesquisa para o primeiro tratamento corrobora a cor encontrada por esses autores durante o período seco, quando a disponibilidade e qualidade da forragem foram comprometidas.

O odor foi aromático para todas as amostras do primeiro tratamento e levemente ácido para 100% das amostras do segundo. A viscosidade foi levemente espessa para todos os animais do primeiro tratamento. Para todos os novilhos alimentados sem volumoso, o líquido ruminal foi espesso com intensa produção de bolhas de gases, indicando intensa atividade microbiana (DIRKSEN, 1993).

A redução do azul de metileno foi maior que seis minutos para 62% dos animais a pasto e menor que um minuto para o restante deles e para 100% os animais em confinamento. Dietas com níveis elevados de concentrado podem resultar em tempo de redução de apenas um minuto. Por outro lado, o tempo de redução do azul de metileno prolonga-se para até mais de 15 minutos em animais alimentados com dietas pobres em energia e proteína ou em bovinos com inapetência prolongada (DIRKSEN, 1993). Os dados observados para todas as amostras do segundo tratamento demonstram características macroscópicas e físico-químicas de animais com

acidose ruminal e com microbiota ruminal intensamente ativa.

As médias de pH diferiram estatisticamente, como demonstrado na TAB. 2. A análise do pH ruminal também sugere acidose ruminal para os novilhos arraçoados sem volumoso. A média observada de 5,06 poderia estar ainda mais reduzida durante o manejo normal dos animais, uma vez que, na coleta, os animais estavam em jejum de 12 horas e, possivelmente, sob efeito tamponante da saliva, durante esse período.

TABELA 2

Médias de pH e da concentração de fungos aeróbios por ml de suco ruminal de novilhos de corte criados em pastagem tropical, no período seco e de novilhos confinados e alimentados somente com concentrado

	pH	UFC/ml*
Com volumoso	7,43 A	$6,0 \times 10^2$ B
Sem volumoso	5,06 B	$1,6 \times 10^4$ A

Notas: Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste t de *Student* ($P < 0,05$). * Unidades formadoras de colônia de fungos micelianos por ml de fluido ruminal.

O valor fisiológico do pH do conteúdo ruminal oscila entre 5,5 e 7,4, de acordo com a dieta administrada e com o intervalo da última alimentação. O valor do pH aumenta até a faixa alcalina após jejum de mais de 24 horas ou quando a microbiota estiver inativada ou em putrefação. Valores baixos do pH são verificados, quando ocorre superalimentação com carboidratos facilmente digeríveis (DIRKSEN, 1993).

3.2 Exames diretos

Para os novilhos criados em pastagens, observou-se, nos esfregaços corados pelo método de Gram, a presença de bactérias Gram positivas (+) e Gram negativas, em forma de bastonetes, de cocos e de cocobastonetes (+++) e leveduras com hifas e pseudohifas em formato oval e retangular (++). Essa diversidade microbiana foi observada em amostras de todos os animais desse tratamento (FIG. 1). Entretanto, a visualização microscópica direta, após essa coloração, em amostras provenientes dos novilhos confinados indicou o predomínio de *Streptococcus* spp. (+++) a presença de poucos bastonetes Gram negativos (+) e poucas células leveduriformes (+) (FIG. 2).

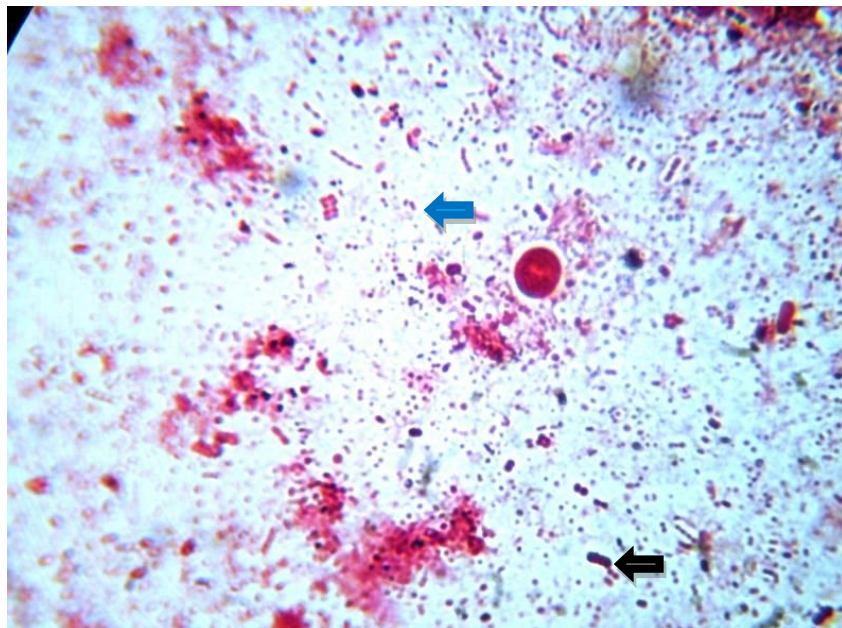


FIGURA 1- Diversidade microbiana observada após a coloração de Gram do fluido ruminal de novilhos de corte criados extensivamente em pastagens tropicais, no período seco, no Norte de Minas Gerais

Notas: A seta azul indica a presença de bactérias Gram negativas. A seta preta indica a presença de leveduras retangulares, objetiva de 100X.

Fonte: Arquivo da pesquisa, 2010.

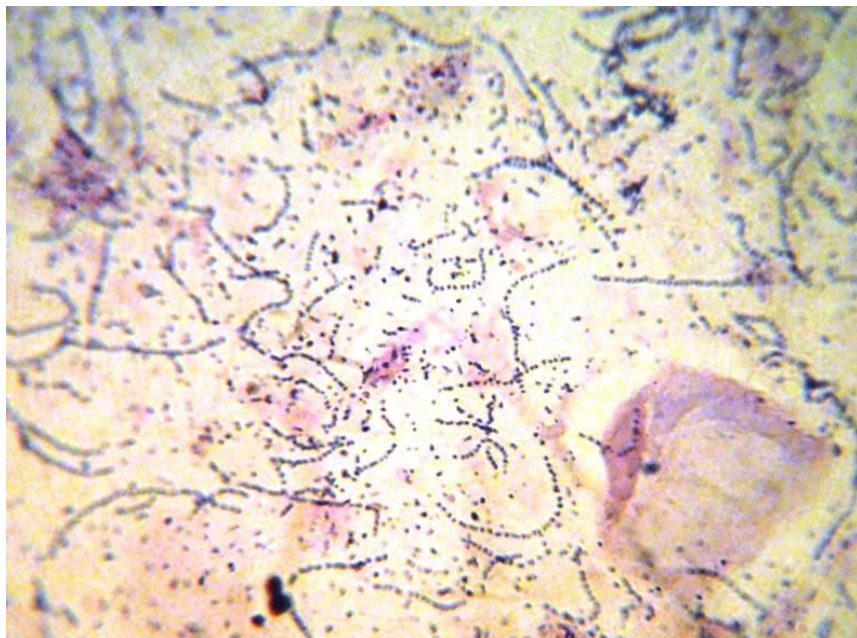


FIGURA 2 - Predomínio de *Streptococcus* spp. após coloração de Gram do fluido ruminal de novilhos confinados e alimentados somente com concentrado, objetiva de 100X

Fonte: Arquivo da pesquisa, 2010.

Os resultados dos exames diretos das amostras provenientes dos novilhos recebendo forragem lignificada foram semelhantes aos obtidos por Vieira *et al.* (2007), onde bactérias Gram-negativas predominaram no conteúdo ruminal de ovinos criados em pastagem formado por braquiária, durante o período seco. Kamra (2005) relata que a maioria das bactérias ruminais é Gram-negativas, porém o número de bactérias Gram positivas tende a se elevar em dietas com altos teores de energia na dieta. Pesquisas evidenciam que a adição de grãos à dieta promove crescimento rápido de *Streptococcus bovis* e, conseqüentemente, aumento na produção de lactato, predispondo o animal à acidose ruminal (MARTIN; NISBET, 1992).

Após o exame micológico direto, foi observada a presença de estruturas fúngicas típicas de fungos anaeróbios do rúmen para 60% das amostras dos novilhos em pastagem. Fungos policêntricos foram detectados em 34 % (17) das amostras e os monocêntricos foram detectados em 46 %

(23) dos exames. Não houve diferença significativa na taxa de detecção de monocêntricos e policêntricos ($P > 0,05$). Observou-se a presença concomitante de fungos monocêntricos e policêntricos em amostras de dez novilhos criados em pastagens tropicais.

Entretanto, nas amostras provenientes de novilhos alimentados com a dieta sem volumoso, não foram detectadas estruturas de fungos anaeróbios do rúmen. Esse importante grupo microbiano do rúmen poderia ter sido inibido pela redução do pH ruminal, observada para esses bovinos (TAB. 2). O alimento, ao ser fermentado, pode liberar compostos secundários, que irão alterar no conjunto ou em parte as populações de microrganismos ruminais (ARCURI *et al.*, 2006). Dietas com baixa concentração de fibras apresentam menor tempo de passagem no trato gastrointestinal e promovem maior redução do pH ruminal, devido à alta concentração de açúcares solúveis. A redução no potencial hidrogeniônico do fluido ruminal diminui, drasticamente, a produção de zoósporos de fungos anaeróbios do rúmen (ORPIN *et al.*, 1977; KAMRA, 2005).

Segundo Russel e Wilson (1996), o baixo pH ruminal reduz a atividade ou o número de bactérias e fungos celulolíticos. Esses autores respaldam ainda, que até mesmo uma leve redução no pH ruminal pode inibir, severamente, a digestão da celulose. Possivelmente, a atividade celulolítica do líquido ruminal dos novilhos alimentados sem volumoso estaria reduzida em função da menor média do pH observada, pela ausência de fungos anaeróbios do rúmen e pela menor diversidade bacteriana, observada no exame direto.

3.3 Cultivo, quantificação e identificação de fungos aeróbios

Os resultados do cultivo micológico indicaram presença de fungos micelianos e ausência de leveduras em todas as amostras de suco ruminal provenientes de novilhos alimentados somente com concentrados. Entretanto, para os novilhos alimentados com volumoso, foram observadas taxas de positividade de 85% e 25% para fungos filamentosos e leveduras, respectivamente.

Na quantificação, observou-se que a média UFC/ml de líquido ruminal provenientes dos novilhos confinados foi significativamente maior que a dos novilhos em pastagem (TAB. 2). Possivelmente, fungos filamentosos foram mais prevalentes em bovinos confinados, devido à maior disponibilidade de carboidratos solúveis fornecida a esse grupo (TAB. 1). Pesquisas devem ainda elucidar a ausência de leveduras no ecossistema ruminal desses animais, uma vez que esses fungos também são favorecidos com a maior concentração de carboidratos solúveis (DIRKSEN, 1993; ALMEIDA, 2009).

Foram identificados 15 isolados fúngicos provenientes do conteúdo ruminal de novilhos criados em pastagens tropicais. Constatou-se que 86,7 % dos isolados ruminais desse grupo apresentaram características compatíveis com o gênero *Aspergillus* e 13,3% com *Onychocola* spp..

Após a identificação micromorfológica dos isolados de fungos micelianos, verificou-se que *Aspergillus* spp. foi o gênero mais frequente em ambos tratamentos ($P < 0,05$). Para os bovinos confinados, foram observadas estruturas dos gêneros *Aspergillus* e *Lichtheimia* em 32 e em oito isolados, respectivamente. O predomínio de *Aspergillus* spp. poderia ser justificado por sua versatilidade e eficiência em catabolizar diferentes fontes de carbono solúveis, bem como polímeros complexos (FLIPPPI *et al.*, 2009).

Algumas espécies do gênero *Lichtheimia* têm sido reportadas como causadoras de mucormicose, patologia que acomete indivíduos imunocomprometidos, transmitida por contato desses com solos contaminados por esses microrganismos (GARCIA-HERMOSO *et al.*, 2009). É possível que esse fungo estivesse presente no solo onde foi cultivado o milho fornecido aos novilhos confinados e, no momento do arraçoamento, contaminado o ambiente ruminal desses animais.

Os isolados de fungos encontrados em animais alimentados com pastagem tropical podem apresentar atividade de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, importantes na degradação da parede celular vegetal. Isolados fúngicos com tais características e adaptados às condições tropicais poderiam ser suplementados como aditivos. Futuros estudos poderão contribuir para elucidar o papel benéfico desses microrganismos no trato digestório de ruminantes ou na saúde do ambiente ruminal, contribuindo para

maximizar a produção de ruminantes em pastagens tropicais, em regiões semiáridas.

A produção extracelular de celulases por *Aspergillus terreus* M11, isolado de resíduos vegetais de indústrias, foi avaliada em recente pesquisa (GAO *et al.*, 2008). Os resultados indicaram que a atividade de celulases foi maior a 45 °C e em pH 3. Endoglucanase e b-glucosidase apresentaram notável estabilidade na faixa de pH 2 a 5. As preparações de enzimas produzidas por essa cepa de fungo foram avaliadas na hidrólise da celulose microcristalina. Os maiores índices de hidrólise foram observados com 72 horas de incubação, correspondendo a, aproximadamente, 63% de redução (GAO *et al.*, 2008).

Em um estudo, foram avaliados os efeitos da adição do extrato de *Aspergillus oryzae*, espécie utilizada na produção de molho de soja, sobre amostras do fungo anaeróbio *Neocallimastix frontalis*, proveniente do rúmen de vacas leiteiras. Os resultados demonstraram aumento de três vezes na produção de zoósporos móveis de *N. frontalis*, indicando o potencial promissor da adição do extrato fúngico no ambiente ruminal (SCHMIDT *et al.*, 2004).

Considerando o possível papel patogênico de *Aspergillus* spp., Quin *et al.* (2005) descrevem que esse gênero contém mais de 190 espécies e que poucas espécies estão associadas a infecções oportunistas em animais. As aspergiloses frequentemente reportadas para os bovinos envolvem quadros de aborto, pneumonia, mastite e infecções intestinais.

4 CONCLUSÃO

A microbiota ruminal de novilhos submetidos a dietas com e sem volumoso é diferente. Bovinos alimentados somente com concentrado por até 60 dias apresentam maior população de fungos micelianos, ausência de fungos anaeróbios estritos e leveduras e predomínio de *Streptococcus* spp.. *Aspergillus* spp. é o gênero de fungo filamentoso mais frequentemente isolado no rúmen de novilhos alimentados com ou sem volumoso.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, F. O.; BARRETO, S. M. P.; GERASEEV, L. C.; DUARTE, E. R. Fungos anaeróbios do rúmen de bovinos e caprinos de corte criados em pastagens tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 3, p. 757-760, 2010.

ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C.; GODOI, A. R.; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, suplemento especial, p. 260-258, 2008.

ALLISON, M. J.; REDDY, C. A. Adaptations of gastrointestinal bacteria in response to changes in dietary oxalate and nitrate. **Current Perspectives on Microbial Ecology** (Ed. Klug, M. J.; Reddy, C. A), Washington DC, p. 248–256, 1984.

ALMEIDA, P. N. M. **Análise da população microbiana e caracterização de fungos com atividade celulolítica em fluido ruminal de bovinos leiteiros alimentados com diferentes forragens**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros. 88 f., 2009.

AKIN, D. E. Association of rumen fungi with various forage grasses. **Animal Feed Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 273-285, 1987.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 111-140.

ARCURI, P. B.; MANTOVANI, H. C. Recentes avanços em microbiologia ruminal e intestinal (bio)tecnologias para a nutrição de ruminantes. In: V Simpósio de Produção de Gado de Corte. **Anais...** p. 273-312, 2006.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18.ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.

BAUCHOP, P. The rumen anaerobic fungi: colonizers of pant fibre. **Annals of veterinary research**, v. 10, n. 2, p. 246-248, 1979.

BREWER, D.; TAYLOR, A. *Aspergillus Fumigatus* and *Sporormia Minima* Isolated from the Rumen of Sheep. **Journal of General Microbiology**. v. 59, p. 137-139, 1969.

BRUNO, R. G. S.; RUTIGLIANO, H. M.; CERRI, R. L.; ROBINSON, P. H.; SANTOS, J. E. P. Effect of feeding *Saccharomyces Cerevisiae* on performance of dairy cows during summer heat stress. **Animal Feed Science and Technology**, v. 150, p. 175–186, 2009.

CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V. Organização dos tecidos de plantas forrageiras e suas implicações para os ruminantes. **Archives de Zootecnia**, Córdoba, v. 57, n. 1, p. 13-28, 2008.

CERDÀ, A. R. **Fermentación Ruminal, Degradación Protéica y Sincronización Energía-Proteína en Terneras en Cebo Intenso**. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha, 196 f., 2003.

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

CHAUDHRY A. S. Microscopic studies of structure and ruminal fungal colonization in sheep of wheat straw treated with different alkalis. **Anaerobe**, v. 6, n. 3, p. 155-161, 2000.

CUHHINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 384-385.

CUNHA, I. S.; KRUGER, R. H., QUIRINO, B. F. Construção de uma biblioteca metagenômica de expressão da microbiota de rúmen de caprinos. **Comunicado Técnico 02 EMBRAPA**. 2009.

DANTAS, A. F. **Características da Carcaça de Ovinos Santa Inês Terminados em Pastejo e Submetidos a Diferentes Níveis de Suplementação**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Campina Grande. 2006.

DAVIES, D. R.; THEODOROU, M. K.; LAWRENCE, M. I. G.; TRINCI A. P. Distribution of anaerobic fungi in the digestive tract of cattle and their survival in faeces. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 1395-1400, 1993.

DEHORITY, B. A. Microbial Interactions in the Rumen. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 15, n. 1, p. 69-86, 1998.

DIRKSEN, G. Sistema digestivo. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. (Eds). Rosenberger: **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1993. p.167-169.

EXPORT HUB (EH). **Exportação Brasil: Demanda mundial por carne bovina pode alavancar leilões na Superagro Minas 2011**. 2011. Disponível em: <<http://export-hub.com/pt/noticias/brasil/362-exportacao-brasil-demanda-mundial-por-carne-bovina-pode-alavancar-leiloes-na-superagro-minas-2011>>. Acesso em: 17 mai. 2011.

FONTY, G.; GOUET, P. H. Plant Cell Wall Degradation by Anaerobic Fungi. In: PRINS, R. A.; STEWART, C. S. (Ed.). **Micro-organisms in Ruminant Nutrition**. Dalfsen: Nottingham University Press, 1994.

FLIPPPI, M.; SUN, J.; ROBELLET, X.; KARAFFA, L.; FEKETE, E.; ZENG, A. P.; KUBICEK, C. P. Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. S19-S44, 2009.

FOCUS. **Visão Brasil: Pecuária Bovina no Brasil: Maior Produtividade com Menor Impacto Socioambiental**. 2010. Disponível em: <http://www.visaobrasil.org/wpcontent/uploads/2010/09/focus_julho2010_pecuaria1.pdf>. Acesso em: 05 maio 2011.

FUKUSHIMA, R. S. Metabolismo energético e protéico. **Anais...** In: Nutrição Mineral de Bovinos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. 1996. Disponível em: < http://www.google.com.br/#sclient=psy-ab&hl=pt-BR&source=hp&q=METABOLISMO+ENERG%C3%89TICO+E+PROT%C3%89ICO&pbx=1&oq=METABOLISMO+ENERG%C3%89TICO+E+PROT%C3%89ICO&aq=f&aql=&aql=&gs_sm=s&gs_upl=5269391152693911315271297111101010182818281611110&bav=on.2,or.r_gc.r_pw.,cf.osb&fp=3170f32ca20eab88&biw=1360&bih=571>. Acesso em: 07 jan. 2012.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7623–7629, 2008.

GARCIA-HERMOSO, D.; HOINARD, D.; GANTIER, J; GRENOUILLET, F.; DROMER, F.; DANNAOUI, E. Molecular and Phenotypic Evaluation of *Lichtheimia corymbifera* (Formerly *Absidia corymbifera*) Complex Isolates Associated with Human Mucormycosis: Rehabilitation of *L. ramose*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 3862-3870, 2009.

GOES, R. H. T. B. G.; ALVES, D. D.; VALADARES FILHO, S. C.; MARSON, E. P. Utilização de aditivos alimentares microbianos na alimentação de bovinos de corte e leite: revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zootecnia da UNIPAR**, Umuarama, v. 8, n. 1, p. 47-56, 2005.

GORDON, G. L. R.; PHILLIPS, M. W. Extracellular Pectin Lyase Produced by *Neocallimastix* sp. LM1, a Rumen Anaerobic Fungus. **Letters in Applied Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 113-115, 1992.

GOUET, F. E.; JOUANY, S. P. L'écosystème microbien deu réticulo-rumen. **Nutrition des ruminants**. INRA editions, p. 299-348. 1995.

GRENET, E.; JAMONT, J.; FONTY, G.; BERNALIER, A. Kinetics study of the degradation of wheat straw and maize stem by pure cultures of anaerobic

fungi observed by scanning electron microscopy. Asian- Australian, **Journal of Animal Science**, v. 2, n. 1, p. 456-457. 1989.

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M.; BERCHIELLI, T. T.; BUDDINGTON, R.; BEELLEN, R. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecia**, v. 58, n. 5, p. 910-917, 2006.

HO, Y. W.; BARR, D. J. S. Classification of anaerobic fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. **Mycologia**, v. 87, n. 5, p. 655-677, 1995.

HO, Y. W.; BAUCHOP, T.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.; KUDO, H., *Neocallimastix variabilis*, a new species of anaerobic fungus from the rumen of cattle. **Mycotaxon**, v. 46, p. 241-258, 1993.

HOFMANN, R. R. **The ruminant stomach**: Stomach structure and feeding habits of east African game ruminants. Nairobi: East African Literature Bureau, 1973. 354 p.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2009-2010, v. 38, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/>>. Acesso em: 07 jan. 2012

KAMRA, D. N. Rumen Microbial Ecosystem. **Current Science**, v. 89, p. 125-35, 2005.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams e Wilkins, v. 1, 1984.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeast**: a taxonomic study. 4nd, Elsevier, Amsterdam, p. 1055, 1998.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Savier, 2002. 1120p.

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

LI, J.; HEATH, I. B.; PACKER, L. The phylogenetic relationships of the anaerobic chytridiomycetous gut fungi (*Neocallimasticaceae*) and the *Chytridiomycota*. II. Cladistic analysis of structural data and description of *Neocallimasticales* ord. nov. **Canadian Journal of Botany**, v. 71, p. 393-407, 1993.

MARTILLOTTI, F. Microbial and Chemical Characterization of Rumen Contents of Grazing Dairy Cows. In: PRINS, R. A.; STEWART, C. S. (Ed.). **Micro-organisms in Ruminant Nutrition**. Dalfsen: Nottingham University Press, 1994.

MARTIN, A. S.; NISBET, D. J. Effect of direct-feed microbial on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 6, p. 1736-1744, 1992.

MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F.; TABOSA, I. M.; SILVA, Z. A.; BARBOSA, R. C.; MARQUES, A. V. M. S.; NOGUEIRA, F. R. B. Intoxicação por nitratos e nitritos em bovinos por ingestão de *Echinochloa polystachya* (capim-mandante) e *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) no sertão da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 17-20, 2003.

MINERVA. **A indústria mundial de carne bovina**. 2011. Disponível em: <http://www.mzweb.com.br/minerva/web/conteudo_pt.asp?idioma=0&conta=28&tipo=7706>. Acesso em: 10 jan. 2012.

NOORAE, S. E.; ALIMON, A. R.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N. Characterization of *Kluyveromyces marxianus* as a potential feed additive for ruminants. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p. 578–584, 2010.

OBISPO, N. E.; DEHORITY, B. A. Factores affecting the concentration and cellulolytic activity of sheep rumen fungi. **Livestock Research for Rural Development**, v. 14, n. 5, p. 5-10, 2002.

OLIVEIRA, B. M. L.; BITENCOURT, L. L.; SILVA, J. R. M.; DIAS JUNIOR, G. S.; BRANCO, I. C. C.; PEREIRA, M. N. Suplementação de vacas leiteiras com *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500. **Anais...** In: 45ª Reunião Anual da sociedade brasileira de zootecnia, Lavras – MG, p. 1-3, 2008.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista eletrônica de veterinária REDVET**, v. 8, n. 6, jun. 2007.

OP DEN CAMP, H. J. M.; DIJKERMAN, R.; TEUNISSEN, M. J.; VAN DER DRIFT, C. Production of depolymerizing enzymes by anaerobic fungi. In: PRINS, R. A., STEWART, C. S. (Ed.). **Micro-organisms in Ruminant Nutrition**. Dalfsen: Nottingham University Press, 1994.

ORPIN, C. G. Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. **Journal of General Microbiology**, v. 98, p. 423-430, 1977.

ORSKOV, E. R. Optimizing rumen environment for cellulose digestion. In: **Rumen ecology research planning. Proceedings of a workshop held at ILRI**, 13-18 March, 1995, Addis Ababa, Ethiopia, International Livestock Research Institute. 1995. p.177-182.

OYELEKE, S. B.; OKUSANMI, T. A. Isolation and characterization of cellulose hydrolysing microorganism from the rumen of ruminants. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 10, p. 1503-1504, 2008.

PAUL, S. S.; KAMRA, D. N.; SASTRY, V. R.B.; SAHU, N. P.; AGARWAL, N. Effect of anaerobic fungi on in vitro feed digestion by mixed rumen microflora of buffalo. **Reproduction Nutrition Development**, v. 44, n. 4, p. 313–319, 2004.

PONTALTI, G. C. **Nitritos e nitratos: venenos ou nutrientes?** In: Seminário apresentado na disciplina de Bioquímica do Tecido Animal, Programa de Pós-Graduação (Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

QUIN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, W. J.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

REMBRANDT, D.; BAHNSING, D. C. P.; CAMP, H. J. M. O.; DRIFT, C. V.; VOGELS, G. Degradation of structural polysaccharides by the plant cell-wall degrading enzyme system from anaerobic fungi. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 21, p. 130-136, 1997.

ROMÃO, F. T. N. M. A.; PEREIRA, P. F. V.; QUEIROZ, G. R.; COSENZA, M.; RIBEIRO, R. C.; LISBÔA, J. A. N.; REIS, A. C. F. Intoxicação por nitrito em bovinos na região centro ocidental do Paraná. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 4, Suplemento 3, p. 568-571, 2011.

RUIZ-LACAZ, R., *et al.* Microbiologia do rúmen e do biodigestor. In: RUIZ-LACAZ, R. **Microbiologia zootécnica**. São Paulo: Roca, p.123-167, 1992.

RUSSEL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1119-1122, 2001.

RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 8, p. 1503 - 1509, 1996.

RUSSELL, J. R.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, v. 292, p. 1119-1122, 2001.

SAEG - **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**, Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 2. Ed. 1998. 263p.

SCHMIDT J. A.; ALBRIGHT S.; TSAI K.-P.; CALZA G. M.; CHANG J. S.; CALZA R. E. Characterization of *Aspergillus oryzae* fermentation extract effects on the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*, EB 188. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 63, p.422–430, 2004.

SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K. H. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: International Rapeseed Congress, **Anais...** 1999, Canberra. Gosford, Australia: Regional Institute, 1999. 241p. Disponível em: <<http://www.regional.org.au/au/gcirc/1/241.htm>>. Acesso em: 05 mai. 2011.

STEWART, C. S. Plant-Animal and Microbial Interactions in Ruminant Fibre Degradation. In: PRINS, R. A., STEWART, C. S. (Ed.). **Micro-organisms in Ruminant Nutrition**. Dalfsen: Nottingham University Press, Cap. 2, p.13-28, 1994.

SUNDSET, M. A.; EDWARDS, J. E.; CHENG, Y. F.; SENOSIAIN, R. S.; FRAILE, M. N.; NORTHWOOD, K. S.; PRAESTENG, K. E.; GLAD, T.; MATHIESEN, S. D.; WRIGHT, A. G. Molecular Diversity of the Rumen Microbiome of Norwegian Reindeer on Natural Summer Pasture. **Microbiol Ecology**, v. 57, p. 335-348, 2009.

THAREJA, A.; APUNIYA, A. K.; GOEL, G.; NAGPAL, R.; SEHGAL, J. P.; SINGH, P. K.; SINGH. *In vitro* degradation of wheat straw by anaerobic fungi from small ruminants. **Archivos Animal Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 412-417, 2006.

TEUNISSEN, M. J.; OP DEN CAMP, H. J. M. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 1, p. 63-76, 1993.

TRINCI, A. P. J.; RICKERS, A.; GULL, K.; DAVIES, D. R.; NIELSEN, B. B.; ZHU, W. Y.; THEODOROU, M. K. Anaerobic Fungi: their distribution and life cycle. In: PRINS, R. A., STEWART, C. S. (Eds.). **Micro-organisms in Ruminant Nutrition**. Dalfsen: Nottingham University Press, 1994. Cap. 7, p. 79-126. 1994.

VERONESE, V. B.; BARRIOS, S. B.; DALL'ALBA, K.; *et al.* Glicerina: matéria - prima para preparação de adesivos e espumas poliuretânicas a resinas aquídicas. In: III CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL. **Anais...** Brasília-DF, 2009.

VIEIRA, A. C. S.; AFONSO, J. A.; MENDONÇA, C. L. Características do fluido ruminal de ovinos Santa Inês criados extensivamente em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 110-114, 2007.

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

WUBAH, D. A.; FULLER, M. S.; AKIN, D. E. Studies on *Caecomyces communis*: Morphology and Development. **Mycologia**, v. 83, n. 3, p. 303-310. 1991.

YAN, Q.; HAO, S.; JIANG, Z.; ZHAI, Q.; CHEN, W. Properties of a xylanase from *Streptomyces matensis* being suitable for xylooligosaccharides production. **Journal Molecular Catal**, v. 58, p. 72-77, 2009.