

**COLEGIADO DA PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL**

**THIAGO ALVES XAVIER DOS SANTOS**

**ESTUDO DA MICROBIOTA DO TRATO DIGESTÓRIO, PARÂMETROS SANGUÍNEOS E  
DESEMPENHO DE BEZERROS NELORE SUPLEMENTADOS COM FUNGOS  
ANAERÓBICOS FACULTATIVOS AUTÓCTONES DO RÚMEN**

**MONTES CLAROS - MG  
2020**

THIAGO ALVES XAVIER DOS SANTOS

**ESTUDO DA MICROBIOTA DO TRATO DIGESTÓRIO, PARÂMETROS SANGUÍNEOS E  
DESEMPENHO DE BEZERROS NELORE SUPLEMENTADOS COM FUNGOS  
ANAERÓBICOS FACULTATIVOS AUTÓCTONES DO RÚMEN**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

**Área de Concentração:** Produção Animal

**Linha de Pesquisa:** Nutrição e alimentação animal.

**Orientador:** Dsc. Amália Saturnino Chaves

**Co-orientador:** Dsc. Eduardo Robson Duarte

MONTES CLAROS - MG

2020

Santos, Thiago Alves Xavier

S237e  
2020

Estudo da microbiota do trato digestório, parâmetros sanguíneos e desempenho de bezerros Nelore suplementados com fungos anaeróbicos facultativos autóctones do rúmen / Thiago Alves Xavier dos Santos. Montes Claros, 2020.  
82 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Produção Animal. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Amália Saturnino Chaves  
Banca examinadora: Flávia Oliveira Abrão Pessoa, Livia Vieira Barros, Eduardo Robson Duarte, Amália Saturnino Chaves.

Inclui referências: f. 35-49; 72-80.

1. Ruminante. 2. Nutrição animal. 3. Bezerro. I. Chaves, Amália Saturnino. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 636.2

ELABORADA PELA BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA DO ICA/UFMG  
Rachel Bragança de Carvalho Mota / CRB-6/2838



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Agrárias  
Colegiado de Pós-Graduação em Produção Animal

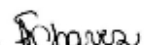
### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO


Aos 26 dias do mês de junho de 2020 às 09 horas, sob a Presidência da Professora Amália Saturnino Chaves, D. Sc. (Orientadora - UFJF) e com a participação dos Professores Eduardo Robson Duarte, D. Sc. (Coorientador - ICA/UFMG), Flávia Oliveira Abrão Pessoa, D. Sc. (IF Goiano) e Lívia Vieira de Barros, D. Sc. (ICA-UFMG) reuniu-se, por videoconferência, a Banca de defesa de dissertação de THIAGO ALVES XAVIER DOS SANTOS, aluno do Curso de Mestrado em Produção Animal. O resultado da defesa de dissertação intitulada "Estudo do ambiente ruminal e parâmetros zootécnicos de bezerros Nelore suplementados com fungos anaeróbicos facultativos do rúmen", foi expresso pelo conceito "A" (nota 95), sendo o aluno considerado (aprovado/reprovado) APROVADO. E, para constar, eu, Professora Amália Saturnino Chaves, Presidente da Banca, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.


OBS.: O aluno somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 64 do regulamento do Curso de Mestrado em Produção Animal, conforme apresentado a seguir:


Art. 64 – Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do colegiado do Curso, com a anuência do orientador, no mínimo 3 (três) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação, no prazo de 60 (sessenta) dias.

Montes Claros, 26 de junho de 2020.

  
Amália Saturnino Chaves  
Orientadora

  
Flávia Oliveira Abrão Pessoa  
Membro

  
Eduardo Robson Duarte  
Coorientador

  
Lívia Vieira de Barros  
Membro

Dedicado à minha mãe, ao meu padrasto, ao meu irmão, a Zelinha (*in memoriam*) e Noquinha (*in memoriam*) por sempre acreditarem em mim e embarcarem comigo nos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Á Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por toda força e pela graça concedida na realização deste sonho de ser mestre.

Á minha família: em especial a minha mãe Marlene, minha motivação e inspiração diária, sem você tenho certeza que mais esse sonho não seria realizado. Ao meu padrasto Osvaldo por todo apoio e confiança deposita em mim. Ao meu irmão Túlio pela paciência, carinho e atenção.

Aos dois grandes amigos Luiz Cássio e Cássia pelo acolhimento, apoio, amizade e companheirismo desde do início da minha vida e até hoje. À Zelinha (*in memoriam*) e Noquinha (*in memoriam*) que tenho certeza que lá de cima estão felizes com esse sonho realizado.

Á minha orientadora professora Amália, pelas orientações, compreensão, e principalmente pela paciência. Desde do início sempre me mostrando que era possível a realização do mestrado. Que Deus te abençoe abundantemente.

Ao meu co-orientador professor Eduardo, pelas orientações, amizade, compreensão, companheirismo, bondade, paciência e cuidado. Serei eternamente grato a tudo que me possibilitou e permitiu alcançar. Que exemplo de profissional e “ser humano”. Que Deus abençoe sempre o seu coração maravilhoso.

Aos amigos, Valdo, Suze, Claudio, Matheus, Aniele, Karen, Lara, Higor, Bruna, Katchusse, Carol, Luís Miguel, os meninos do Grupo de Estudo e Pesquisa em Microbiologia e Parasitologia (GEMP), do Grupo de Nutrição Animal (GENA) e os PIC-Júnior do IFNMG que contribuíram diretamente ou indiretamente para realização desta pesquisa. Obrigado a todos por tudo, sou muito grato.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), à coordenação do Mestrado em Produção Animal e aos Professores do programa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), Fundação de Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Pró-reitorias de Pesquisa e Pós-Graduação da UFMG, pelo apoio financeiro e logístico para a realização da pesquisa.

Ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA/UFMG), pelo apoio com os animais e a estrutura para a realização da experimentação.

À Connan – Nutrição Animal, pelo apoio com a alimentação dos animais utilizados no experimento.

E a todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho/sonho. A vocês meus sinceros agradecimentos.

Com fé em Deus e Nossa Senhora Aparecida: #partiudotrado.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AGCC:</b>	Ácido Graxo de Cadeia Curta.
<b>pH:</b>	Potencial de Hidrogênio.
<b>PRAM:</b>	Redução de Azul de Metileno.
<b>H<sub>2</sub>:</b>	Hidrogênio.
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Dióxido de Carbono.
<b>CH<sub>4</sub>:</b>	Metano.
<b>N:</b>	Nitrogênio.
<b>UFC:</b>	Unidade Formadora de Colônia.
<b>VCM:</b>	Volume Corpuscular Médio.
<b>HCM:</b>	Hemoglobina Corpuscular Média.
<b>CHCM:</b>	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.
<b>ALT:</b>	Alanina Aminotransferase.
<b>rDNA:</b>	Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal.
<b>CMCase:</b>	Carboximetilcelulase.
<b>GPD:</b>	Ganho de Peso Diário.
<b>GPT:</b>	Ganho de Peso Total.
<b>PCF:</b>	Peso Corpóreo Final.
<b>PCI:</b>	Peso Corpóreo Inicial.

## RESUMO

Em regiões com escassez de forragens de boa qualidade na maior parte do ano, a suplementação com fungos poderia contribuir para a modulação ruminal, promovendo maior produção de enzimas fibrolíticas. O objetivo neste estudo é analisar os efeitos da suplementação com fungos ruminais sobre a microbiota do trato digestório, os parâmetros sanguíneos e o desempenho de bezerros Nelore. O experimento foi conduzido em blocos casualizados, avaliando oito bezerros Nelore suplementados diariamente com um isolado de *Aspergillus terreus* e um isolado de *Trichoderma longibrachiatum* e oito bezerros que não receberam esses fungos. Após 55 dias de experimentação os animais foram pesados e coletou-se amostras do fluido ruminal, fezes e sangue para as análises. As características que apresentaram distribuição normal foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey, enquanto as variáveis que não apresentaram distribuição normal foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis. Observou-se que a suplementação com os dois fungos promoveu redução do pH ruminal, na concentração média de eritrócitos e de hemoglobina ( $P < 0,05$ ). O peso vivo final, o ganho de peso médio diário, o ganho de peso total, PRAM, e a contagem de Enterobacteriaceae, fungos micelianos e leveduriformes do fluido ruminal e das fezes, total de os protozoários ruminais e demais parâmetros sanguíneos e bioquímicos não foram influenciados pela suplementação ( $P > 0,05$ ). Observou-se que o gênero de protozoários *Eodinium* spp. foi identificado apenas nos animais que receberam a suplementação ( $P < 0,05$ ). Conclui-se com esta pesquisa que a suplementação com os fungos anaeróbios avaliados apresentam potencial para uso como aditivos, promovendo o aumento de ciliados do gênero *Eodinium* no fluido ruminal. Contudo, novos estudos devem ser realizados para definir melhor as dosagens e período de utilização desses fungos na suplementação de bezerros.

**Palavras-chaves:** microbiota ruminal, desmame, Enterobacteriaceae, protozoários do rumen, semiárido.



## ABSTRACT

In regions with a shortage of good quality fodder for most of the year, supplementation with fungi could contribute to rumen modulation, promoting greater production of fibrolytic enzymes. The aim of this study is to analyze the effects of supplementation with ruminal fungi on the digestive tract microbiota, blood parameters and performance of Nellore calves. The experiment was conducted in randomized blocks, evaluating eight Nellore calves supplemented daily with an isolate of *Aspergillus terreus* and an isolate of *Trichoderma longibrachiatum* and eight calves that did not receive these fungi. After 55 days of experimentation, the animals were weighed and samples of ruminal fluid, feces and blood were collected for analysis. The characteristics that showed normal distribution were subjected to analysis of variance and compared by the Tukey test, while the variables that did not show normal distribution were subjected to the Kruskal-Wallis test. It was observed that supplementation with the two fungi promoted a reduction in ruminal pH, in the average concentration of erythrocytes and hemoglobin ( $P < 0.05$ ). The final live weight, the average daily weight gain, the total weight gain, PRAM, and the count of Enterobacteriaceae, mycelial fungi and yeasts of ruminal fluid and feces, total of rumen protozoa and other blood and biochemical parameters were not considered. influenced by supplementation ( $P > 0.05$ ). It was observed that the genus of protozoa *Eodinium* spp. was identified only in animals that received supplementation ( $P < 0.05$ ). It is concluded with this research that the supplementation that with the evaluated anaerobic fungi presents potential for use as additives, promoting the increase of *Eodinium* ciliate in the ruminal fluid. However, new studies should be carried out to better define the dosages and period of use of these fungi in supplementing calves.

**Keywords:** ruminal microbiota, weaning, Enterobacteriaceae, rumen protozoa, semiarid.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> <i>Entodinium</i> spp. encontrado no líquido ruminal de bezerros Nelore alimentados com <i>Urochloa brizantha</i> no Norte de Minas Gerais corados com lugol (Objetiva de 40x).....	19
<b>Figura 2.</b> Desenhos esquemáticos de protozoários ciliados encontrados em ruminantes domésticos. Ordem Vestibuliferida: Gêneros A: <i>Isotricha</i> (A'- <i>Isotricha</i> prostoma; A''- <i>Isotricha</i> intestinalis), B: <i>Dasytricha</i> . Ordem Entodiniomorphida: Gêneros: C: <i>Charonina</i> ; D: <i>Entodinium</i> ; E: <i>Diplodinium</i> ; F: <i>Eodinium</i> ; G: <i>Eremoplastron</i> ; H: <i>Ostracodinium</i> ; I: <i>Eudiplodinium</i> ; J: <i>Diploplastron</i> ; K: <i>Metadinium</i> ; L: <i>Enoploplastron</i> ; M: <i>Polyplastron</i> (M': Lado esquerdo; M'': Lado direito); N: <i>Epidinium</i> e O: <i>Ophryoscolex</i> .....	20

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características das bactérias do rúmen .....	16
<b>Tabela 2.</b> Gêneros dos protozoários do rúmen e suas características.....	21
<b>Tabela 3.</b> Valores de referências do eritrograma em bovinos.....	28
<b>Tabela 4.</b> Valores de referências leucograma e plaquetograma em bovinos .....	29
<b>Tabela 5.</b> Valores de referências do perfil bioquímico sérico em bovinos.....	30
<i>Artigo</i>	
<b>Tabela 1.</b> Composição bromatológica da dieta.....	55
<b>Tabela 2.</b> Médias e desvio padrão (dp) do ganho de peso dia (GPD), ganho de peso total (GPT), peso corporal final (PCF), redução do azul de metilo (PRAM) e potencial de hidrogênio (pH) de bezerros Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais .....	60
<b>Tabela 3.</b> Médias de unidades formadoras de colônias (UFC) e desvio padrão (dp) de Enterobacteriaceae, fungos micelianos e leveduriformes isolados do fluido ruminal e fezes de bezerros Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais .....	61
<b>Tabela 4.</b> Distribuição de gêneros de Enterobacteriaceae isoladas do fluido ruminal e das fezes de bezerros Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais .....	62
<b>Tabela 5.</b> Distribuição de gêneros de fungos micelianos isolados do fluido ruminal e das fezes de bezerros Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais .....	63
<b>Tabela 6.</b> Concentrações médias, desvio padrão (dp) e distribuição gêneros dos protozoários no fluido ruminal de bezerros Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais .....	64
<b>Tabela 7.</b> Concentrações médias e desvio padrão (dp) o eritrograma, leucograma e plaquetograma de bezerros Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais .....	65
<b>Tabela 8.</b> Concentrações médias e desvio padrão (dp) do perfil bioquímico sérico de bezerros Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais.....	66

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 Objetivos Gerais .....	14
2.2 Objetivos Específicos .....	14
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
3.1 Ambiente ruminal .....	15
3.2 Bactérias do rúmen .....	15
3.3 Enterobacteriaceae em ruminantes .....	18
3.4 Protozoários do rúmen.....	19
3.5 Fungos anaeróbicos do rúmen .....	25
3.6 Fungos anaeróbios facultativos no trato digestório de ruminantes.....	26
3.7 Parâmetros sanguíneos em bovinos .....	27
3.7.1 Eritrograma em bovinos .....	27
3.7.2 Leucograma e Plaquetograma em bovinos .....	28
3.7.3 Perfil Bioquímico Sérico em bovinos.....	30
3.8 Suplementação de deitas utilizando fungos como aditivos microbianos em ruminantes...	32
3.8.1 Efeitos da suplementação sobre o desempenho animal.....	34
3.8.2 Efeitos da suplementação sobre os parâmetros sanguíneos em ruminantes .....	35
<b>4 REFERÊNCIAS</b> .....	36
<b>5 ARTIGO</b> .....	51
5.1 Efeito da suplementação com fungos ruminais na microbiota do trato digestório, parâmetros sanguíneos e desempenho de bezerros Nelore .....	51
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	82
<b>ANEXO</b> .....	83

## 1. INTRODUÇÃO

Com avanço da nutrição de ruminantes, novas estratégias para a manipulação da fermentação ruminal vem sendo estudada para que os efeitos benéficos sejam aprimorados e os danosos minimizados ou até mesmo excluídos, visto que a resposta do animal a um alimento depende das interações entre os componentes da dieta, intervalo entre as alimentações, do valor nutritivo e principalmente interações entre os microrganismos ruminais na digestibilidade e na fermentação (VAN SOEST, 1994; STIVARI *et al.*, 2014). Dentre essas estratégias, a suplementação com probióticos ou aditivos microbianos trazem perspectivas promissoras para apoiar a potencial incorporação de microrganismos nas práticas de produção animal (SCHOFIELD *et al.*, 2018; ALAWNEH *et al.*, 2020).

Neste contexto, os fungos anaeróbios do rúmen assumem papel relevante para serem usados como aditivo microbiano na suplementação de ruminantes, devido a sua importância na degradação dessas forragens, pois produzem enzimas com atividade fibrolíticas capazes de aumentar a disponibilidade energética e de proteínas, favorecendo o crescimento da microbiota ruminal e proporcionando melhorias na degradabilidade das fibras, nos índices zootécnicos e nos parâmetros ruminais (PAUL *et al.*, 2012; GRUNINGER *et al.*, 2014; STIVARI *et al.*, 2014).

O papel dos fungos no ambiente ruminal consiste em desestabilizar a estrutura da parede celular de forragens, solubilizam a fibra lignificada e aumentando a superfície de acesso para a ação das bactérias ruminais. Utilizam uma ampla variedade de carboidratos solúveis como fonte de energia e quase todos os polissacarídeos das plantas, por produzirem uma variedade de enzimas, com a atividades celulolíticas, hemocelulíticas, xilanolíticas e amilolíticas que solubilizam as fibras vegetais, melhorando a digestão de forragens, visto que podem preferencialmente atingir diferentes componentes de carboidratos na parede celular da planta, por isso estão associados a dietas à base de forragem, e sua abundância diminui rapidamente com a adição de concentrado à dieta (GRUNINGER *et al.*, 2014; GRUNINGER *et al.*, 2018; GRUNINGER *et al.*, 2019).

Os fungos anaeróbios facultativos podem estar presentes no ambiente ruminal em proporções aproximadas de  $1 \times 10^4$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL em animais criados sobre pastagem tropical no período de seca (FREITAS *et al.*, 2012; ABRÃO *et al.*, 2014). Esses fungos podem apresentar produção superior de celulases, importantes para solubilização de fibras de forragens tropicais (ALMEIDA *et al.*, 2014; ABRÃO *et al.*, 2017). Estudos demonstram que isolados de *Aspergillus* spp. do ambiente ruminal apresentam alto nível produção de enzimas que solubilizam as paredes celulares lignificadas e não são produtores de micotoxinas (ABRÃO *et al.*, 2017; ABRÃO *et al.*, 2018).

Abirão *et al.* (2014), contataram que em bovinos de corte alimentados com pastagens tropicais lignificadas albergam em maiores concentrações os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*, fungos que apresentam potencial para suplementação animal e para fins biotecnológicos (FACCHINI *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2014). Ao se adicionar enzimas de *Trichoderma reesei* a

dietas de bezerros, foi observado aumento na digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta, promovendo aumento no ganho de peso diário (NAWAZ *et al.*, 2016).

Fungos exógenos como *Aspergillus oryzae* e seus extratos têm sido usados como suplementos em dietas de ruminantes, melhorando a produtividade desses animais, visto que exercem a fermentação ruminal e populações microbianas entre diferentes fontes de volumosos, sendo observado aumento na produção de proteína microbiana, de ácido graxo de cadeia curta (AGCC) e propionato. (SUN *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2017).

Tripathi *et al.* (2007) e Alzahal *et al.* (2014), consideram que a adição de fungos e/ou enzimas fúngicas na dieta de ruminantes, pode melhorar a microbiota, estabilizar o pH ruminal, e promover a degradação microbiana da parede celular das plantas.

Contudo, a maior parte dos estudos com o uso de probióticos ou aditivos microbianos em animais tem sido demonstrado a utilização de cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei* adicionadas à dieta de ruminantes (DIAS *et al.*, 2018). Sendo assim em regiões com escassez de forragens de boa qualidade na maior parte do ano, a suplementação com fungos provenientes do trato digestório dos ruminantes adaptados às condições tropicais poderia ser importante na suplementação, contribuindo para a modulação ruminal promovendo maior produção de enzimas fibrolíticas e reduzindo populações de bactérias patogênicas, melhorando as variáveis sanguíneas e o desempenho dos animais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

Caracterizar a microbiota do trato digestório, parâmetros sanguíneos e desempenho de bezerros Nelore suplementados com fungos anaeróbicos facultativos isolados do rúmen.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o ganho de peso total, ganho de médio diário e peso vivo final em função da suplementação com fungos anaeróbicos facultativos de rúmen.
- Analisar as características macroscópicas e físico-químicas como cor, odor, viscosidade, pH, sedimentação e tempo redução do azul de metileno (PRAM) do líquido ruminal dos bezerros suplementação com fungos anaeróbicos facultativos do rúmen.
- Caracterizar a população de protozoários, fungos anaeróbicos facultativos e Enterobacteriaceae do rúmen em função da suplementação com fungos anaeróbicos facultativos do rúmen.
- Caracterizar a população de fungos anaeróbicos facultativos e Enterobacteriaceae do rúmen das fezes da suplementação com fungos anaeróbicos facultativos do rúmen.
- Caracterizar os componentes sanguíneos e bioquímicos séricos em bezerros Nelore suplementação com fungos anaeróbicos facultativos do rúmen.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Ambiente ruminal

O ecossistema ruminal é complexo e tem como finalidade principal a fermentação do alimento consumido pelo animal. Esse processo acontece por intervenção dos microrganismos presentes, que transformam o alimento ingerido pelo animal em AGCC e proteínas microbianas principalmente (WEIMER *et al.*, 2009).

O rúmen possui um ambiente anaeróbio estrito com temperaturas de 38 a 42°C, pH entre 6 e 7 e umidade na faixa de 80-90%. Esse compartimento é capaz de atuar como uma câmara fermentativa, favorecendo o crescimento de uma grande população de microrganismos (OLIVEIRA *et al.*, 2007; LANA, 2005). É composto de partículas, agregados de alimentos e microrganismos anaeróbios que vivem de forma interativa (FONSECA; DIAS-DA-SILVA, 2001).

O microbioma é composto por bactérias ( $10^{10} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), protozoários ciliados ( $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ), fungos anaeróbicos estritos ( $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ), fungos anaeróbicos facultativos ( $10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ ), enterobactérias ( $10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ), micoplasmas (interdeminado) e bacteriófagos ( $10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Essa complexa comunidade de microrganismos, estabelece diversas interações importantes para o equilíbrio ruminal, como a atividade fermentativa e inibição do crescimento de microrganismos contaminantes e patogênicos. As interações microbianas e com o hospedeiro são responsáveis pela bioconversão dos alimentos em substâncias utilizadas pelo animal (KAMRA, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007; KOZLOSKI, 2011), como o AGCC e as proteínas microbianas (ENDERSON *et al.*, 2015).

A composição do ecossistema microbiano ruminal é influenciada pela dieta e sua frequência de distribuição, idade, condições do animal hospedeiro e bem como as interações microbianas (WELKIE *et al.*, 2010; JAMI *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Estima-se que o rúmen dos bezerros recém-nascidos possua cerca de 29% do volume total dos compartimentos do estômago, entretanto os animais adultos essa proporção é de 55% (LI *et al.*, 2012). A colonização e estabelecimento do processo fermentativo ruminal são essenciais para o desenvolvimento do rúmen em bezerros (LOPES, 2014).

#### 3.2 Bactérias anaeróbicas do rúmen

As bactérias equivalem a cerca de 60 a 90% da biomassa microbiana com aproximadamente 200 espécies distintas e são indispensáveis para a saúde dos ruminantes (WELKIE *et al.*, 2010; KOZLOSKI, 2017). Esses microrganismos produzem vitaminas do complexo B, importantes para garantir crescimento bacteriano, enzimas para a degradação das fibras (SCOTT; DEHORITY, 1965) e também podem degradar compostos tóxicos para o animal (ALLISON *et al.*, 1990). Por possuírem a capacidade de degradação e fermentação de proteínas, peptídeos, amidos, celulasas e hemiceluloses (WEIMER, 2015), os gêneros bacterianos são descritos em seis grupos funcionais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Características das bactérias do rúmen.

<b>Grupo Funcional</b>	<b>Características</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Autores</b>
Celulolíticas	Degradam a celulose e hemicelulose da parede das células vegetais. Possuem enzimas capazes de quebrar as ligações $\beta$ 1-4, entre os açúcares que constituem a celulose (hexoses) e hemicelulose (pentoses).	<i>Ruminobacter</i> spp.; <i>Ruminococcus albus</i> ; <i>Ruminococcus flavefaciens</i> ;	REECE, 2015 KOZLOSKI, 2017
Proteolíticas	Degradam as proteínas utilizando a enzima protease e produzem ácidos graxos. São influenciadas pela disponibilidade de nitrogênio livre para sintetizar seus aminoácidos.	<i>Bacteroides ruminicola</i> ; <i>Peptostreptococci</i> spp.	KOZLOSKI, 2017 SILVA <i>et al.</i> , 2017
Amilolíticas	Degradam amido utilizando a enzima amilase e liberam ácidos graxos de cadeia curta e ácidos lácticos, reduzindo o pH ruminal, que, em princípio, é ideal para essas espécies.	<i>Bacteroides amylophilus</i> ; <i>Clostridium aminophilum</i> ;	TORRES <i>et al.</i> , 2015 WLODARSKI <i>et al.</i> , 2017
Lipolíticas	Hidrolisam os lipídios, como o acilgliceróis em ácidos graxos livres e o glicerol em ácido propiônico.	<i>Anaerovibrio lipolytica</i> <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> .	BURIN, 2016
Pectinolíticas	Fermentam a pectina, mesmo essa sendo de natureza estrutural, sua fermentação é semelhante aos carboidratos não estruturais.	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	KOZLOSKI, 2017
Lácticas	Fermentam os ácidos lácticos, diminuindo a acidificação ruminal. Competem com patógenos intestinais e produzem peróxido de hidrogênio que inibem os efeitos das bactérias metanogênicas ruminais.	<i>Megasphaera elsdenii</i> ; <i>Selenomas ruminatum</i> , <i>Lactobacillus</i> sp.	SORIANO <i>et al.</i> , 2014 KHOTA <i>et al.</i> , 2016



Tabela 1. Continuação.

<b>Grupo Funcional</b>	<b>Características</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Autores</b>
Ureolíticas	Encontra-se aderidas no epitélio ruminal e hidrolisam a ureia através da enzima urease e liberam amônia no rúmen. Essa amônia vai até o fígado pela veia porta, onde é convertida em ureia novamente, parte ureia volta ao rúmen, e outra parte vai para a saliva, e o excedente é excretado pela urina.	<i>Enterococcus faecium</i> ;	COSTA, 2015 KOZLOSKI, 2017
Metanogênicas	Produzido no rúmen pela da atividade da população de archaeas metanogênicas que convertem hidrogênio e gás carbônico (H <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> ) produzido pela complexa comunidade de ciliados, bactérias e fungos anaeróbicos a metano.	<i>Methanobrevibacter gottschalkii</i> ; <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> .	HENDERSON <i>et al.</i> , 2015 OZBAYRAM <i>et al.</i> , 2018

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

### 3.3 Enterobacteriaceae em ruminantes

Enterobacteriaceae é uma família de bactérias Gram-negativas que apresenta diversos números de gêneros e espécies descritas. Os gêneros mais frequentemente isolados são *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. (KONEMAN *et al.*, 2001).

As espécies dessa família podem ser encontradas no ecossistema ruminal, sendo influenciadas principalmente pela dieta dos animais (DOWD *et al.*, 2008, FREITAS *et al.*, 2014). Estudos relatam também a ocorrência de enterobactérias no ambiente ruminal. Embora residentes naturais do trato intestinal, essas bactérias que podem causar infecções no intestino são denominadas de enteropatogênicas, são elas *Escherichia coli*, *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. (KONEMAN *et al.*, 2001; TRABULSI; CAMPOS, 2002).

Entretanto, algumas cepas dessa família podem promover a diminuição de oxigênio ruminal (RUIZ-LACAZ, 1992), degradar de compostos tóxicos (AUNG *et al.*, 2006) e ainda podem apresentar um promissor potencial biotecnológico (LIN *et al.*, 2010).

Em estudo realizado no Norte de Minas Gerais, foram observados grupos das Enterobacteriaceae no rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais nas concentrações médias de  $8,4 \times 10^6$  e  $1,4 \times 10^5$  UFC/mL, para novilhas e vacas, respectivamente (FREITAS *et al.*, 2014). Contudo, as concentrações dessas bactérias não diferiram no ambiente ruminal de vacas, novilhos e bezerros zebuínos de corte alimentados com pastagem tropical lignificada (VIEIRA *et al.*, 2014).

Vieira *et al.* (2014) ao avaliarem bezerros Nelore mais jovens, alimentados com pastagem tropical, constatou que o gênero *Klebsiella* spp. foi o mais isolado. Sabe-se que o tipo e frequência da dieta exercem influência no pH ruminal, que conseqüentemente interfere no crescimento microbiano dessas bactérias (CALLAWAY *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2016). Dietas ricas em grãos promovem diminuição do pH ruminal e aumentam a população de *Escherichia coli* mais patogênicas (KHAFIPOUR *et al.*, 2011).

Ao analisarem a concentração de Enterobacteriaceae nas fezes de bezerros da raça Holandesa com dois meses de idade criados em aleitamento artificial, Virgínio Júnior *et al.* (2016) detectaram uma média de  $5,2 \times 10^{10}$  UFC/g e o gênero *Proteus* spp. mais isolado. Para Acres (1985) a presença de Enterobacteriaceae, principalmente *Escherichia coli*, são detectados no intestino de bezerros entre oito a 10 horas após o nascimento, por contaminação do meio ambiente fezes. DUSE *et al.* (2015), considera que deve ser melhor elucidado em futuros estudos a como essas bactérias fazem a sua colonização em bovinos, visto que são capazes de causar diarreia e mastite em bovinos, promovendo perdas econômicas na pecuária (DUSE *et al.*, 2015).

### 3.4 Protozoários do rúmen

Os protozoários ruminais são microrganismos unicelulares, não patogênicos, que representam cerca de 2% do peso do conteúdo ruminal. Entretanto, são responsáveis por 40%

do nitrogênio total e 60% do nitrogênio proveniente da fermentação. Apresentam variação de tamanho, entre 20 a 200  $\mu\text{m}$ , sendo, portanto, cerca de 10 a 100 vezes maiores que as bactérias (KAMRA, 2005). Os protozoários do rúmen desempenham ainda um importante papel no metabolismo dos nutrientes e no equilíbrio ambiental do rúmen (NEWBOLD *et al.*, 2015).

A saliva é uma das principais vias de transmissão de protozoários para bezerros. O contato direto com animais faunados contribui para a migração desses eucariotos até o rúmen, mas nas primeiras semanas de vida, são encontrados em maior quantidade (74%) retidos no espaço retículo-rúmen (FOULKES; LENG, 1989). Nas primeiras seis semanas de vida do animal, principalmente gênero detectado é o *Entodinium* spp. (Figura 1) (ARCURI *et al.*, 2006). Esse gênero de ciliados é capaz de despolimerizar amido, hemicelulose, pectina e os polissacarídeos da parede celular bacteriana e fúngica, além de degradar proteínas e são comumente encontrados no ambiente ruminal de bovinos em diversas faixas etárias (ABRAR *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2019).

A população de protozoários no rúmen é constituída em maior quantidade pelos ciliados, com uma média de  $10^5$  a  $10^6$  células/ml do conteúdo ruminal; e pelos flagelos, que estão presentes em menor quantidade de acordo com as condições da dieta.

De acordo com as características morfológicas, os protozoários ciliados presente no rúmen se dividem em dois grupos: os entodiniomorfos, predominante quando a dieta fornecida é a base de forragem, visto que preferem se alimentar partículas insolúveis suspensas no fluido ruminal; e os holotriquios, possuem melhor habilidade de ingestão de grânulos de amido e materiais solúveis, presentes em maior quantidade, quando a dieta é rica em grãos e farelos de cereais (KOZLOSKI, 2017).

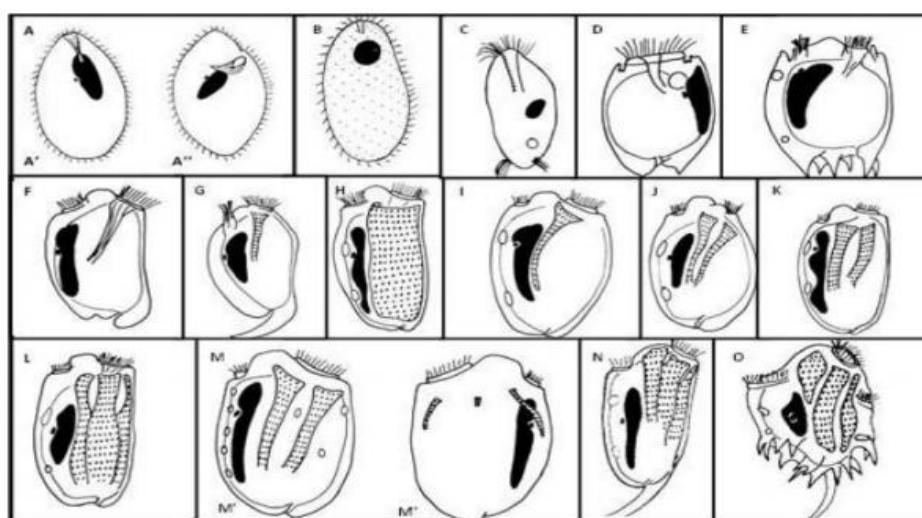
**Figura 1-** *Entodinium* spp. encontrado no líquido ruminal de bezerros Nelore alimentados com feno *Urochloa brizantha* no Norte de Minas Gerais corados com lugol (Objetiva de 40x).



Fonte: Foto do autor, 2020.

Esses microrganismos têm sido classificados em cinco famílias e 24 gêneros diferentes (Figura 2), sendo os gêneros mais frequentes no ecossistema ruminal: *Entodinium*, *Isotricha* e *Dasytricha* (HERDT, 2008, WRIGHT, 2015).

**Figura 2** - Desenhos esquemáticos de protozoários ciliados encontrados em ruminantes domésticos. Ordem Vestibuliferida: Gêneros A: *Isotricha* (A'- *Isotricha prostoma*; A''- *Isotricha intestinalis*), B: *Dasytricha*. Ordem Entodiniomorphida: Gêneros: C: *Charonina*; D: *Entodinium*; E: *Diplodinium*; F: *Eodinium*; G: *Eremoplastron*; H: *Ostracodinium*; I: *Eudiplodinium*; J: *Diploplastron*; K: *Metadinium*; L: *Enoploplastron*; M: *Polyplastron* (M': Lado esquerdo; M'': Lado direito); N: *Epidinium* e O: *Ophryoscolex*.



Fonte: D'AGOSTO; CARNEIRO (1999).

Lynn (2008) classifica a ordem Vestibuliferida em cinco famílias de protozoários ciliados e nos ruminantes essa é caracterizada pela família Isotrichidae (Tabela 2).

Já ordem Entodiniomorphida abrange três subordens, sendo as duas primeiras, Archistomatina e Blepharocorythina, caracterizadas pelas famílias Buetschliidae e Blepharocorythidae, que compreendem os gêneros *Buetschlia* e *Charonina* (LYNN, 2008).

A caracterização da terceira subordem Entodiniomorphina inclui a família Ophryoscolecidae. Os componentes desta família são comumente encontrados em ruminantes, são dotados por regiões com ciliatura retrátil e contém macronúcleo longo. Incluem-se os gêneros: *Entodinium*, *Eodinium*, *Diplodinium*, *Diploplastron*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium*, *Enoploplastron*, *Elytroplastron*, *Polyplastron*, *Epidinium* e *Ophryoscolex* (LYNN, 2008).

**Tabela 2.** Gêneros dos protozoários do rúmen e suas características.

<b>Gêneros dos Protozoários</b>	<b>Características</b>
<i>Ordem Vestibuliferida</i>	
<i>Dasytricha</i>	Apresenta características morfológicas como cílios, cobrindo o corpo em cinécias oblíquas e também fissura do vestíbulo localizado na região posterior do corpo, com comprimento de 60-100 µm e 38-53 µm de largura.
<i>Isotricha</i>	Apresenta corpo coberto por cílios dispostos em cinécias longitudinais e fissura do vestíbulo situado em arranjos distintos, dependendo da espécie.
<i>Ordem Entodiniomorpha</i>	
<i>Buetschlia</i>	Apresenta o corpo em formato oval com duas regiões contendo cílios, na parte 20 anterior e posterior, sendo a anterior composta por uma coroa ciliar. Possui um macronúcleo elíptico com um vacúolo contrátil (região posterior) e vacúolo consolidado (região posterior), o comprimento varia de 30-35 µm e largura 20-30 µm.
<i>Charonina</i>	Apresenta ciliatura restrita às regiões anterior e posterior do corpo, o vestíbulo é bastante acentuado, o comprimento pode variar entre 28-46 µm e a largura 9-15 µm.
<i>Ordem Entodiniomorpha - Família Ophryoscolecidae.</i>	
<i>Entodinium</i>	Apresenta uma única região ciliar retrátil, a qual envolve a fissura do vestíbulo. O comprimento varia de 22-115 µm e a largura 14-90 µm.
<i>Diplodinium</i>	Apresenta duas regiões ciliares retráteis dispostas no mesmo plano corporal. Não possuem placas esqueléticas e o macronúcleo apresenta-se com o terço anterior inclinado a região ventral. Os vacúolos são contráteis, o comprimento varia de 30-120 µm e a largura 20-80 µm.
<i>Eodinium</i>	Apresenta regiões ciliares retráteis estão situadas em um mesmo plano corporal. Não possuem placas esqueléticas e o macronúcleo apresenta-se em formato de bastão localizado na região dorsal. Os vacúolos são contráteis, o comprimento varia de 40-70 µm e largura 20-40 µm.

Tabela 2. Continuação.

Gêneros dos Protozoários	Características
<i>Ordem Entodiniomorphina - Família Ophryoscolecidae.</i>	
<i>Eremoplastron</i>	Apresenta regiões ciliares retráteis estão situadas em um mesmo plano corporal. Possuem somente uma única placa esquelética estreita e o macronúcleo apresenta-se em formato de bastão ligeiramente inclinado a região ventral. Os dois vacúolos são contráteis, o comprimento dos pertencentes a este gênero varia de 35-110 µm e a largura 25-70 µm.
<i>Eudiplodinium</i>	Apresentam regiões ciliares retráteis estão situadas em um mesmo plano corporal. Possuem uma única placa esquelética alongada, sendo esta alargada na parte anterior situada próxima ao macronúcleo, este apresenta-se em forma de gancho e os vacúolos são contráteis. As medidas de comprimento variam de 120-200 µm e a largura 80-50 µm.
<i>Diploplastron</i>	Apresenta as duas regiões com presença de cílios retráteis estão situadas no mesmo plano corporal. As placas esqueléticas são delgadas, sendo o macronúcleo em formato de bastão. Os vacúolos são contráteis, com comprimento de 90-128 µm e largura de 65-87 µm.
<i>Polyplastron</i>	Apresenta duas regiões ciliares retráteis, situadas no mesmo plano corporal. Possui cinco placas esqueléticas, duas situadas na superfície esquerda e outras três na superfície direita e cinco vacúolos contráteis. O comprimento varia de 122-210 µm e a largura 97-130 µm.
<i>Ostracodinium</i>	Apresenta duas regiões ciliares situadas no mesmo plano corporal. Possui somente uma placa esquelética na superfície esquerda. O macronúcleo apresenta-se lobado, os vacúolos são contráteis que se diferenciam de acordo com a espécie. O comprimento varia de 50-128 µm e a largura de 36-70 µm.
<i>Elytroplastron</i>	Apresenta duas regiões ciliares situadas no mesmo plano corporal. Possui quatro placas esqueléticas, duas situadas na superfície esquerda e outras duas na superfície direita e quatro vacúolos contráteis. O macronúcleo se apresenta na forma de bastão, o comprimento varia de 100-160 µm e a largura 76-100 µm.

Tabela 2. Continuação.

Gêneros dos Protozoários	Características
<i>Ordem Entodiniomorpha - Família Ophryoscolecidae.</i>	
<i>Metadinium</i>	Apresenta duas regiões ciliares situadas no mesmo plano corporal. Possui duas placas esqueléticas largas unidas ou não na região posterior. Apresenta dois vacúolos são contráteis. As medidas de comprimento variam de 110-210 $\mu\text{m}$ e a largura 80-140 $\mu\text{m}$ .
<i>Enoploplastron</i>	Apresenta duas regiões ciliares situadas no mesmo plano corporal. Apresenta três placas esqueléticas afastadas ou parcialmente acopladas. O macronúcleo se apresenta na forma de bastão e dois vacúolos contráteis. O comprimento varia de 80-110 $\mu\text{m}$ e a largura de 60-78 $\mu\text{m}$ .
<i>Ophryoscolex</i>	Apresenta duas regiões ciliares situadas em planos diferentes no corpo. Possui três placas esqueléticas e uma coroa de espinhos que se inicia na região mediana até a área posterior do corpo. Exibe inúmeros vacúolos contráteis, o comprimento varia de 140-190 $\mu\text{m}$ e a largura 80-110 $\mu\text{m}$ .
<i>Epidinium</i>	Apresenta duas regiões ciliares retráteis situadas em planos diferentes no corpo. Apresenta três placas esqueléticas e podem apresentar espinhos na parte posterior. Os dois vacúolos são contráteis, o comprimento varia de 80-150 $\mu\text{m}$ e a largura 40-70 $\mu\text{m}$ .

Fonte: LYNN, 2008.

Ao quantificarem a concentração média de protozoários, Duarte *et al.* (2018) detectaram uma população de  $1,7 \pm 9,1 \times 10^4/\text{mL}$  de fluido ruminal de bezerros Nelores com média de oito meses de idade recebendo com dieta feno de *Uroclhoa decumbens* de baixo valor nutricional. Para Suárez *et al.* (2007) a composição da dieta oferecida ao animal jovem influencia diretamente no desenvolvimento ruminal, e a adição de concentrado e grãos aumenta a velocidade do desenvolvimento ruminal, em dietas de alta forragem, estima-se que os protozoários no rúmen representem 17% a 21% da degradação total das fibras (GRUNINGER *et al.*, 2019).

Os ciliados ruminais apresentam ainda o quimiotactismo, que permite locomoção em direção a gradientes de concentração contendo açúcares (ARCURI *et al.*, 2006).

O equilíbrio do pH é primordial à sobrevivência e desenvolvimento dos protozoários ruminais, sendo a faixa ideal do pH entre 6 e 7. Os protozoários são inibidos em pH inferior a 5,5 e morrem quando o pH é igual ou menor a 4,5 (FRANZOLIN; DEHORITY, 1996). Em novilhos Nelore alimentados com ou sem volumoso, Nigri *et al.* (2017) apuraram que esses quando alimentados com dieta de alto grão e sem volumoso apresentam uma menor população de protozoários ruminais em relação aqueles criados em pastagem lignificada. Segundo os autores isso foi atribuído à redução significativa do pH.

Os ciliados formam uma grande proporção de sua biomassa microbiana e predam bactérias, como principal fonte de aminoácidos e ácidos nucleicos, e fazem o engolfamento de grânulos amidos. Além disso, os entodiniomorfos possuem atividade celulolíticas e hemicelulolíticas. Devido a presença da organela hidrogenossoma possuem alta atividade metabólica. Por liberarem hidrogênio, esses eucariotos apresentam relação direta com os organismos metanogênicos (ARCURI *et al.*, 2011; BELANCHE *et al.*, 2014; NEWBOLD *et al.*, 2015; KOZLOSKI, 2017).

Silva *et al.* (2014) concluíram que a quantidade total de protozoários diminuiu significativamente com a evolução do período de seca em novilhos alimentados com pastagens tropicais em região semiárida. Em outro estudo a população de protozoários ruminais em zebuínos alimentados com ou sem volumoso, Duarte *et al.* (2018) constataram que o gênero *Buetschilia* spp. foi o mais frequente em bezerros, o *Entodinium* spp. foi mais prevalente em bovinos adultos e o *Charonina* spp. foi mais predominante em vacas, sendo esses animais alimentados em pastagens de *Urochloa* spp., com baixo valor nutricional. Sendo assim, a quantidade e os gêneros de protozoários no ambiente ruminal podem ser influenciados pelo tipo e a frequência da alimentação, a inclusão de aditivo alimentares, a distribuição geográfica, o antagonismo entre espécies, as raças e o estado fisiológico do animal (MONÇÃO *et al.*, 2013; YUSTE *et al.*, 2019).

Em um estudo utilizando bovinos mestiços do cruzamento entre bovinos holandeses e japoneses pretos, canulados ruminalmente e recebendo dieta com maior proporção de concentrado, observou-se nestes animais uma maior concentração de protozoários do gênero *Entodinium* (ABRAR *et al.*, 2016). Tymensen; Barkley; MacAllister (2012) também constaram o gênero *Entodinium* como o mais abundante em bovinos alimentados com silagem de grãos e



Manella; Lourenço (2004), também verificou maior prevalência do gênero *Entodinium* em bovinos Nelore recém-desmamados, pastando exclusivamente em *Urochloa brizantha*.

Ainda para Bainbridge *et al.* (2018) alterar a quantidade e o tipo de gêneros dos protozoários no rúmen pode ser uma abordagem inovadora para aumentar a quantidade de AGCC em ruminantes. Entretanto, a defaunação diminui a digestibilidade da matéria orgânica do rúmen e da fibra, resultando na perda de atividades fibrolíticas pelos protozoários. No entanto, a eliminação de protozoários pode aumentar a oferta de proteínas microbianas e reduzir a produção de metano (GUYADER *et al.*, 2014; NEWBOLD *et al.*, 2015).

### 3.5 Fungos anaeróbios do rúmen

Os fungos são transmitidos entre os ruminantes, pela saliva, pelo ar ou com a ingestão de alimentos contaminados. A colonização fúngica começa a partir da adesão do zoósporo aos materiais vegetais, para degrada-la, permitindo o crescimento dos micélios. Esses eucariotos estão responsáveis pela produção de enzimas necessárias para essa degradação, por exemplo, a celulase, xilanase e hidrolases. O crescimento é estimulado por aminoácidos, AGCC e por vitaminas (GULIYE; WALLACE, 2007; EDWARDS *et al.*, 2008; PUNIYA *et al.*, 2015). Entretanto, altas concentrações de açúcares promovem diminuição do pH ruminal, podendo inibir o crescimento dos zoósporos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Os fungos anaeróbicos são os mais encontrados no ambiente ruminal ( $10^6$ .mL<sup>-1</sup>) e são responsáveis pela degradação de fibras vegetais. O conhecimento dos fungos ruminais e suas enzimas de degradação vem sendo objetos de muitas pesquisas, principalmente pelo seu potencial biotecnológico e também na melhoria da nutrição dos ruminantes (RESENDE *et al.*, 2015).

Os fungos anaeróbicos estritos recobrem as partículas alimentares e representam aproximada de 6% a 8% do total da microbiota ruminal. São produtores de zoósporos e fazem parte da divisão *Eumycota*, subdivisão *Mastigomycotina*, classe *Chytridiomycetos*, ordem *Neocallimastigales*, família *Neocallimasticeae* e gêneros *Caecomyces*, *Cyllumyces*, *Piromyces*, *Neocallimastix*, *Anaeromyces* e *Orpinomyces* (OZKOSE *et al.*, 2001; GRIFFITH *et al.*, 2009; KOZLOSKI, 2011). Essa divisão de gêneros é baseada na morfologia do talo simples (monocêntrico e policêntrico), talo composto (bubos celulares vegetativos e esporângios) e número de flagelos (uniflagelados e multiflagelados) (GRIFFITH *et al.*, 2009).

O gênero *Neocallimastix*, caracterizado por ser monocêntrico, poliflagelado e esporângios (filamentosos), podem ser encontrados em diferentes ruminantes. Nos bovinos, a principal espécie é a *Neocallimastix variabilis* (HO *et al.*, 1993). Segundo Thareja *et al.* (2006), esse gênero não foi observado nas fezes de caprinos e ovinos, visto que nesses ruminantes os principais gêneros observados foram *Anaeromyces*, *Piromyces*, *Neocallimastix* e *Orpinomyces*.

Em estudo com bovinos e caprinos corte criados em pastagens tropicais, foram encontrados fungos *Neocallimastix* spp., *Orpinomyces* spp. e *Anaeromyces* spp. em bovinos e os gêneros *Orpinomyces* spp. e *Anaeromyces* spp. em caprinos (ABRÃO *et al.*, 2010). Esses

resultados mostram que a ocorrência de fungos anaeróbios estritos ruminal são influenciados por fatores como tipo de dieta, frequência alimentar e tipo de fermentação (GRUNINGER *et al.*, 2014).

Os fungos produzem diversas enzimas como as celulolíticas, hemicelulolíticas e fibrolíticas, por exemplo, que solubilizam as fibras vegetais, melhorando e acelerando o processo de digestão de forragens tropicais, aumentando assim a disponibilidade energética e de proteínas, oferecendo subsídios para o crescimento da população microbiana no rúmen (CERDÁ, 2003; PAUL *et al.*, 2004; PAUL *et al.*, 2012; GRUNINGER *et al.*, 2014).

A lignina é um polímero de natureza aromática com alto peso molecular que tem como base estrutural unidades de fenil-propano. Esse polímero barreira física que impede a hidrólise dos polissacarídeos presente na parede celular vegetal (ADESOGAN *et al.*, 2014). A degradabilidade da fibra vegetal é influenciada pela quantidade de lignina presente na parede celular, estrutura e composição dessa lignina e sua interligação com outros componentes da parede (RAFFRENATO *et al.*, 2017).

Os fungos ruminais anaeróbicos produzem enzima lignocelulolíticas que degradam os complexos de ligninas das paredes vegetais, por ação mecânica ou por atividade celulolítica e hemicelulolítica, quebrando as ligações de éster da lignina e a hemicelulose, liberando a celulose e outros carboidratos que atendem as demandas nutricionais dos ruminantes (DASHTBAN *et al.*, 2010; ABRÃO *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2016).

As análises dos zoósporos possibilitam a confirmação da presença de fungos anaeróbios no ambiente ruminal e com a sua diversidade morfológica é possível sugerir a presença de várias espécies (RESENDE *et al.*, 2015). Além disso, induz os celulosomas fúngicos a aumentar o seu potencial de degradação em função da composição química do substrato aderido (SOLOMON *et al.*, 2016).

### 3.6 Fungos anaeróbios facultativos no trato digestório de ruminantes

Os fungos anaeróbios facultativos também estão presente no ambiente ruminal em proporções menores que as dos fungos anaeróbios obrigatórios sendo detectados em população de aproximadamente  $10^4$  UFC/mL no fluído ruminal (ABRÃO *et al.*, 2014). Esses fungos são aptos para utilizar o oxigênio ou um componente orgânico comoceptor final de elétrons, possibilitando a esses microrganismos sobreviver em vários ambientes (MADIGAN *et al.*, 2010).

Almeida *et al.* (2014) detectaram a ocorrência em amostras de fluido ruminal de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Rhizophus* e *Scedosporium* na microbiota de vacas alimentadas com pastagem de *Urochloa brizanta* (*syn. brizanta*) e bezerras alimentadas com silagem de sorgo ou com cana-de-açúcar.

Em um estudo conduzido por Virgínio Júnior *et al.* (2016) com bezerros da raça Holandesas alimentados com silagem de transição, em água ou leite, foram isolados os seguintes gêneros de fungos micelianos do rúmen e das fezes: *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichophyton*, sendo o *Aspergillus* o mais isolado.

Outro estudo com bezerros Nelore desmamados, alimentados exclusivamente a pasto (*Urochloa brizanta*) verificou-se a presença de fungos micelianos dos gêneros, *Onychocolas*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichophyton*, sendo o gênero *Aspergillus*, o mais frequente (ABRÃO *et al.*, 2014).

Em estudo com a microbiota ruminal de ruminantes domésticos mantidos em pastagens tropicais, os gêneros mais cultivados do fluido ruminal de vacas, ovelhas e cabras foram *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucore* e os isolados obtidos apresentaram atividade celulolítica comprovada (OYELEKE; OKUSANMI, 2008).

Em outra pesquisa Freitas *et al.* (2012) avaliaram fungos micelianos provenientes das fezes de ovinos mestiços da raça Santa Inês alimentados com capim-tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia) criados no Norte de Minas Gerais. Os gêneros mais frequentemente identificados foram o *Aspergillus* spp., seguindo de *Paecilomyces* spp., *Trichoderma* spp. *Acremonium* spp.. Já em matrizes, os autores, isolaram em maior quantidade os gêneros *Paecilomyces* spp., *Aspergillus* spp., *Malbranchea* spp. e *Onychocola* spp.

### 3.7 Parâmetros sanguíneos em bovinos

A análise de metabólitos sanguíneos pode representar uma ferramenta para avaliação do estado nutricional do animal, além de representar um apoio a diagnósticos e acompanhamento de tratamentos (GONZÁLEZ *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003).

Fatores como idade, sexo, exercício e estado emocional devem ser considerados ao estabelecer valores de referências para bovinos (KAPALE *et al.*, 2008). Entretanto para bezerros em diferentes idades há poucas informações para estabelecimento desses valores de referência, sendo necessários estudos para aprimorar e fornecer mais dados dos parâmetros sanguíneos as suas concentrações em faixas de normalidade (LIMA *et al.*, 2012; PÉREZ-SANTOS *et al.*, 2015).

A determinação dos valores de referência em exames laboratoriais é um grande desafio, pois exige metodologias adequadas, que inclui a amostragem representativa e cuidados metodológicos na coleta, no processamento, no transporte, na análise bioquímica e na estatística (RAO, 2016; ROSENFELD *et al.*, 2019). As estações do ano interferem na temperatura corporal superficial, no número de neutrófilos e eosinófilos, enquanto que a idade exerce efeito nas variáveis termofisiológicas, no eritrograma, plaquetograma e leucograma de bezerros (NASCIMENTO *et al.*, 2019).

#### 3.7.1 Eritrograma em bovinos

Os principais parâmetros avaliados no eritrograma são: a contagem total de eritrócitos, a concentração de hemoglobina, hematócrito, o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Tabela 3) (RAO, 2016; SÁ *et al.*, 2018).

**Tabela 3.** Valores de referências do eritrograma em bovinos.

<b>Componentes sanguíneos</b>	<b>Valores de referência</b>
Eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ )	5,0 - 10
Hemoglobina (g/dL)	8,0 - 15
Hematócrito (%)	24 - 46
VCM ( $\mu^3$ )	40 - 60
HCM (%)	14,8 - 18,6
CHCM (%)	30 - 36

Nota: VCM= Volume Corpuscular Médio, HCM= Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM= Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

Fonte: KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008.

O hematócrito é a proporção das hemácias no sangue total em porcentagem, e é utilizado como um indicador de anemia e possível grau de desidratação em bovinos (RAO, 2016; THRALL *et al.*, 2012).

Dentro dos índices hematimétricos o VCM se refere ao tamanho das hemácias e seu cálculo é baseado na razão entre o hematócrito e a hemoglobina, podendo classificar as hemácias em normocítico (tamanho normal), macrocítico (aumento do tamanho das hemácias) ou microcítico (diminuição do tamanho das hemácias) (RAO, 2016). A determinação do tamanho das hemácias é importante para auxiliar na compreensão das causas das anemias (SILVA, 2017).

Outro índice hematimétrico é o HCM, que avalia a quantidade média de hemoglobina dentro da célula sanguínea, de acordo com a sua coloração, classificando-a em hiperocrômica (hemácia escurecida), normocrômica (coloração típica da hemácia) ou hipocrômica (hemácia clara). O CHCM é um índice hematimétrico que serve para contar e avaliar as características das hemácias, classificando de acordo com a coloração, assim como o HCM (WEISS; WARDROP, 2010; RAO, 2016).

Para Kerr (2003) as avaliações de amostras de fluidos corpóreos, como o plasma e o soro sanguíneo podem auxiliar esclarecer o quadro clínico, a produção e o ganho de peso dos animais.

Rocha *et al.* (2013) ao analisarem o eritrograma de 26 bezerros ( $\frac{1}{2}$  Chanchim x Nelore) durante os 30 primeiros dias de vida, constataram valores médios dos eritrócitos de  $8,51 \pm 0,44 \times 10^6/\text{mm}^3$  e de  $12,8 \pm 0,67$  g/dL da hemoglobina.

### 3.7.2. Leucograma e Plaquetograma em bovinos

O leucograma por sua vez é utilizado para interpretação das respostas dos leucócitos ou glóbulos brancos ou células de defesas, que fazem parte do sistema imunitário, participando da resposta imune inata e específica, permitindo diagnóstico, monitoramento e prognóstico de patologias (RAO, 2016; SILVA, 2017).

Os leucócitos são divididos granulócitos (polimorfonucleares) e em mononucleares. Os granulócitos são compostos pelos neutrófilos, eosinófilos e basófilos, e mononucleares são representados pelos linfócitos e monócitos (Tabela 4) (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; THRALL *et al.*, 2012).

**Tabela 4.** Valores de referências leucograma e plaquetograma em bovinos.

Componentes sanguíneos	Valores de referência
Plaquetas ( $10^6/\mu\text{L}$ )	100 - 800
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	4,0 – 12,0
Segmentados ( $10^3/\mu\text{L}$ )	0,6– 4,0
Eosinófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	0 – 2,4
Monócitos ( $\mu\text{L}$ )	25 - 840
Linfócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	2,5– 7,5

Fonte: KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008.

Os neutrófilos são os granulócitos que diferenciam entre célula em bastonete (imaturas) e célula segmentada (madura), sendo as segmentadas o segundo tipo de célula de defesa mais presente na circulação dos bovinos. Os neutrófilos participam como primeira linha de defesa do organismo frente a processos infecciosos e inflamatórios. Em bovinos submetidos a estresse ou à doença, essas células apresentam um de pico de leucocitose menor quando do que expressam uma resposta inflamatória (HARVEY, 2012; SILVA, 2017).

Em torno de 3 a 5% dos leucócitos circulantes são eosinófilos. Esse tipo célula apresenta importante ação contra parasitas. Os basófilos, por sua vez, são raramente encontrados em bovinos e não apresentam a sua função totalmente elucidada (STOCKHAM; SCOTT, 2011; SILVA, 2017).

Os monócitos são leucócitos mononucleares que promovem a fagocitose de patógenos e a eliminação de tecidos mortos ou lesados, entretanto, essa célula pode diminuir em processos inflamatórios agudos e se elevar em doenças crônicas (WEISS; WARDROP, 2010; STOCKHAM; SCOTT, 2011; SILVA, 2017).

Os linfócitos são as células brancas mais numerosas no sangue de ruminantes e desempenham um papel importante na defesa orgânica. Ocorrem comumente em infecções virais e são de dois tipos o linfócito T que são os responsáveis pela imunidade celular do organismo e atuam estimulando a produção de anticorpos, e o linfócito B que são responsáveis pela imunidade humoral e dão origem aos plasmócitos que produzem os anticorpos. (HARVEY, 2012; SILVA, 2017). Entretanto, pode ocorrer a linfopenia em animais submetidos ao estresse (SCOTT; STOCKHAM, 2011). Silva (2017) atesta que em ruminantes, os grandes linfócitos podem ser confundidos com monócitos.

Baccili *et al.* (2018) observaram os seguintes valores para leucócitos ( $10 \pm 4 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), neutrófilos segmentados ( $2,9 \pm 2 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), monócitos ( $1,1 \pm 0,6 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) e linfócitos ( $5,1 \pm 2,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) em bezerros da raça Holandesa com seis meses de idade e alimentados com colostro.

Coppo *et al.* (2003) constataram que após o desmame, bezerros zebuínos apresentaram concentração sérica de adrenalina e manutenção da concentração de cortisol, associadas a maiores contagens de leucócitos, neutrófilos e linfócitos. Outro estudo sobre o desmame de bezerros Nelore aos sete a oito meses de idade em Linhares, Espírito Santo, constatou-se que no primeiro dia de desmame, mas não no dia subsequente, elevações significativas das contagens de leucócitos e neutrófilos, sem alteração da relação neutrófilos, linfócitos compatíveis com a ação da adrenalina (PAES *et al.*, 2012). O desmame é um processo abrupto e aumenta o nível de estresse dos animais. Consequentemente, esse período é caracterizado pela redução do ganho de peso no início da fase de recria, associada a queda da imunidade dos animais (VALLE; ANDREOTTI; THIAGO, 1998).

O plaquetograma é um dos componentes do hemograma que inclui a mensuração e a avaliação plaquetária do sangue (Tabela 4). As plaquetas apresentam como função primordial a formação de um tampão homeostático para evitar o extravasamento de sangue durante uma injúria endotelial, evitando uma hemorragia (COSTA *et al.*, 2020).

### 3.7.3. Perfil bioquímico sérico em bovinos

Os principais componentes bioquímicos sanguíneos representativos do metabolismo proteico são proteínas totais, albumina, globulinas, ureia e creatinina. Para a análise do metabolismo energético, são avaliados valores séricos de glicose e colesterol (PÉREZ *et al.*, 2014). Alterações hepáticas podem ser diagnosticadas pela quantificação das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e a fosfatase alcalina (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores de referências do Perfil Bioquímico Sérico em Bovinos.

<b>Componentes Bioquímicos</b>	<b>Valor de referência</b>
Albumina (g/dL)	2.6 – 3.6 <sup>a</sup>
ALT (U/L)	78 – 132 <sup>b</sup>
Creatinina (mg/dL)	1,0 – 2,0 <sup>a</sup>
Fosfatase alcalina (U/L)	0 – 490 <sup>c</sup>
Glicose (mg/dL)	45 – 75 <sup>c</sup>
Globulina (g/dL)	2.6 – 4.0 <sup>c</sup>
Proteína Total (g/dL)	6,5 – 7,4 <sup>a</sup>
Ureia (mg/dL)	23 – 58 <sup>a</sup>

Nota: ALT= alanina aminotransferase.

Fonte: <sup>a</sup>MEYER; COLER; RICH, 1995; <sup>b</sup>MEYER; HARVEY, 1998;

<sup>c</sup>KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008.

As proteínas são os componentes mais abundante no plasma sanguíneo, pois desempenham diversas funções, como na coagulação do sangue, nas defesas contra agentes

patogênicos, no transporte de metabólitos, na regulação do metabolismo celular e na manutenção da pressão osmótica (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

A albumina representa cerca de 50% das proteínas totais circulantes e desempenha diversas funções no organismo, como manter a pressão osmótica, auxílio do transporte de substâncias que são pouco solúveis em meios aquosos, os ácidos graxos, o colesterol, a bilirrubina, o óxido nítrico e os íons metálicos e fármacos. Além disso, tem papel importante na atividade antioxidante (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; KERR, 2003). Doenças infecciosas e inflamatórias levam a queda na concentração dessa proteína plasmática (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

As globulinas são proteínas responsáveis pelo transporte de lipoproteínas, glicoproteínas, mucoproteínas e o cobre, exerce ainda um papel fundamental na imunidade. Produzida pelo fígado, podem ser divididas em três tipos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . As análises dessas proteínas podem indicar processos inflamatórios (GONZALEZ, 2009).

Os ruminantes necessitam manter quantidades mínimas de glicose para ser usada pelos tecidos prioritários, como o sistema nervoso central. A gliconeogênese acontece a partir do ácido propiônico e possui absorção intestinal. No entanto, de acordo com o estado metabólico do animal a glicose pode ser proveniente de uma ou mais fontes para dar conta de suprir suas exigências (RADOSTITS *et al.*, 2007; THRALL *et al.*, 2012). Além disso, o nível sérico de glicose pode ser um indicador de status energético do animal, visto que a glicose apresenta insensibilidade a mudança nutricional e sensibilidade ao estresse (GONZALEZ, 2009).

Para González; Silva (2006) o colesterol em bovinos pode ser proveniente de fontes exógenas e endógenas. A fonte exógena é oriunda dos alimentos consumidos pelo animal, principalmente em dietas ricas de carboidratos ou de lipídios. Já a endógena deriva da degradação do acetil-CoA no fígado, nas gônadas, no intestino e nas glândulas adrenal. Esses autores afirmam ainda que os níveis de colesterol podem ser aumentados por hipotireoidismo, pancreatite e obstrução biliares, por exemplo.

A ureia e a creatinina são os principais indicadores da função renal e são produtos do metabolismo do nitrogênio. A ureia quando mensurada através do soro ou do plasma sanguíneo indica que está em trânsito entre o fígado, transportada pela via plasma para os rins, onde será excretada através da urina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; THRALL *et al.*, 2012). Kerr (2003) considera fatores relacionados a dieta como elevados níveis de proteína, a inclusão de proteína de má qualidade e os níveis deficientes de carboidrato que podem influenciar concentração de ureia no sangue.

A creatinina por sua vez é produzida pelo fígado a partir dos aminoácidos e circula pelo plasma até ser captada pela musculatura esquelética. Contudo, as alterações nos níveis de plasmático de creatinina são devidas as alterações na excreção de creatinina, ou seja, retratam a função renal. Por isso ela é considerada o melhor indicador da taxa de filtração glomerular se comparado com a ureia (KERR, 2003; THRALL *et al.*, 2012). O aumento da sua concentração pode ser visto em casos de fluxo renal diminuído por hipotensão, desidratação, doenças renais ou obstrução urinária (WITTEWER *et al.*, 1993; GONZALEZ, 2009).

As aminotransferases são enzimas essenciais envolvidas no metabolismo de todos os organismos. O objetivo das reações de transaminação consiste em coletar os grupos amino dos aminoácidos diferentes na forma de L-glutamato que funciona como doador de grupos amino para as vias biosintéticas ou de excreção que eliminam os produtos nitrogenados (LEHNINGER, 2006). A ALT é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito. Elevação do nível da ALT é um indicador específico para doença hepatobiliar (infecciosa, trauma, neoplasia, amiloidose e esteatose), porém o aumento pode ser induzido por medicamentos (anticonvulsivantes, glicocorticoides, mebendazol, paracetamol), miocardite e regeneração hepato-celular (OCKNER, 1993; GONZALEZ, 2009).

A fosfatase alcalina é uma enzima responsável pela catalise da hidrólise alcalina de uma variedade de substratos, pois é uma enzima de membrana, encontrada principalmente no fígado, túbulos renais, intestino e tecido ósseo, sendo assim não é considerada uma enzima hepato-específica (KERR, 2003). O aumento no nível dessa enzima pode ser devido há um dano hepato-celular, indução por medicamentos (barbitúricos e anticonvulsivantes) ou esteroides, doenças ósseas (tumores, osteomalácia, consolidação de fraturas), deficiência de vitamina D, caquexia, septicemia, endotoxemia, pancreatite, hiperparatireoidismo, hiperadrenocorticismismo (GONZALEZ, 2009). Além disso, em animais jovens ocorre o aumento dessa enzima devido à grande quantidade de isoenzima óssea, presente nos ossos dos animais em fase de crescimento, que diminui com o avançar da idade e com a calcificação das epífises ósseas (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; GONZALEZ, 2009).

Em estudo com bezerras Nelore com a faixa etária de  $\pm 210$  dias, recebendo feno de *Urochloa decumbens*, observou-se a concentração média da albumina de  $3,2 \pm 0,5$  g/dL, dentro do valor de referência (FORTE *et al.*, 2016). Ao se analisar o perfil bioquímico de bezerros mestiços Holandês x Gir (machos e fêmeas), alimentado com colostro, Gomes *et al.* (2016), encontraram os valores médios da ALT ( $20,0 \pm 17,8$  U/L), Creatinina ( $0,8 \pm 0,2$  mg/dL), Fosfatase alcalina ( $303,8 \pm 110,5$  U/L), Globulina ( $6,1 \pm 1,4$  g/dL) e Proteína Total ( $8,6 \pm 1,5$  g/dL).

### 3.8 Suplementação de dietas utilizando fungos como aditivos microbianos em ruminantes

Para ruminantes domésticos como bovinos, caprinos e búfalos a utilização de bactérias, leveduras e fungos aeróbicos têm apresentando sucesso como suplementação na dieta desses, pois promovem aumento na taxa de crescimento e na eficiência da produção. Sendo assim, o uso de fungos anaeróbicos provenientes do rúmen pode apresentar um potencial promissor, visto que produzem uma variedade de enzimas que solubilizam as paredes lignificadas das células vegetais normalmente dentro do ambiente ruminal (PUNIYA *et al.*, 2015).

Autores como Tripathi *et al.* (2007) e Alzahal *et al.* (2014), consideram que a adição de fungos e/ou enzimas fúngicas na dieta de ruminantes, podem melhorar a microbiota ruminal, estabilizar o pH ruminal, e melhorar a degradação microbiana da parede celular das plantas. E pesquisas já demonstram que os fungos anaeróbicos têm interferência no processo de digestão,



fermentação e na melhoria das condições do ambiente ruminal, propiciando aumento da comunidade microbiana ruminal (MANTOVANI; BENTO, 2013).

Beharka e Nagaraja (1998), concluíram que a inclusão de *Aspergillus orizae* podem estabilizar o pH ruminal, sendo benéfico em dietas ricas em grãos. O pH ideal para o fluido ruminal é considerado normal entre a faixa de 5,5 a 7,6, e é vital para a sobrevivência e a estabilidade dos microrganismos do rúmen, visto que esse são muito sensíveis a pequenas mudanças no nível do pH, o que ocorre devido ao tipo de alimento consumido e o tempo desde a última alimentação (DIRKSEN, 1993). Alzhal *et al.* (2014), observaram que o *Saccharomyces cerevisiae* pode proliferar no rúmen de vacas lactantes e contribuir para o aumento de bactérias que degradam fibras no rúmen como *Fibrobacter succinogenes* e *Rumminococcus albus*.

Ao avaliarem a digestibilidade *in vitro* de diversos volumosos e a estabilidade enzimática da xinalase obtidas de *Aspergillus niveus*, Nogueira *et al.* (2013) observaram um aumento da digestibilidade em 10,8% para alfafa, 6,0% para capim-Marandu e 33,6% para o feno de capim-jaraguá. Esses autores concluíram que a adição dessas enzimas na suplementação de dietas de ruminantes é promissora, além de se mostrarem estáveis às condições ruminais e não apresenta efeito citotóxico às células de mamíferos.

Os isolados de *Aspergillus* spp. do rúmen de bovino em pastagens tropicais durante a estação seca apresentaram notável produção de enzimas celulases, xilanases e fenoloxidasas para a degradação da lignina, mesmo após dois dias de incubação. As atividades de avicelase, xilanase e CMCase apresentaram diferenças inter e intraespecíficas. Os isolados de *Aspergillus terreus* e *Aspergillus fumigatus* foram mais identificados por sequenciamento do rDNA e apresentam potencial uso como probióticos para bovinos alimentados em pastagens lignificadas e para produção comercial de enzimas para fins biotecnológicos. Observou-se ainda que a primeira espécie fúngica apresentou a maior atividade enzimática para a avicelase ( $3,96 \pm 1,77$ ) e xilanase ( $3,13 \pm 0,91$ ) (ABRÃO *et al.*, 2017).

Vinte cepas de *Aspergillus* spp. provenientes do trato gastrointestinal de bovinos criados com feno de *Urochloa decumbens* lignificado, em período de seca no norte do estado de Minas Gerais, foram utilizados para avaliar a viabilidade de crescimento no fluido ruminal por até 96 horas e a produção de aflatoxinas *in vitro*. Após a incubação Abrão *et al.* (2018) observaram que 95% destes isolados apresentaram resistência aos ácidos ruminais, dois isolados apresentaram viabilidade sob a pressão da microbiota autóctone e de metabólitos do ecossistema ruminal e ainda os fungos avaliados não produziram aflotoxinas. Além disso, observaram que estes apresentavam características fisiológicas para serem utilizados como aditivos microbianos ou probióticos para o ambiente ruminal.

Em outro estudo, ao adicionar enzimas de *Trichoderma reesei* em dietas de bezerros bubalinos, constatou-se aumento na digestibilidade de matéria seca, de proteína bruta promovendo aumento linear no ganho de peso diário (NAWAZ *et al.*, 2016).

Ahmed *et al.* (2015) analisaram a substituição integral do feno de *Trifolium alexandrinum* por uma mistura de *Atriplex nummularia* e *Acacia saligna* na dieta de cordeiros da raça Barki suplementados com *Trichoderma reesei* ou *Saccharomyces cerevisiae*, esses autores

verificaram que os animais suplementados obtiveram aumento na ingestão de alimentos e produziram mais AGCC em comparação aos não suplementados.

Sun *et al.* (2014) avaliaram os efeitos *in vitro* de *Aspergillus oryzae* sobre a fermentação ruminal e populações microbianas com diferentes fontes de volumosos, e constataram aumento na produção de proteína microbiana, de AGCC e de propionato. Além de aumento na porcentagem de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*. Já o efeito deste fungo na fermentação ruminal de vacas leiteiras da raça Holandesa Sun *et al.* (2017) apuraram um ganho de peso proteína microbiana, de AGCC e atividade de carboximetilcelulase (CMCase) em relação aos animais do controle.

### 3.8.1 Efeitos da suplementação sobre o desempenho animal

A adição de cepas *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* pode aumentar o ganho de peso e a produção de leite, aumentando o consumo de matéria seca e a eficiência alimentar, reduzindo a produção de metano (CH<sub>4</sub>) e beneficiando o sistema imune bovino (WALLACE, 1994; OLLE *et al.*, 2017). Oliveira *et al.* (2010) avaliaram o desempenho e a eficiência digestiva de vacas leiteiras da raça Holandesa suplementadas com 10g de levedura comercial ( $2 \times 10^{10}$ UFC/g) de *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500 por animal com dietas contendo silagem de milho, polpa cítrica e milho maduro. Constatou-se que os animais que receberam a levedura apresentaram ganho na eficiência alimentar (3,8%). Corroborando com Wallace (1994), esses autores concluíram ainda que houve diminuição no consumo de matéria seca e aumento na produção de leite com redução na contagem de células somáticas do leite em comparação com os animais não suplementados.

Raghebian *et al.* (2016) avaliaram o efeito no crescimento, parâmetros sanguíneos e sistema imunológico de 27 cordeiros da raça Zandi que receberam suplementados com diferentes níveis de *Saccharomyces cerevisiae*. Verificou-se aumento do ganho médio diário, maior taxa de conversão alimentar e aumento do pH ruminal, reduzindo o risco de acidose ruminal.

Em novilhos da raça Canchim com 13 meses de idade e alimentados com silagem de milho, Neumann *et al.* (2016), observaram que a suplementação desses animais com *Saccharomyces cerevisiae* cepa NCYC 996, não elevou o ganho de peso diário (GPD). Contudo, López Aguirre *et al.* (2016) observaram que ovinos da raça Pelibuey recém desmamados com 60 dias de idade, alimentados com capim Buffel e suplementados com enzimas exógenas de *Trichoderma longibrachiatum*, apresentaram um GPD (0,21 kg/dia) significativamente maior que aqueles não suplementados. Estes autores observaram ainda que essa suplementação com enzimas exógenas de *Trichoderma longibrachiatum* influenciaram positivamente no ganho de peso total (GPT) (8,63 kg) de ovinos da raça Pelibuey.

Em outra pesquisa o peso vivo final (PVF) não foi influenciado pela adição de enzimas amilases de *Aspergillus awamori* em touros Nelore terminados em confinamento, com média de 24 meses, recebendo a alimentação volumoso de feno de Tifton (OLIVEIRA *et al.*, 2015)

Hassan et al. (2016) ao avaliarem o efeito da suplementação *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de bezerros mestiços Friesian x Baladi, no período de transição da alimentação do leite para o feno de berseem (*Trifolium alexandrinum*) constataram que o gênero de Enterobacteraceae, *Escherichia* spp. como o mais identificado nesses animais. Stella et al. (2007) constaram que a suplementação comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (CNCM I-1077) em caprinos da raça Saanen, alimentados silagem de triticales, não afetou nas concentrações de eliminação fecais de dessas bactérias ( $8,0 \times 10^1$  UFC/g) em relação animais do grupo controle após 60 dias de experimentação.

### 3.8.2 Efeitos da suplementação sobre parâmetros sanguíneos

Kapadiya et al. (2019) constataram que a suplementados com enzimas exógenas de *Aspergillus* spp. na dieta de bezerros mestiços Holstein Friesian x Kankrej alimentados com feno de sorgo influenciou significativamente na concentração média da hemoglobina ( $9,07 \pm 0,08$  g/dL) desses animais em relação aos não suplementados. Já Piamphon et al. (2017) diferentemente relataram que em bezerros mestiços Brahman x raça nativa da Tailândia, recebendo capim Naiper fermentado com *Aspergillus niger*, a concentração média da hemoglobina ( $11,0$  g/dL) não foi afetada quando comparada grupo controle.

Em outra pesquisa, após o desmame, os bezerros da raça Zebú, sem suplementação apresentaram concentração sérica de adrenalina e manutenção da concentração de cortisol, associadas a maiores contagens de leucócitos, neutrófilos e linfócitos (COPPO et al., 2003).

Kapadiya et al. (2019) não constaram a influência da suplementação de enzimas exógenas de *Aspergillus* spp. sobre as concentrações de glicose ( $83.72 \pm 2.27$  mg/dL) e proteína total ( $6.10 \pm 0.09$  g/dL) do perfil bioquímico sérico dos bezerros mestiços Holstein Friesian x Kankrej. Em outro estudo constatou-se que em bezerros mestiços Brahman x raça nativa da Tailândia, recebendo capim Naiper fermentado com *Aspergillus niger* não apresentaram diferença no perfil bioquímico, sendo detectados valores de glicose ( $74,5$  mg/dL), creatinina ( $1,0$  mg/dL), ALT ( $98,0$  U/L). (PIAMPHON et al., 2017).

## 5 REFERÊNCIAS

ABRÃO, F. O. *et al.* Fungos anaeróbios do rúmen de bovinos e caprinos de corte criados em pastagens tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 757-760, 2010.

ABRÃO, F. O. *et al.* Characterization of Fungi from Ruminal Fluid of Beef Cattle with Different Ages and Raised in Tropical Lignified Pastures. **Current Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 649-59, 2014.

ABRÃO, F. O. *et al.* Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p.1-13, 2017.

ABRÃO, F. O. *et al.* Inocuidade micotoxicológica e viabilidade de *Aspergillus* spp. com potencial probiótico provenientes do trato digestório bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1833-1839, 2018.

ABRAR, A. *et al.* Diversity and fluctuation in ciliate protozoan population in the rumen cattle. **Animal Science Journal**, v. 87, n. 9, p. 1188-1192, 2016.

ACRES, S. D. A review: enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in newborn calves. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 229-256.1985.

ADESOGAN, A. T. *et al.* Ruminant nutrition symposium: Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 1317-1330, 2014.

AHMED, M. H. *et al.* Influence of *Trichoderma reesei* or *Saccharomyces cerevisiae* on performance, ruminal fermentation, carcass characteristics and blood biochemistry of lambs fed *Atriplex nummularia* and *Acacia saligna* mixture. **Livestock Science**, n. 180, p. 90–97, 2015.

ALLISON, M. J. *et al.* Detection of ruminal bacteria that degrade toxic dihydroxypyridine compounds produced from mimosine. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 590–594, 1990.

ALMEIDA, P. N. M. *et al.* Atividade celulolítica de fungos aeróbios isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, p. 202–207, 2014.

ALZAHAL, O. *et al.* Active dry *Saccharomyces cerevisiae* can alleviate the effect of subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 7751-7763, 2014.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**, 1 ed, Jaboticabal: Funep, p. 111-116, 2006.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**, 2 ed, Jaboticabal: Funep, p. 115 – 160, 2011.

AUNG, A. *et al.* Control of *Leucaena* toxicosis in Myanmar using IBT-Goettinger Bioreactor grow mimosine degrading ruminal *Klebsiella* spp. Tropentag 2006 – In: CONFERENCE ON INTERNATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH FOR DEVELOPMENT, University of Bonn, Alemanha. 2006.

BAINBRIDGE, M. L. *et al.* Alteration of Rumen Bacteria and Protozoa Through Grazing Regime as a Tool to Enhance the Bioactive Fatty Acid Content of Bovine Milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 904-910, 2018.

BACCILI, C. C. *et al.* Hematological and immunological development from birth to six months of age in Holstein calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1823-1832, 2018.

BEHARKA, A. A.; NAGARAJA, T.G. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. **Journal Dairy Science**, v. 1, n. 6, p. 1591-1598, 1998.

BELANCHE, A. *et al.* Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. **FEMS Microbiol Ecology**, p. 1-15, 2014.

BIRGEL JÚNIOR, E. H. *et al.* Valores de referência do eritrograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 2, p. 1-9, 2001.

BORDIM, S. *et al.* Microscópicos e eficientes: importância dos microrganismos no ambiente ruminal. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 17, n. 2, p. 28-30, 2016.

BORGES, N. C. *et al.* Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do fluido ruminal de ovinos confinados submetidos a crescentes níveis de mistura mineral energético - protéica. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 392-399, 2011.

BUENO, A. R.; RASBY, R.; CLEMENS, E. T. Age at weaning and the endocrine response to stress. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 1-7, 2003.

BURIN, P. C. Quality of fat sheep: characteristics and influence factors. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 17, n. 10, p. 1-28, 2016.

CALLAWAY, T. R. *et al.* Diet, Escherichia coli O157:H7, and Cattle: A Review After 10 Years. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 11, n.2, p. 67-68, 2009.

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

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.

COPPO, J. A. *et al.* Absence of biochemically demonstrable stress in early weaned half-bred zebu calves. **Ciência e Investigação Agrária**, v. 30, n. 2, p. 97-105, 2003.

COSTA, C. T. F. Palma forrageira enriquecida com ureia como suplemento para bovinos. (*Tese*) Recife, PE: UFRPE, 2015. 101 f.

COSTA, B. M. B. *et al.* Plaquetograma: relato de caso de pseudotrombocitopenia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.56, 2020.

DASHTBAN, M. *et al.* Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 36 -50, 2010.

D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, p. 725-729, 1999.

DE HOOG G. S. *et al.* **Atlas of Clinical Fungi**. Second ed. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.

DEHORITY, B. A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied Environmental Microbiology**. v. 48, n. 1, p. 182-185, 1984.

DIAS, J.D.L. *et al.* Yeast culture increased plasma niacin concentration, evaporative heat loss, and feed efficiency of dairy cows in a hot environment. **Journal Dairy Science**, v. 101, p. 5924–5936, 2018.

DIRKSEN, G. Sistema digestivo In: Dirksen, G.; Grunder, H. D.; Stober, M. Rosenberger. **Exame clínico dos bovinos**, 3 ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 167–169, 1993.

DOWD, S. E. *et al.* Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p.125-137, 2008.

DUARTE, E. R. *et al.* Rumen protozoa of different ages of beef cattle raised in tropical pastures during the dry season. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n.1, p.1457-1461, 2018.

DUSE, A. *et al.* Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. **Journal Dairy Science**, v. 98, n. 1, p. 500-516, 2015.

EDWARDS, J. E. *et al.* Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, p. 537-545, 2008.

ELGHANDOUR, *et al.* Effects of *Saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre-incubation on in vitro gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds, **Italian Journal of Animal Science**, n. 13, v. 2, p. 295 – 301, 2014.

FONSECA, A. J. M.; DIAS-DA-SILVA, A. A. Efeitos da eliminação dos protozoários do rúmen no desempenho produtivo de ruminantes - Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96, n. 538, p. 60-64. 2001.

FONTY G.; GOUET P. H. Plant cell wall degradation by anaerobic fungi. In: PRINS, R. A.; STEWART C. S.; **Micro-organisms in ruminant nutrition**. Nottingham University Press, Nottingham, Dalfsen, p. 97–112, 1994.

FORTE, M. S. *et al.* Avaliações hematológicas, bioquímicas e de urinálise, em fêmeas Nelore, originadas de propriedades rurais com e sem a presença de samambaia nas pastagens. **PUBVET.**, v. 10, n. 7, p. 513 – 579, 2016.

FOULKES, D.; LENG, R. A. Dynamics of protozoa in the rumen of cattle. **British Journal of Nutrition**, v. 59, p. 429–436, 1989.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B. A. Efeitos do pH ruminal e ingestão alimentar na defaunação em ovinos sob rações concentradas. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 25, n. 6, p. 1207-1215, 1996.

FREITAS, C.E.S. *et al.* Fungos aeróbios no intestino grosso de borregos e de ovelhas criados em pastagens tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 225-227, 2012.

FREITAS, C. E. S. *et al.* Aerobe and anaerobe facultative Gram-negative bacteria rod-shaped in the ruminal fluid of dairy cattle fed with different diets containing tropical forages. **Archivos de Medicina Veterinaria**, n. 6, p. 457-462, 2014.

GHOSE, T. K. **Measurement of cellulase activities**. New Delhi: Indian Institute of Technology, 1987.

GOMES, J. E. G. *et al.* Characterization and evaluation of in vitro digestion of phytases, xylanases and cellulases for feed industry. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 551–558, 2014.

GOMES, L. R. *et al.* Serum biochemistry profile in newborn Senepol and crossbred Holstein x Gir calves aged three to five days in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 1415-1421, 2016.

GONZÁLEZ, F. H. D.; CONCEIÇÃO, T. R.; SIQUEIRA, A. J. S. Variações sanguíneas de uréia, creatinina, albumina e fósforo em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 20, n. 117, p. 59-62, 2000.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

GONZÁLEZ, F. H. D. Ferramentas de diagnóstico e monitoramento das doenças metabólicas. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, p. 1-22, 2009.

GULIYE, A. Y.; WALLACE, R. J. Effects of aromatic amino acids, phenylacetate and phenylpropionate on fermentation of xylan by the rumen anaerobic fungi, *Neocallimastix frontalis* and *Piromyces communis*. **Journal Applied Microbiology**, v. 103, p. 924-932, 2007.

GUYADER, J. *et al.* Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis approach. **Animal**, v. 8, n. 11, p. 1816-1825, 2014.

GRIFFITH, G. W. *et al.* Diversity of anaerobic fungal populations in cattle revealed by selective enrichment culture using different carbon sources. **Fungal Ecology**, v. 2, p. 87-97, 2009.



GRUNINGER, R. *et al.* Anaerobic fungi (phylum *Neocallimastigomycota*): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, p. 1-17, 2014.

GRUNINGER, R. J. *et al.* Application of transcriptomics to compare the carbohydrate active enzymes that are expressed by diverse genera of anaerobic fungi to degrade plant cell wall carbohydrates. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p.1581, 2018.

GRUNINGER, R. J. *et al.* Invited review: Application of meta-omics to understand the dynamic nature of the rumen microbiome and how it responds to diet in ruminants. **Animal**, v.13, n. 9, p.1843-1854, 2019.

HAN, K.Y. *et al.* Effects of Dietary Forage and Calf Starter Diet on Ruminal pH and Bacteria in Holstein Calves during Weaning Transition. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1575-1576, 2016.

HASSAN, A.A. *et al.* Performance of crossbred dairy Friesian calves fed two levels of *Saccharomyces cerevisiae*: intake, digestion, ruminal fermentation, blood parameters and faecal pathogenic bacteria. **Journal of Agricultural Science**, v. 154, n. 8, p. 1488-1498, 2016.

HARVEY, J.W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. 1st Editio ed. St. Louis Missouri, USA.: [s.n.], 2012.

HENDERSON, G. *et al.* Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, v. 15, p.1-15, 2015.

HERDT, T. H. Digestão: Processos Fermentativos. IN: CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN B. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 368-369, 2008.

HENSKE, J. K. *et al.* Transcriptomic characterization of *Caecomyces churrovis*: a novel, non-rhizoid-forming lignocellulolytic anaerobic fungus. **Biotechnol Biofuels**, n. 10, v. 305, p. 1-12, 2017.

HO, Y. W. *et al.* *Anaeromyces*, an earlier name for *Ruminomyces*. **Mycotaxon**, v. 47, p.283-293, 1993.

JAMI, E. *et al.* Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. **The ISME Journal**, v. 6, p. 1069–1079, 2013.

- KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v.89, n.1, p.124-134, 2005.
- KAPADIYA, R.I. *et al.* Effect of Fibrolytic Microbes and Enzymes on Biochemical Blood Parameters in Crossbred Calves. **The Indian Journal of Veterinary Science & Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 18-21, 2019
- KAPALE, P. M. *et al.* Haematological constituents of blood of Gaolao cattle. **Veterinary World**, v. 1, n. 4, p. 113–114, 2008.
- KHAFIPOUR, E. *et al.* Population structure of rumen *Escherichia coli* associated with subacute ruminal acidosis (Sara) in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 351-360, 2011.
- KERR, M. G. Substâncias nitrogenadas: **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 119-130, 2003.
- KHOTA, W. *et al.* Natural lactic acid bacteria population of tropical grasses and their fermentation factor analysis of silage prepared with cellulase and inoculant. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 9768-9781, 2016.
- KOZLOSKI, V. G. **Bioquímica dos ruminantes**. 2. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2011, 212 p.
- KOZLOSKI, V. G. **Bioquímica dos ruminantes**. 3. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2017, 203p.
- KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico**. 5 ed, São Paulo: MEDSI, 2001 p.177 - 261.
- KUNG, L. *et a.* Effects of a live yeast culture and enzymes on in vitro ruminal fermentation and milk production of dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 2045– 2051, 1997.
- LACAZ, C. S. *et al.* **Tratado de Micologia Médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.
- LANA, R. P. **Nutrição e alimentação animal**. 1. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2005, 343p.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. 2006. 4 ed. São Paulo. Servier.
- LI, R. W. *et al.* Characterization of the rumen microbiota of preruminant calves using metagenomic tools. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 129–139, 2012.

LIN C. W. *et al.* Response surface optimization for ethanol production from *Pennisetum Alopecoides* by *Klebsiella oxytoca* THLC0409. **Biomass Bioenviron**, v.1, n. 12, p. 1-8, 2010.

LIMA, P. O. *et al.* Parâmetros séricos de bezerros submetidos a diferentes tipos de dietas líquidas. **Revista de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 2, p. 529-540, 2012.

LÓPEZ-AGUIRRE, D. *et al.* Effects of exogenous enzymes and application method on nutrient intake, digestibility and growth performance of Pelibuey lambs. **Springerplus**, v. 1399, p. 1-6, 2016.

LYNN, D.H. The ciliated protozoa. Characterization, classification and guide to the literature, 3rd ed. **Springer, Dordrecht**, 2008.

MADIGAN, M.T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MANELLA, M.Q.; LOURENÇO, A. J. População de protozoários ciliados no rúmen de bovinos Nelore em pastos de *Urochloa brizantha* Marandu recebendo suplemento proteico ou com livre acesso a banco de proteína de *Leucaena leucocephala* nas diferentes estações do ano. **Boletim de Industria Animal**, v. 61, n. 1, p. 01–11, 2004.

MANTOVANI, H. C.; BENTO, C. B. P. Manipulação da fermentação microbiana ruminal para máxima eficiência animal. In: SIMPÓSIO MATOGROSSENSE DE BOVINOCULTURA DE CORTE. 2, 2013, Mato Grosso. Anais Eletrônicos. Mato Grosso: SIMBOV, 2013. Disponível em: <http://www1.ufmt.br/ufmt/unidade/userfiles/publicacoes/051c5a85238bd82d1e4487f08ffe4bb1.pdf> Acesso em: 08 Maio 2018.

MARTILENE, I.; D'AGOSTO, M. Predação e canibalismo entre protozoários ciliados (*Ciliophora: Entodiniomorphida: Ophryoscolecidade*) no rúmen de ovinos (*Ovis aries*). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 3, p. 451-455, 2008.

MATHIEU, F. *et al.* The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. **Reproduction Nutrition Development**, v. 36, p. 271-287, 1996.

MILLER, G.L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent of determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MONÇÃO, F. P. P. *et al.* Desenvolvimento da microbiota ruminal de bezerros: revisão de literatura. **Revista Unimontes Científica**, v. 15, n. 1, 2013.

MORGAVI, D. P. *et al.* Rumen microbial (meta) genomics and its application to ruminant production. **Animal**, v. 7, n. 1, p. 184 – 201, 2013.

MURRAY, P. R. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2488p, 2007.

NASCIMENTO, F. G. O. *et al.* Efeito das estações do ano e da idade sobre as variáveis termofisiológicas e hematológicas de bezerros leiteiros mestiços em ambiente tropical. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 47, p. 1-12, 2019.

NAWAZ, H. *et al.* Effect of feeding xylanase and cellulase treated oat silage on nutrient digestibility, growth performance and blood metabolites of Nili Ravi buffalo calves. **Pakistan Journal of Agricultural Science**, v. 53, n. 4, p. 999-1004, 2016.

NEUMANN, M. *et al.* Eficácia do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* no desempenho e características de carcaça de novilhos Canchim. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v.14, p. 177-184, 2016.

NIGRI, A. C. A. *et al.* População de protozoários ruminais em novilhos zebuínos alimentados com ou sem volumoso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p. 1339-1345, 2017.

NOGUEIRA, S. C. P. *et al.*, Estabilidade xilanásica no rúmen e digestibilidade *in vitro* de volumosos tratados com extrato enzimático de *Aspergillus niveus*. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.7, n.1, p. 46 – 60, 2013.

NEWBOLD, C. J. *et al.* The role of ciliate protozoa in the rumen. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n.1, p 1313, 2015.

OCKNER, R.K. Doenças do Fígado, da Vesícula Biliar e dos Ductos Biliares. In: Wyngaarden J B. **Tratado de Medicina Interna**. 1993. 19ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. v.1, 1214p.

OYELEKE, S. B., OKUSANMI, T. A. Isolation and characterization of cellulose hydrolyzing microorganism from the rumen of ruminants. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1530-1504, 2008.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINIE, A. M.; SANTOS, E. M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 8, n. 6, 2007.

OLIVEIRA, B. M. L. *et al.* Suplementação de vacas leiteiras com *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1174-1182, 2010.

OLIVEIRA V. S. *et al.* Características químicas e fisiológicas da fermentação ruminal de bovinos em pastejo – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária [online]**, v. 11, p. 1-21, 2013.

OLIVEIRA, L.G. *et al.* Performance of beef cattle bulls in feed lots and fed on diets containing enzymatic complex. **Acta Scientiarum**, v. 3, n. 2, p.181-186, 2015.

OZBAYRAM, E. G. *et al.* Enrichment of lignocellulose-degrading microbial communities from natural and engineered methanogenic environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 1035–1043, 2018.

OZKOSE, E. *et al.* *Cyllumyces aberensis* gen.nov. sp.nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. **Canadian Journal Botany**, v. 79, p. 666–673, 2001.

PAES, P.R.O. *et al.* O leucograma como indicador de estresse no desmame e no transporte rodoviário de bovinos da raça Nelore. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 305-312, 2012.

PAUL, S. S. *et al.* 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.

PAUL, K. *et al.* “*Methanoplasmatales*”, thermoplasmatales-related *Archaea* in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, p. 8245–8253, 2012.

PEREIRA, J. C. *et al.* Dinâmica da degradação ruminal por novilhos mantidos em pastagem natural, em diferentes épocas do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 740-748, 2002.

PÉREZ-SANTOS, M. *et al.* Biochemical variables from Holstein-Friesian calves older than one week are comparable to those obtained from adult animals of stable metabolic status on the same farm. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 44, n. 1, p. 145–151, 2015.

PIAMPHON, N. *et al.* Influence of *Aspergillus niger* or *Saccharomyces cerevisiae*-Fermented Napier Grass (*Pennisetum purpureum*) Mixed with Fresh Cassava Root on Blood Parameters and Nutrient Digestibility in Growing Beef Cattle. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 16, n. 10, p. 776-781, 2017.

PITUCO, E. M; *et al.* Ruminantes, equídeos e suídeos. In: **Manual Veterinário de Colheita e Envio de Amostras. Brasília - DF: [s.n.]. p. 35–74.2010**

PUNIYA, A. K. *et al.* Role of Live Microbial Feed Supplements with Reference to Anaerobic Fungi in Ruminant Productivity: A review. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, p. 1201-1217, 2015.

RAFFRENATO, F. *et al.* Effect of lignin linkages with other plant cell wall components on *in vitro* and *in vivo* neutral detergent fiber digestibility and rate of digestion of grass forages. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 8119-8131, 2017.

RAGHEBIAN, M. *et al.* Effect of different levels of live yeast in a high concentrate diet on performance, blood constituents and immune system status of Zandi lambs. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 6, n. 4, p. 833-840, 2016.

RANGEL, A. H. N. *et al.* Utilização de ionóforos na produção de ruminantes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.8, n.2, p.173-182, 2008.

RAO, L. V. Fatores que influenciam os exames laboratoriais. In: WILLIAMSON M.; SNYDER L. M.; editores. **Wallach-Interpretação de exames laboratoriais**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2016. 1225 p.

RESENDE, J. A. *et al.* Isolation and fermentative activity of rumen anaerobic fungi in dairy cows. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.14, n.1, p.92-95, 2015.

REECE, W. O. **Dukes Physiology of Domestic Animals**, 13 Ed. Iowa: Willey Blackwell, p. 522-528, 2015.

RIBEIRO, L. A. O.; GONZÁLEZ, F. H. D.; CONCEIÇÃO, T. R. Perfil metabólico de borregas Corriedale em pastagem nativa do Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 3, p. 167-170, 2003.

RIBEIRO JUNIOR, C.S. *et al.* Uso de aditivos naturais e fitocompostos na manipulação do ambiente ruminal. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, p. 977-1004, 2011.

RIBEIRO, G. J. *et al.* Mining the rumen for fibrolytic feed enzymes. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 2, p. 20-27, 2016.

ROCHA, T.G. *et al.* Hemograma e proteínas de fase aguda de bezerros sadios do nascimento aos 30 dias de idade. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.1, p. 25-31, 2013.

ROSENFELD, L.G. *et al.* Valores de referência para exames laboratoriais de hemograma da população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 22, n. 02, 2019.

RUIZ-LACAZ, R. **Microbiologia Zootécnica**. Roca, São Paulo, 1992, p.123-167.

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

SÁ, N. E. R. *et al.* Perfil hematológico de recém-nascidos de uma Unidade de Terapia Intensiva neonatal de Teresina – PI. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 11, n. 1, p. 105-112, 2018.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SALVATI, G. G. S. *et al.* Response of lactating cows to live yeast supplementation during summer. **Journal of Dairy Science**, n. 98, n. 6, p. 4062-4073, 2015.

SCHADE, J. *et al.* Hemogram, fibrinogen concentration and plasma total protein from calves of Criollo Lageano Breed Variety Hornless and Aberdeen Angus Breed (*Red Angus*) on the first six months of life. **Acta Scientiae Veterinariae**, n 44, v.1389, p. 1-7, 2016.

SCOTT, H.W., DEHORITY, B.A., Vitamin Requirements of Several Cellulolytic Rumen Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 89, n. 5, p. 1169–1175, 1965.

STELLAA, A.V. *et al.* Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. **Small Ruminant Research**, v. 67, n. 1, p. 7-13, 2007.

SHABAT, S. K. B. *et al.* Specific microbiome - dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. **The ISME Journal**, v. 10, p. 2958–2972, 2016.

SILVA, H. L. *et al.* Indicadores fecais de bovinos nelore alimentados com dietas de alta proporção de concentrado. **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.2, p. 145-156, 2012.

SILVA, K. L. *et al.* Protozoários ruminais de novilhos de corte criados em pastagem tropical durante período seco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 259-265, 2014.

SILVA, R. N. P. *et al.* Degradabilidade ruminal de casca de vagem de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) amonizada com ureia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 18, n. 1, p. 26-37, 2017.

SILVA, M. N. **Hematologia veterinária**. Belém: Editora AEDi, 2017, 114 p.

SMITH, D.L. *et al.* Postweaning behavior and growth performance of early and conventionally weaned beef calves. **The Professional Animal Scientist**, v. 19, n. 1, p. 23-29, 2003.

SOLOMON, K. V. *et al.* Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes. **Science**, v. 351, n. 6278, p. 1192-1195, 2016.

SORIANO, A. *et al.* Effect of *Lactobacillus mucosae* *in vitro* rumen fermentation characteristics of dried brewers grain, methane production and bacterial diversity. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, n. 11, p. 1562–1570, 2014.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2a ed. Ed. Guanabara Koogan, 729 p., 2011.

SUÁREZ, B. J. *et al.* Effect of roughage source and roughage to concentrate ratio on animal performance and rumen development in veal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 5, p. 2390–2403, 2007.

SUN, H. *et al.* Effects of addition of *Aspergillus oryzae* culture and 2-hydroxyl-4-(Methylthio)-butanoic acid on rumen fermentation and microbial populations between different roughages sources. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v. 27, n. 9, p. 1285-1292, 2014.

SUN, H. *et al.* Effects of addition of *Aspergillus oryzae* culture and 2- hydroxyl-4-(methylthio)-butanoic acid on milk performance and rumen fermentation of dairy cows. **Animal Science Journal**, v. 88, p. 602-609, 2017.

THAREJA, A. *et al.* *In vitro* degradation of wheat straw by anaerobic fungi from small ruminants. **Archives of Animal Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 412-417, 2006.

THRALL, M. A. *et al.* **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Second Edi ed. Ames, Iowa: [s.n.], 2012.



TORRES, M. *et al.* Efectos de la *Stevia rebaudiana* (KA'A HE'E) en los indicadores del metabolismo ruminal en ovinos alimentados con balaceado para engorde. **Compendio de Ciências Veterinarias**, v. 5, n. 2, p. 32-37, 2015.

TRABULSI, L.R.; CAMPOS, L.C. Generalidades sobre enterobactérias. In.: TRABULSI, L.R. *et al.* **Microbiologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2002, p.207-213.

TRIPATHI, V. K. *et al.* Effect of administration of anaerobic fungi isolated from cattle and wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*) on growth rate and fibre utilization in buffalo calves. **Archives of Animal Nutrition**, v. 61, n. 5, p. 416-423, 2007.

TYMENSEN, L., BARKLEY, C., MCALLISTER, T.A. Relative diversity and community structure analysis of rumen protozoa according to T-RFLP and microscopic methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, n. 1, p. 1-6, 2012.

VALLE, E.R.; ANDREOTTI, R.; THIAGO, L.R.L.S. **Estratégias para aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos de corte**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 80f., 2012.

VERMELHO, A. B. *et al.* **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. v. 1, 239p.

VIEIRA, E. A. *et al.* Bastonetes Gram-negativos aeróbios e anaeróbios facultativos no fluido ruminal de bovinos de corte alimentados em pastagem lignificada e em novilhos com acidose ruminal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 9, p. 811-816, 2014.

VIRGINIO JUNIOR, G. F., *et al.* Caracterização físico-química e microbiológica do fluido ruminal e do conteúdo gastrointestinal de bezerros alimentados com silagem de leite de transição. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.11, n.2, p.142-147, 2016.

WALLACE, R. J. *et al.* Archaeal abundance in *post-mortem* ruminal digesta may help predict methane emissions from beef cattle. **Scientific Reports**, v. 4, n. 5892, p. 1-8, 2014.

WANG, L. *et al.* The transcriptome of the rumen ciliate *Entodinium caudatum* reveals some of its metabolic features. **BMC Genomics**, v. 20, p. 1008, 2019.

WEIMER, P. J. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 296, 2015.

WEIMER, P. J.; RUSSEL, J. B; MUCK, R. E. Lessons from the cow: what the ruminant animal can teach us about consolidated bioprocessing of cellulosic biomass. **Bioresource Technol**, v. 100, n. 21, p. 5323-5331, 2009.

WELKIE, D. G.; STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. **Anaerobe**, v. 16, n. 2, p. 94–100, 2010.

WEISS, DOUGLAS J.; WARDROP, JANE K. (Org.). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th Editio ed. Ames, Iowa: Wiley Blackwell, 2010.

WILLIAMS, A. G; COLEMAN, G. S. **The rumen protozoa**. New York: Springer-Verlag, 1991, 423p.

WLODARSKI, L. *et al.* Microbiota ruminal: diversidade, importância e caracterização. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v, 18, n. 11, p. 1-20, 2017.

WRIGHT, A. D. G. Rumen Protozoa. In: PUNIYA, A.K., SINGH, R. AND KAMRA, D.N. **Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution**, Springer: India, p 379, 2015.

YUANGKLANG, C. *et al.* Growth performance and macronutrient digestion in goats fed a rice straw based ration supplemented with fibrolytic enzymes. **Small Ruminant Research**, v. 154, p. 20-22, 2017.

YUEST, S. *et al.* Rumen protozoal dynamics during the transition from milk/grass to high-concentrate based diet in beef calves as affected by the addition of tannins or medium-chain fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, v.257, p. 1-10, 2019.

ZIMMER, A. H.; EUCLIDES, V. P. B. Importância das pastagens para o futuro da pecuária de corte no Brasil. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGEM, 1, 2000, Lavras. *Anais...* Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000. p.1-49.98.

## **5 ARTIGO**

5.1 Efeito da suplementação com fungos ruminais na microbiota do trato digestório, parâmetros sanguíneos e desempenho de bezerros Nelore

Este artigo foi elaborado de acordo com as normas da revista *Veterinary World*.

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM FUNGOS RUMINAIS NA MICROBIOTA DO  
TRATO DIGESTÓRIO, PARÂMETROS SANGUÍNEOS E DESEMPENHO DE  
BEZERROS NELORE**

**RESUMO:**

**Introdução e Objetivo:** Em regiões com escassez de forragens de boa qualidade na maior parte do ano, a suplementação com fungos poderia contribuir para a modulação ruminal, promovendo maior produção de enzimas fibrolíticas e reduzindo populações de bactérias patogênicas. O objetivo deste estudo é analisar os efeitos da suplementação com fungos ruminais sobre a microbiota do trato digestório, os parâmetros sanguíneos e o desempenho de bezerros Nelore.

**Materiais e Métodos:** O experimento foi conduzido em blocos casualizados, avaliando oito bezerros Nelore suplementados diariamente com um isolado de *Aspergillus terreus* e um isolado de *Trichoderma longibrachiatum* e oito bezerros que não receberam esses fungos. Após 55 dias de experimentação os animais foram pesados e coletou-se amostras do fluido ruminal, fezes e sangue para as análises. As características que apresentaram distribuição normal foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey, enquanto as variáveis que não apresentaram distribuição normal foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% de probabilidade e as frequências dos gêneros bacterianos e fúngicos foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado a 10%.

**Resultados:** Observou-se que a suplementação com os dois fungos promoveu redução do pH ruminal, na concentração média de eritrócitos e de hemoglobina ( $P < 0,05$ ). O peso vivo final, o ganho de peso médio diário, o ganho de peso total, PRAM, e a contagem de Enterobacteriaceae, fungos micelianos e leveduriformes do fluido ruminal e das fezes, os protozoários ruminais e demais parâmetros sanguíneos e bioquímicos não foram influenciados pela suplementação ( $P > 0,05$ ). E observou-se ainda que o gênero de protozoários *Eodinium* spp. foi identificado apenas nos animais que receberam a suplementação ( $P < 0,05$ ).

**Conclusão:** Conclui-se com esta pesquisa que a suplementação com os dois isolados fúngicos apresentam potencial para uso como possível aditivos, visto que influenciou nos bovinos

parâmetros como pH ruminal, a concentração média de eritrócitos e da hemoglobina. Contudo novos estudos devem ser realizados para definir melhor as dosagens de utilização deste na suplementação de bezerros.

**Termos Indexadores:** microbiota ruminal, desmame, Enterobacteriaceae, protozoários do rumen, semiárido.

## INTRODUÇÃO

Os bovinos dependem diretamente da sua microbiota gastrointestinal para o metabolismo de energia, digestão de nutrientes e para a redução microrganismos patogênicos ingeridos [1]. Em especial, o estresse e o riscos à saúde dos bezerros após o desmame é alto, visto que ainda são muito suscetíveis a doenças e às alterações digestivas durante esse período [2,3] Para reduzir os riscos e melhorar a eficiência alimentar, tem-se promovido a administração profilática de antimicrobianos [4]. A suplementação com probióticos ou aditivos microbianos representa uma alternativa promissora para reduzir danos no período pós desmame e melhorar o desempenho desses animais [5,6].

Neste contexto, os fungos anaeróbios do rúmen podem assumir papel relevante como aditivo microbiano na suplementação de ruminantes, devido à sua capacidade em degradar as forragens, produzindo enzimas com atividade celulolíticas capazes de aumentar a disponibilidade de carboidratos solúveis e aminoácidos, favorecendo a microbiota ruminal, proporcionando melhorias no ecossistema ruminal e nos índices zootécnicos ruminais [7,8,9].

Os fungos anaeróbios facultativos podem estar presentes no ambiente ruminal em proporções aproximadas de  $1 \times 10^4$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL em animais criados sobre pastagem tropical no período de seca [10,11] Esses fungos podem apresentar produção superior de celulases, importantes para solubilização de fibras de forragens tropicais [11,12].

Em nossos estudos anteriores, constatou-se que bovinos de corte alimentados em pastagens tropicais lignificadas albergam os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* [12], fungos que

apresentam potencial para suplementação animal e para fins biotecnológicos [16,17]. Estudos demonstram que isolados de *Aspergillus* spp. do ambiente ruminal apresentam alto nível produção de enzimas que solubilizam as paredes celulares lignificadas e não são produtores de micotoxinas [17,18].

Contudo, a maior parte dos estudos com o uso de fungos como aditivos microbianos em bovinos foram realizados com a utilização de cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei* adicionadas à dieta de ruminantes. Sendo assim em regiões com escassez de forragens de boa qualidade na maior parte do ano, a suplementação com fungos provenientes do rúmen, poderia ser importante na suplementação, contribuindo assim para a modulação ruminal promovendo maior produção de enzimas fibrolíticas e reduzindo populações de bactérias patogênicas. Sendo assim o objetivo neste estudo é de analisar os efeitos da suplementação com fungos ruminais sobre a microbiota do trato digestório, os parâmetros sanguíneos e o desempenho de bezerros Nelore.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Aprovação ética**

Todos os procedimentos adotados pelo estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), sob o parecer de número 209/2018.

### **Design do estudo**

O experimento foi realizado em Montes Claros – Norte de Minas Gerais, Brasil. A região encontra-se na altitude de 648m, coordenadas 16°42'16" de latitude sul e 43°49'13" de longitude oeste. O clima da região é do tipo AW, segundo a classificação de Köppen que se caracteriza por uma estação chuvosa no verão e seca no inverno, com vegetação típica de cerrado. A temperatura média anual é de 24,2°C e pluviosidade média anual é de aproximadamente 1.050 mm com o período de estiagem de abril a outubro [19].

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados contendo 16 bezerros Nelore com aproximadamente oito meses de idade, sendo oito machos não cadastros e

oito fêmeas, com peso corporal inicial (PCI) de 284,5 kg ± 38 kg, pesados com auxílio de balança mecânica do tipo brete (Fiziola, modelo 3106000, São Paulo, Brasil). Inicialmente os animais passaram por 15 dias de adaptação à dieta e as baias e receberam vacina contra clostridioses e anti-helmíntico (albendazol 15 mg/kg via subcutânea).

A dieta foi formulada de acordo com o NRC [20], para um ganho médio diário de 400 gramas e foi constituída de 56,79% feno de *Urochloa brizantha* e 43,21% concentrado (Tabela 1), fornecidas diariamente, às 08:00 h e às 15:00 h. As quantidades de alimento ofertado, foram ajustadas diariamente em função das sobras, mantidas em 5%, para permitir o consumo à vontade e a água foi fornecida *ad libitum*.

**Tabela 1.** Composição nutricional da dieta experimental

Ingredientes, % Matéria Seca	Dieta experimental
Feno <i>Urochloa brizantha</i>	56,79
Milho moído	28,73
Farelo de Soja	2,23
Núcleo Mineral <sup>1</sup>	12,25
<hr/>	
Composição, % Matéria Seca	
Matéria seca	93,00
Proteína Bruta	10,96
Extrato Etéreo	1,17
Fibra em Detergente Neutro	74,23
Fibra em Detergente Acido	44,21
Matéria Mineral	1,17

<sup>1</sup>Connan Pasto Seco®: Cálcio (mín/máx) 20-90 g; Fósforo (mín) 15 g; Sódio (mín) 50 g; Magnésio (mín) 5,5 g; Enxofre (mín) 9 g; Flúor (máx) 150 mg; Zinco (mín) 610 mg; Cobre (mín) 200 mg; Manganês (mín) 150 mg; Cobalto (mín) 13 mg; Iodo (mín) 45 mg; Selênio (mín) 4,5 mg; Proteína Bruta (mín) 350 g; NNP Equiv. PB (mín) 295 g

As amostras compostas das dietas foram analisadas quanto aos teores de matéria seca a 105°C, matéria mineral, extrato etéreo e proteína bruta de acordo com a Association of Official Analytical Chemists [20]; e a fibra detergente neutra (FDN), a fibra detergente ácido (FDA) de acordo com a metodologia sugerida por Van Soes et al. (1991).

## Grupos experimentais

Foram avaliados um grupo com oito bezerros suplementados com a mistura dos fungos *Aspergillus terreus* (isolado VN 15) e *Trichoderma longibrachiatum* (isolado VN 20) e um grupo controle também composto por oito bezerros recebendo somente o meio de cultivo desses microrganismos. Cada grupo era constituído por quatro bezerros machos e quatro fêmeas.

O experimento teve duração de 70 dias, com 15 dias de adaptação, e 55 dias destinados ao fornecimento da suplementação com os fungos e das dietas experimentais. Os animais foram confinados em baias individuais, cobertas na área de cocho, com dimensões de 1,5 m (largura) x 3,0 m (comprimento), situadas lado a lado.

No momento do arraçoamento da manhã, os animais foram suplementados diariamente com 160 ml de meio de cultura contendo em média  $4,4 \times 10^8$  UFC/mL de *Aspergillus terreus* e  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL de *Trichoderma longibrachiatum*, misturados com 200g do concentrado. Os animais do grupo controle receberam a mesma quantidade do meio de cultura sem os fungos e do concentrado. O meio de cultura foi composto de 2,5g de soja; 2,5g de amido; 2,5g de dextrose e 2% de feno de *Urochloa decumbens* para um litro de água destilada de acordo como descrito por Freitas [68].

As cepas dos fungos utilizados foram provenientes do rúmen de novilhos Nelore criados em sistema extensivo em pastagem *Urochloa decumbens*, com suplementação mineral contendo ureia [12]. Foram identificados pelo sequenciamento do DNA ribossomal obtido da amplificação da região ITS do rDNA utilizando-se os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) [21]. Os produtos foram analisados em DYEnamic™ (AmershamBiosciences, EUA) utilizando o sistema de sequenciação automatizado MegaBACETM 1000, GenomeAnalysis Center e Gene Expression. As sequências obtidas foram analisadas utilizando BLASTn v. 2.215 de BLAST 2.0 [22]. Considerou-se como essa espécie o isolado com similaridade de 99% ou mais, e sequências foram depositadas no GenBank, *Aspergillus terreus* [KF781532] e *Trichoderma longibrachiatum* [KF781535].



As cepas foram selecionadas por estarem presente em maiores proporções no trato digestório de bovinos, por não produzirem micotoxinas, por não terem relatos de micoses ocasionados as espécies e pela maior produção de enzimas fibrolíticas [12,14].

### **Coleta das amostras**

No início e no final do período experimental os animais foram pesados com jejum de sólidos de aproximadamente 16 horas, e a cada 15 dias todos os animais foram pesados, antes do arraçãoamento, a fim de minimizar as diferenças de enchimento entre os animais.

Após 55 dias de experimentação, foram coletados oito ml de sangue por venopunção da jugular e armazenado em tubos contendo EDTA (BD Vacutainer® EDTA K2), acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável. Os bezerros foram imobilizados em brete de contenção e as coletas foram realizadas no período de sete às 11 horas da manhã, após jejum prévio de 16 horas.

Em um período de até quatro horas, foram realizados os hemogramas (eritrócitos, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas, leucócitos, segmentados, eosinófilos, monócitos e linfócitos) em aparelho eletrônico de contagem (BC 2.800 Vet, Mindray Medical International LTDA, China). Os perfis bioquímicos (glicose, ureia, creatinina, proteínas totais, albumina, globulina, alanina aminotransferase (ALT) e fostase alcalina) foram determinados utilizando-se kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A., Belo Horizonte, Brasil).

Após obtenção das amostras de sangue, realizou-se as coletas do fluido ruminal e das fezes. Na parte ventral do abdômen esquerdo, abaixo cranialmente da articulação do joelho, com aproximadamente 5 cm<sup>2</sup>, foram realizadas a tricotomia e a assepsia, com solução de Polivinilpirrolidona-Iodo (Iodo-PVP 1%). Foram puncionados aproximadamente 15 ml de fluido ruminal, com o auxílio de cateter, acoplado a seringas estéreis. Antes da coleta de fezes, foi realizada a assepsia da região perianal com o mesmo antisséptico e amostras de aproximadamente 100 gramas foram coletadas diretamente da ampola retal com uso de luvas e sacos plásticos estéreis. As amostras foram armazenadas por até uma hora e transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável [12].

## **Caracterização Físico-Química do Fluido Ruminal**

Em subamostras de 5 ml do fluido ruminal foram avaliadas à cor, odor e a viscosidade. A atividade microbiana foi estimada pelo teste de redução em azul de metileno (PRAM) a 0,03%, e o potencial de hidrogênio (pH) foi determinado com o auxílio de um potenciômetro digital (GEHAKA®, São Paulo, Brasil) [23].

## **Análises dos microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos**

Para o cultivo microbiano, as fezes e fluido ruminal foram manipulados em capela de fluxo laminar, para promover diluições decimais em tubos contendo solução salina estéril. Posteriormente, alíquotas das diluições  $10^2$ ,  $10^4$  e  $10^6$  foram inoculadas em placas de Petri estéreis contendo o meio ágar *Mac-Conkey* (KASVI®, Terámo, Itália) e das diluições  $10^3$ ,  $10^5$  e  $10^7$  em placas contendo ágar *Sabouraud* (ACUMEDIA®, Michigan, Estados Unidos). As placas foram incubadas a 37°C em estufa BOD e monitoradas, para o crescimento por 48 horas para Enterobacteriaceae e até sete dias para dos fungos [24]. As UFC/mL ou UFC/g foram quantificadas com o auxílio de um contador de colônias.

A identificação dos gêneros de Enterobacteriaceae mais frequentes ocorreu após reisolamento e o crescimento em placas contendo ágar *Mac-Conkey* em estufa a 37°C por 24 horas. Após o crescimento exponencial, cada isolado foi inoculado em tubos contendo meio Rugai e Araújo, modificado por Pessoa e Silva. Nessa classificação foram consideradas a capacidade de produção de indol e sulfetos e gases, a utilização de triptofano, lisina, glicose, sacarose, ureia, produção de indol e sulfetos e a motilidade [24,25].

Para a identificação dos gêneros de fungos micelianos foram realizados microcultivos de 23 isolados provenientes do fluido ruminal e das fezes dos bezerros. As características micromorfológicas foram evidenciadas em microscópio óptico nas objetivas de 10 e 40X, considerando as características descritas por Lacaz et al. [26] e Germain; Summerbel [27].

Para análises dos protozoários do rúmen, amostras de 100 µl dos fluidos ruminais foram diluídos em 900 µl de solução de formaldeído a 10% para conservação das estruturas morfológicas desses eucariotos [28].

Para a quantificação, foram realizadas diluições decimais em solução salina estéril, classificando-se protozoários pequenos (40 x 60 µm), médios (100 x 150 µm) e grandes (100 x 150 µm), em câmara de Sedgewick Rafter (S52 glass, Pyser-SGI, Edenbridge, Kent, UK), em microscópio óptico em objetiva de 10x [23].

Para identificação, foram avaliadas alíquotas das diluições 10<sup>-1</sup>, juntamente com uma gota de lugol em lâminas de microscopia, para visualização em microscópio óptico das microestruturas dos protozoários [29]. Utilizou-se objetiva de 40x, para analisar aproximadamente 700 protozoários por animal que foram classificados e identificados de acordo com a chave descrita em Dehority [28]. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

### **Análises Estatísticas**

Após análise exploratória (teste de Liliefors e teste de Cochran e Bartlett), para análise das populações microbianas, as concentrações foram transformadas em log<sub>10</sub> (x+10).

O ganho de peso diário (GPD) foi calculado a partir do coeficiente de inclinação da reta resultante da regressão das medidas individuais de peso corporal sem jejum em função do tempo, utilizando o procedimento REG do SAS (2004).

As características de desempenho, pH ruminal, parâmetros sanguíneos (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHMC, plaquetas, leucócitos, linfócitos) e parâmetros bioquímicos (proteínas totais, albumina, globulina, ureia, creatinina, glicose e ALT) que apresentaram distribuição normal, pelo teste de Shapiro-Wilk, foram submetidos à análise de variância utilizando PROC GLM do SAS (2004). O modelo incluiu os efeitos do sexo como bloco e PCI como covariável e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O PRAM, variáveis microbiológicas ruminais e das fezes (Enterobacteriaceae, fungos micelianos e leveduras), protozoários ruminais e parâmetros sanguíneos (segmentados, eosinófilos, monócitos e fosfatase alcalina) que não apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade e as frequências dos gêneros bacterianos e fúngicos foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado (P=0,01), utilizando PROC NPAR1WAY do SAS (2004).

## RESULTADOS

### Desempenho

Os animais suplementados com os fungos ruminais na dieta não apresentaram diferenças significativas ( $P>0,05$ ) no GPD, peso corporal final (PCF) e ganho de peso total (GPT) como demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Médias e desvio padrão (dp) do ganho de peso diário (GPD), ganho de peso total (GPT), peso corporal final (PCF), redução em azul de metileno (PRAM) e potencial de hidrogênio (pH) de bezerras Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais.

Variáveis	Controle	Suplementados <sup>1</sup>	dp	Valor de P
<i>Desempenho</i>				
GPD (kg/dia)	0,44	0,48	0,19	0,25 <sup>a</sup>
GPT (kg)	24,00	26,63	10,82	0,26 <sup>a</sup>
PCF (kg)	294,38	275,13	38,00	0,79 <sup>a</sup>
<i>Fluido Ruminal</i>				
PRAM	6 min e 35 seg	3 min e 31 seg	3 min e 27 seg	0,14 <sup>b</sup>
pH	7,43	7,15	0,29	*0,02 <sup>a</sup>

Nota: Min= minutos, Seg= segundos.

<sup>a</sup>Teste de comparação de média pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

<sup>b</sup>Teste de comparação de média pelo teste de Kruskal-Wallis, com 5% de significância.

<sup>1</sup>Suplementação com fungos anaeróbios facultativos: *Aspergillus terreus* (isolado VN 15) e *Trichoderma longibrachiatum* (isolado VN 20).

### Análises físico-químicas e macroscópica do fluido ruminal

As características de cor, odor, viscosidade não foram influenciadas significativamente pela suplementação com os fungos ruminais na dieta ( $P>0,05$  – Tabela 2). A atividade da microbiota ruminal apresentou-se ativa, sendo observado o PRAM entre três e seis minutos, contudo também não sofreu influência da suplementação ( $P>0,05$  – Tabela 2). Já o pH do fluido ruminal foi influenciado pela suplementação, sendo menor para nos animais suplementados em relação aos não suplementados ( $P>0,05$  – Tabela 2).

### Quantificação e identificação dos gêneros de Enterobacteriaceae

A presença de bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos, como os da família Enterobacteriaceae, foi verificada em todas as amostradas do fluido ruminal e fezes dos bezerros avaliados. As concentrações médias dessas bactérias não foram influenciadas pela suplementação com os fungos ruminais na dieta dos bezerros ( $P>0,05$  – Tabela 3). Em relação as enterobactérias fermentadoras (Lac+) e as não fermentadoras da (Lac-), a concentração média também não foram influenciadas pela suplementação ( $P>0,05$  – Tabela 3).

**Tabela 3.** Médias de unidades formadoras de colônias (UFC) e desvio padrão (dp) de Enterobacteriaceae, fungos micelianos e leveduriformes isolados do fluido ruminal e das fezes de bezerros Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais.

Variáveis	Controle	Suplementados <sup>1</sup>	dp	Valor de P
<i>Fluido Ruminal (UFC/mL)</i>				
Enterobacteriaceae	8,9 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>5</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	0,20
Lac +	7,4 x 10 <sup>5</sup>	8,6 x 10 <sup>4</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	0,17
Lac -	1,5 x 10 <sup>5</sup>	3,2 x 10 <sup>4</sup>	1,9 x 10 <sup>5</sup>	0,15
Fungos Micelianos	1,5 x 10 <sup>4</sup>	7,6 x 10 <sup>3</sup>	2,0 x 10 <sup>4</sup>	0,75
Leveduras	5,8 x 10 <sup>4</sup>	5,5 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>5</sup>	0,87
<i>Fezes (UFC/g)</i>				
Enterobacteriaceae	1,4 x 10 <sup>6</sup>	9,0 x 10 <sup>5</sup>	1,7 x 10 <sup>6</sup>	0,52
Lac +	1,2 x 10 <sup>6</sup>	8,8 x 10 <sup>5</sup>	1,6 x 10 <sup>6</sup>	0,59
Lac -	1,7 x 10 <sup>5</sup>	1,8 x 10 <sup>4</sup>	2,2 x 10 <sup>5</sup>	0,28
Fungos Micelianos	2,6 x 10 <sup>6</sup>	3,2 x 10 <sup>5</sup>	4,2 x 10 <sup>6</sup>	0,99
Leveduras	1,1 x 10 <sup>6</sup>	2,1 x 10 <sup>7</sup>	2,8 x 10 <sup>7</sup>	0,83

Nota: Teste de Kruskal-Wallis, com 5% de significância.

Lac+= Enterobacteriaceae fermentadoras da lactose, Lac-= Enterobacteriaceae não fermentadoras da lactose.

<sup>1</sup>Suplementação com fungos anaeróbios facultativos: *Aspergillus terreus* (isolado VN 15) e *Trichoderma longibrachiatum* (isolado VN 20).

Foram identificadas presuntivamente 32 colônias de Enterobacteriaceae e verificou-se que, entre os grupos de bezerros avaliados e os sítio, fluido ruminal e fezes, não se constatou diferenças significativas ( $P>0,05$ ) em relação aos gêneros dessas bactérias (Tabela 5). Ao avaliar as frequências de todos os isolados avaliados, constatou-se que *Escherichia* spp. apresentou

frequência de distribuição semelhante a *Enterobacter* spp. ( $P>0,01$ ) e foram mais frequentes que *Proteus* spp. e *Providencia* spp. ( $P>0,01$  – Tabela 5).

**Tabela 4.** Distribuição de gêneros de Enterobacteriaceae isoladas do fluído ruminal e das fezes de bezerros Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais.

Gêneros	Total N	Fluido Ruminal				Fezes			
		Controle		Suplementados <sup>1</sup>		Controle		Suplementados <sup>1</sup>	
		n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Escherichia</i> spp.	15**	1	7	3	20	5	33	6	40
<i>Enterobacter</i> spp.	10**	5	50	3	30	1	10	1	10
<i>Proteus</i> spp.	5	1	20	2	40	1	20	1	20
<i>Providencia</i> spp.	2	1	50	-	-	1	50	-	-
Total	32	8		8		8		8	

Nota: \*\*Valores significativamente maiores quando comparados entre os tratamentos e entre os gêneros pelo teste de Qui-quadrado ( $P=0,01$ ).

<sup>1</sup>Suplementação com fungos anaeróbicos facultativos: *Aspergillus terreus* (isolado VN 15) e *Trichoderma longibrachiatum* (isolado VN 20).

### Quantificação e identificação dos gêneros de fungos anaeróbicos facultativos

A concentração média de fungos anaeróbicos facultativos micelianos e leveduras do fluido ruminal (média geral  $6,2 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^5$  UFC/mL) e nas fezes (média geral  $2,1 \times 10^7 \pm 3,9 \times 10^7$  UFC/g), não sofreram influência significativa ( $P>0,05$ ) pela suplementação dos fungos na dieta (Tabela 3).

O gênero de fungos micelianos mais frequentemente identificado nas amostras de fluído ruminal e fezes dos bezerros foi *Aspergillus* spp. (Tabela 5). Foi possível a detecção de dois isolados de *Trichoderma* spp. no fluido ruminal dos animais suplementados e a de um isolado de *Paecilomyces* spp. nas fezes de um animal do grupo controle (Tabela 5).

**Tabela 5.** Distribuição de gêneros de fungos micelianos isolados do fluido ruminal e das fezes de bezerros Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais.

Gêneros	Total N	Fluido Ruminal				Fezes			
		Controle		Suplementados <sup>1</sup>		Controle		Suplementados <sup>1</sup>	
		n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Aspergillus</i> spp.	20*	5	25	5	25	6	30	4	20
<i>Trichoderma</i> spp.	2	-	-	2	100	-	-	-	-
<i>Paecilomyces</i> spp.	1	-	-	-	-	1	100	-	-
Total	23	5		7		7		7	

Nota: \*Valor significativamente superior quando comparados entre os tratamentos e entre os gêneros pelo teste de Qui-quadrado ( $p=0,01$ ).

<sup>1</sup>Suplementação com fungos anaeróbios facultativos: *Aspergillus terreus* (isolado VN 15) e *Trichoderma longibrachiatum* (isolado VN 20).

#### Quantificação e identificação dos gêneros dos protozoários

A suplementação com os fungos ruminais na dieta não influenciou ( $P>0,05$ ) na concentração total e nas subpopulações dos protozoários (pequenos, médios e grandes) no fluido ruminal (Tabela 6). Neste estudo foram identificados 11.246 ciliados do fluido ruminal. Ao analisar o perfil de distribuição dos gêneros, constatou-se que *Eodinium* spp. foram detectados somente nos animais suplementados com os fungos ( $P<0,05$  – Tabela 6).

**Tabela 6.** Concentrações médias, desvio padrão (dp) e distribuição gêneros dos protozoários no fluido ruminal de bezerros Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais.

Variáveis	Controle		Suplementados <sup>1</sup>		Valor de P
	n (/mL)	%	n (/mL)	%	
Classificação por tamanho					
Pequenos <sup>2</sup>	50,3 ± 61,8	7,0	41,7 ± 33,2	6,1	0,75
Médios <sup>2</sup>	624,6 ± 163,6	87,2	582,5 ± 216,6	84,5	0,40
Grandes <sup>2</sup>	41,8 ± 47,2	5,8	64,9 ± 60,9	9,4	0,37
Classificação dos gêneros					
<i>Buetschlia</i> spp.	34,9 ± 55,1	4,9	24,0 ± 30,3	3,5	0,74
<i>Isotricha</i> spp.	67,5 ± 53,2	9,4	86,5 ± 35,2	12,6	0,26
<i>Dasytricha</i> spp.	37,0 ± 39,7	5,2	65,7 ± 48,3	9,5	0,26
<i>Charonina</i> spp.	15,4 ± 32,2	2,1	17,7 ± 13,1	2,6	0,21
<i>Entodinium</i> spp.	440,5 ± 136,8	61,3	370,6 ± 203,5	53,8	0,24
<i>Diplodinium</i> spp.	28,6 ± 29,9	4,0	24,6 ± 12,0	3,0	0,91
<i>Eodinium</i> spp.	0,0	0,0	6,9 ± 11,2	1,0	*0,02
<i>Eremoplaston</i> spp.	1,1 ± 2,2	0,2	1,6 ± 4,6	0,2	0,64
<i>Eudiplodinium</i> spp.	14,7 ± 15,7	2,1	24,9 ± 31,5	3,6	0,70
<i>Diploplastron</i> spp.	27,6 ± 29,4	3,9	16,2 ± 13,8	2,4	0,70
<i>Polyplastron</i> spp.	13,1 ± 18,3	1,8	4,9 ± 6,9	0,7	0,45
<i>Ostracodinium</i> spp.	11,6 ± 16,9	1,6	3,7 ± 5,8	0,5	0,58
<i>Elytroplastron</i> spp.	7,0 ± 12,6	1,0	3,1 ± 5,9	0,5	0,52
<i>Metadinium</i> spp.	13,5 ± 16,9	1,9	14,5 ± 11,5	2,1	0,55
<i>Enoploplastron</i> spp.	0,4 ± 1,1	0,1	1,2 ± 3,5	0,2	0,92
<i>Ophyroscolex</i> spp.	0,4 ± 1,1	0,1	20,6 ± 44,9	3,0	0,19
<i>Epidinium</i> spp.	4,4 ± 8,2	0,6	3,7 ± 10,6	0,5	0,64
Total	716,6 ± 141,4	100	689,1 ± 254,3	100	0,67

Nota: Teste de comparação de média pelo teste Kruskal-Wallis, com 5% de significância.

<sup>1</sup>Suplementação com fungos anaeróbios facultativos: *Aspergillus terreus* (isolado VN 15) e *Trichoderma longibrachiatum* (isolado VN 20).

<sup>2</sup>Pequeno (até 40 x 60µm), médio (até 100 x 150µm) e grande (maior do que 100 x 150µm) [23].

### Análises dos parâmetros sanguíneos

Neste estudo constatou-se que a suplementação com fungos autóctones inferiu significativamente em duas variáveis do eritrograma, diminuindo a concentração média de



eritrócitos ( $7,0 \pm 0,7 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) e hemoglobina ( $11,5 \pm 1,1 \text{ g/dL}$ ) ( $P < 0,05$  - Tabela 7). Entre as demais células do eritrograma, leucograma e plaquetograma não houve diferenças significativas e esses os valores estão dentro dos valores de referências ( $P > 0,05$  - Tabela 7).

**Tabela 7.** Concentrações médias e desvio padrão (dp) do eritrograma, leucograma e plaquetograma de bezerras Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais.

Variáveis	Controle	Suplementados <sup>1</sup>	Valor de P	Valores de referência <sup>2</sup>
Eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ )	$7,6 \pm 0,6$	$7,0 \pm 0,7$	*0,01 <sup>a</sup>	5,0 – 10
Hemoglobina (g/dL)	$12,3 \pm 0,8$	$11,5 \pm 1,1$	*0,02 <sup>a</sup>	8,0 – 15
Hematócrito (%)	$28,2 \pm 2,1$	$27,6 \pm 3,1$	0,35 <sup>a</sup>	24 – 46
VCM ( $\mu^3$ )	$37,2 \pm 2,7$	$39,7 \pm 4,7$	0,14 <sup>a</sup>	40 – 60
HCM (%)	$16,2 \pm 0,6$	$16,6 \pm 1,1$	0,23 <sup>a</sup>	14,8 - 18,6
CHCM (%)	$43,6 \pm 2,0$	$42,0 \pm 2,5$	0,11 <sup>a</sup>	30 – 36
Plaquetas ( $10^6/\mu\text{L}$ )	$565 \pm 262$	$513 \pm 431$	0,18 <sup>a</sup>	100 - 800
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$8,9 \pm 1,5$	$9,0 \pm 1,8$	0,99 <sup>a</sup>	4,0 – 12,0
Segmentados ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$2,7 \pm 0,9$	$2,6 \pm 0,9$	0,91 <sup>b</sup>	0,6– 4,0
Eosinófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,2$	0,83 <sup>b</sup>	0 – 2,4
Monócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$251,4 \pm 354,8$	$38,1 \pm 75,7$	0,20 <sup>b</sup>	25 - 840
Linfócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	$5,8 \pm 0,8$	$6,2 \pm 1,7$	0,99 <sup>a</sup>	2,5– 7,5

Nota: VCM= Volume Corpuscular Médio, HCM= Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM= Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM).

<sup>a</sup>Teste de comparação de média pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

<sup>b</sup>Teste de comparação de média pelo teste de Kruskal-Wallis, com 5% de significância.

<sup>1</sup>Suplementação com fungos anaeróbios facultativos: *Aspergillus terreus* (isolado VN 15) e *Trichoderma longibrachiatum* (isolado VN 20).

<sup>2</sup>[30]

Em relação ao perfil bioquímico sérico não foram detectadas diferenças significativas nos bezerras suplementados em sua dieta com fungos anaeróbicos autóctones ( $P > 0,05$  -Tabela 8). Contudo os valores da albumina, ALT e ureia estavam abaixo dos valores de referência, e a glicose, globulina e proteína total apresentavam acima dos valores de referências para bovinos.

**Tabela 8.** Concentrações médias e desvio padrão (dp) do perfil bioquímico sérico de bezerros Nelore suplementados ou não com os fungos ruminais.

Variáveis	Controle	Suplementados <sup>1</sup>	Valor de P	Valor de referência
Albumina (g/dL)	2,2 ± 0,5	2,3 ± 0,4	0,59 <sup>a</sup>	2.6 – 3.6 <sup>2</sup>
ALT (U/L)	32,4 ± 7,4	30,1 ± 3,9	0,42 <sup>a</sup>	78–132 <sup>3</sup>
Creatinina (mg/dL)	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,3	0,86 <sup>a</sup>	1,0 – 2,0 <sup>2</sup>
Fosfatase alcalina (U/L)	263,6 ± 110,6	343,1 ± 88,4	0,11 <sup>b</sup>	0 – 490 <sup>4</sup>
Glicose (mg/dL)	93,8 ± 19,3	84,0 ± 12,0	0,13 <sup>a</sup>	45 – 75 <sup>4</sup>
Globulina (g/dL)	4,6 ± 0,7	4,5 ± 1,2	0,58 <sup>a</sup>	2.6 – 4.0 <sup>4</sup>
Proteína Total (g/dL)	6,9 ± 0,7	6,8 ± 0,9	0,93 <sup>a</sup>	6,5 – 7,4 <sup>2</sup>
Ureia (mg/dL)	12,0 ± 1,8	12,8 ± 2,4	0,24 <sup>a</sup>	23 – 58 <sup>2</sup>

Nota: ALT= alanina aminotransferase.

<sup>a</sup>Teste de comparação de média pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

<sup>b</sup>Teste de comparação de média pelo teste de Kruskal-Wallis, com 5% de significância.

<sup>1</sup>Suplementação com fungos anaeróbios facultativos: *Aspergillus terreus* (isolado VN 15) e *Trichoderma longibrachiatum* (isolado VN 20).

<sup>2</sup>[31]; <sup>3</sup>[32]; <sup>4</sup>[30]

## DISCUSSÃO

### Desempenho

Neste estudo, a suplementação com os dois fungos anaeróbicos facultativos do rúmen não alterou significativamente ( $P > 0,05$ ) o desempenho dos animais (Tabela 2). Adicionalmente diferentes fatores como o tipo de microrganismo utilizado e sua dosagem, a natureza da dieta, o *status* fisiológico do animal e a estratégia de alimentação [33, 34, 35], poderiam ser atribuídos há não influência desses fungos microbiana ao desempenho dos bezerros do presente estudo. Os animais deste estudo estavam recebendo dietas balanceadas e dessa forma os fungos não teria contribuído para o melhor desempenho desses animais que receberam a forragem lignificada.

Outro estudo também constatou que o GPD (1,47 kg/dia) não foi influenciado ( $P > 0,05$ ) pela adição de enzimas amilases de *Aspergillus awamori* em touros Nelore terminados em confinamento, com média de 24 meses, recebendo como volumoso feno de Tifton [37]. Contudo,

López Aguirre *et al.* [38], observaram que em ovinos da raça Pelibuey recém desmamados com 60 dias de idade, alimentados com capim Buffel (*Cenchrus Ciliaris L.*) e suplementados com enzimas exógenas de *Trichoderma longibrachiatum*, apresentaram melhorias no GPD e no GPT em relação ao controle.

### **Análises físico-químicas e macroscópica do fluido ruminal**

Neste estudo características físicas como a cor (castanho), o odor (aromático) e a viscosidade (aquoso) do fluido ruminal não sofreram influencia estatisticamente pela suplementação com os fungos e estiveram compatíveis com a dieta ofertada [23]. O PRAM também não foi influenciado pela suplementação com fungos e todos os bezerros suplementados apresentaram a microbiota ruminal ativa segundo Dirksen [23]. Estudo com bezerros Nelore, alimentados em pastagem de *Urochloa brizantha* sem suplementação, apresentaram PRAM acima de três minutos e a atividade microbiana foi considerada levemente inativa [12]. Para Dirksen [23], o odor (aromático) e a viscosidade (aquosa) sugerem que o fluido ruminal dos animais está levemente ativo e em dietas pobres em energia e proteína ou com jejum prolongado o tempo de redução pode-se estende por mais de 15 minutos.

O pH do fluido ruminal dos bezerros avaliados esteve dentro da faixa de normalidade apesar de ter sido 3,76% inferior para aqueles não suplementados. A adição de fungos e/ou enzimas fúngicas na dieta de ruminantes, pode melhorar a microbiota, estabilizar o pH ruminal, e promover a degradação microbiana da parede celular das plantas [39,40]. Mathieu *et al.* [41] observaram que após utilização *Aspergillus orizae* melhorou em 2,68% o pH ruminal de ovelhas. Beharka e Nagaraja [42], concluíram que a inclusão de *Aspergillus orizae* podem estabilizar o pH ruminal, sendo benéfico em dietas ricas em grãos em ruminantes. O pH ideal para o fluido ruminal é considerado normal entre a faixa de 5,5 a 7,6, e é vital para a sobrevivência e a estabilidade dos microrganismos celulolíticos do rúmen, visto que esse são muito sensíveis a pequenas mudanças no nível do pH [23].

### **Quantificação e identificação dos gêneros de Enterobacteriaceae**

As populações de bactérias dessa família não foram influenciadas pela inclusão dos fungos ruminais. As concentrações dessas bactérias no fluido ruminal foram próximas àquelas descritas por Vieira *et al.* [8] de  $1,0 \times 10^4$  UFC/mL em bezerros Nelore machos de seis a sete meses de idade e mantidos em pastagem tropical, sem suplementação. Mesmo residentes naturais do trato intestinal de bovinos, as Enterobacteriaceae são frequentemente descritas dentro do ambiente ruminal, porém suas relações ainda não foram totalmente elucidadas [6, 43].

Neste estudo não foi observada influência da suplementação com os fungos na eliminação fecal dessas bactérias. Em outra pesquisa, Stella *et al.* [44], também constaram que a suplementação com cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (CNCM I-1077) em caprinos da raça Saanen, alimentados silagem de triticale (*X Triticosecale Wittmack*), não alterou as concentrações de eliminação fecais dessas bactérias em relação animais do grupo controle após 60 dias de experimentação.

Considerando o perfil de gêneros da Enterobacteriaceae, *Escherichia* spp. e o *Enterobacter* spp. foram o mais identificado com 46,9% e 31,2% respectivamente. Hassan *et al.* [45], ao avaliarem o efeito da suplementação *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de bezerros mestiços Friesian  $\times$  Baladi, no período de transição da alimentação do leite para o feno de berseem (*Trifolium alexandrinum*) constataram, semelhantemente ao presente estudo o gênero o *Escherichia* spp. foi o mais identificado. Contudo, sabe-se que o tipo e frequência da dieta exercem influência no pH ruminal, que conseqüentemente interfere no crescimento microbiano dessas bactérias [46, 47].

### **Quantificação e identificação dos gêneros de fungos anaeróbicos facultativos**

Neste estudo, a concentração média dos fungos anaeróbicos facultativos micelianos e leveduras do fluido ruminal e nas fezes não sofreram influência significativa pela suplementação dos fungos na dieta. As concentrações detectadas para esses fungos, neste presente estudo são superiores àquelas descritos por Abrão *et al.* [12], que detectaram média de  $3,3 \times 10^3$  UFC/mL em amostras do fluido ruminal de bezerros Nelores, alimentados exclusivamente em pastagens *Urochloa decumbens* e *Urochloa brizantha* de baixo valor nutricional e sem suplementação no

Norte de Minas Gerais. Esses fungos anaeróbios facultativos seriam capazes de colonizar e apresentar atividade celulolítica e hemicelulolíticas, importantes para degradação das fibras dos tecidos vegetais, principalmente em forragens tropicais [12, 13].

O gênero de fungos micelianos mais frequentemente identificado nos fluído ruminal e nas fezes dos bezerros foi *Aspergillus* spp.. Foi possível a identificação de dois isolados do fungo *Trichoderma* spp. no fluido ruminal dos suplementados indicando que esses fungos poderiam permanecer viável no ambiente ruminal

O principal gênero detectado neste estudo (*Aspergillus* spp.) foi também o mais frequente em amostras de bezerros Nelores, alimentados em pastagem de *Uroclhoa* spp., sem suplementação, durante a estação seca [12]. O predomínio desse gênero poderia ser justificado devido versatilidade e eficiência na catabolização de diferentes fontes de carbonos, incluindo celulose lignificada por esses microrganismos [14, 48].

### **Quantificação e identificação dos gêneros dos protozoários**

Os protozoários do rúmen desempenham um papel importante no metabolismo dos nutrientes e no equilíbrio ambiental do rúmen, sendo responsável por 40% do nitrogênio (N) total e 60% do produto final da fermentação [49,50]. Sendo encontrados nas primeiras seis semanas de vida do animal, principalmente os do gênero *Entodinium* spp. [50].

Neste estudo a suplementação com os fungos anaeróbicos facultativos autóctones não influenciou a concentração média desses ciliados. Em estudo com bezerros Nelore de ambos os sexos, com a mesma faixa etária e alimentação similar a deste estudo, porém sem suplementação com os fungos, Duarte *et al.* [51], detectaram uma população superior de protozoários ( $1,7 \pm 9,1 \times 10^4/\text{mL}$ ) no fluído ruminal. A menor concentração de ciliados observada nos bezerros avaliados neste estudo poderia ser justificada pelas condições nutricionais do feno utilizado, que apresentaram baixos teores de proteínas e altas proporções de lignina e pelo fato que os animais permaneceram em baias isoladas, o que poderia ter influenciado na colonização.

Os ciliados são altamente proteolíticos e são responsáveis pela rotatividade de grande parte da proteína microbiana ruminal, por causa da predação bacteriana [69,70]. Além disso, os

protozoários também contribuem para estabilidade do pH ruminal por meio da absorção do amido e da metabolização do lactato, reduzindo o risco de acidose ruminal, e adicionalmente alguns ciliados contribuem significativamente para a degradação da fibra vegetal [49].

Foram observados no total, 17 gêneros de protozoários neste estudo. Assim como descrito por Wright [54] os gêneros *Entodinium*, *Isotricha* e *Dasytricha* foram os mais frequentes nos bezerros avaliados. Em outro estudo, Duarte *et al.* [51], avaliaram em bezerros Nelore, criados em pastagens tropicais no período da seca e constatou-se que, *Buetschilia* spp. representou o gênero ciliado ruminal mais frequente no rúmen. A diversidade dos gêneros desses eucariotos pode indicar um ambiente ruminal saudável, mesmo na estação seca, quando diferentes grupos de ciliados encontraram condições necessárias para o seu estabelecimento [56,57].

Entre 17 os gêneros de ciliados, constatou-se o *Eodinium* spp. foram detectados somente nos animais suplementados com os fungos. Esse gênero de protozoários faz parte da família *Ophryoscolecidae* que são caracterizados preferencialmente como celulolíticos [62] e seriam importantes para a degradação de celulose presente na forragem utilizada. Silva *et al.* [57] e Nigri *et al.* [55] também constaram o gênero *Eodinium* spp. entre os mais frequentes em novilhos Nelore alimentados com feno de *Urochloa* spp. sem suplementação.

### **Analises dos parâmetros sanguíneos**

Apesar dos animais suplementados com os fungos celulolíticos apresentarem diminuição na concentração média de eritrócitos e hemoglobina, em relação ao grupo controle. Entretanto essas variáveis estavam dentro da faixa de referência para bovinos. Adicionalmente as demais células do eritrograma, leucograma e o plaquetograma não foram influenciadas pela inoculação com os fungos e esses os valores estão também dentro dos valores de referências. Futuros estudos devem elucidar a influência da suplementação com esses fungos ou seus metabólitos na dieta sobre o hemograma de bovinos, apesar de terem apresentado ganho de peso compatível com a idade e dieta fornecida. Kapadiya *et al.* [59] também constaram redução na concentração de hemoglobina ( $9,07 \pm 0,08$  g/dL) em bezerros mestiços Holstein Friesian x Kankrej, alimentados com feno de sorgo e suplementados com enzimas exógenas de *Aspergillus* spp. Diferentemente,

Piamphon et al. [60], relataram que em bezerros mestiços Brahman x raça nativa da Tailândia, recebendo capim Naiper fermentado com *Aspergillus niger*, a concentração da hemoglobina (11,0 g/dL) não foi alterada em relação ao controle.

Variáveis como idade, sexo, exercício e estado emocional devem ser consideradas ao estabelecer valores de referências para bovinos [61]. Em outra pesquisa, após o desmame, os bezerros da zebuínos, sem suplementação apresentaram concentração sérica de adrenalina e manutenção da concentração de cortisol, associadas a maiores contagens de leucócitos, neutrófilos e linfócitos [62], que não foram constatados no presente estudo.

Quanto ao perfil bioquímico sérico não foram detectadas diferenças significativas nos bezerros suplementados com os fungos avaliados. Contudo, para ambos grupos de bezerros os valores da albumina, ALT e ureia estavam abaixo dos valores de referência, e as concentrações média da glicose, globulina e da proteína total apresentavam acima dos valores de referências para bovinos. Semelhante a este estudo, Kapadiya *et al.* [59] não constaram a influência da suplementação de enzimas exógenas de *Aspergillus spp.* sobre as nas concentrações de glicose ( $83.72 \pm 2.27$  mg/dL) e proteína total ( $6.10 \pm 0.09$  g/dL) no perfil bioquímico sérico dos bezerros mestiços Holstein Friesian x Kankrej, e ainda a concentração da glicose estava acima dos valores de referência, como neste presente estudo. Piamphon *et al.* [60], também observou que bezerros mestiços Brahman x raça nativa da Tailândia, recebendo capim Naiper fermentado com *Aspergillus niger* também não houve diferenças no perfil bioquímico dos animais analisado, sendo glicose (74,5 mg/dL), creatinina (1,0 mg/dL), ALT (98,0 U/L).

Os valores de albumina e ureia para os bezerros de ambos os grupos avaliados neste estudo, estiveram abaixo dos valores de referência para bovinos. Essa redução poderia estar relacionada ao baixo teor de proteínas do feno ofertado aos animais e pelo estresse pós desmame. A concentração sérica de albumina é o parâmetro bioquímico mais sensível para avaliar o *status* nutricional, valores baixos desse parâmetro sugerem inadequado consumo de proteínas [63]. As concentrações séricas de ureia são influenciadas diretamente pela quantidade de nitrogênio proteico ingerido, e também, por sua absorção [64]. A redução dos valores dessas duas variáveis,

no presente estudo poderiam sugerir que a dieta fornecida não atenderia as necessidades desses animais em crescimento. o que deve ser elucidados em futuros estudos.

A enzima citoplasmática ALT catalisa a transaminação de  $\alpha$ -cetoglutarato e L-alanina, formando glutamato e piruvato e pode desempenhar um papel importante no metabolismo proteico e seus níveis elevados estão associados a lesões e a necroses hepáticas em ruminantes [65,66]. Portanto, o valor dessa enzima detectados nos bezerros avaliados podeiram indicar que a inclusão dos fungos não seria hepatotóxica.

Apesar de os níveis de glicose de bezerros de ambos os grupos avaliados estarem acima dos valores de referência, Drackley [67] afirma que esse parâmetro, é o menos indicado para avaliar o *status* energético, pois a glicemia é facilmente alterada em funções de mudanças nutricionais, e é sensível a alterações em função de fatores estressantes. Os valores das globulinas também estiveram acima da faixa de referência. Segundo Kaneko *et al.* [30], o aumento da concentração de globulinas plasmáticas está relacionado à resposta imune do organismo animal a possíveis desafios infecciosos, entretanto os valores de variáveis do leucograma dos bezerros avaliados neste estudo estiveram dentro da faixa de normalidade para a espécie.

Neste estudo a suplementação com cepas dos fungos celulotícos, não alterou significativamente o perfil bioquímico sérico em relação ao grupo de bezerros não suplementados. Todavia, é importante salientar a necessidade de futuros estudos, com o fornecimento de diferentes doses, diferentes manejos e idades para a suplementação, para elucidar as elevações de globulinas, glicose e reduções de albumina e ureia observadas para os bezerros de ambos os grupos avaliados em confinamento, após o desmame.

## CONCLUSÃO

Conclui-se com esta pesquisa que a suplementação com os dois isolados de *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* apresentam potencial para uso como possível aditivos, visto que não alterou os parâmetros fisiológicos da composição da microbiota anaeróbica facultativa do rumen, das fezes e do sangue e adicionalmente favoreceu a presença do gênero de



ciliados Eodinium spp. Contudo, novos estudos devem ser realizados para definir melhor as dosagens de utilização deste na suplementação de bezerros.

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código Financeiro 0001), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, Tecnológico Desenvolvimento (CNPq), Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG) e a Connan – Nutrição Animal.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. 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., and Wright, A.G. (2009). Molecular Diversity of the Rumen Microbiome of Norwegian Reindeer on Natural Summer Pasture. *Microb. Ecol.*, 57:335–348.
2. Jami, E., Israel, A., Kotser, A., and Mizrahi, I. (2013). Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J.*, 6: 1069–1079.
3. Oliveira, V.S., Santana Neto, J.S., and Valença, R.L. (2013). Características químicas e fisiológicas da fermentação ruminal de bovinos em pastejo – Revisão de literatura. *Rev. Cient. Eletrônica Med. Vet.*, 11: 1-21.
4. Welkie, D.G., Stevenson, D.M., and Weimer, P.J. (2010). Analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe*, 16(2): 94–100.
5. Weimer, P.J. (2015). Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front. Microbiol.*, 6: 296-297.
6. Freitas, C.E.S., Almeida, P.N.M., Duarte, E.R., Abrão, F.O., Careli, R.T. and Gerassev, L.C. (2014). Aerobe and anaerobe facultative Gram-negative bacteria rod-shaped in the

- ruminal fluid of dairy cattle fed with different diets containing tropical forages. *Arch. Med. Vet.*, 6: 457-462.
7. Duse, A., Waller, K.P., Emanuelson, U., Unnerstad, H.E., Persson, Y., and Bengtsson, B. (2015). Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. *J. Dairy. Sci.*, 98(1):500-516.
  8. Vieira, E.A., Abrão, F.O., Ribeiro, I.C.O., Nigri, A.C.A., Silva, K.F., Careli, R.T., Geraseev, L.C., and Duarte, E.R. (2015). Bastonetes Gram-negativos aeróbios e anaeróbios facultativos no fluido ruminal de bovinos de corte alimentados em pastagem lignificada e em novilhos com acidose ruminal. *Pesq. Vet. Bras.*, 35(9):811-816.
  9. Paul, K., Nonoh, J.O., Mikulski, L., and Brune, A. (2012). “Methanoplasmatales”, thermoplasmatales-related Archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78: 8245–8253.
  10. Gruninger, R.J., Puniya, A.K., Callaghan, T.M., Edwards, J.E., Youssef, N., Dagar, S.S., Fliegerova, K., Griffith, G.W., Forster, R., Tsang, A., McAllister, T., and Elshahed, M.S. (2014). Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 90(1): 1-17.
  11. Freitas, C.E.S., Abrão, F.O., Silva, K.L., Almeida, P.N.M., and Duarte, E.R. (2012). Fungos aeróbios no intestino grosso de borregos e de ovelhas criados em pastagens tropicais. *Arq. Bras. Med. Zootec.*, 64(1): 225-227.
  12. Abrão, F.O., Duarte, E.R., Freitas, C.E., Vieira, E.A., Geraseev, L.C., Silva-Hughes, A.F., Rosa, C.A. and Rodrigues, N.M. (2014). Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. *Curr. Microbiol.*, 69(2): 649-659.
  13. Almeida, P.N.M., Freitas, C.E., Abrão, F.O., Ribeiro, I.C.O., Vieira, E.A., Geraseev, L.C., and Duarte, E.R. (2014). Atividade celulolítica de fungos aeróbios isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. *Rev. Caatinga.*, 27(4): 202–207.

14. Abrão, F.O., Duarte, E.R., Pessoa, M.S., Santos, V.L., Freitas Júnior, L.F., Barros, K.O.; Silva-Hughes, A.F., Silva, T.D. and Rodriguez, N. M. (2017). Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. *PLoS One.*, 12(8):1-13
15. Abrão, F.O., Duarte, E.R., Pessoa, M.S., Santos, V.L., and Rodriguez, N.M. (2018). Inocuidade micotoxicológica e viabilidade de *Aspergillus* spp. com potencial probiótico provenientes do trato digestório bovino. *Arq. Bras. Med. Zootec.*, 70(6): 1833-1839.
16. Facchini, F.D.A., Vici, A.C., Reis, V.R.A., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Reis, R.A., Polizeli, M.L. (2011). Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. *Bioproc. Biosys Engin.*, 34: 347–355.
17. Gomes, J.E.G., Nascimento, T.C.E.S., Queiroz, A.E S.F., Júnior, J.I.S.S., Souza-Motta, C.M., Medeiros, E.V., and Moreira, K.A. (2014). Characterization and evaluation of in vitro digestion of phytases, xylanases and cellulases for feed industry. *African. J. Microbiol. Res.*, v. 8, p. 551–58.
18. Sun, H., Wu, Y., Wang, Y. Wang, C., and Liu, J. (2016). Effects of addition of *Aspergillus oryzae* culture and 2-hydroxyl4-(methylthio) butanoic acid on milk performance and rumen fermentation of dairy cows. *Anim. Sci. J.*, 88: 602–609.
19. INMET – Instituto Nacional de Meteorologia [Internet]. 2020 Abril 02 [citado 2020 Abril 02]. Disponível em: [http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/gera\\_serie\\_txt\\_mensal.php?&mRelEstacao=83437&btnProcesso=serie&mRelDtInicio=01/04/2020&mRelDtFim=01/10/2020&mAtributos=,,,,,,,1,,,1,,1](http://www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa/gera_serie_txt_mensal.php?&mRelEstacao=83437&btnProcesso=serie&mRelDtInicio=01/04/2020&mRelDtFim=01/10/2020&mAtributos=,,,,,,,1,,,1,,1). Portuguese.
20. NRC - National Research Council. (2016). Nutrient requirements of beef cattle. 8th ed. Washington: Eighth Revised Edition., 494 p.
21. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky

- JJ, White TJ. (eds) PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic Press San Diego. pp 315–22.
22. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zheng Zhang, J.Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST, a new generation of protein database search programs. *Nucl. Aci. Res.*, 25:3389–3402.
  23. Dirksen, G. Sistema digestivo In: Dirksen, G., Grunder, H.D., Stober, M., and Rosenberger, M. (1993). Exame clínico dos bovinos, 3th edition, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 167–169.
  24. Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., and Pfaller, M.A. (2007). Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 2488p.
  25. McFaddin, J.F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 912p.
  26. Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E. M., and Takahashi de Melo, N. (2002). Tratado de Micologia Médica. 9th edition. São Paulo: Sarvier, 1104p.
  27. Germain, G.S., Summerbell, R. (2010). Identifying Fungi: A Clinical Laboratory Handbook. Star Publishing Company (Belmont, CA); 2nd edition. 377 p.
  28. Dehority, B.A. (1993) Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. Florida: CRC Press Inc; p. 96.
  29. D’Agosto, M., and Carneiro, M.E. (1999). Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. *Rev. Bras. Zool.*, 16(1): 725–729.
  30. Kaneko, J.J., Harvey, J.W. and Bruss, M. (2008). Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6th ed. Academic Press; 928p.
  31. Meyer, D.J., Coles, E.H., and Rich, L.J. (1995). Medicina de Laboratório Veterinária. São Paulo: Roca, 308p.
  32. Meyer, D.J., and Harvey, J.W. (1998) Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 372p.

33. Magalhães, V.J.A., Susca, F., Lima, F.S., Branco, A.F., Yoon, I., and Santos, J.E.P. (2008). Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *J Dairy Sci.*, 91:1497–1509.
34. Chaucheyras-Durand, F., N. D. Walker, and A. Bach. (2008). Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 145:5- 26.
35. Alugongo, G.M., Xiao, J., Wu, Z., Li, S., Wang, Y., and Cao, Z. (2017). Review: Utilization of yeast of *Saccharomyces cerevisiae* origin in artificially raised calves. *J Animal Sci Biotechnol.*, 8:34.
36. Neumann, M., Horst, E.H., Ueno, R.K., Leão, G.F.M., and Almeida, E.R. (2016). Eficácia do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* no desempenho e características de carcaça de novilhos Canchim. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.*, 14:177-184.
37. Oliveira, L.G., Ferreira, R.N., Padua, J.T., Ulhoa, C.J., Cysneiros, C.S.S., and Arnhold, E. (2015). Performance of beef cattle bulls in feed lots and fed on diets containing enzymatic complex. *Acta Sci.*, 37(2):181-186.
38. López Aguirre, D., Hernández-Meléndez, J., Rojo, R., Sánchez-Dávila, F., López-Villalobos, N., Salem, A.Z.M., Martínez-González, J.C., Vázquez-Armijo, J.F. and Ruíz, S. (2016). Effects of exogenous enzymes and application method on nutrient intake, digestibility and growth performance of Pelibuey lambs. *Springerplus*, 1399: 1-6.
39. Tripathi, V.K., Sehgal, J.P., Puniya, A.K., Singh, K. (2007). Effect of administration of anaerobic fungi isolated from cattle and wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*) on growth rate and fibre utilization in buffalo calves. *Arch. Anim. Nutr.*, 61(5): 416-423.
40. Alzahal, O., Dionissopoulos, L., Laarman, A.H., Walker, N. and McBride, B.W. (2014) Active dry *Saccharomyces cerevisiae* can alleviate the effect of subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 97(12):7751-7763.
41. Mathieu, F., Jouany, J.P., Sénaud, J., Bohatier, J., Bertin, G., and Mercier, M. (1996). The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the

- rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reprod. Nutri. Dev.*, 36: 271-287.
42. Beharka, A.A. and Nagaraja, T.G. (1998). Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.*, 1(6):1591-1598.
43. Khafipour, E., Plaizier, J.C., Aikman, P.C., and Krause, D.O. (2011). Population structure of rumen *Escherichia coli* associated with subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 94(1): 351-360.
44. Stella, A.V., Parattea, R., Valnegria, L., Cigalino, G., Soncinia, G., Chevaux, E., Dell'Orto, V. Savoni, G. (2007). Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. *Small Ruminant. Res.*, 67(1):7-13.
45. Hassan, A.A., Salem, A.Z. M., Kholif, A.E., Samir, M., Yacout, M.H., Abu Hafsa, S.H., Mendoza, G.D., Elghandour, M.M.Y., Ayala, M., and Lopez, S. (2016). Performance of crossbred dairy Friesian calves fed two levels of *Saccharomyces cerevisiae*: intake, digestion, ruminal fermentation, blood parameters and faecal pathogenic bacteria. *J. Agric. Sci.*, 154(8): 1488-1498.
46. Callaway, T.R., Carr, M., Edrington, T., Anderson, R.C., and Nisbet, D.J. (2009). Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and Cattle: A Review After 10 Years. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 11(2): 67-68.
47. Han, K.Y., Nagata, R., Natsuki, O., Toshihiro, I., Kentaro, I., and Shigeru, S. (2016). Effects of Dietary Forage and Calf Starter Diet on Ruminal pH and Bacteria in Holstein Calves during Weaning Transition. *Front. Microbiol.*, 7(1):1575-1576.
48. Flipphi, M., Sun, J., Robellet, X., Karaffa, L., Fekete, E., Zeng, A. P., and Kubicek, C. P. (2009). Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. *Fungal Genet. Biol.*, 46(1):19-44.
49. Newbold, C.J., De la Fuente, G., Belanche, A.; Ramos-Morales, E., and McEwan, N.R. (2015). The role of ciliate protozoa in the rumen. *Front. Microbiol.*, 6(1):1313-1314.

50. Arcuri, P.B., Lopes, F.C.F., and Carneiro, J.C. (2011). Microbiologia do rúmen. In: Berchielli, T.T., Pires, A.V., and Oliveira, S G. Nutrição de ruminantes, 2th edition, Jaboticabal: Funep, 115 – 160, 2011.
51. Duarte, E.R., Abrão F.O., Ribeiro, I.C.O., Vieira, E.A., Nigri, A.C., Silva, L.K., Virgínio-Júnior, G. F., Barreto, S.M.P. and Gerassev, L.C. (2018). Rumen protozoa of different ages of beef cattle raised in tropical pastures during the dry season. *J. Appl. Anim. Res.*, 46 (1):1457-1461.
52. Virgínio Júnior, G.F., Duarte, E.R., Ornelas, L.T.C., Azevedo, R.A., Pinto, S.M., and Gerassev, L.C. (2016). Caracterização físico-química e microbiológica do fluido ruminal e do conteúdo gastrointestinal de bezerros alimentados com silagem de leite de transição. *Rev. Bras. Ciênc. Agrár.*, 11(2): 142-147.
53. Huws, S.A., Creevey, C.J., Oyama, L.B., Mizrahi, I., Denman, S.E., Popova, M., Muñoz-Tamayo, R., Forano, E., Waters, S.M., Hess, M., Tapio, I., Smidt, H., Krizsan, S.J., Yáñez-Ruiz, D.R., Belanche, A., Guan, L., Gruninger, R.J., McAllister, T.A., Newbold, C.J, Roehle, R., Dewhurst, R.J., Snelling, T.J., Watson, M., Suen, G., Hart, E.H., Kingston-Smith, A.H., Scollan, N.D., Prado, R.M., Pilau, E.J., Mantovani, H.C., Attwood, G.T., Edwards, J.E., McEwan, N.R., Morrisson, S., Mayorga, O.L., Elliott, C., and Morgavi, D.P. (2018). Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future. *Front. Microbiol.*, 9:2161.
54. Wright, A.D.G. (2015). Rumen Protozoa. In: Puniya, A.K., Singh, R. and Kamra, D.N. Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution, Springer: India, 379 p.
55. Nigri, A.C.A., Ribeiro, I.C.O., Vieira, E.A., Silva, M.L.F., Virgínio-Júnior, G.F, Abrão, F.O., Gerassev, L.C., and Duarte, E.R.. (2017). População de protozoários ruminais em novilhos zebuínos alimentados com ou sem volumoso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 69(5), 1339-1345.
56. Kamra, D.N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.*, 89(1):124-134.

57. Silva, K.L., Duarte, E.R., Freitas, C.E.S., Abrão, F.O., and Geraseev, L.C. (2014). Protozoários ruminais de novilhos de corte criados em pastagem tropical durante o período seco. *Ciênc. Anim. Bras.*, 15(3), 259-265.
58. Reis, C.C., Maeda, E.M., Cedrola, F., Martins, E. N., De Paula, F.M., and Martinele, I. (2019). Diet and breed alter community structures of rumen protozoa in cattle subjected to different feeding systems. *Semina: Ciênc. Agrár.*, 40(2):909-918.
59. Kapadiya, R.I., Shah, S.V., Patel, Y.G. and Pandya, P.R. (2019). Effect of Fibrolytic Microbes and Enzymes on Biochemical Blood Parameters in Crossbred Calves. *Ind. J. Vet. Sci. and Biotech.*, 15(2): 18-21.
60. Piamphon, N., Wachirapakorn, C., Bannasan, K., Pornsopin, P., Sotawong, P., and Gunun, P. (2017) Influence of *Aspergillus niger* or *Saccharomyces cerevisiae* - Fermented Napier Grass (*Pennisetum purpureum*) Mixed with Fresh Cassava Root on Blood Parameters and Nutrient Digestibility in Growing Beef Cattle. *Pak. J. Nutr.*, 16 (10): 776-781.
61. Kapale, P.M., Jagtap, D.G., Badukale, D.M. and Sahatpure, S.K. (2008). Haematological constituents of blood of Gaolao cattle. *Vet. World*, 1(4): 113–114.
62. Coppo, J.A., Mussart, N.B., Revidatti, M.A., and Capellari, A. (2003). Absence of biochemically demonstrable stress in early weaned half-bred zebu calves. *Cien. Inv. Agr.*, 30(2):97-105
63. González, F.H.D., Conceição, T.R., Siqueira, A.J.S., and La Rosa, V.L. (2000). Variações sanguíneas de ureia, creatinina, albumina e fósforo em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. *Hora Vet.*, 20(1): 59-62.
64. Bricarello, P.A., Gennari, S.M., and Oliveira-Serqueira, T.C.G. (2004) Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioulalanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small Rumin. Res.*, 51(1): 75-83.
65. Bain, P.J., 2003. Liver. In: Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology, Latimer, K.S., E.A. Mahaffrey and K.W. Prasse (Eds.). 4th Edn., Iowa State Press, Ames, IA., USA., pp: 193-214.



66. Solaiman, S., J. Thomas, Y. Dupre, B.R. Min, N. Gurung, T.H. Terrill and G.F.W. Haenlien, 2010. Effect of feeding sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) on growth performance, blood metabolites and carcass characteristics of Kiko crossbred male kids. *Small Rumin. Res.*, 93: 149-156.
67. Drackley, J.K. (1999). Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier. *J. DairySci.*, 82: 2259-2273.
68. Freitas, C.E.S. (2018). Fungos do trato digestório de ruminantes como potencial probiótico para ovinos. (Tese). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Brasil, 83 f.
69. Hartinger T., Gresner N., Südekum K.-H. (2018). Does intra-ruminal nitrogen recycling waste valuable resources? A review of major players and their manipulation. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 9:33.
70. Firkins J. L., Mackie R. I. (2020). "Ruminal protein breakdown and ammonia assimilation," in *Improving Rumen Function*, eds McSweeney C. S., Mackie R. I., (Cambridge, MA: Burleigh Dodds; ).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se com esta pesquisa que a suplementação com os dois isolados de *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* apresentam potencial para uso como possível aditivos, visto que influenciou nos bovinos parâmetros como pH ruminal, a concentração média de eritrócitos e da hemoglobina. Entretanto, o gênero de protozoários *Eodinium* spp. foi identificado somente nos bezerros suplementados. As demais variáveis microbiológicas, sanguíneas e de desempenho não são influenciadas pela suplementação. Contudo, novo estudos devem ser realizados para definir melhor as dosagens de utilização deste na suplementação de bezerros.

## ANEXOS

Apêndice A - Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso Animais



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 209/2018

Título do projeto: DESEMPENHO E CARACTERIZAÇÃO DO FLUIDO RUMINAL DE BEZERROS SUPLEMENTADOS COM ADITIVO MICROBIANO

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Eduardo Robson Duarte

Unidade: Instituto de Ciências Agrárias

Departamento: Instituto de Ciências Agrárias

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 09/07/2018. Validade: 09/07/2018 à 08/07/2023  
Belo Horizonte, 09/07/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [celea@prpq.ufmg.br](mailto:celea@prpq.ufmg.br)