

PATRÍCIA NATALICIA MENDES DE ALMEIDA

**POPULAÇÃO MICROBIANA RUMINAL E ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE
FUNGOS PROVENIENTES DE BOVINOS LEITEIROS ALIMENTADOS
COM DIFERENTES FORRAGENS**

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

Orientador: Prof. Eduardo Robson Duarte

Montes Claros

2009

**A447p
2009**

Almeida, Patrícia Natalícia Mendes de.

População Microbiana Ruminal e Atividade Celulolítica de Fungos Provenientes de Bovinos Leiteiros Alimentados com Diferentes Forragens / Patrícia Natalícia Mendes de Almeida. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2010.

96: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

Orientador: Prof. Eduardo Robson Duarte.

Banca examinadora: Iran Borges, Diogo Gonzaga Jayme, Luciana Castro Geraseev, Eduardo Robson Duarte.

Inclui bibliografia: f. 82-96.

1. Bovino leiteiro – Nutrição. 2. Forragem. 3. Alimentação – Veterinária. I. Duarte, Eduardo Robson. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 636.244

PATRÍCIA NATALICIA MENDES DE ALMEIDA

POPULAÇÃO MICROBIANA RUMINAL E ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE
FUNGOS PROVENIENTES DE BOVINOS LEITEIROS ALIMENTADOS
COM DIFERENTES FORRAGENS

Aprovada em 18 de dezembro de 2009.



Prof. Iran Borges
(EV/UFMG)



Prof. Diogo Gonzaga Jayme
(IFET - Triângulo)



Prof.^a Luciana Castro Geraseev
(Co-orientadora – ICA/UFMG)



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

Montes Claros
2009

Dedico
Ao meu Senhor DEUS, força soberana
que guia a tudo e se mostra, poderosa e
silenciosamente, ao nosso redor.

À Nossa Senhora Aparecida, minha Mãe,
meu amparo, meu refúgio e minha força,
voltando os seus olhos para mim e me
cobrindo de graças quando eu menos
esperava. Ave, Maria!

Aos meus pais, exemplo de luta,
honestidade, sabedoria e harmonia, que,
muitas vezes, renunciaram aos seus
sonhos em prol dos meus. Sem vocês,
este passo, assim como muitos outros,
nunca seria dado. Eu amo muito vocês!

Ao Ildeu, pela presença amiga, carinhosa
e incentivadora, mostrando-me que
sempre é possível irmos além.

Aos meus amados filhos: Ana Carolina,
Elias e Sara, motivo maior de todas as
batalhas travadas desde o início da minha
vida, embora só viesse saber disso mais
tarde.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que me permitiu realizar este trabalho, suprimindo as minhas necessidades e as de minha família. Minha eterna gratidão por eu poder ter participado como um pequeno instrumento nesta Sua obra maravilhosa.

Ao meu orientador, Prof. Eduardo Robson Duarte, um verdadeiro mestre a ser seguido e que sempre me emociona. Em sua humildade, mostra toda a sabedoria que guarda no coração. O senhor melhorou-me como uma profissional, mas também me transformou em uma pessoa melhor, capaz de perceber a grandeza do doar-se sem abdicar do que há de mais importante: a nossa família. Obrigada por sua paciência e por sua imensa compreensão. Obrigada por seu zelo, sua dedicação, seu esforço, seu despojamento e por sua orientação tão bem conduzida, dividindo, generosamente comigo, os seus amplos conhecimentos.

À minha coorientadora, Prof.^a Luciana Castro Geraseev, por seus ensinamentos bem dirigidos, sua colaboração inigualável, especialmente nas análises estatísticas e por suas fantásticas sugestões na área da nutrição de ruminantes.

Agradecimentos especiais à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro sob a forma de bolsas e financiamento do projeto dessa pesquisa. Sem tal apoio seria impossível a realização desse experimento científico.

Agradeço a todos que, com ações ou palavras, contribuíram na execução de todas as etapas deste trabalho, mas que não foram citados nominalmente.

Em especial, agradeço imensamente: aos meus pais, Maria do Carmo e José Quirino, pela dedicação impossível de descrever. Especialmente à minha

mãe, por ajudar a cuidar de meus pequenos filhos para que eu pudesse me dedicar aos estudos, abrindo mão de suas férias, finais de semana e sossego.

Ao meu marido, Ildeu, as horas insones para ajudar em minhas tarefas, por seu apoio e abdicção.

Aos meus pequenos amores, Ana Carolina, Elias e Sara, sopros de alegria em meio a tantas turbulências. Com suas espertas ideias, abraços apertados e beijos lambuzados, implantaram, em minha vida, uma alegria e uma força que eu jamais conheceria sem vocês.

Ao meu irmão, Pedro, e a sua querida esposa, Janice, o grande incentivo e os conselhos, mesmo que via telefone.

À Bina, a intrépida babá dos meus filhos e companheira de todos os dias, o valeroso auxílio e a disposição em entreter os meus pequenos. Obrigada por se dedicar tanto e me permitir trabalhar tranquila, sabendo que os meus filhos não poderiam estar em melhor companhia.

Aos meus esforçados estagiários:

Flávia Oliveira Abrão, amiga brava e divertida, de competência ímpar, com quem aprendi muito.

Cláudio Eduardo Silva Freitas, esse jovem e responsável pesquisador, que me ensinou a ver alegria onde Deus tocou os dedos.

Kellerson Luiz da Silva, por sua alegre participação ao longo de todo este projeto.

E, ainda, aos estagiários que apareceram mais tarde: Lucélia Karoline, Gercino Ferreira Virginio Júnior, Maria Luiza França, Ana Carolina Nigri,

Caroline Lanza, Izabela Karoline, Edvaldo Alves, Sérgio Gomes, Fabiana Paiva e Danilo Quinto. E aos amigos Carlos Stefesson e Maria Rosely.

Aos colegas do mestrado: Verônica Mota, Fabiano Prates, Janaína Ribeiro, Aline Luciane, Franciellen Moraes, Otávio, Vanessa e todos os outros, as palavras de incentivo e os momentos de descontração, que tornaram o fardo mais leve.

Ao colega e funcionário do ICA/UFMG, Janderson Tolentino, a inestimável ajuda nas coletas e na disponibilidade dos dados sobre a fazenda do ICA.

Aos Senhores Joaquim Souza Eleutério e Alda Maria Eleutério Nogueira, e a seu filho, Afrânio Nogueira Soares Neto, por disponibilizarem os seus animais para esta pesquisa. Obrigada pela confiança.

A todos os professores e funcionários do ICA/UFMG, especialmente aos porteiros do Bloco C, Ricardo, Danilo, Vinício, Júnior e Yuri, que me permitiram trabalhar com segurança durante o dia e por muitas madrugadas; às meninas da Treviservis: Tânia, Alessandra, Daniela e Silvia, que mantêm as salas e laboratórios sempre limpos e organizados, facilitando o nosso trabalho.

À secretária do mestrado, Priscila Gomes, por nos socorrer sempre que precisamos.

Finalmente, gostaria de agradecer imensamente à Prof^a. Anna Christina de Almeida, coordenadora da pós-graduação do ICA/UFMG. Uma verdadeira guerreira, que se dedica de coração aberto ao nosso mestrado, buscando melhorá-lo sempre e imprimindo, em todos nós, a certeza de que também podemos estar em constante evolução. Obrigada pelo bravo exemplo de galhardia.

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.

(Albert Einstein)

RESUMO

Objetivou-se avaliar as características físico-químicas e a microbiota do suco ruminal de vacas e bezerras Holandesas alimentadas com diferentes forragens tropicais no Norte de Minas Gerais. Foram coletadas 30 amostras de fluido ruminal de vacas alimentadas com silagem de sorgo e 32 de vacas alimentadas em pastagem de *Brachiaria brizantha*. Coletaram-se ainda 12 amostras de fluido ruminal de bezerras recebendo silagem de sorgo e 11 de bezerras alimentadas com cana-de-açúcar. Após as coletas, foram realizados exames diretos em lâminas coradas pelo método de Gram, e exames micológicos após clarificação com KOH. Os cultivos para detecção de microrganismos aeróbios foram realizados nos meios ágar *Sabouraud*, ágar *MacConkey* e meio C contendo celulose microcristalina a 1%. Fez-se identificação de gêneros de Enterobacteriaceae e das espécies de leveduras, considerando as suas características micromorfológicas e físico-químicas. Para as leveduras, essa identificação foi confirmada com base na análise de sequências do DNA ribossomal. Os isolados de fungos micelianos foram identificados após a técnica de microcultivo e a visualização das características micromorfológicas e reprodutivas, sob a luz da microscopia ótica. A atividade celulolítica desses fungos foi avaliada após o crescimento de colônias isoladas e a mensuração do halo de degradação de celulose no meio C. Os dados obtidos a partir do exame micológico direto indicaram a presença de estruturas fúngicas em 100% das amostras de vacas alimentadas em *B. brizantha*. Entretanto, essa taxa de positividade foi significativamente menor para as vacas alimentadas com silagem de sorgo (33%). As populações de Enterobacteriaceae e de leveduras no líquido ruminal de bezerras alimentadas com cana foram significativamente maiores quando comparadas com as dos outros grupos avaliados. Nesses animais, a disponibilidade de carboidrato solúvel proveniente da cana poderia estar favorecendo o crescimento desses grupos microbianos. Entretanto, essas bezerras apresentaram menor concentração de fungos micelianos no líquido ruminal amostrado, que poderiam estar sob interações negativas como a competição e o antagonismo promovidos pelas bactérias e leveduras. Foram identificados 100 isolados de Enterobacteriaceae, demonstrando predominância dos gêneros *Klebsiella* (28%), *Enterobacter* (26,7%) e *Proteus* (21,3%). A maioria dessas bactérias é patogênica para humanos e animais, entretanto elas poderiam consumir o oxigênio ruminal e fermentar carboidratos solúveis no rúmen. Identificaram-se 38 isolados de leveduras, provenientes do rúmen dos animais avaliados. A espécie mais frequente foi *Candida krusei*, que é importante agente de micoses oportunistas em animais e humanos e apresenta resistência intrínseca e adquirida a diferentes drogas antifúngicas. Entre os fungos micelianos obtidos, os gêneros mais frequentes foram: *Aspergillus* (56%), *Rhizopus* (13%), *Trichophyton* (8%), *Paecilomyces* (6,7%) e *Scedosporium* (6%). A atividade celulolítica foi significativamente maior para o gênero *Aspergillus*, indicando o potencial biotecnológico desses microrganismos nas mais diversas áreas de pesquisa, produção animal e industrial. Bezerras alimentadas com cana-de-açúcar apresentaram maiores alterações nas populações desses microrganismos. Futuros estudos devem elucidar essas diferenças quanto às fontes de carboidratos presentes nas forragens tropicais e quanto às categorias dos animais. O papel ecológico ou patogênico desses microrganismos deve também ser considerado, buscando melhor produtividade e saúde dos bovinos.

Palavras-chave: Silagem de sorgo. Cana forrageira. *Brachiaria brizantha*. Microbiologia de rumen. Enterobacteriaceae. Fungos.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the physical and chemical characteristics and microbiota of rumen fluid of Holstein cows and heifers fed with different tropical forages in the North of Minas Gerais. Thirty samples of rumen fluid were collected from cows fed with sorghum silage and 32 from cows fed with *Brachiaria brizantha* pasture. Twelve rumen fluid samples from heifers fed with sorghum silage and eleven from heifers fed with sugar cane were also collected. After the collection, direct exams using stained slides through Gram's method and mycological detection after clearance with KOH were performed. The culture for aerobic microorganism detection was performed in *Sabouraud* agar, *MacConkey* agar and C media containing 1% microcrystalline cellulose. The Enterobacteriaceae genus and yeast species were identified, considering its micromorphological, physical and chemical characteristics. This identification was confirmed on yeast based on the sequence analysis of ribosomal DNA. The isolates of mycelial fungal were identified using the micro culture technique and visualization of the micromorphological and reproductive characteristics in the optical microscopy. The cellulolytic activity of these fungi was evaluated after the isolated colony growth and measurement of the cellulose degradation halo in the C medium. The obtained data from the direct mycological exam indicated the presence of fungi structure in 100% of the samples from cows fed with *B. brizantha*. However, this positivity tax was significantly lower for cows fed with sorghum silage (33%). The Enterobacteriaceae and yeast populations in the rumen liquid of heifers fed with sugar cane were significantly higher when compared to those from other evaluated groups. In these animals, the soluble carbohydrate from the sugar cane could be enabling the growth of these microbial groups. However, these heifers presented lower concentration of mycelial fungi in the sampled rumen liquid that could be under negative interactions such as competition and antagonism promoted by bacteria and yeasts. One hundred isolates of Enterobacteriaceae were identified, showing the predominance of the genus *Klebsiella* (28%), *Enterobacter* (26,7%) and *Proteus* (21,3%). The majority of these bacteria are pathogenic for humans and animals; however, they could consume the rumen oxygen and ferment soluble carbohydrates in the rumen. Thirty eight yeast isolates from the evaluated animal rumen were identified and the most frequent species was *Candida krusei*, which is an important agent of opportunistic mycosis in animals and humans and presents intrinsic and acquired resistance to different antifungal drugs. Among the obtained mycelial fungi, the most frequent genus were *Aspergillus* (56%), *Rhizopus* (13%), *Trichophyton* (8%), *Paecilomyces* (6,7%), and *Scedosporium* (6%). The cellulolytic activity was significantly higher for the genus *Aspergillus*, indicating the biotechnological potential of these microorganisms in several research areas, animal and industrial productions. Heifers fed with sugar cane presented more alterations in these microorganism populations. Future studies should unveil these differences concerning the carbohydrate sources present in the tropical forages and in the animal categories. The ecological or pathogenic role of these microorganisms should also be considered aiming better productivity and animal health.

Keywords: Sorghum silage. Sugar cane forage. *Brachiaria brizantha*. Rumen microbiology. Enterobacteriaceae. Fungi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Fotomicrografia de <i>Caecomicces</i> spp., isolado de rúmen de bovino.....	23
FIGURA 2 -	Fotomicrografia de <i>Neocallimastix</i> spp., isolado de rúmen de bovino.....	23
FIGURA 3 -	Ciclo de vida típico de um fungo monocêntrico anaeróbio do rúmen.....	25
FIGURA 4 -	Estrutura fúngica identificada após clarificação em fluido ruminal de bezerra alimentada com silagem de sorgo (microscopia ótica; aumento de 1000 vezes).....	61
FIGURA 5 -	Estrutura fúngica identificada após clarificação em fluido ruminal de bezerra alimentada com cana picada e ureia (microscopia ótica; aumento de 1000 vezes).....	61
FIGURA 6 -	<i>Aspergillus</i> spp. isolado de amostra de fluido ruminal de vaca alimentada com <i>B. brizantha</i> (microscopia ótica; aumento: 40 vezes)	72
GRÁFICO 1 -	Porcentagens de positivities para o cultivo de fungos em amostras do suco ruminal (A) e de fezes (B) provenientes de vacas alimentadas com silagem de sorgo (n=32) ou em pastagem de <i>Brachiaria brizantha</i> (n=30), e de bezerras Holandesas alimentadas com silagem de sorgo (n=12) ou com cana (n=11). Nas legendas: C: meio com 1% de celulose microcristalina como fonte única de carbono; Sb: meio Sabouraud acrescido de cloranfenicol.....	68
QUADRO 1 -	Classificação e morfologia de fungos ruminais isolados de diferentes herbívoros.....	24
QUADRO 2 -	Gêneros de fungos anaeróbios encontrados no rúmen e as suas principais enzimas produzidas.....	30
QUADRO 3 -	Microrganismos identificados em maior prevalência nos diferentes grupos avaliados nesta investigação científica.....	79

LISTA DE TABELAS

1	Degradação de matéria-seca por diferentes espécies de fungos anaeróbios do rúmen.....	28
2	Composição químico-bromatológica da silagem de sorgo (base na matéria seca) e da ração concentrada fornecidas às vacas deste experimento.....	42
3	Composição químico-bromatológica do capim <i>B. brizantha</i> (base na matéria seca) fornecido às vacas.....	43
4	Composição químico-bromatológica da silagem de sorgo e da ração concentrada (base na matéria seca) fornecidas às bezerras deste experimento.....	44
5	Composição químico-bromatológica da cana picada e da ração concentrada (base na matéria seca) fornecidas às bezerras.....	45
6	Análises macroscópicas e físicas do líquido ruminal de bovinos leiteiros alimentados com diferentes tipos de volumosos.....	53
7	Composição químico-bromatológica da silagem de sorgo, do capim <i>B. brizantha</i> , da cana picada e das rações concentradas fornecidas às vacas e bezerras deste experimento.....	55
8	Médias dos valores do potencial hidrogeniônico dos fluidos ruminais de bovinos leiteiros alimentados com diferentes fontes de volumosos.....	57
9	Taxas de positividade de Enterobacteriaceae, provenientes do fluido ruminal dos quatro grupos de animais avaliados neste estudo.....	62
10	Médias totais de Enterobacteriaceae, provenientes do fluido ruminal dos quatro grupos de bovinos avaliados.....	63
11	Distribuição de gêneros de Enterobacteriaceae, provenientes do líquido ruminal de bovinos leiteiros alimentados com diferentes forragens tropicais.....	65
12	Quantificação de fungos micelianos e leveduriformes em amostras de líquido ruminal, provenientes de vacas alimentadas com silagem de sorgo (n=32), vacas alimentadas em pastagem de <i>B. brizantha</i> (n=30), de bezerras Holandesas alimentadas com silagem de sorgo (n=12) ou com cana (n=11).....	69

13	Quantificação dos gêneros fúngicos (n=149) isolados de amostras de fezes e de fluido ruminal dos quatro grupos de animais.....	70
14	Quantificação dos gêneros fúngicos (n=149) isolados de amostras de fluido ruminal para cada grupo experimental.....	71
15	Atividade celulolítica de isolados de <i>Aspergillus</i> spp. provenientes do trato digestório de bovinos leiteiros, alimentados com forragens tropicais, após o cultivo em meio contendo celulose microcristalina (1%) com 24 e 48 h de incubação.....	76
16	Atividade celulolítica média de isolados de diferentes gêneros de fungos provenientes do trato digestório de bovinos leiteiros, alimentados com forragens tropicais, após o cultivo em meio contendo celulose microcristalina a 1% com 24 e 48 h de incubação.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV's -	Ácidos graxos voláteis
CT -	Carboidratos totais
EE -	Extrato etéreo
FDA -	Fibra em detergente ácido
FDN -	Fibra em detergente neutro
FEHAN -	Fazenda Escola Professor Hamilton de Abreu Navarro
ICA/UFMG -	Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais
MM -	Matéria mineral
MS -	Matéria seca
NDT -	Nutrientes digestíveis totais
NH₃ -	Nitrogênio amoniacal
PB -	Proteína bruta
PRAM -	Potencial de redução do azul de metileno
UFC ml⁻¹ -	Unidades formadoras de colônias por ml

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Caracterização geral da microbiota ruminal.....	19
2.1.1	Fungos anaeróbios do rúmen.....	21
2.1.1.1	Classificação.....	22
2.1.1.2	Ciclo de vida de fungos anaeróbios do rúmen.....	25
2.1.1.3	Distribuição dos fungos anaeróbios ao longo do trato digestório dos ruminantes.....	26
2.1.1.4	Papel dos fungos anaeróbios na digestão das fibras vegetais dentro do rúmen.....	27
2.1.2	Interações entre microrganismos do rúmen.....	31
2.1.2.1	Interações entre fungos e protozoários.....	31
2.1.2.2	Interações entre fungos e bactérias.....	32
2.2	Suplementação de fungos em dietas de ruminantes.....	34
3	JUSTIFICATIVA.....	38
4	OBJETIVOS.....	39
4.1	Objetivo geral.....	39
4.2	Objetivos específicos.....	39
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
5.1	Local.....	40
5.2	Caracterização dos animais.....	40
5.3	Tratamentos.....	41
5.4	Análises bromatológicas.....	45
5.5	Procedimentos de coleta.....	46

5.6	Características físico-químicas do fluido ruminal.....	47
5.7	Análises microbiológicas do fluido ruminal.....	47
5.7.1	Exames microbiológicos diretos.....	47
5.7.2	Cultivo, quantificação, isolamento e identificação de fungos micelianos e leveduras.....	48
5.7.3	Avaliação da atividade celulolítica de fungos isolados.....	50
5.7.4	Cultivo, quantificação, isolamento e identificação de Enterobacteriaceae.....	51
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
6.1	Características físico-químicas do fluido ruminal.....	52
6.2	Análises microbiológicas do fluido ruminal.....	59
6.2.1	Exame direto para detecção de bactérias e leveduras.....	59
6.2.2	Exame direto para detecção de fungos ruminais.....	60
6.2.3	Cultivo, quantificação, isolamento e identificação de Enterobacteriaceae.....	62
6.2.3.1	Quantificação.....	62
6.2.3.2	Identificação.....	64
6.2.4	Cultivo, quantificação, isolamento e identificação de fungos micelianos e de leveduras.....	67
6.2.4.1	Detecção.....	67
6.2.4.2	Quantificação.....	68
6.2.4.3	Identificação de fungos micelianos.....	70
6.2.4.4	Identificação de fungos leveduriformes.....	74
6.2.4	Avaliação da atividade celulolítica de fungos micelianos.....	75
6.2.5	Considerações gerais sobre a quantificação e a identificação dos microrganismos aeróbios presentes no líquido ruminal dos animais.....	78

7	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

A relação entre humanos e ruminantes perde-se na linha do tempo, sendo tão antiga que não se sabe ao certo quando e como teve início. Acredita-se que os humanos na pré-história, ainda nômades, começaram a domesticar os ruminantes e passaram a explorar o potencial fotossintético de gramíneas para a produção de proteína animal. Essa atividade permitiu o aumento e a manutenção de alimentos de grande valor nutricional, favorecendo a sobrevivência e o estabelecimento das primeiras comunidades primitivas (RUSSEL; RYCHLIK, 2001).

Atualmente, a bovinocultura é responsável pelo abastecimento da maior parte da demanda mundial de proteína animal. A carne e o leite bovinos têm participação significativa na economia nacional, representando cerca de 8,4% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro. O rebanho bovino do Brasil é constituído por, aproximadamente, 208 milhões de cabeças, com uma produção anual de 7,15 milhões de toneladas de carne e 24,5 bilhões de litros de leite. Os níveis médios de produtividade são baixos tanto no estado de Minas Gerais quanto na federação. Entretanto, a demanda potencial é grande, exigindo do setor altas taxas de crescimento a cada ano (FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FAEMG, 2007)¹.

As pastagens tropicais, principalmente de regiões com baixa precipitação pluviométrica, como as encontradas no Norte de Minas Gerais, apresentam-se lignificadas e com menor degradabilidade ao longo de grande parte do ano, limitando o aproveitamento de seus nutrientes. Ainda assim, os ruminantes sobrevivem sob tais condições, graças à notável capacidade de digestão. Essa característica é atribuída ao seu sistema de pré-estômagos, que alberga um complexo ecossistema microbiano. Sendo os alimentos fibrosos a base da alimentação dos ruminantes, esse ecossistema tem importância ímpar, por ser responsável pela degradação da fibra vegetal, digerindo os polímeros da parede celular (STEWART, 1994). Essa interação

¹ <http://www.agricultura.mg.gov.br/pib.pdf>

simbiótica pode suprir os ruminantes quanto aos seus requisitos energéticos, proteicos e vitamínicos, contribuindo para o seu crescimento, produção e reprodução (OLIVEIRA *et al.*, 2007)².

Em diferentes países, em todo o mundo, tem-se caracterizado a microbiota ruminal e registrado a importante participação desses microrganismos na digestão e no equilíbrio do ecossistema ruminal e na saúde dos ruminantes. Entretanto, a literatura científica pouco descreve o isolamento e a identificação desses microrganismos, presentes em animais alimentados com forrageiras tropicais, em regiões semiáridas. Poucos estudos têm avaliado, também, a presença de fungos micelianos aeróbios e leveduras na microbiota ruminal desses animais, o significado clínico e ecológico desses microrganismos no rúmen de animais sadios.

² www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/06_0703.pdf

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização geral da microbiota ruminal

O rúmen pode ser comparado a um quimiostato com um ambiente anaeróbio estrito, temperatura entre 38 e 42° C, favorável ao crescimento de microrganismos mesófilos e pH entre seis e sete. Os ácidos produzidos durante a fermentação são prontamente tamponados pelo bicarbonato e fosfato, presentes na saliva. O ambiente ruminal adequado favorece a pressão da microbiota autóctone sobre os microrganismos do solo, água e alimentos ingeridos a todo instante pelos ruminantes, eliminando possíveis patógenos (RUIZ-LACAZ, 1992).

No interior do rúmen, há uma complexa mistura de fragmentos alimentares, água e microrganismos. A população microbiana ruminal geralmente está distribuída da seguinte forma: bactérias (10^{10} ml⁻¹), protozoários ciliados (10^6 ml⁻¹), fungos anaeróbios (10^6 ml⁻¹), micoplasmas (indeterminado) e bacteriófagos (10^8 ml⁻¹), os quais estabelecem entre si diversas interações positivas ou negativas (KAMRA, 2005; LOPES *et al.*, 2002; RUIZ-LACAZ, 1992).

A população autóctone do rúmen pode sofrer flutuações de acordo com as estações do ano, segundo Martillotti *et al.* (1994). Isto se deve aos níveis de ácidos graxos voláteis (AGV) e de nitrogênio amoniacal (NH₃), disponibilizados no rúmen. Grandes populações de bactérias e fungos têm sido observadas quando altas concentrações de NH₃ e AGV's estão presentes no rúmen. O estabelecimento e a manutenção do equilíbrio dessas populações são dependentes, principalmente, da dieta, da qualidade, da frequência de distribuição do alimento e das interações microbianas que ocorrem dentro do rúmen (DEHORITY, 1998).

Os microrganismos habitantes do rúmen possuem relação de simbiose com o hospedeiro. Ambos atuam sinergicamente para a bioconversão de substâncias indigeríveis como a celulose, a hemicelulose e a amônia, em compostos, como os AGV, aminoácidos, vitaminas e outras substâncias que estimulam o crescimento e a produção de carne, leite e lã (KAMRA, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A microbiota autóctone ruminal foi selecionada e adaptada para sobreviver a determinadas flutuações que podem ocorrer no ambiente ruminal. Microrganismos que não conseguem sobreviver a essas flutuações são eliminados desse sítio (KAMRA, 2005). Para tanto, as principais características desenvolvidas no rúmen são: anaerobiose, alta capacidade fermentativa e elevada pressão osmótica, além de competição saprofítica com a microbiota ruminal. Nesse tipo de competição, os microrganismos digerem as fibras vegetais ingeridas pelo ruminante, aproveitando os seus carboidratos solúveis e insolúveis, liberados pela ação enzimática. Posteriormente, esses microrganismos são carreados junto com a ingesta, pelo trato digestório de seu hospedeiro. O ruminante, então, utiliza proteína microbiana de elevado valor nutricional como fonte de aminoácidos, garantindo a sua sobrevivência (KAMRA, 2005).

O rúmen abriga pelo menos 48 espécies diferentes de bactérias, as quais atuam na degradação da celulose, hemicelulose, amido, proteína e outros componentes das plantas (KAMRA, 2005). Estudos têm demonstrado que apenas *Fibrobacter succionogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* são constantemente encontrados no rúmen e realizam intensa solubilização de celulose e hemicelulose. Uma comprovação dessa atividade pode ser o fato de que *F. succionogenes* tem sido encontrada preferencialmente associada a fibras de celulose (FLINT, 1994).

Os protozoários do rúmen foram os primeiros microrganismos a serem descritos nesse nicho, provavelmente pelo fato de serem facilmente visualizados quando observados no microscópio óptico. Podem representar 2% de peso do conteúdo ruminal, 40% do nitrogênio total e 60% do produto final da fermentação. A princípio, acreditava-se que os protozoários fossem essenciais para o hospedeiro, porém os ruminantes conseguem sobreviver e crescer sem a população de protozoários do rúmen (RUIZ-LACAZ, 1992).

A maioria dos protozoários ruminais é ciliada e pertence às famílias Ophryoscolecidae e Isotrichidae. São classificados como holotríqueos, com uma cobertura de cílios ao seu redor, e entodinomorfos, com apenas algumas regiões ciliadas (LOPES *et al.*, 2002). Protozoários ruminais possuem considerável atividade celulolítica e fermentativa. Animais faunados

apresentam maior ganho de peso e digestibilidade da matéria seca (MS) quando comparados com os defaunados (LOPES *et al.*, 2002; RUIZ-LACAZ, 1992).

Estudos realizados no Brasil demonstraram que bubalinos e bovinos apresentam diferentes concentrações e distribuições dos gêneros de protozoários no conteúdo ruminal quando os animais foram alimentados com diferentes níveis de fibra em detergente neutro (FDN) na dieta. O número total de protozoários foi significativamente maior em bubalinos do que em bovinos (BARBOSA *et al.*, 2003).

Pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de melhorar a digestibilidade de alimentos de baixa qualidade, ricos em ligninocelulose, usando aditivos alimentares microbianos ou químicos. A manipulação da fermentação do rúmen, seja pelo incremento no número de microrganismos ligninocelulolíticos, seja pelo aumento da atividade desses microrganismos, é considerada como uma das melhores alternativas para alcançar esse objetivo. Dentre os microrganismos ruminais, os fungos anaeróbios são considerados promissores, porque produzem enzimas com elevadas atividades celulolítica e ligninocelulolítica (PAUL *et al.*, 2004).

2.1.1 Fungos anaeróbios do rúmen

Os fungos anaeróbios estritos do rúmen podem representar 8% da biomassa microbiana nos animais que recebem dieta rica em fibras (AKIN, 1987). Esses fungos foram inicialmente detectados no conteúdo ruminal de ovelhas que receberam dietas pobres em material fibroso (BAUCHOP, 1979).

Em estudo preliminar, realizado na região norte do estado de Minas Gérias, foram avaliados líquidos ruminais de novilhos mestiços Nelore, criados em *Brachiaria decumbens* e pastagem natural. Após a clarificação das amostras, os exames indicaram uma maior frequência de fungos anaeróbios monocêntricos que de policêntricos (ABRÃO *et al.*, 2008).

2.1.1.1 Classificação

Embora o conhecimento sobre a taxonomia dos fungos anaeróbios seja comparativamente restrito, sabe-se que são produtores de zoósporos (TRINCI *et al.*, 1994). Recentemente, foi proposta uma nova taxonomia por Hibbett *et al.*, (2007). Atualmente, os fungos anaeróbios do rúmen são assim classificados:

Domínio: Eukariota – eucariotos.

Reino: Fungi.

Filo: Neocallimastigomycota.

Classe: Neocallimastigomycetes.

Ordem: Neocallimastigales.

Família: Neocallimastigacea.

Gêneros: *Piromyces*, *Caecomyces*, *Neocallimastix*,
Anaeromyces e *Orpinomyces*.

Até o momento, são conhecidas 16 espécies nos cinco gêneros de fungos anaeróbios do rúmen. Essas espécies podem ser diferenciadas pela morfologia do micélio, que pode ser monocêntrico, policêntrico ou filamentosso/bulboso (FIG. 1 e 2) e pelo número de flagelos por zoósporo (uniflagelados ou poliflagelados), visualizados por meio de microscópio ótico (HO; BARR, 1995).

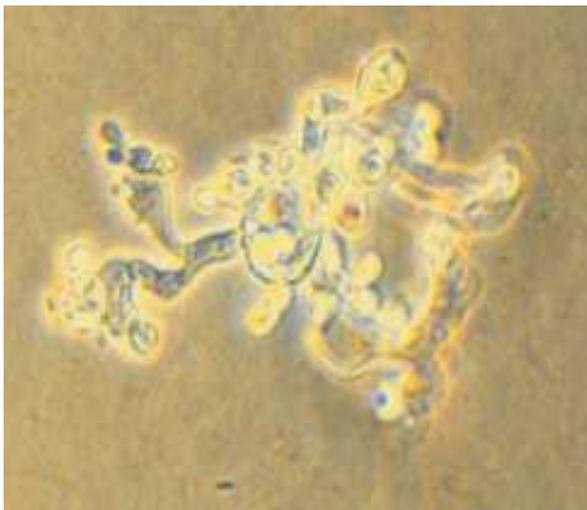


FIGURA 1 – Fotomicrografia de *Caecomices* spp.,
isolado de rúmen de bovino
Fonte: BALL STATE UNIVERSITY, (2009)³.

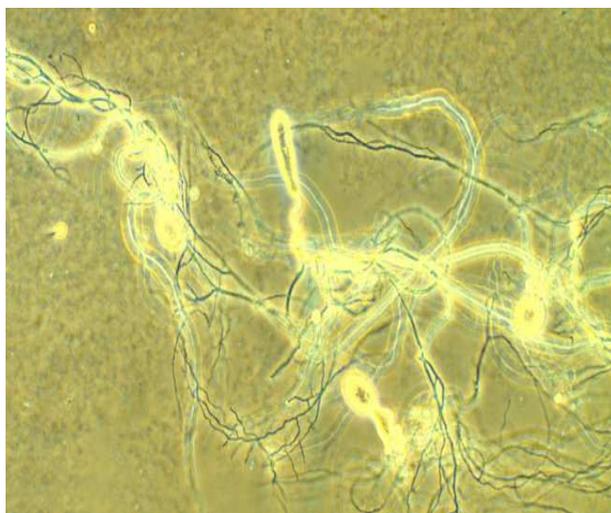


FIGURA 2 – Fotomicrografia de *Neocallimastix* spp.,
isolado de rúmen de bovino
Fonte: BALL STATE UNIVERSITY, (2009)⁴.

No QUADRO 1 estão descritas a classificação e a caracterização morfológica dos cinco gêneros de fungos anaeróbios do rúmen.

³<http://www.bsu.edu/classes/ruch/msa/wubah/10-10.jpg>

QUADRO 1

Classificação e morfologia de fungos ruminais
isolados de diferentes herbívoros

Gêneros / Características morfológicas	Espécies	Hospedeiros
<i>Caecomyces</i>	<i>C. communis</i>	Ovinos
Monocêntricos ou policêntricos, zoósporos uniflagelados, rizomicélio pouco desenvolvido	<i>C. equi</i>	Equinos
	<i>C. sympodialis</i>	Bovinos
<i>Piromyces</i>	<i>P. communis</i>	Ovinos
Monocêntricos, zoósporos uniflagelados, rizomicélio filamentosos	<i>P. dumbonica</i>	Paquidermes
	<i>P. mae</i>	Equinos
	<i>P. minutis</i>	Cervídeos
	<i>P. rhizinflata</i>	Asininos do Saara
	<i>P. spiralis</i>	Caprinos
<i>Neocallimastix</i>	<i>N. frontalis</i>	Ovinos
Monocêntricos, zoósporos poliflagelados, rizomicélios filamentosos e desenvolvidos	<i>N. patriciarum</i>	Ovinos
	<i>N. hurleyensis</i>	Ovinos
	<i>N. variabilis</i>	Bovinos
<i>Anaeromyces</i>	<i>A. elegans</i>	Bovinos
Policêntricos, zoósporos uniflagelados, rizomicélio filamentosos	<i>A. mucronatus</i>	Ovinos
<i>Orpinomyces</i>	<i>O. joyonii</i>	Ovinos
Policêntricos, zoósporos poliflagelados, rizomicélio filamentosos		

Fonte: adaptado de KAMRA, 2005; OZKOSE *et al.*, 2001; TRINCI *et al.*, 1994, CHEN *et al.*, 2007.

Técnicas mais recentes utilizam análises das sequências ribossomais dos fragmentos ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal dos fungos ruminais. Essas técnicas permitem rápida e acurada identificação, possibilitando estudos promissores relacionados à ecologia desses microrganismos (BROOKMAN *et al.*, 2000; TUCKWELL *et al.*, 2005).

2.1.1.2 Ciclo de vida de fungos anaeróbios do rúmen

Fungos anaeróbios do rúmen alternam entre um estágio móvel, em forma de zoósporos flagelados encontrados livremente na fase líquida da digesta e um estágio fixo, vegetativo, reprodutivo e saprofítico que está presente em fragmentos da digesta no trato digestório do animal (ORPIN, 1994). A FIG. 3 ilustra o resumo do ciclo de vida desses microrganismos.

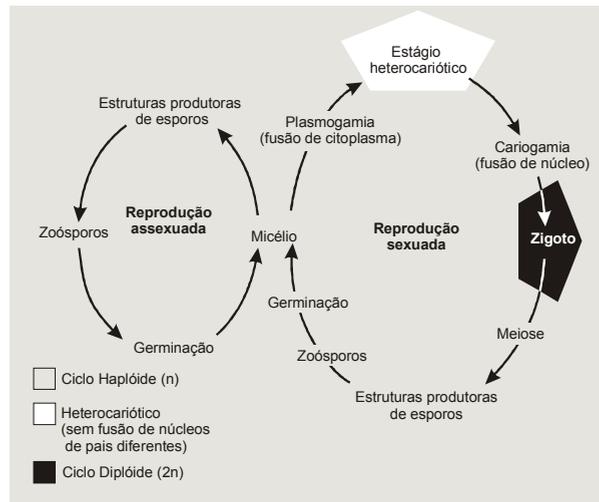


FIGURA 3 - Ciclo de vida típico de um fungo monocêntrico anaeróbio do rúmen
Fonte: adaptado de VELEZ, 2008⁴.

Os zoósporos são capazes de assumir uma forma ameboide, com quimiotaxia positiva para os fragmentos de digesta (ORPIN, 1994). Dependendo do gênero do fungo, o zoósporo pode ter apenas um flagelo ou um grupo de até 30 flagelos com movimentos sincronizados (GORDON; PHILLIPS, 1998).

Davies *et al.* (1993) relatam a hipótese de que o ciclo de vida desses fungos apresente um terceiro estágio, caracterizado pela sobrevivência e tolerância ao oxigênio com cistos ou zoosporângios de resistência. Gordon e

⁴www.academic.uprm.edu/~jvelezg/Hongos.ppt

Phillips (1998) exaltam a importância do estudo dessa fase, pois as estruturas de resistência sobrevivem por longos períodos de dessecação e exposição a oxigênio, situações sob as quais os fungos ruminais, em seus outros estágios de vida, não sobreviveriam.

Quando fungos anaeróbios do rúmen são cultivados *in vitro*, o seu ciclo de vida varia entre 24 e 32h, embora a zoosporogênese ocorra mais rapidamente, em torno de oito horas após a germinação. Não se conhece exatamente o tempo que esses mesmos fungos levariam para crescer em ambiente ruminal. É sugerido que um fungo típico possa apresentar tempo de ciclo de crescimento semelhante ao tempo médio de retenção das partículas de ingesta no rúmen (GORDON; PHILLIPS, 1998).

2.1.1.3 Distribuição dos fungos anaeróbios ao longo do trato digestório dos ruminantes

A maioria das espécies de fungos anaeróbios do rúmen é cosmopolita, sendo isolada tanto de herbívoros pré-fermentadores (ruminantes) quanto de pós-fermentadores (monogástricos) (GORDON; PHILLIPS, 1998; ORPIN, 1994; TRINCI *et al.*, 1994). Esses microrganismos foram isolados na saliva dos ruminantes e podem sobreviver nesse sítio por até oito horas a 39°C. Podem ser dispersos entre os animais por aerossóis provenientes da saliva contaminada, por zoósporos presentes em fezes secas e em partículas restantes da digestão (TRINCI *et al.*, 1994).

Estruturas fúngicas podem ser observadas em todas as partes do trato digestório dos ruminantes, desde as secreções salivares até as porções finais, o que sugere a existência de estágios de resistência no ciclo de vida desses microrganismos. De acordo com Trinci *et al.* (1994), estima-se que haja $7,6 \times 10^8$ UFC g⁻¹ de conteúdo, no rúmen/retículo, $7,6 \times 10^7$, no omaso, $2,5 \times 10^6$, no intestino delgado e, no intestino grosso, estima-se que existam $6,7 \times 10^6$ UFC g⁻¹ de conteúdo intestinal. Nas fezes secas, é possível encontrar cerca de $4,2 \times 10^4$ UFC g⁻¹ de material examinado. Gordon e Phillips (1998) sugerem que amostras de mesmas espécies de fungos apresentam diferenças na sua estrutura quando coletadas de diferentes partes do trato digestório.

A transferência desses fungos, bem como de outros microrganismos, entre animais pode ocorrer com a aquisição inicial de uma população seguida por adição ou sua substituição ao longo da vida do ruminante (GORDON; PHILLIPS, 1998). As fezes podem servir como rota de transferência dos fungos entre os herbívoros. Apesar dos ruminantes não realizarem coprofagia, acidentalmente, a ingestão de fezes frescas ou secas contaminadas com os fungos pode ocorrer. Saliva e alimentos, como o capim, a silagem, o feno e a água contaminados por fungos são fontes importantes de transferência tanto entre animais quanto entre rebanhos (DEHORITY, 2004; TRINCI *et al.*, 1994).

2.1.1.4 Papel dos fungos anaeróbios na digestão das fibras vegetais dentro do rúmen

As células vegetais mais velhas são recobertas por lignina, cutina, taninos e sílica, o que dificulta a adesão e consequente ação dos microrganismos ruminais à parede celular. Por isso, a degradação dessas células é feita preferencialmente de dentro para fora. Os fungos são os únicos microrganismos capazes dessa ação, permitindo que outros microrganismos possam continuar a digestão das proteínas e carboidratos vegetais. Os zoósporos fúngicos se aderem à partícula vegetal e um rizoide simples atravessa a parede celular por lesões em sua superfície ou pelos estômatos. Depois disso, o rizoide se expande, formando vários e longos “braços”, que, por ação de enzimas e por forças mecânicas, quebram a parede celular vegetal, expondo os açúcares solúveis do interior da célula, possibilitando que outros microrganismos ruminais possam se nutrir e finalizar a digestão das fibras (CERDÀ, 2003; CHRISTENSEN, 2004)⁵.

A habilidade em degradar a parede celular vegetal varia de acordo com a espécie e a cepa dos fungos. Cepas pertencentes ao gênero *Caecomyces* geralmente apresentam níveis de atividade celulolítica mais reduzidos quando comparados aos de cepas pertencentes a outros gêneros (FONTY; GOUET, 1994). Gordon e Phillips (1998) relataram relação positiva na

⁵ www.goatbiology.com/animations/funguslc.html

digestibilidade de fibras vegetais, no consumo voluntário e na qualidade da população microbiana ruminal com a presença desses fungos.

A biomassa vegetal ingerida pelos ruminantes consiste basicamente de celulose (280-500g kg⁻¹), hemicelulose (200-300 g kg⁻¹) e lignina (180-300 g kg⁻¹), além da pectina, que contribui com mais de 100 g kg⁻¹ de matéria seca de algumas forragens, sendo a ação enzimática um dos meios de se degradar esses carboidratos (THEODOROU *et al.*, 1996). Tais enzimas são produzidas naturalmente por diversas células vivas para catalisar reações específicas. No caso dos fungos da microbiota ruminal, ocorre grande produção enzimática para degradação de vários polissacarídeos da parede celular vegetal (GORDON; PHILLIPS, 1998; MCALLISTER *et al.*, 2001; XIMENES, 2003). Geralmente, essas enzimas estão presentes na superfície do fungo, concentradas no rizomicélio ou no rizoide, sendo secretadas para o ambiente em quantidades consideráveis (THEODOROU *et al.*, 1996). A comparação da atividade enzimática entre gêneros pode ser observada na TAB. 1.

TABELA 1

Degradação de matéria-seca por diferentes espécies de fungos anaeróbios do rúmen

Culturas de fungos	Porcentagem de redução da matéria seca*	
	4 dias	8 dias
<i>Neocallimastix frontalis</i>	43	78
<i>Pyromices communis</i>	60	82
<i>Orpinomyces joyonii</i>	42	76
<i>Anaeromyces mucronatus</i>	18	60
<i>Caecomyces communis</i>	10	22

Nota: * 100mg de papel filtro incubados inicialmente com as culturas dos fungos
Fonte: FONTY; GOUET, 1994.

Em seus estudos, McAllister *et al.* (2001) observaram que um dos principais fatores que limitam a degradação da parede celular é a insuficiente qualidade ou quantidade de enzimas produzidas pela população microbiana do rúmen. Esse fator pode estar associado às deficiências na interação entre enzimas e substratos e às condições ruminais inadequadas para a atividade

das enzimas.

Um total de 21 diferentes tipos de enzimas hidrolíticas já foi isolado e identificadas em fungos ruminais provenientes de diversas espécies animais (McALLISTER *et al.*, 2001). Dentre elas, as mais importantes são: celulases, hemicelulases, amilases, amiloglicosidases, proteases, feruloil esterases, p-cumaril esterases, xilanases, mananases, pectinases, β -glucanases, β -glucosidases, acetil-xilana esterases, pectinases, exonucleases, avicelases e várias dissacaridases (GORDON; PHILLIPS, 1998; LOWE *et al.*, 1987; MOUNTFORT; ASHER, 1988; PAUL *et al.*, 2004; XIMENES, 2003). No QUADRO 2, estão descritas as enzimas produzidas por cada gênero de fungos anaeróbios encontrados no rúmen.

QUADRO 2

Gêneros de fungos anaeróbios encontrados no rúmen e
as suas principais enzimas produzidas

Gênero do fungo	Enzimas produzidas	Referência
<i>Neocallimastix</i> spp.	Amilase	Schmidt <i>et al.</i> (2004)
	Avicelase	Ekinci <i>et al.</i> (2006)
	Carboximetilcelulase	Atanasova-Pancevska (2008)
	Celulase	Schmidt <i>et al.</i> (2004)
	Endoglucanase	Srinivasan (2001)
	Endoxilanase	Mesta <i>et al.</i> (2003)
	Esterases	Dalrymple <i>et al.</i> (1997)
	Fe-hidrogenase	Voncken <i>et al.</i> (2002)
	Feruloil e acetil esterase	Yue <i>et al.</i> (2009)
	Hemicelulase	Fanutti <i>et al.</i> (1995)
	Pectina-liase	Kopečný; Hodrová, (1995)
	Piruvato-formato-liase	Boxma <i>et al.</i> (2004)
	Poligalacturonase	Kopečný; Hodrová (1995)
	Succinil-coA sintetase	Dacks <i>et al.</i> (2006)
Xilanase	Ekinci <i>et al.</i> (2006)	
β -glucosidase	Schmidt <i>et al.</i> (2004)	
<i>Piromyces</i> spp.	Avicelase	Atanasova-Pancevska (2008)
	Carboximetilcelulase	Atanasova-Pancevska (2008)
	Celobiohidrolases	Harhangi <i>et al.</i> (2003)
	Endoglucanase e beta-glucosidase	Dijkerman <i>et al.</i> (1996)
	Glicosil-hidrolases	Liu <i>et al.</i> (2001)
	Glutamato-dehidrogenase ligada a NADP (NADP-GDH) e glutamina sintetase (GS)	Dijkerman <i>et al.</i> (1997)
	Hemicelulase	Charnock <i>et al.</i> (2002)
	Malato dehidrogenase, aconitase e acetohidroxiacido redutoisomerase	Akhmanova <i>et al.</i> (1998)
	Manase	Fanutti <i>et al.</i> (1995)
	Piruvato-formato-liase	Boxma <i>et al.</i> (2004)
	Xilanase	Tripathi <i>et al.</i> (2007)
<i>Orpinomyces</i> spp.	Acetil-xilan esterase	Blum <i>et al.</i> (1999)
	Celulases	Chen <i>et al.</i> (2003)
	Endoglucanase	Hodrová <i>et al.</i> (1998)
	Pectina-liase e poligalacturonase	Kopečný; Hodrová (1995)
	β -glucosidase	Li <i>et al.</i> (2004)
Carboximetilcelulase	Tripathi <i>et al.</i> (2007)	
<i>Anaeromyces</i> spp.	Celulase, xilanase, celobiohidrolase, β -xilosidase e β -glucosidase	Fliegerová (2002)
	Carboximetilcelulase	Tripathi <i>et al.</i> (2007)
<i>Caecomyces</i> spp.	Endoglucanase	Hodrová <i>et al.</i> (1998)
	Xilanase e celulase	Gerbi <i>et al.</i> (1996)
	β -D-fucosidase, β -D-xilosidase e β -D-glucosidase	Bata e Gerbi (1997)

2.1.2 Interações entre microrganismos do rúmen

Alguns microrganismos do rúmen dependem de outros para suprir o seu requerimento de nutrientes, enquanto outros antagonizam entre si pela excreção de componentes antimicrobianos (KAMRA, 2005). Dessa forma, inúmeras interações podem ser observadas entre os microrganismos existentes no rúmen, especialmente entre os três grandes grupos, sendo eles as bactérias, os protozoários e os fungos. As interações microbianas são positivas ou negativas, resultando em efeitos benéficos para o hospedeiro com o incremento da digestibilidade e da utilização dos alimentos ingeridos (DEHORITY, 1998).

As associações entre os microrganismos ruminais podem ser de mutualismo, quando ambos se beneficiam; de comensalismo, quando um se beneficia, mas não há efeitos negativos nem positivos sobre o outro; ou de parasitismo, quando um se beneficia em detrimento do outro (DEHORITY, 2004). No caso dos fungos, essas interações dependem do local de ocupação dentro do ambiente ruminal. Os fungos anaeróbios, na forma vegetativa, têm maior afinidade pela fase de digesta fragmentada, sólida; enquanto os zoósporos, em seu estágio de vida livre, são mais frequentes na fase líquida. Portanto, é esperado que os zoósporos interajam com microrganismos presentes na porção fluida da digesta ruminal, e fungos, em estágio vegetativo, com os microrganismos abundantes na fase sólida (GORDON; PHILLIPS, 1998).

2.1.2.1 Interações entre fungos e protozoários

A interação com protozoários ocorre, predominantemente, na fase fluida da digesta e na superfície das partículas de plantas. As evidências apontam para uma relação de predação dos fungos pelos protozoários, uma vez que tem-se observado aumentos significativos na concentração de fungos e/ou zoósporos em animais defaunados (DEHORITY, 1998; GORDON; PHILLIPS, 1998). Por outro lado, tem sido relatado que a ausência de protozoários no rúmen diminui pela metade o *turnover* de

proteína fúngica, apesar da população ter aumentado o seu tamanho em duas vezes. Observou-se que essa variação no número de fungos foi resultado tanto da predação por protozoários quanto pela competição por substratos (NEWBOLD; HILLMAN, 1990).

Os efeitos da interação entre protozoários e fungos são melhor avaliados quando esses microrganismos são cultivados em co-culturas. Geralmente, a presença de protozoários inibe o nível de atividade celulolítica nas culturas, embora tenha sido demonstrado que a degradação de matéria seca não é influenciada (FONTY; JOBLIN, 1991). Também, em co-culturas de fungos e protozoários, foi relatado um aumento efetivo na quantidade de celulose por unidade de biomassa de fungo, apesar da diminuição da população fúngica devido à predação por protozoários. Os efeitos negativos da atividade predatória no crescimento dos fungos e, conseqüentemente, na quantidade de celulose degradada por esses fungos, foi parcialmente atenuada pela atividade fibrolítica dos protozoários ou por um aumento na atividade fúngica devido ao meio mais favorável (MORGAVI *et al.*, 1994).

As evidências da predação de fungos por protozoários podem ser comprovadas por fotomicrografias eletrônicas de varredura, mostrando protozoários ingerindo rizoides e esporângios fúngicos e pela redução do *turnover* de proteínas fúngicas em fermentações *in vitro* de fluido ruminal de ovinos defaunados (DEHORITY, 1998).

2.1.2.2 Interações entre fungos e bactérias

No caso de interações entre fungos e bactérias, alguns desses microrganismos competem pelos mesmos nichos na superfície das partículas de alimento e, para isso, cada um deles utiliza mecanismos próprios para sobressair. No caso de bactérias fibrolíticas, a interação com fungos promove incremento na atividade quando se compara à atividade isolada da bactéria ou do fungo (GORDON; PHILLIPS, 1998). Alguns fungos estão envolvidos na nutrição cruzada com as bactérias, disponibilizando açúcares como resultado de seu metabolismo. Por outro lado, os fungos necessitam das bactérias para suprir as suas necessidades de vitaminas do complexo B, aminoácidos e

outros substratos (WILLIAMS, 1994).

A digestibilidade da celulose em papel filtro aumenta consideravelmente em co-culturas de fungos e bactérias metanogênicas (DEHORITY; TIRABASSO, 2000). Efeitos similares foram observados na utilização de hemicelulose nos cultivos mistos desses dois grupos de microrganismos. Essa melhor digestibilidade foi atribuída à remoção de metabólitos que inibiriam o crescimento do fungo. Apesar desses resultados, a degradação *in vivo* desses polissacarídeos no tecido vegetal intacto foi consideravelmente menor. Isso poderia ser justificado pelo acesso restrito desses microrganismos ao substrato (WILLIAMS, 1994). Para Dehority (1998), a extensão do incremento na digestibilidade da parede celular em co-culturas está intimamente relacionada ao tipo de cepas dos fungos e às espécies das bactérias metanogênicas cultivadas.

Os primeiros estudos relataram que qualquer bactéria presente no fluido ruminal poderia inibir o crescimento e a atividade dos fungos (LOWE *et al.*, 1987). Entretanto pesquisas mais recentes comprovaram que somente algumas espécies de bactérias têm essa capacidade, como, por exemplo, *Ruminococcus* spp., que inibem a digestão de celulose pelos fungos (DEHORITY, 1998). Experimentos realizados por Fondevila e Dehority (1996) comprovaram que o crescimento de determinados fungos só ocorre se houver inibição do desenvolvimento de bactérias quando ambos estão em co-cultura.

As bactérias podem atuar sinergicamente com fungos, melhorando a degradação da parede celular vegetal lignificada. Desse modo, além da ação de suas enzimas celulolíticas, os fungos podem romper mecanicamente, por força de seus rizoides, as estruturas rígidas da parede celular, expondo polissacarídeos estruturais para que as bactérias possam digeri-los. Somente os fungos têm essa capacidade, por isso são essenciais na digestão de alimentos com elevados teores de lignina e celulose. Algumas bactérias também podem atuar na degradação de tecidos vegetais íntegros, entretanto as suas células devem apresentar paredes celulares menos lignificadas (DEHORITY, 1998).

2.2 Suplementação de fungos em dietas de ruminantes

A síntese de proteína microbiana no rúmen, tanto de microrganismos exógenos quanto indígenas, depende da eficiência microbiana, que é representada pela produção de células microbianas sintetizadas por unidade de substrato utilizada (CABRAL *et al.*, 2008). Essa eficiência é afetada por uma série de fatores, tais como o teor e a fonte de N e de carboidratos na dieta, a taxa de diluição ruminal, a frequência de alimentação, o consumo de alimento, a relação volumoso: concentrado, a ensilagem, os aditivos da silagem, os ionóforos e o teor de minerais, como P, S e Mg (RIBEIRO *et al.*, 2001). Sugere-se ainda que a eficiência microbiana esteja diretamente associada aos teores de NDT (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2001), à energia metabolizável fermentescível (AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC, 1993 *apud* CABRAL *et al.*, 2008), à disponibilidade de carboidratos no rúmen (RUSSELL *et al.*, 1992), à disponibilidade e à sincronização entre energia e os compostos nitrogenados (DIJKSTRA *et al.*, 1998; PIRT, 1965; RUSSELL, 1998; VAN KESSEL; RUSSELL, 1996).

Em regiões de clima tropical, onde a base da alimentação dos ruminantes são as forrageiras tropicais, os carboidratos fibrosos (CF) são a maior fonte de energia no rúmen. Uma vez que as forragens dessas regiões apresentam teores médios ou baixos de proteína, a disponibilidade de $N-NH^3$ no rúmen pode ser o principal fator limitante do crescimento microbiano nesse compartimento (NOLAN; LENG, 1972).

Sumarizando diversos estudos, Goes *et al.* (2005) relatam a utilização de aditivos alimentares, visando à manipulação do ecossistema microbiano ruminal. A adição de substâncias na dieta, como enzimas, ionóforos, antibióticos e aditivos alimentares microbianos, tem melhorado, potencialmente, a performance animal, especialmente esses últimos. Aditivos à base de fungos mostraram importante papel na degradação da fibra, podendo ser considerados facilitadores da degradação, enquanto que leveduras seriam consideradas estimuladoras dessa degradação (GOES *et al.*, 2005). Outros efeitos que podem ser encontrados são: aumento na

ingestão de matéria seca (ERASMUS *et al.*, 1992); aumento na produção de leite em vacas leiteiras (WILLIAMS *et al.*, 1991; ERASMUS *et al.*, 1992; PIVA *et al.*, 1993); aumento das porcentagens de gordura no leite (WOHLT *et al.*, 1991); diminuição da produção de metano (CH₄) (WILLIAMS *et al.*, 1991), além de melhoras no ganho de peso (PIVA *et al.*, 1993) e nas características de carcaça (MIR; MIR, 1994). Todavia, o resultado desses aditivos microbianos na produção de ruminantes é inconsistente e a sua ineficiência é frequentemente observada, uma vez que nem todas as culturas de *Saccharomyces cerevisiae* modificam, efetivamente, a população bacteriana ruminal (NEWBOLD *et al.*, 1995). Um exemplo é que os efeitos da utilização de leveduras são altamente dependentes da dose e da dieta fornecida (WALLACE, 1994).

Culturas microbianas vivas dos fungos exógenos *Aspergillus orizae* e *Sacchariomyces cerevisiae* e os seus respectivos extratos têm sido utilizados como suplementos alimentares na dieta dos animais. Alguns estudos têm demonstrado que aditivos microbianos podem melhorar a produtividade de ruminantes em cerca de 7% a 8% (MARTIN; NISBET, 1992; WALLACE, 1994). Adição de leveduras na dieta de ruminantes tem provocado aumento das proporções molares dos ácidos graxos voláteis (AGV) e pH ruminal (WALLACE, 1994), porém pode resultar também em diminuição do pH (PIVA *et al.*, 1993); em aumento na digestibilidade de nutrientes, especialmente fibras, no número de bactérias ruminais, principalmente as celulolíticas (WALLACE, 1994); em redução das concentrações de NH₃ e alteração do fluxo de nitrogênio (N) (ERASMUS *et al.*, 1992); em aumento no número de protozoários (PLATA *et al.*, 1993) e alteração do fluxo de proteína microbiana para o duodeno (ERASMUS *et al.*, 1992; WALLACE, 1994).

A ação desses microorganismos no ambiente ruminal tem sido frequentemente associada ao aumento da ingestão de matéria seca, sendo proporcionada por uma elevação significativa na taxa de degradação da fibra, especialmente em dietas ricas em concentrado. Há aumento expressivo no número total de bactérias anaeróbias e, entre elas, as celulolíticas e as que utilizam lactato. Observou-se maior estabilidade no ambiente ruminal, redução das variações de pH, de amônia e de ácidos graxos voláteis ao

longo do dia (WALLACE, 1994).

Poucos estudos na literatura avaliaram o efeito da administração de culturas com fungos da microbiota autóctone do rúmen na dieta dos bovinos. Em um desses estudos, a adição de culturas viáveis de *P. communis*, um filtrado de sua cultura ou seu extrato autoclavado aumentou a produção de gás, a digestão da celulose, o número total de bactérias, de bactérias celulolíticas e de fungos anaeróbios. Foi observado também o aumento da atividade das enzimas carboximetil celulase e xilanase, quando comparado com sistemas fermentativos controles não suplementados. A adição de produtos celulares do fungo, presentes nos filtrados e nos extratos autoclavados, demonstrou ser um fator favorecedor do crescimento de culturas mistas de microrganismos ruminais (LEE *et al.*, 2004).

Em conformidade com Góes e Marson (2004), dentre os benefícios atribuídos à inclusão de leveduras e fungos nas dietas de ruminantes, destacam-se: o aumento das proporções dos ácidos graxos voláteis (AGV), do pH ruminal e da digestibilidade de nutrientes, principalmente da fibra; a redução da concentração de NH_3 ; aumento do número de bactérias ruminais, principalmente as celulolíticas; aumento do número de protozoários; alteração do fluxo de N e aumento do fluxo de proteína microbiana para o duodeno. Além desses, citam-se: aumento na ingestão de matérias seca; aumento na produção de leite em vacas leiteiras; aumento da porcentagem de gordura no leite; diminuição da produção de metano; melhoras no ganho de peso e nas características de carcaça. Os resultados, embora numerosos, são controversos. Acredita-se que os efeitos da utilização de leveduras são altamente dependentes da dose e da dieta fornecida. De maneira geral, em todas as pesquisas conduzidas, a adição de leveduras à dieta não produziu nenhum efeito que fosse prejudicial à performance do animal ou à sua eficiência na utilização dos alimentos.

A adição direta de culturas com o fungo *P. communis* no rúmen de ovinos aumentou a digestibilidade de nutrientes e a retenção de nitrogênio, aumentando o número de bactérias e fungos e, conseqüentemente, aumentando a produção de ácidos graxos voláteis. Esse fungo, diferentemente do *Aspergillus oryzae* e da levedura *Saccharomyces*

cerevisiae, é anaeróbio e continua multiplicando no rúmen após a inoculação (LEE *et al.*, 2004).

Os efeitos da administração de um fungo anaeróbio isolado de búfalos selvagens (*Bosephalus tragocamelus*) em búfalos domésticos (*Bubalus bubalis*) na fermentação ruminal e digestão de nutrientes foram avaliados na Índia. Um grupo controle de animais recebeu 200 ml do meio de cultura autoclavado contendo fungos. O grupo tratado recebeu 200 ml de uma cultura viável do fungo anaeróbio *Piromyces* sp. amostra FNG5. Os resultados demonstraram aumento na digestibilidade da matéria seca e de fibras nos animais alimentados com a cultura viva. A administração do isolado fúngico com atividade superior de ligno-celulases aumentou a utilização de nutrientes em búfalos domésticos (PAUL *et al.*, 2004).

3 JUSTIFICATIVA

Em diferentes países tem-se caracterizado a microbiota ruminal e registrado a importante participação desses microrganismos na digestão e no equilíbrio do ecossistema ruminal e na saúde dos ruminantes. Entretanto poucos estudos têm sido realizados em Minas Gerais, identificando e caracterizando os principais microrganismos presentes no rúmen de bovinos criados em condições semiáridas.

A literatura científica brasileira não descreve o isolamento e a identificação de fungos anaeróbios em animais criados em condições extensivas ou sob dietas à base de silagens. Reduzido número de pesquisas têm avaliado, também, a presença de fungos micelianos e leveduras na microbiota ruminal desses animais e o significado clínico e ecológico de tais microrganismos no rúmen de animais sadios.

A habilidade dos microrganismos para degradar polissacarídeos, como a celulose, é uma característica de grande interesse, tanto na microbiologia industrial quanto na ecologia microbiana geral. A determinação do número e do tipo de microrganismos celulolíticos presentes em um complexo sistema, como é o rúmen, entretanto, é uma questão difícil de ser resolvida (TEATHER; WOOD, 1982). Neste estudo, acredita-se que a caracterização da microbiota ruminal de bovinos alimentados com diferentes forrageiras tropicais permitirá a seleção de isolados microbianos com atividade de enzimas celulolíticas, importantes na degradação da parede celular vegetal.

Em futuros estudos, microrganismos com tais características e adaptados às condições tropicais, presentes no semiárido mineiro, poderão ser suplementados como aditivos ou probióticos para bezerros, principalmente após o desmame e para as demais categorias de bovinos. Essa suplementação poderá reduzir o período de adaptação para digestão de diferentes forragens, reduzindo a perda de peso e aumentando a produtividade desses animais.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar a microbiota ruminal e a população de fungos presentes no rúmen de bovinos leiteiros alimentados com diferentes fontes de volumoso.

4.2 Objetivos específicos

I. Analisar as características macroscópicas e físico-químicas como cor, odor, viscosidade, tempos de sedimentação e redução do azul de metileno (PRAM), e pH no líquido ruminal de bovinos leiteiros alimentados com diferentes fontes de volumosos.

II. Comparar as taxas de detecção de fungos anaeróbios em exames diretos do suco ruminal de bovinos leiteiros de diferentes categorias e suplementados com diferentes volumosos.

III. Determinar as características micromorfológicas e tintoriais dos grupos bacterianos presentes no líquido ruminal dos animais avaliados.

IV. Quantificar, isolar e identificar fungos micelianos, leveduras e Enterobacteriaceae no líquido ruminal dos bovinos avaliados nesta investigação.

V. Avaliar a atividade celulolítica dos fungos e leveduras mais prevalentes no rúmen dos bovinos amostrados.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local

As coletas de fluido ruminal foram realizadas na Fazenda Experimental Professor Hamilton de Abreu Navarro - FEHAN, do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG e em uma propriedade particular. A seleção dessa propriedade levou em consideração a semelhança dos animais e do sistema de criação adotados quando comparados aos da FEHAN. Além disso, a propriedade localiza-se próxima à sede do município de Montes Claros, onde se encontra o campus do ICA e a FEHAN, fato este desejável para que houvesse a maior homogeneidade possível das condições, principalmente climáticas, às quais todos os animais estavam submetidos.

O município de Montes Claros está inserido no norte do estado de Minas Gerais, dentro da região conhecida como “Polígono da Seca”. As coordenadas geográficas da sede do município correspondem a 16°50’52” de latitude sul, 43°55’29” de longitude oeste e encontra-se a 646 m de altitude. O clima, segundo classificação de Köppen-Geiger, é do tipo Aw, considerado tropical de savana, com longo período seco e período chuvoso no verão. A temperatura média durante o período no qual se realizou este experimento (novembro de 2008 a agosto de 2009) foi de 22,9°C e a pluviosidade foi de 960,0 mm, de acordo com o 5º Distrito do Instituto Nacional de Meteorologia, Montes Claros/MG.

5.2 Caracterização dos animais

Foram coletadas amostras de conteúdo ruminal de vacas de aptidão leiteira, adultas e com grau de sangue predominantemente da raça Holandesa (3/4 a puro por cruzas). Esse tipo de animal foi escolhido levando-se em conta que, em grande parte das propriedades rurais da região norte mineira dedicadas à produção leiteira, encontram-se animais similares aos utilizados para esta pesquisa.

As vacas apresentavam em média 5,91 anos de idade e 546 kg de peso. Os animais alimentados com silagem de sorgo estavam em lactação e com produção média diária de 15 kg de leite em duas ordenhas. Já as vacas em pastejo não estavam em lactação.

As bezerras utilizadas neste estudo eram da raça Holandesa e à época das coletas apresentavam idade média de 12,9 meses e peso médio de 196,8 kg, sendo que todas estavam semiconfinadas, recebendo suplementação volumosa em cocho de alvenaria.

5.3 Tratamentos

Nesta pesquisa, foram avaliados quatro tratamentos, em delineamento inteiramente casualizado, considerando-se a utilização de diferentes volumosos por diferentes categorias de animais.

Tratamento 1: vacas alimentadas com silagem de sorgo

Foram coletadas amostras de 30 vacas alimentadas com silagem de sorgo, sendo a primeira coleta, de 14 animais, no dia 20 de novembro de 2008 e a segunda, de 16 animais, no dia seis de junho de 2009, ambas na fazenda do ICA/UFMG – Montes Claros. Esses animais receberam diariamente, em média, 35 kg de silagem de sorgo por animal como única fonte de volumoso, além de 5 kg animal⁻¹ de concentrado. Esse concentrado possuía 70% de grãos moídos de milho, 25% de grãos moídos de soja, 3% de premix mineral (Tolentino 160[®]) e 2% de ureia. As composições bromatológicas da silagem de sorgo e do concentrado estão descritas na TAB. 2. Os animais tinham ainda, à disposição em cocho de alvenaria para consumo *ad libitum*, uma mistura de premix mineral (Tolentino 160[®]) e sal comum na proporção de 1:1.

TABELA 2

Composição químico-bromatológica da silagem de sorgo (base na matéria seca) e da ração concentrada fornecidas às vacas deste experimento

Parâmetros	Silagem de sorgo	Concentrado vacas
MS	31,04%	85,36%
FDN	46,28%	10,56%
FDA	38,21%	8,02%
PB	5,45%	18,65%
EE	2,93%	5,15%
MM	7,44%	8,27%
CT	84,18%	67,58%
CNF	37,90%	57,02%

Nota: MS: matéria seca; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; CT: carboidratos totais; CNF: carboidratos não-fibrosos.

$CT = 100 - (PB + EE + MM)$

$CNF = CT - FDN$

(VAN SOEST, 1991).

Tratamento 2: vacas alimentadas em pastagem de *Brachiaria brizantha*

O segundo grupo de vacas foi alimentado exclusivamente em pastagem de *Brachiaria brizantha*. Os resultados da análise bromatológica de amostras desse capim encontram-se na TAB. 3. Os animais recebiam também à vontade a mesma mistura de premix mineral e sal comum que os do tratamento anterior. As coletas de 30 animais foram realizadas entre os dias 11 de fevereiro e nove de março de 2009. Seis desses animais eram procedentes de uma propriedade rural de Montes Claros e 24 eram integrantes do rebanho bovino do ICA/UFMG – Montes Claros.

TABELA 3

Composição químico-bromatológica do capim *B. brizantha* (base na matéria seca) fornecido às vacas

Parâmetros	<i>B. brizantha</i>
MS	32,76%
FDN	37,49%
FDA	31,18%
PB	6,02%
EE	2,02%
MM	6,61%
CT	85,35%
CNF	47,86%

Nota: MS: matéria seca; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; CT: carboidratos totais; CNF: carboidratos não-fibrosos.

$CT = 100 - (PB + EE + MM)$

$CNF = CT - FDN$

(VAN SOEST, 1991).

Tratamento 3: bezerras alimentadas com silagem de sorgo

Após o período de 60 dias consumindo silagem de sorgo, 12 bezerras foram submetidas à coleta de fluido ruminal no dia 30 de junho de 2009. Esses animais consumiam em média $15 \text{ kg animal}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ da mesma silagem de sorgo fornecida às vacas e dois $\text{kg animal}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de concentrado (TAB. 4). Os ingredientes utilizados no preparo desse concentrado foram cachos de sorgo triturados (70%), farelo de soja (25%), ureia (2%) e mistura mineral Tolentino 160[®] (3%). As bezerras tinham à sua disposição, para consumo *ad libitum*, uma mistura de mineral (Tolentino 160[®]) com sal pecuário na proporção de 1,5:1, além de serem mantidas em piquete de 3 hectares, plantado com *B. brizantha* acima do ponto ideal de pastejo e apresentando sinais de degradação.

TABELA 4

Composição químico-bromatológica da silagem de sorgo e da ração concentrada (base na matéria seca) fornecidas às bezerras deste experimento

Parâmetros	Silagem de sorgo	Concentrado bezerras
MS	31,04%	86,50%
FDN	46,28%	18,12%
FDA	38,21%	13,86%
PB	5,45%	11,61%
EE	2,93%	4,71%
MM	7,44%	4,39%
CT	84,18%	79,29%
CNF	37,90%	61,17%

Nota: MS: matéria seca; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; CT: carboidratos totais; CNF: carboidratos não-fibrosos.

CT= 100 – (PB + EE + MM)

CNF = CT – FDN

Fonte: VAN SOEST, 1991.

Tratamento 4: bezerras alimentadas com cana de açúcar

As bezerras utilizadas nesse tratamento foram as mesmas que receberam anteriormente a silagem de sorgo. Após a primeira coleta, esses animais foram adaptados à dieta com cana de forrageira picada em um lapso temporal de 43 dias, alcançando o consumo médio desse volumoso de 9,2 kg animal⁻¹ dia⁻¹ (TAB. 5). Antes das alimentações, foram adicionados ureia e sulfato de amônia na proporção de 9:1, ambos diluídos em água.

TABELA 5

Composição químico-bromatológica da cana picada e da ração concentrada (base na matéria seca) fornecidas às bezerras

Parâmetros	Cana picada*	Concentrado bezerras
MS	24,84%	86,50%
FDN	36,68%	18,12%
FDA	30,55%	13,86%
PB	5,16%	11,61%
EE	0,90%	4,71%
MM	7,37%	4,39%
CT	86,57%	79,29%
CNF	49,89%	61,17%

Nota: * cana picada sem adição de ureia e sulfato de amônia.

MS: matéria seca; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; CT: carboidratos totais; CNF: carboidratos não-fibrosos.

CT= 100 – (PB + EE + MM)

CNF = CT – FDN

Fonte: VAN SOEST, 1991.

A quantidade da mistura de ureia e sulfato fornecida foi de 40 g para cada 100 kg de peso corporal dos animais. Foram disponibilizados ainda a mistura de sal mineral com sal comum e o mesmo concentrado fornecido anteriormente a esses animais nas mesmas quantidades fornecidas anteriormente.

Em todos os tratamentos, à exceção dos animais a pasto, os alimentos foram fornecidos duas vezes ao dia, às 8:00 h e às 17:00 h.

5.4 Análises bromatológicas

Para a análise bromatológica, foram coletadas amostras de *B. brizantha* do pasto, no qual os animais eram mantidos. Coletaram-se, também, amostras da silagem de sorgo e da cana picada nos momentos em que eram fornecidas aos animais. Por fim, amostras de ambos os concentrados disponibilizados aos grupos de animais foram recolhidas e levadas ao laboratório para posterior análise. As coletas foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por Silva e Queiroz (2002).

As análises dos alimentos foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do ICA da UFMG em Montes Claros. Os teores de matéria seca (MS), de proteína bruta (PB), de extrato etéreo (EE), de matéria mineral (MM), de fibra em detergente neutro (FDN) e de fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados conforme procedimentos descritos pela *Associations of Official Analytical Chemists - AOAC* (1990), descritas por Silva e Queiroz (2002). Os carboidratos totais (CT) dos alimentos foram calculados de acordo com Sniffen *et al.* (1992), em que $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$. Os teores de carboidratos não fibrosos (CNF) foram obtidos pela diferença entre CT e FDN (VAN SOEST *et al.*, 1991).

5.5 Procedimentos de coleta

Os animais foram imobilizados em brete de contenção, no período da manhã, antes da primeira refeição. Para a coleta do fluido ruminal foram realizadas tricotomia e assepsia, com solução de Iodo-PVPI (1%), em uma área de aproximadamente cinco cm², localizada na parte ventral do abdômen esquerdo, abaixo da fossa paralombar e cranialmente à articulação do joelho (DIRKSEN, 1993).

Foram puncionados aproximadamente 15 ml de fluido ruminal, com o auxílio de cateter humano (Solidor®, 14,2, Bio Med Health Care Products, Haryana - Índia) acoplado a seringas estéreis. Cada seringa foi lacrada, identificada e armazenada em caixa isotérmica com gelo, sendo essa caixa levada ao Laboratório de Microscopia do ICA, para realização das análises.

Foi coletada, ainda, amostra de fezes direto da ampola retal de cada animal, utilizando-se swab estéril, o qual foi acondicionado em sua própria embalagem e colocado em caixa isotérmica com gelo até o momento da inoculação em meio de cultura. É importante ressaltar que todos os procedimentos adotados com os animais foram submetidos e aprovados, antecipadamente, pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, o que ficou registrado no Protocolo 156/2005.

5.6 Características físico-químicas do fluido ruminal

A análise macroscópica do líquido coletado foi realizada imediatamente após a coleta, em um tubo contendo cinco ml do suco amostrado. Foram avaliados: cor, odor, viscosidade e tempo de redução do azul de metileno (PRAM) na concentração 0,03%. O pH do líquido ruminal foi estimado utilizando-se um potenciômetro digital (DIRKSEN, 1993). Adotando-se o delineamento inteiramente casualizado, efetuou-se análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, com significância de 5%.

5.7 Análises microbiológicas do fluido ruminal

5.7.1 Exames microbiológicos diretos

As características micromorfológicas e tintoriais dos grupos bacterianos e das leveduras predominantes no líquido coletado foram observadas após a realização de esfregaços do suco, que foram secos, fixados e corados pelo método de Gram (DIRKSEN, 1993).

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

(CHAUDHRY, 2000).

Os dados obtidos dos quatro tratamentos foram comparados, usando-se o teste do Qui-quadrado (χ^2) com $p < 0,05$.

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

Foi realizado o cultivo para avaliar a positividade de fungos micelianos e leveduras para todos os animais avaliados. Utilizou-se um *swab* estéril para inocular o suco ruminal em placas de petri (90 x 150 mm) contendo meio ágar *Sabouraud* (Acumedia® Manufactures, Lansing, Michigan - EUA), acrescido de cloranfenicol (150 mg l^{-1}). Após inoculação por estriação, as placas foram incubadas invertidas em estufa a 37°C e monitoradas para o crescimento de colônias fúngicas por até 21 dias (LACAZ *et al.*, 2002). Esse mesmo procedimento foi adotado com as amostras de fezes.

Diluições decimais do líquido ruminal foram preparadas em tubos contendo nove ml de solução salina estéril. Após cada diluição, os tubos foram homogeneizados em vórtex durante um minuto e alíquotas de 100 μl das diluições 10^{-2} e 10^{-4} foram inoculadas em placas estéreis contendo o meio de cultura *Sabouraud*. Os inóculos foram espalhados de forma homogênea com alças de Drigalski estéreis, as placas foram incubadas invertidas em estufa BOD de ventilação forçada a 39°C e monitoradas para o crescimento de colônias fúngicas por até 21 dias (KURTZMAN; FELL, c1998; LACAZ *et al.*, 2002).

Para a identificação dos fungos micelianos obtidos, foi realizado microcultivo de todos os isolados provenientes das amostras coletadas. As características micromorfológicas, evidenciadas ao microscópio óptico, foram associadas àquelas descritas para fungos de interesse biotecnológico e médico-veterinário (LACAZ *et al.*, 2002). As leveduras foram identificadas por meio de avaliação das características fisiológicas, bioquímicas e micromorfológicas, considerando-se as chaves taxonômicas descritas por Kurtzman e Fell (c1998).

Foram identificados 38 isolados leveduriformes provenientes das amostras de fluido ruminal das vacas e das bezerras alimentadas com

silagem de sorgo. As cepas foram previamente coradas pela técnica de Gram e observadas ao microscópio óptico para determinação de suas características micromorfológicas. Em seguida, selecionaram-se 66 dessas cepas, tomando-se o cuidado de escolher amostras de todos animais dos grupos avaliados.

As amostras selecionadas foram enviadas para o Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Campus Pampulha, para identificação pela técnica de sequenciamento do DNAr. Essa técnica consiste em ampliar os domínios D1 e D2 da maior subunidade do DNAr pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e, em seguida, as análises prosseguiram de acordo com a metodologia descrita por Lachance *et al.* (1999 citados por DUARTE *et al.*, 2002). A sequência de dados foi obtida para cepas que apresentaram características atípicas de crescimento. As colônias leveduriformes cresceram em meio Dixon modificado por um período de cinco dias, sendo então diluídas em água destilada estéril até atingir a densidade de “1+” (turbidez à luz). Dez microlitros dessa suspensão foram adicionados a 30 µl de reagente de amplificação, utilizando-se Platinum Taq polimerase. Os produtos resultantes da amplificação foram previamente purificados em coluna de Quiagen e, em seguida, sequenciados. Os primers adotados para ambas as técnicas, amplificação e sequenciamento, foram NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCC GAG GAA AAG-3'0 e NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (DUARTE *et al.*, 2002).

Os dados obtidos da quantificação das colônias de fungos e leveduras foram transformados para $\log_{10} X+1$ e, adotando-se o delineamento inteiramente casualizado, foram submetidos à análise de variância em fatorial 4x2, constituído pelos quatro tratamentos avaliados e pelos dois tipos fúngicos comparados – fungos micelianos e fungos leveduriformes. Posteriormente, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan, com nível de significância de 5% (SAMPAIO, 1998). As taxas de positivities entre os diferentes grupos animais amostrados foram avaliadas, utilizando-se o teste do Qui-quadrado (χ^2), considerando os valores de $p < 0,05$ (SAMPAIO, 1998).

5.7.3 Avaliação da atividade celulolítica de fungos isolados

Foi avaliada a atividade celulolítica de 49 amostras de fungos micelianos isolados dos grupos de animais constantes neste estudo. Esses isolados corresponderam a 27 do gênero *Aspergillus*, quatro do gênero *Gliocladium*, seis do *Paecilomyces*, nove do *Rhizopus* e três isolados do gênero *Scedosporium*. Cada isolado foi reinoculado em meio C, contendo celulose microcristalina (1%), sulfato de amônio (0,5%), sulfato de magnésio heptahidratado (0,05%) e ágar-ágar a (2%) para se adaptarem e crescerem nesse meio, onde a única fonte de carbono disponível foi a celulose microcristalina.

Após incubação durante sete dias, cada isolado foi novamente semeado em placas de petri 90 mm x 90 mm contendo 15 ml do mesmo meio e em triplicata. Posteriormente, foram incubadas em estufa BOD a 39° C. As leituras da atividade celulolítica foram realizadas às 24 h e 48 h, conforme adaptação à metodologia descrita por Teather e Wood (1982). Embora tenha sido também avaliada essa atividade para 96 h de incubação, os dados obtidos não foram utilizados para a análise estatística. Nesse período, 55% das amostras apresentaram colônias que ocupavam toda a área de cultivo e, em 24,3 % delas, o halo de atividade enzimática foi semelhante ao diâmetro da placa. Essa particularidade impossibilitou as mensurações acuradas dos diâmetros dos halos e colônias.

Ao final de cada período de incubação, procedeu-se à lavagem das placas durante 15 minutos, utilizando-se 15 ml de solução com o corante vermelho congo (1mg ml^{-1}). Após esse procedimento, as placas foram novamente lavadas com 15 ml de solução 1M de NaCl, por três vezes consecutivas, procedendo-se à mensuração dos diâmetros dos halos claros, que indicou degradação da celulose e o diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo®). Com esses resultados, calculou-se o índice de atividade enzimática (I.A.) de cada microrganismo, dividindo-se os valores das medidas do halo de hidrólise pelo diâmetro da colônia para cada período de avaliação (LOPES *et al.*, 2009).

Para a atividade celulolítica, foi realizada a análise de variância com emprego do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação das atividades celulolíticas de fungos micelianos nos dois períodos avaliados. A comparação entre os tempos de incubação foi realizado, utilizando-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Ambos os testes foram realizados, utilizando-se o programa Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG (2007).

5.7.4 Cultivo, quantificação, isolamento e identificação de Enterobacteriaceae

Diluições decimais do líquido ruminal foram preparadas em tubos contendo nove ml de solução salina estéril. Após cada diluição, os tubos foram homogeneizados em vórtex durante um minuto. Alíquotas de 100 µl das diluições 10^{-2} e 10^{-4} foram inoculadas em placas estéreis de 90mm x 90mm contendo o meio ágar *MacConkey* (Acumedia® Manufactures, Lansing, Michigan - EUA). Os inóculos foram espalhados no meio de cultura com alças de Drigalski estéreis, as placas foram incubadas em estufa BOD de ventilação forçada a 39° C e monitoradas, para o crescimento de colônias bacterianas por até sete dias (HAJDENWURCEL, 1998).

Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado e os valores obtidos nas quantificações das colônias foram transformados para $\log_{10} X+1$. Na análise estatística, foi procedida a análise de variância. As médias de concentrações de Enterobacteriaceae por ml de líquido ruminal nos quatro tratamentos foram comparadas pelo teste de Duncan, com 5% de significância (SAMPAIO, 1998).

Para a identificação dos gêneros bacterianos mais prevalentes nas amostras de fluido ruminal, foram realizados o reisolamento e o crescimento em placas contendo meio ágar MacConkey em estufa a 37°C por 24 h. Após o crescimento exponencial, cada isolado foi inoculado em tubos contendo meio Rugai e Araújo, modificado por Pessoa e Silva (MBiolog Diagnósticos Ltda, lote 906051). Os tubos foram incubados em estufa BOD a 39°C e procedeu-se à leitura dos resultados após 24 h, usando-se tabela ilustrativa para identificação presuntiva de Enterobacteriaceae, de acordo com Pessoa e Silva (1972).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Características físico-químicas do fluido ruminal

A TAB. 6 ilustra os resultados das análises macroscópicas e físicas do líquido ruminal das duas categorias animais avaliadas nesta pesquisa, submetidas às diferentes dietas.

TABELA 6

Análises macroscópicas e físicas do líquido ruminal de bovinos leiteiros alimentados com diferentes tipos de volumosos

Variáveis	Número	%	Valores de referência Dirksen(1993)
Vacas silagem (n=30)			
Cor			
Castanho escuro	30	100	Castanho oliva ou verde
Odor			
Aromático	30	100	Aromático
Viscosidade			
Levemente espessa	14	46,7	Espessa
Espessa	16	53,3	
PRAM*			
Até 3 minutos	11	36,7	Até 3 minutos
De 3 a 6 minutos	5	16,6	
Acima de 6 minutos	14	46,7	
Vacas capim (n=32)			
Cor			
Castanho oliva ou verde	31	96,9	Castanho oliva ou verde
Castanho enegrecido	1	3,1	
Odor			
Aromático	32	100	Aromático
Viscosidade			
Levemente espessa	23	71,9	Espessa
Espessa	9	28,1	
PRAM			
Até 3 minutos	6	18,7	Até 3 minutos
Acima de 6 minutos	26	81,3	
Bezerras silagem (n=12)			
Cor			
Castanho escuro	12	100	Castanho oliva ou verde
Odor			
Aromático	30	100	Aromático
Viscosidade			
Levemente espessa	14	100	Espessa
PRAM			
De 3 a 6 minutos	12	100	Até 3 minutos
Bezerras cana (n=11)			
Cor			
Castanho médio a escuro	3	27,3	Castanho oliva ou verde
Verde oliva claro	8	72,7	
Odor			
Aromático a inodoro	11	100	Aromático
Viscosidade			
Aquosa	11	100	Espessa
PRAM			
Até 3 minutos	9	81,8	Até 3 minutos
De 3 a 6 minutos	2	18,2	

Nota: * PRAM: potencial de redução do azul de metileno.

Esses resultados mostram diferenças nas características físicas do fluido ruminal entre os grupos avaliados, o que sugere a interferência da dieta nesses parâmetros. O parâmetro cor demonstrou diferenças marcantes entre os grupos de animais pesquisados, sendo aqueles alimentados com silagem de sorgo, os que apresentaram fluido ruminal mais escuro, enquanto a grande maioria das vacas que receberam capim possuía líquido ruminal verde claro característico. Já as bezerras cuja alimentação era à base de cana forrageira apresentaram fluido ruminal castanho claro.

O potencial de redução do azul de metileno (PRAM) variou consideravelmente entre os grupos avaliados. Enquanto 100% das amostras de fluido ruminal coletadas das bezerras apresentaram valores iguais ou inferiores a seis minutos, 81% das amostras coletadas em vacas alimentadas com capim apresentaram PRAM superior a seis minutos. Além disso, a relação volumoso/concentrado poderia ter interferido nesse parâmetro, pois as vacas que estavam a pasto, recebendo 100% de sua alimentação à base de volumoso, apresentaram 81,3% das amostras de fluido ruminal com PRAM igual ou superior a seis minutos. Todavia, para as vacas alimentadas com silagem de sorgo e concentrado, cuja proporção volumoso/concentrado foi de 72/28, a proporção de amostras que apresentaram PRAM igual ou superior a seis minutos foi de 46,7%. Para a categoria bezerras, o PRAM encontrado em todas as amostras foi igual ou inferior a seis. Ressalte-se que o primeiro grupo de bezerras estava recebendo silagem de sorgo e concentrado, também na proporção 72/28 (volumoso/concentrado), enquanto o segundo grupo recebeu cana picada, adicionada de ureia, além de ração concentrada na proporção 57/43 (volumoso/concentrado). Esses resultados confirmam o que relata a literatura científica. Dietas com níveis elevados de concentrado poderiam resultar em um PRAM de apenas um minuto, enquanto uma ração constituída exclusivamente de feno pode elevar esse tempo para três a seis minutos. Por outro lado, prolonga-se para até mais de 15 minutos na inatividade simples da microbiota em animais alimentados com dietas pobres em energia e proteína ou em bovinos com inapetência prolongada (DIRKSEN, c1993).

Os teores de FDN e FDA, associados à idade dos animais, também podem ter interferido no PRAM. Enquanto 100% das bezerras recebendo silagem de sorgo apresentaram valores de PRAM iguais ou inferiores a seis minutos, apenas 53,3% das amostras provenientes das vacas recebendo o mesmo tipo de alimento demonstraram resultados iguais. Comparando-se esses valores com os resultados apresentados na TAB. 7, é possível constatar que a silagem de sorgo foi o alimento com maiores teores de FDN e FDA. Os teores dessas fibras interferem na digestibilidade, no consumo de matéria seca e na salivação, interferindo diretamente o pH ruminal (NRC, 2001) e, talvez, esses sejam os fatores responsáveis pelas variações encontradas nos valores do PRAM.

TABELA 7

Composição químico-bromatológica da silagem de sorgo, do capim *B. brizantha*, da cana picada e das rações concentradas fornecidas às vacas e bezerras deste experimento

Parâmetros	Silagem de sorgo	<i>B. brizantha</i>	Cana picada*	Concentrado vacas	Concentrado bezerras
MS	31,04%	32,76%	24,84%	85,36%	86,50%
FDN	46,28%	37,49%	36,68%	10,56%	18,12%
FDA	38,21%	31,18%	30,55%	8,02%	13,86%
PB	5,45%	6,02%	5,16%	18,65%	11,61%
EE	2,93%	2,02%	0,90%	5,15%	4,71%
MM	7,44%	6,61%	7,37%	8,27%	4,39%
CT	84,18%	85,35%	86,57%	67,58%	79,29%
CNF	37,90%	47,86%	49,89%	57,02%	61,17%

Nota: * cana picada sem adição de ureia e sulfato de amônia.

MS: matéria seca; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral; CT: carboidratos totais; CNF: carboidratos não-fibrosos.

CT= 100 – (PB + EE + MM)

CNF = CT – FDN

Fonte: VAN SOEST, 1991.

Em estudo avaliando as características físico-químicas de fluido ruminal de vacas leiteiras de alta produção – média de 25 kg de leite dia⁻¹ –, o PRAM foi menor que seis minutos em 100% das 130 amostras avaliadas durante a segunda, quinta, oitava e décima primeira semanas pós-parto. Embora a técnica de coleta de fluido ruminal tenha sido por sonda estomacal de via dupla, os resultados estão dentro do esperado, uma vez que a dieta

das vacas amostradas constituiu-se de alimentos com elevado valor proteico como silagem de sorgo e milho, ração concentrada e pastagem de grama Tifton (*Cynodon niemfluesis*) (CAMPOS *et al.*, 2006).

Ressalta-se que em regiões de clima semiárido, como a região na qual foi realizada esta investigação, a produção de forrageiras de boa qualidade torna-se difícil ao longo de todo o ano. Isso ocorre em função do menor índice pluviométrico e do maior período de déficit hídrico. A quantidade de alimento disponível é comprometida, assim como também a qualidade das forrageiras persistentes à seca (CARVALHO; PIRES, 2008; DANTAS, 2006).

Estudos mostraram que a digestibilidade *in vitro* de matéria seca (DIVMS) de forrageiras tropicais do sertão brasileiro é significativamente baixa, enquanto os teores de FDN podem ser elevados. Um exemplo é o capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L), muito difundido em regiões de clima semiárido, que apresentou DIVMS de 32,9% e FDN de 68,49% no mês de setembro de 2001, em experimento realizado no estado de Pernambuco (MOREIRA *et al.*, 2007). Essas taxas são baixas, quando comparadas às obtidas por Gerdes *et al.* (2000) no Rio Grande do Norte, em agosto de 1998. Em suas pesquisas, constatou-se que a DIVMS de capim Tanzânia pode chegar a 61% e a de capim marandu se aproxima de 62%, enquanto o FDN de ambas as forrageiras foi 66,32% e 62,30%, respectivamente. Baixa DIVMS implica em maior tempo de retenção da forragem no rúmen (CUNHA *et al.*, 2007) e está inversamente relacionada à FDN, que, por sua vez, é o componente da forragem mais consistentemente associado ao consumo (VAN SOEST, 1994).

Considerando-se os valores elevados de FDN dos alimentos utilizados nesta pesquisa (TAB. 7), pode-se inferir que a taxa de passagem no rúmen seria influenciada pelos teores de fibras das dietas, associados à proporção de volumoso/concentrado e ao tamanho das partículas de alimento (NRC, 2001). Esses fatores, conseqüentemente, atuam diretamente na população microbiana ruminal dos diferentes grupos de animais avaliados.

A mensuração do pH teve importância como método de triagem das amostras de fluido de rúmen a serem utilizadas nas outras análises físico-químicas e nas microbiológicas, uma vez que é um método auxiliar no

diagnóstico da acidose ruminal em rebanhos leiteiros (Garret *et al.*, 1999). Caso alguma amostra apresentasse resultados sugestivos de alguma patologia, essa seria descartada. Salienta-se, ainda, que o pH ruminal reflete diretamente as características da dieta e produtos finais da fermentação, mas também a taxa de crescimento microbiano, podendo, dessa forma, ocorrer variações nos microrganismos predominantes no rúmen (LAVEZZO *et al.*, 1998). Além disso, a estabilização do pH ruminal é devido, em grande parte, à saliva, que possui alto poder tamponante e à capacidade da mucosa do rúmen de absorver mais rapidamente os ácidos livres que os combinados, resultantes da fermentação. Esse é outro fator que contribui para reduzir a acidificação do meio, que influenciaria, negativamente, as atividades dos microrganismos celulolíticos (DUKES *et al.*, 1996).

As médias do potencial hidrogeniônico (pH) do líquido ruminal dos quatro grupos avaliados podem ser observadas na TAB. 8. Esses valores, quando comparados pelo teste t de Student, não apresentaram diferenças entre os grupos alimentados com diferentes fontes de volumosos e nem mesmo entre as categorias com os mesmos volumosos.

TABELA 8

Médias dos valores do potencial hidrogeniônico dos fluidos ruminais de bovinos leiteiros alimentados com diferentes fontes de volumosos

Grupo animal	pH (média do grupo)
Vacas silagem	6,98
Vacas capim	6,84
Bezerras silagem	6,85
Bezerras cana	6,97

Nota: coeficiente de variação: 5,14%

As médias de pH para os diferentes grupos avaliados estão dentro ou próximo dos valores normais, segundo Dirksen (1993). O valor normal do pH do conteúdo ruminal oscila entre 5,5 e 7,4 ao longo do dia, de acordo com a alimentação administrada e com o intervalo de tempo da última alimentação. Esse autor relata, ainda, que a elevação do valor do pH pode ocorrer em casos de jejum superior a 24 h ou quando a microbiota for alterada por outros motivos, como na intoxicação por ureia ou em processos de putrefação, que

resultam em acentuada alcalose ruminal. Em pesquisa realizada com vacas leiteiras lactantes, verificou-se que os valores médios do pH foram de 7,28. Esses resultados, considerados altos, podem ter sido influenciados pelo método de coleta adotado, que foi via sonda esofágica, quando geralmente ocorre contaminação da amostra com a saliva do animal. Outro fator que, em associação à contaminação pela saliva, pode ter colaborado para a elevação do pH ruminal dos animais é que, no momento da coleta, as vacas encontravam-se em jejum alimentar de pelo menos sete horas (MOREIRA *et al.*, 2001), situação que tende a aproximar o pH da neutralidade (DIRKSEN, c1993).

O ponto ótimo da digestão das fibras vegetais é dado quando valores de pH se encontram entre 6,7 e 7,1. Em situações em que o pH atinge níveis inferiores a 6,2, ocorre redução na digestibilidade, já que os microrganismos celulolíticos são os mais sensíveis ao aumento da concentração de íons hidrogênio (ORSKOV, 1986). Outra consequência da queda do pH ruminal é a redução da digestão de proteínas, celulose, hemicelulose, pectinas e amido. Isso seria justificado porque, quando o pH atinge a faixa de 6,5 a 5,5, ocorre decréscimo no metabolismo microbiano no rúmen (HOOVER; STOKES, 1991).

Em um estudo realizado em Rio Grande-RS, as diferenças dos sucos ruminais entre os sexos dos animais foram avaliadas. Tabeleão *et al.* (2008) relataram a inexistência de diferenças na funcionalidade ruminal e nas características físico-químicas do suco do rúmen entre bovinos mestiços machos e fêmeas, criados em sistema de semiconfinamento em pastagem diferida e recebendo concentrado duas vezes ao dia. Essas diferenças também não foram observadas entre as amostras provenientes do rúmen de vacas e bezerras recebendo silagem de sorgo como volumoso, avaliadas nesta investigação.

A avaliação físico-química do fluido ruminal é de indiscutível valor no diagnóstico de enfermidades associadas ao aparelho digestivo dos ruminantes, especialmente aquelas dos compartimentos pré-gástricos, onde está alojada a microbiota autóctone do rúmen. Esses microrganismos são altamente sensíveis às alterações externas e internas às quais,

rotineiramente, estão submetidos os animais (BORGES *et al.*, 2002). São, assim, um bom marcador do estado de saúde dos seus hospedeiros.

Os resultados das análises microbiológicas e físico-químicas do fluido ruminal podem sofrer interferências de acordo com a dieta fornecida aos animais. Dietas pobres em fibra, por exemplo, desencadeiam mecanismos fisiológicos de homeostasia, uma vez que levam ao declínio do pH do conteúdo do rúmen, à alteração da população microbiana e à maior suscetibilidade do ruminante a desordens metabólicas e infecções (RUSSELL; RYCHLIK, 2001). Dessa forma, deve-se levar em conta que os resultados encontrados neste estudo são referentes às dietas às quais os animais estavam submetidos. No caso específico dos animais a pasto, pode-se inferir que a pastagem disponível para as vacas desta pesquisa era de boa qualidade, conforme resultados apresentados na TAB. 3. Assim, os resultados das análises do fluido ruminal podem ser diferentes, caso a pastagem esteja acima do ponto ideal para pastejo.

6.2 Análises microbiológicas do fluido ruminal

6.2.1 Exame direto para detecção de bactérias e leveduras

Os resultados obtidos a partir dos espécimes provenientes dos diferentes grupos de animais avaliados indicaram a presença de bactérias Gram positivas e Gram negativas em forma de bastonetes, cocos e cocobastonetes, sendo os bastonetes Gram-negativos encontrados em maior proporção nos fluidos ruminais de todos os animais. A maioria das bactérias ruminais é Gram negativa, porém o número de bactérias Gram positivas tende a se elevar em dietas com alta concentração de carboidratos solúveis (DIRKSEN, 1993; KAMRA, 2005).

Observou-se, também, a presença de leveduras com hifas e pseudohifas, em formato oval e retangular. Para todas as amostras avaliadas, foi observada grande diversidade de células microbianas visualizadas. Sendo o ecossistema microbiano ruminal um nicho complexo, formado por diferentes grupos, que vivem em relação simbiótica para bioconversão da celulose em ácidos graxos voláteis, fica evidenciada a

importância da diversidade microbiana no rúmen, para a saúde e capacidade produtiva do animal (KAMRA, 2005).

6.2.2 Exame direto para detecção de fungos ruminais

Após o exame micológico direto das amostras de líquido ruminal, observou-se a presença de estruturas fúngicas para todas as vacas alimentadas com capim *B. brizantha*, todas as bezerras recebendo silagem de sorgo e todas as bezerras que estavam recebendo cana picada com ureia. Para as vacas alimentadas com silagem de sorgo, das 30 amostras avaliadas, apenas dez apresentaram micélios fúngicos em seu conteúdo. Todavia, as estruturas encontradas foram abundantes e exuberantes para as vacas recebendo capim e para as bezerras alimentadas com silagem (FIG. 4). As estruturas encontradas nas bezerras que receberam cana eram pequenas, maceradas e em menor concentração (FIG. 5). Comparando-se as taxas de positividade desses exames pelo teste do Qui-quadrado (χ^2), constatou-se que o grupo de vacas recebendo silagem de sorgo apresentou menor número de exames positivos, quando comparado ao grupo de vacas alimentadas com *B. brizantha* ($p < 0,01$). Dietas à base de fibras estimulam o crescimento de fungos micelianos do rúmen, pois esses preferem tecidos mais lignificados para se fixar e degradar. Por outro lado, dietas peletizadas usualmente apresentam tempo de passagem curto pelo sistema digestório, o que dificulta o crescimento dos fungos anaeróbicos. Além disso, elevadas concentrações de açúcares solúveis inibem a germinação dos zoósporos fúngicos dentro do rúmen. Isso ocorreria devido à redução do pH do fluido do rúmen graças à presença de grande concentração de açúcares, que também inibem a produção de zoósporos (KAMRA 2005).

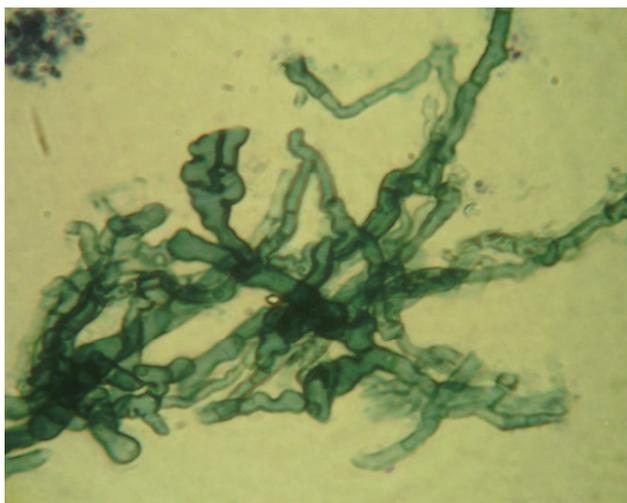


FIGURA 4 – Estrutura fúngica identificada após clarificação em fluido ruminal de bezerra alimentada com silagem de sorgo (microscopia ótica; aumento de 1000 vezes)

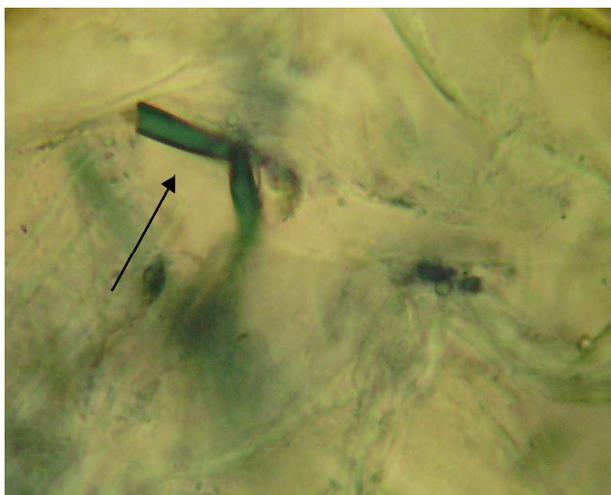


FIGURA 5 – Estrutura fúngica identificada após clarificação em fluido ruminal de bezerra alimentada com cana picada e ureia (microscopia ótica; aumento de 1000 vezes)

As formas fúngicas detectadas para todos os grupos avaliados nesta pesquisa eram espessas, com estruturas de múltiplos zoosporângios e rizomicélios bulbosos e poderiam ser comparadas às do fungo anaeróbio do rúmen *Caecomyces* spp. (FIG. 1). As estruturas fúngicas já observadas em experimentos prévios em bovinos de corte, na mesma região deste estudo,

indicaram, diferentemente, características do gênero *Neocallimastix* (ABRÃO *et al.*, 2008). Futuros estudos são necessários para elucidar essas diferenças observadas.

6.2.3 Cultivo, quantificação, isolamento e identificação de Enterobacteriaceae

6.2.3.1 Quantificação

Após o cultivo, foi observado o desenvolvimento de Enterobacteriaceae em todos os grupos avaliados nas porcentagens constantes na TAB. 9. A porcentagem de cultivos positivos para Enterobacteriaceae não-fermentadoras de lactose foi menor para as amostras provenientes das bezerras alimentadas com cana ($p < 0,05$). Embora não tenham sido encontrados relatos na literatura científica, esse resultado pode sugerir a existência de fatores inibitórios sobre a população de bactérias não-fermentadoras de lactose produzidos pela população de microrganismos que utiliza a sacarose.

TABELA 9

Taxas de positividade de Enterobacteriaceae, provenientes do fluido ruminal dos quatro grupos de animais avaliados neste estudo

Grupo (n)	Enterobacteriaceae		
	Totais % (n)	Lac - % (n)	Lac + (n)
Vacas capim (30)	96,67% (29)	93,33% (28)	96,67% (29)
Vacas silagem (30)	83,33% (25)	50,00% (15)	76,67% (23)
Bezerras silagem (12)	100% (12)	100% (12)	100% (12)
Bezerras cana (11)	100% (11)	36,36% (4)	100% (11)

As médias das quantificações totais dessas bactérias foram comparadas após análise de variância e as médias confrontados pelo teste Duncan (TAB. 10). Por esses resultados, pode-se sugerir que a dieta interferiu, significativamente, na população de Enterobacteriaceae, sendo a alimentação à base de cana picada e ureia a que mais favoreceu o

desenvolvimento desses microrganismos entre as bezerras. É possível explicar esse fato, levando-se em conta que a cana-de-açúcar é rica em sacarose, que é facilmente fermentada no ambiente ruminal.

TABELA 10

Médias totais de Enterobacteriaceae, provenientes do fluido ruminal dos quatro grupos de bovinos avaliados

Grupo animal	n	Médias (UFC ml⁻¹)
Vacas capim	30	6,0 x 10 ⁵ B
Vacas silagem	30	1,4 x 10 ⁵ C
Bezerras silagem	12	8,4 x 10 ⁶ B
Bezerras cana	11	2,1 x 10 ⁸ A

Nota: médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan com valor de $p < 0,05$.

Coeficiente de variação: 30,51%

Entretanto, esse dissacarídeo é utilizado em experimentações científicas como indutor de acidose láctica em ruminantes. Em pesquisa realizada com caprinos nos quais foram feitas infusões intra-ruminais de sacarose observaram-se, ao exame clínico, sinais evidentes de acidose ruminal aguda, tais como: anorexia, apatia, taquicardia, distensão do abdômen, atonia do rúmen, ausência da ruminação, diarreia com fezes amarronzadas, aquosas e fétidas, e perda de peso corporal. Constatou-se ainda evidente decréscimo no pH ruminal, que atingiu o nível de 4,75 ($\pm 0,17$). Consequentemente, a população microbiana sofreu alterações, passando a haver predominância de cocos e bastonetes Gram positivos (MIRANDA NETO *et al.*, 2005), características de bactérias lácticas. Associa-se a isso o fato de que esses microrganismos utilizam, preferencialmente, carboidratos solúveis, mono e dissacarídeos em seus processos fermentativos (MURRAY *et al.*, 2006).

Comparando-se os dados provenientes das duas categorias, vacas e bezerras alimentadas com silagem de sorgo e, utilizando-se o teste t de Student, foi observado que as bezerras apresentaram uma média de UFC ml⁻¹ de líquido ruminal maior que a das vacas ($p < 0,05$). Talvez esse fato possa ser explicado pela imaturidade do ambiente ruminal dos animais jovens, que

é caracterizado por uma população microbiana instável e ainda em adaptação (RUIZ-LACAZ, 1992). Em se tratando da contagem de Enterobacteriaceae dentro de uma mesma categoria, as vacas alimentadas com silagem demonstraram possuir a menor população, quando comparadas aos animais alimentados com capim. O mesmo ocorreu com as bezerras cuja alimentação foi baseada em silagem de sorgo, quando comparadas às bezerras recebendo cana picada. Isso pode ser esclarecido pelas características fermentativas ocorridas na silagem ao longo do tempo. Ostling e Lindgren (2006) afirmaram que, durante o processo normal e adequado de ensilagem, as Enterobacteriaceae normalmente crescem extensivamente durante os primeiros dias, mas a sua população decresce rapidamente à medida que o meio é acidificado. Essa característica própria da silagem pode ter interferido na microbiota ruminal, fazendo com que a população dessas bactérias diminuísse naqueles animais recebendo esse tipo de alimento, uma vez que o ambiente acidificado era inóspito a elas.

6.2.3.2 Identificação

Foi realizada a identificação das amostras de Enterobacteriaceae, isoladas do meio ágar *MacConkey*, utilizando-se o meio Rugai e Araújo, modificado por Pessoa e Silva (1972). Um total de 100 isolados bacterianos dos quatro grupos de animais avaliados neste estudo foi identificado e os resultados encontram-se na TAB. 11.

TABELA 11

Distribuição de gêneros de Enterobacteriaceae, provenientes do líquido ruminal de bovinos leiteiros alimentados com diferentes forragens tropicais

Gêneros	Totais	Vacas silagem		Vacas capim		Bezerras silagem		Bezerras cana	
		n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Alcaligenes</i>	8	2	7,1	2	7,7	4	13,8	0	0,0
<i>Citrobacter</i>	1	0	0,0	1	3,8	0	0,0	0	0,0
<i>Escherichia</i>	9	2	7,1	2	7,7	4	13,8	1	11,1
<i>Edwardsiella</i>	1	1	3,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>Enterobacter</i>	32	5	17,9	13*	50,0	8	27,6	6	33,3
<i>Klebsiella</i>	27	12*	42,9	6	23,1	4	13,8	5	27,8
<i>Proteus</i>	17	3	10,7	1	3,8	8	27,6	5	27,8
<i>Providencia</i>	1	0	0,0	1	3,8	0	0,0	0	0,0
<i>Pseudomonas</i>	4	3	10,7	0	0,0	1	3,4	0	0,0
Totais	100	28	100,0	26	100,0	29	100,0	17	100,0

Nota: os valores acompanhados de asterisco são significativamente maiores quando comparados às quantidades analisadas dentro do grupo estudado ($p < 0,01$).

Os gêneros de Enterobacteriaceae mais frequentemente identificados foram, respectivamente: *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Proteus*. Comparando-se as frequência desses gêneros para as vacas amostradas, *Enterobacter* spp. foi mais frequentemente identificada para os animais em pastagem de *B. brizantha*, enquanto *Klebsiella* spp. foi mais prevalente para vacas alimentadas com silagem de sorgo ($p < 0,01$). Estudos preliminares relatam o promissor potencial desse último gênero para a degradação da mimosina, composto tóxico presente na leguminosa forrageira *Leucaena leucocephala* (AUNG *et al.*, 2006)⁶.

Em um estudo, foi relatada a presença de *Salmonella* spp. em

⁶ <http://www.tropentag.de/2006/abstracts/full/202.pdf>

linfonodos do jejuno e do ceco de diversas espécies animais, inclusive vacas e novilhas, indicando a translocação dessas bactérias (MOO *et al.*, 1980). Estudos realizados na Irlanda, avaliando a prevalência da Enterobacteriaceae *Salmonella* spp. em amostras do rúmen, das fezes e das carcaças dos bovinos, demonstraram que essa bactéria foi mais frequentemente isolada no período de agosto a outubro. Esse gênero foi isolado em dois por cento das amostras de suco ruminal e em dois e 7,6% das amostras de fezes e carcaça, respectivamente (MCEVOY *et al.*, 2003).

Harmon *et al.* (1999) observaram que o jejum alimentar em bezerros ocasionou pouco efeito sobre a proliferação de *Escherichia coli* O157: H7 no rúmen, apesar de promover alterações no pH ruminal e na concentração de ácidos graxos voláteis. Nesta investigação científica, o gênero *E. coli* foi encontrado em 13% das amostras provenientes de bezerras alimentadas com silagem de sorgo.

Os isolados de *Proteus* spp. foram identificados em maiores proporções para os grupos das bezerras ($p < 0,05$). Esse gênero é produtor de urease (RUGAI; ARAÚJO, 1968; SRIWANTHANA *et al.*, 1993) e, possivelmente, poderia contribuir na utilização da ureia, suplementada ao grupo que recebeu cana-de-açúcar. Há relatos na literatura da relação desse gênero com infecções urinárias em humanos (CHROMEK *et al.*, 2005; COKER *et al.*, 2000) e em carnívoros (GAASTRA *et al.*, 1996).

Futuros estudos devem ser realizados, buscando elucidar claramente a influência e a participação dessa família de bactérias no rúmen bovino e seu potencial patogênico e ecológico nesse ambiente, para as diferentes categorias e tratamentos avaliados.

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

6.2.4.1 Detecção

Os resultados do cultivo micológico, tanto em meio ágar *Sabouraud* quanto em meio C (celulose microcristalina a 1%) indicaram presença de fungos micelianos e leveduras para todos os grupos de animais avaliados. Após as análises desses dados, utilizando-se o teste do Qui-quadrado (χ^2), foi constatado que a taxa de positividade para fungos no meio C foi menor ($p < 0,05$) para as amostras de fluido ruminal das vacas alimentadas na pastagem (GRAF. 1).

Observa-se que, em todas as amostras de fluido ruminal dos animais alimentados com silagem, a taxa de positividade de fungos foi de 100%. Pode-se inferir que a silagem fornecida a esses animais tenha sido fonte de contaminação desses microrganismos. Isso poderia ser corroborado por estudos que descrevem a presença desses fungos em silagens de milho e sorgo (MNGADI *et al.*, 2008; O'BRIEN *et al.*, 2005; O'BRIEN *et al.*, 2007; RICHARD *et al.*, 2009).

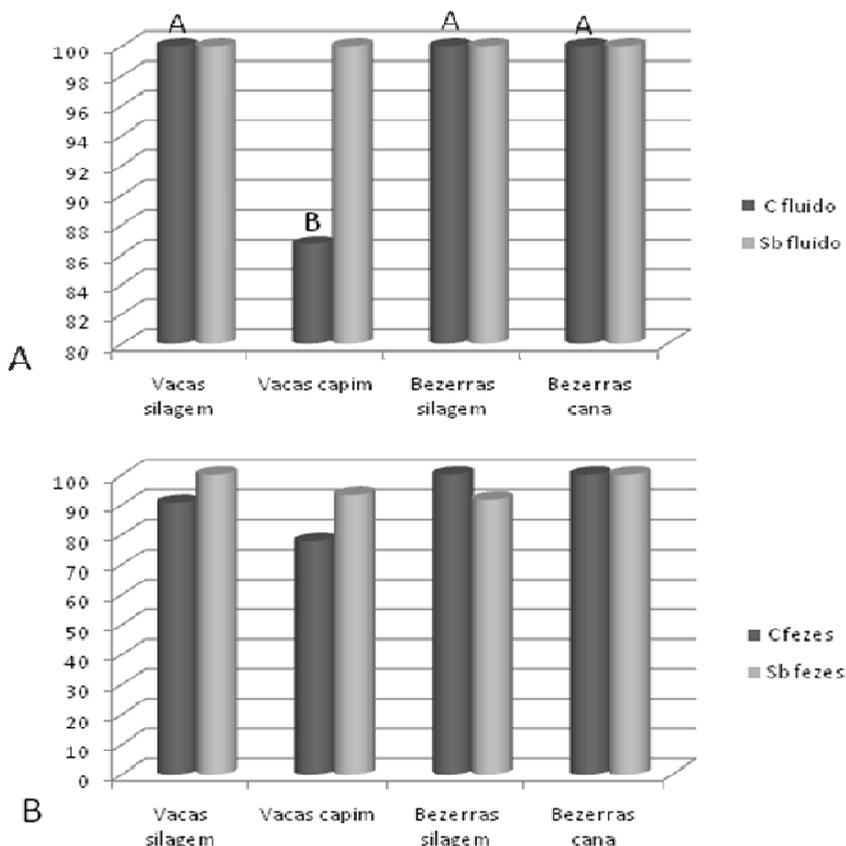


GRÁFICO 1 – Porcentagens de positividade para o cultivo de fungos em amostras do suco ruminal (A) e de fezes (B) provenientes de vacas alimentadas com silagem de sorgo (n=32) ou em pastagem de *Brachiaria brizantha* (n=30), e de bezerras Holandesas alimentadas com silagem de sorgo (n=12) ou com cana (n=11). Nas legendas: C: meio com 1% de celulose microcristalina como fonte única de carbono; Sb: meio *Sabouraud* acrescido de cloranfenicol.

Nota: Colunas com as mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$).

6.2.4.2 Quantificação

Na quantificação, fez-se distinção entre fungos micelianos e leveduriformes. A TAB. 12 relaciona as médias das quantidades de UFC ml^{-1} de fungos micelianos e leveduriformes, encontradas nas amostras de fluido ruminal dos grupos de animais avaliados.

TABELA 12

Quantificação de fungos micelianos e leveduriformes em amostras de líquido ruminal, provenientes de vacas alimentadas com silagem de sorgo (n=32), vacas alimentadas em pastagem de *B. brizantha* (n=30), de bezerras Holandesas alimentadas com silagem de sorgo (n=12) ou com cana (n=11)

Tratamento	Fungos micelianos (UFC ml ⁻¹)	Leveduras (UFC ml ⁻¹)
Vacas capim	2,1 x 10 ⁵ Aa	3,5 x 10 ³ Db
Vacas silagem	8,8 x 10 ⁵ Aa	1,6 x 10 ⁵ Ca
Bezerras silagem	1,6 x 10 ⁵ Ab	2,0 x 10 ⁶ Ba
Bezerras cana	3,6 x 10 ⁴ Bb	5,0 x 10 ⁶ Aa

Nota: Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (p<0,05).

Coefficiente de variação: 45,26%

A população de fungos micelianos foi significativamente menor para as bezerras alimentadas com cana picada, mesmo grupo que apresentou a maior população de colônias leveduriformes (p<0,05). Esse resultado pode sugerir a dominância da população de leveduras sobre a dos fungos micelianos, possivelmente ocasionada pelo tipo de substrato disponível. Ressalta-se que, enquanto fungos micelianos produzem grande quantidade e variedade de enzimas específicas para degradar polissacarídeos da parede celular vegetal (GORDON; PHILLIPS, 1998; MCALLISTER *et al.*, 2001; XIMENES, 2003), amplamente presente em dietas ricas em volumoso, as leveduras degradam com mais facilidade substratos mais simples, como glicose, xilose e glicerol (KURTZMAN; FELL, c1998). Assim, dietas ricas em carboidratos solúveis, como é o caso da sacarose, presente na cana forrageira, poderiam ter favorecido, competitivamente, o crescimento das leveduras. Poderia ter ainda ocorrido antagonismo por substâncias produzidas por leveduras, inibindo o crescimento dos outros fungos.

6.2.4.3 Identificação de fungos micelianos

As colônias de fungos micelianos foram submetidas à técnica de microcultivo, sendo identificado um total de 149 isolados. A TAB. 13 apresenta os diversos gêneros identificados e as suas proporções em amostras de fluido ruminal e de fezes.

TABELA 13

Quantificação dos gêneros fúngicos (n=149) isolados de amostras de fezes e de fluido ruminal dos quatro grupos de animais

Gêneros	AMOSTRA		
	Fezes	Fluido	Total
<i>Acremonium</i>	1 (2,27%)	0 (0%)	1 (0,67%)
<i>Aspergillus</i>	24 (54,54%)	60 (57,14%)	84 (56,38%)
<i>Fusarium</i>	0 (0%)	4 (3,81%)	4 (2,68%)
<i>Gliocladium</i>	5 (11,36%)	2 (1,90%)	7 (4,70%)
<i>Onychocola</i>	0 (0%)	1 (0,95%)	1 (0,67%)
<i>Paecilomyces</i>	4 (9,09%)	6 (5,71%)	10 (6,71%)
<i>Rhizophus</i>	5 (11,36%)	15 (14,29%)	20 (13,42%)
<i>Scedosporium</i>	3 (6,82%)	6 (5,71%)	9 (6,04%)
<i>Scopulariopsis</i>	1 (2,27%)	0 (0%)	1 (0,67%)
<i>Trichophyton</i>	1 (2,27%)	11 (10,48%)	12 (8,05%)
Total	44 (100%)	105 (100%)	149 (100%)

A TAB. 14 indica as proporções dos gêneros fúngicos no fluido ruminal de cada grupo animal analisado. Observa-se que o gênero *Aspergillus* (FIG. 6) foi o mais frequente tanto nas amostras de fezes quanto nas de fluido ruminal ($p < 0,01$) e essa frequência não diferiu entre esses dois tipos de espécimes clínicos coletados, quando comparados pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$). A predominância desse gênero pode ser explicada por sua versatilidade e eficiência em catabolizar fontes de carbono solúveis tão bem quanto polímeros complexos (FLIPPPI *et al.*, 2009). Entretanto

Aspergillus spp. é apontado, junto aos gêneros *Fusarium* e *Penicillium*, como um dos mais importantes produtores de micotoxinas em alimentos para os humanos e para os animais (HIRSH *et al.*, c2003).

TABELA 14

Quantificação dos gêneros fúngicos (n=149) isolados de amostras de fluido ruminal para cada grupo experimental

Gêneros	Categorias				Total
	Vac. silagem	Vacas Capim	Bez. Silagem	Bez. Cana	
<i>Aspergillus</i>	22 (68,75%)	18 (56,25%)	19 (51,35%)	1 (25%)	60 (57,14%)
<i>Fusarium</i>	1 (3,13%)	0 (0 %)	3 (8,11%)	0 (0 %)	4 (3,81%)
<i>Gliocladium</i>	0 (0%)	0 (0%)	2 (5,41%)	0 (0%)	2 (1,90%)
<i>Onychocola</i>	0 (0%)	1 (3,13%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,95%)
<i>Paecilomyces</i>	0 (0%)	1 (3,13%)	3 (8,11%)	2 (50%)	6 (5,71%)
<i>Rhizophus</i>	3 (9,38%)	2 (6,25%)	10 (27,03%)	0 (0%)	15 (14,29%)
<i>Scedosporium</i>	5 (15,63%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	6 (5,71%)
<i>Trichophyton</i>	1 (3,13%)	10 (31,25%)	0 (0%)	0 (0%)	11 (10,48%)
Total	32 (100%)	32 (100%)	37 (100%)	4 (100%)	105 (100%)

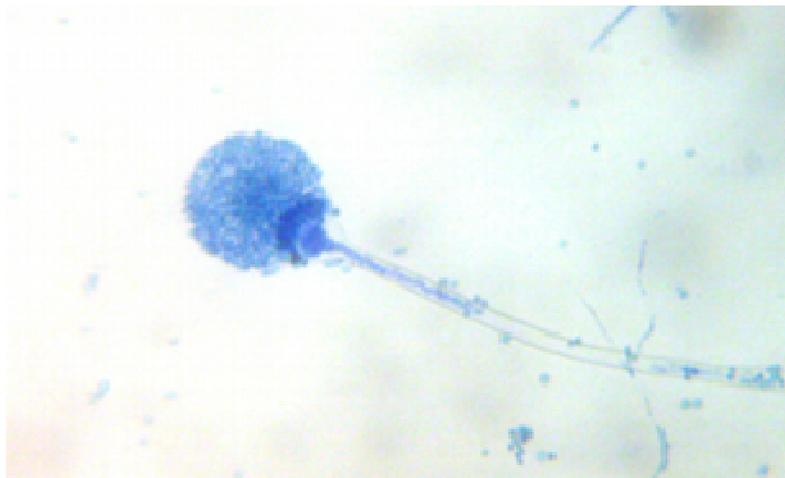


FIGURA 6 – *Aspergillus* spp. isolado de amostra de fluido ruminal de vaca alimentada com *B. brizantha* (microscopia ótica; aumento: 40 vezes)

Dentre os isolados do gênero *Rhizopus*, a ocorrência foi significativamente maior para bezerras alimentadas com silagem (27,03%), quando comparada àquela observada para vacas consumindo o mesmo volumoso (9,38%). Este resultado sugere a silagem de sorgo como possível fonte de contaminação desse e de outros fungos, conforme já relatado na literatura científica (MNGADI *et al.*, 2008; O'BRIEN *et al.*, 2005; O'BRIEN *et al.*, 2007; RICHARD *et al.*, 2009). Outro fator, que pode ter colaborado para as diferenças entre as populações de fungos presentes nos fluidos ruminais de vacas e bezerras, é a instabilidade do ambiente ruminal, própria em animais jovens. Nas bezerras, o rúmen, ainda imaturo, apresenta a população em adaptação e com vários grupos de microrganismos predominantes (RUIZ-LACAZ, 1992).

O gênero *Trichophyton*, considerado patógeno típico e agente de dermatomicoses em humanos e em animais (LACAZ *et al.*, 2002), foi mais frequente para amostras de líquido ruminal de vacas alimentadas na pastagem. Especificamente para esse dermatófito, ainda não foi relatada, na literatura científica, a sua ocorrência e participação no ambiente ruminal, entretanto a fonte de sua inoculação poderia ser atribuída à lambertura da pele e pelos, considerados nicho comum de algumas espécies desse gênero. Esses fungos apresentam notória habilidade de utilização de queratina

(LACAZ *et al.*, 2002), presentes na constituição dessas estruturas superficiais, mas são também integrantes da mucosa dos pré-estômagos (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004). A espécie *Thichophyton mentagrophytes* secreta ativamente uréases (LACAZ *et al.*, 2002), o que poderia sugerir a sua participação na utilização da ureia.

Os gêneros *Trichophyton*, *Aspergillus* e *Fusarium* são amplamente estudados por suas implicações em saúde pública, seja em dermatomicoses ou como agentes produtores de micotoxinas (LACAZ *et al.*, 2002). Esporadicamente, fungos dos gêneros *Acremonium*, *Scedosporium* e *Onychocola* são mencionados como patológicos. Embora sejam encontrados de forma corriqueira no ambiente, esses fungos acometem principalmente pacientes imunocomprometidos (BARRETO-BERGTER *et al.*, 2008; BIENVENU *et al.*, 2009; GUARRO *et al.*, 2009).

Wessollosky *et al.* (2008) relataram um caso de bursite do olécrano causado por *Paecilomyces lilacinus* em humano idoso imunocomprometido. Entretanto esses autores destacam a raridade desse fato, alegando que esse fungo geralmente está presente no solo, no ar e na pele de pessoas, sem causar prejuízos à saúde. Em contrapartida, Braga *et al.* (2008), ao testarem o efeito ovicida desse mesmo fungo sobre os ovos de *Taenia saginata*, informaram que, em condições laboratoriais, ao final de dez dias, o *P. lilacinus* demonstrou eficácia ovicida de até 52% para esse cestódeo.

Fungos da espécie *Gliocladium viride*, associados a *Trichoderma harzianum*, foram utilizados como biocontroladores efetivos do mofo cinzento em culturas de tomateiros (LISBOA *et al.*, 2007).

Esses relatos indicam a possibilidade de estudo dos isolados obtidos nesta pesquisa para controle de diferentes agentes de doenças microbianas ou parasitárias. Contudo, o papel patogênico e toxicológico deve ser também considerado.

6.2.4.4 Identificação de fungos leveduriformes

Dos 38 isolados identificados por testes bioquímicos, fisiológicos e análise das sequências do DNAr, 32 corresponderam à espécie *Candida krusei*, 04 à espécie *Candida glabrata* e 02 foram identificadas como *Candida pararugosa*. Durante os testes bioquímicos, as amostras de *Candida krusei* demonstraram crescimento adequado entre 37° C e 40 ° C e padrão fermentativo característico, utilizando como substratos os monossacarídeos glicose e D-xilose, além de DL-lactato, succinato, acetona, etilacetato, isopropanol, N-acetilglucosamina, lisina, NaCl (10%) e carbonato. Algumas cepas isoladas cresceram também em meio de cultura sem qualquer tipo de aminoácido. De acordo com esses dados, pode-se inferir que essa espécie utiliza o lactato e essa característica poderia contribuir na regulação do pH ruminal.

As cepas de *Candida* identificadas são importantes agentes oportunistas, podendo ocasionar sérios danos à saúde de humanos imunodeprimidos (BODEY *et al.*, 2002; McCULLOUGH *et al.*, 1996). São agentes de micoses sistêmicas e oportunistas e apresentam frequentemente populações com resistência múltipla às drogas antifúngicas (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 1994). Em suas pesquisas, Lund (1974) também isolou *C. krusei* de 49 amostras de fluido ruminal de vacas leiteiras, sendo a espécie mais frequentemente identificada em sua pesquisa. Esse resultado é condizente com o encontrado nesta investigação, respaldando-a.

O gênero *Candida*, assim como outras leveduras, pode estar associado a casos de mastites clínicas e subclínicas em ruminantes, seja como agentes primários ou secundários (SPANAMBERG *et al.*, 2009). Há, ainda, relatos de que *Candida glabrata* pode estar intrinsecamente associada à diarreia de bezerros recém-nascidos (ELAD *et al.*, 1998; RADOSTITIS *et al.*, 2000).

Os resultados encontrados nesta pesquisa reforçam a necessidade de futuros estudos da população de leveduras do rúmen, visando a esclarecer as suas implicações sanitárias nos rebanhos e na saúde pública, assim como o seu potencial biotecnológico para a produção de ruminantes.

6.2.4 Avaliação da atividade celulolítica de fungos micelianos

A comparação da atividade celulolítica nos tempos de 24 e 48 h, avaliada especificamente para o gênero *Aspergillus*, está demonstrada na TAB. 15. Nessa análise, foi possível observar que, mesmo dentro de um único gênero, como foi o caso do *Aspergillus*, houve grandes variações entre os IA das 21 amostras avaliadas. Dentre estas, 13 apresentaram IA inferior a um, o que indica reduzida capacidade para produção de enzimas celulolíticas. Provavelmente, isso se deve pelas diferenças entre espécies e cepas, fator esse ainda não considerado neste estudo.

TABELA 15

Atividade celulolítica de isolados de *Aspergillus* spp. provenientes do trato digestório de bovinos leiteiros, alimentados com forragens tropicais, após o cultivo em meio contendo celulose microcristalina (1%) com 24 e 48 h de incubação

Isolado	24 horas de crescimento			48 horas de crescimento		
	colônia(mm)	halo (mm)	IA*	colônia(mm)	halo (mm)	IA*
BS58	10,00	10,00	1,0000	25,50	19,00	0,7451
BS65	10,00	0,00	0,0000	29,00	9,50	0,3276
BS80	2,00	0,00	0,0001	6,00	4,00	0,6667
BS86	26,50	12,50	0,4717	27,50	10,00	0,3636
BS87	22,00	8,00	0,3636	61,00	12,00	0,1967
BS117	2,00	0,00	0,0000	20,00	9,00	0,4500
BS119	12,50	21,00	1,6800	26,00	9,00	0,3462
BS 17	19,00	0,00	0,0000	39,00	56,00	1,4359
B910	12,00	0,00	0,0000	59,00	0,00	0,0000
B912	9,00	0,00	0,0000	20,00	0,00	0,0000
B933	13,00	0,00	0,0000	34,00	0,00	0,0000
B934	14,00	0,00	0,0000	40,00	70,00	1,7500
BC42	20,00	0,00	0,0000	46,00	66,00	1,4348
V552	12,50	18,00	1,4400	32,00	16,00	0,5000
V685	10,00	0,00	0,0000	32,00	14,00	0,4375
V693	10,00	0,00	0,0000	20,00	0,00	0,0000
V705	11,00	0,00	0,0000	34,00	36,00	1,0588
V832	20,00	0,00	0,0000	33,00	59,00	1,7879
V835	18,00	0,00	0,0000	40,00	54,00	1,3500
V836	18,00	0,00	0,0000	34,00	47,00	1,3824
V841	12,00	0,00	0,0000	30,00	71,00	2,3667
Médias	13,50	3,31	0,2360 B	32,76	26,74	0,7905 A

Nota: *IA corresponde ao índice de atividade celulolítica, que mede a relação do diâmetro do halo de degradação da celulose microcristalina pelo diâmetro da colônia. Médias de IA com letras distintas diferem estatisticamente pelo teste não paramétrico de Wilcoxon com valor de $p < 0,05$.

A TAB. 16 descreve as médias dos índices de atividade celulolítica nos tempos de incubação um (24 h) e dois (48 h) para os cinco gêneros mais frequentes nas amostras avaliadas. Analisando os resultados dos índices de atividade enzimática para o tempo de 48 h de incubação, pôde-se observar que os isolados do gênero *Rhizophus* foram os que apresentaram médias significativamente menores, quando comparadas às do gênero *Aspergillus*.

Esse resultado sugere que fungos desse gênero são mais eficientes na degradação enzimática da celulose, quando comparados aos do gênero *Rhizopus*.

TABELA 16

Atividade celulolítica média de isolados de diferentes gêneros de fungos provenientes do trato digestório de bovinos leiteiros, alimentados com forragens tropicais, após o cultivo em meio contendo celulose microcristalina a 1% com 24 e 48 h de incubação

Gêneros	IA* 24 horas	IA 48 horas
<i>Aspergillus</i> (n=27)	0,2855	0,7494
<i>Gliocladium</i> (n=4)	0,0250	0,5294
<i>Paecilomyces</i> (n=6)	0,0004	1,1149
<i>Rhizopus</i> (n=9)	0,0156	0,2116**
<i>Scedosporium</i> (n=3)	0,0001	0,5333

Nota: *IA: índice de atividade celulolítica, que mede a relação do diâmetro do halo de degradação da celulose microcristalina (mm) pelo diâmetro da colônia do fungo (mm).

** Indica diferença estatisticamente menor na média de IA, utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), em comparação com os resultados obtidos para *Aspergillus* spp.

Pesquisas que avaliaram a atividade celulolítica de bactérias isoladas a partir de amostras de fluido ruminal indicaram efetiva capacidade desses microrganismos em degradar a celulose microcristalina. Foram utilizados as cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Bacteroides succinogenes* e *Eubacterium cellulosolvens* (TEATHER; WOOD, 1982). Entretanto os halos de área de degradação de celulose desses microrganismos foram menores do que os halos das amostras avaliadas neste estudo. Enquanto os halos das bactérias apresentaram-se em torno de 1,5 cm às 16 h de incubação, com aumento semanal de um a dois milímetros por semana, os fungos apresentaram diâmetro médio de 3,31 cm às 24 h de incubação e, após 48 h, passou a ser de 26,74 cm.

Oyeleke e Okusanmi (2008) estudaram a prevalência de fungos celulolíticos no fluido ruminal de cinco vacas, cinco ovelhas e cinco cabras. Esses autores observaram uma maior proporção desses microrganismos nas

amostras provenientes das vacas. Os gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor* foram os mais prevalentes para as espécies de ruminantes avaliadas e ambos apresentaram atividade celulolítica comprovada. Para as amostras isoladas especificamente, a partir do suco ruminal das vacas, o gênero *Mucor* foi o mais prevalente, correspondendo a 42,9% dos isolados, seguido de *Aspergillus flavus*, que foi identificado para 28,6% dos isolados.

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

Em contrapartida, amostras de *Paecilomyces lilacinus* isoladas do sistema digestório de tainhas (*Aldrichetta forsteri*) demonstraram capacidade de desenvolver-se tanto em meio aeróbio quanto em meio anaeróbio, embora a produção enzimática fosse maior e mais eficaz em presença de oxigênio (MOUNTFORT; RHODES, 1991).

6.2.5 Considerações gerais sobre a quantificação e a identificação dos microrganismos aeróbios presentes no líquido ruminal dos animais

Os resultados das quantificações de microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos no líquido ruminal dos animais, consumindo forragens tropicais, revelaram variações populacionais ocasionadas pela dieta ou atribuídas possivelmente à idade e à maturidade dos animais. As concentrações médias para Enterobacteriaceae variaram de $1,4 \times 10^5$ a $2,1 \times 10^8$ UFC ml⁻¹, enquanto que, para as leveduras e os fungos micelianos, as concentrações foram de $3,5 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^6$ UFC ml⁻¹ e $3,6 \times 10^4$ a $8,8 \times 10^5$ UFC ml⁻¹, respectivamente. Essas médias de concentrações desses microrganismos, observadas para os diferentes tratamentos são elevadas, tendo em vista que os animais estavam em jejum ou restrição alimentar antes das coletas e podem sugerir uma participação efetiva desses microrganismos

no ecossistema ruminal desses bovinos.

O resultado geral das análises microbiológicas do fluido ruminal e das fezes dos grupos de animais avaliados nesta pesquisa é apresentado no QUADRO 3.

QUADRO 3

Microrganismos identificados em maior prevalência nos diferentes grupos avaliados nesta investigação científica

Grupo	Fungos micelianos	Leveduras	Enterobacteriaceae
Vacas capim	<i>Aspergillus</i> spp.	-	<i>Enterobacter</i> spp.
Vacas silagem	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Candida krusei</i>	<i>Klebsiella</i> spp.
Bezerras silagem	<i>Aspergillus</i> spp. e <i>Rhizopus</i> spp.	<i>Candida krusei</i>	<i>Enterobacter</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Proteus</i> spp e <i>Alcaligenes</i> spp.
Bezerras cana	<i>Paecilomyces</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp. e <i>Rhizopus</i> spp.	-	<i>Enterobacter</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp. e <i>Proteus</i> spp

Observa-se que ambos os grupos de bezerras apresentaram maior diversidade de gêneros prevalentes para fungos micelianos e para Enterobacteriaceae. Esse fato poderia ser justificado pela imaturidade do nicho rúmen, que se apresenta, em animais jovens, instável e com populações microbianas ainda em estabelecimento (LACAZ *et al.*, 1992).

O gênero *Aspergillus* apresentou-se com maior frequência em todos os grupos estudados, à exceção do grupo de bezerras alimentadas com cana picada e ureia. Todavia, o número de indivíduos identificados neste grupo foi ainda restrito, sendo necessária uma avaliação com maior número de isolados. Esses fungos foram também os que apresentaram maior atividade celulolítica. Esses dados tornam-se relevantes frente às consistentes publicações referentes à utilização da espécie *A. oryzae*, ou de seus extratos, no ambiente ruminal.

Dentre os gêneros da família Enterobacteriaceae, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Proteus*, foram identificados nos quatro tratamentos avaliados nesta pesquisa, sendo que os dois primeiros foram os gêneros

mais prevalentes. As implicações e as interações desses microrganismos no ambiente ruminal ainda não são totalmente elucidadas. Sabe-se que atuam de forma efetiva e benéfica na redução do oxigênio ruminal (LACAZ *et al.*, 1992). Estudos considerando a participação na nutrição e na saúde dos animais, bem como a saúde pública, devem ser elaborados, uma vez que são importantes agentes de toxinfecções alimentares e infecções hospitalares, carreando genes de multirresistências às drogas antibacterianas (BLACK, 2002).

7 CONCLUSÃO

Os dados obtidos a partir do exame micológico direto indicaram a presença de estruturas fúngicas em todas as amostras de vacas alimentadas em *B. brizantha*. Essa taxa de positividade foi significativamente menor para as vacas alimentadas com silagem de sorgo (33%).

As populações de Enterobacteriaceae e de leveduras no líquido ruminal de bezerras alimentadas com cana foram significativamente maiores quando comparadas com as dos outros grupos avaliados. Entretanto, esses animais apresentaram menor concentração de fungos micelianos no líquido ruminal amostrado.

Fungos do gênero *Aspergillus* foram os mais frequentemente identificados entre os isolados, provenientes do suco ruminal e das fezes. Entre os animais alimentados com silagem de sorgo, a ocorrência de *Rhizopus* foi maior para as bezerras do que para as vacas.

A análise da atividade celulolítica dos isolados de *Aspergillus* spp. indicou uma maior capacidade de degradação da celulose no tempo de 48h, em relação a 24h de incubação. Isolados de *Rhizopus* spp. apresentaram atividade inferior àquela observada para os isolados de *Aspergillus* spp.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, F. O.; NOGUEIRA, F. A.; ROSA, C. A., MEDEIROS, A. O.; DUARTE, E. R. Detecção de fungos anaeróbios do rumen de caprinos e bovinos de corte criados no norte de Minas Gerais, Brasil. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ZOOTECNISTAS - ABZ, 2008, João Pessoa. **Anais ZOOTEC 2008**. João Pessoa: Associação Brasileira de Zootecnistas, 2008. 1 CD.

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL - AFRC. **Energy and protein requirements of ruminants**. Cambridge: CAB International, Cambridge University Press, 1993. 159 p. *apud* CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J. T.; SOUZA, A. L.; VELOSO, R. G. Eficiência microbiana e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas à base de volumosos tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p. 919-925, 2008.

AKHMANOVA, A.; VONCKEN, F. G. J.; HARHANGI, H.; HOSEA, K. M.; VOGELS, G. D.; HACKSTEIN, J. H. P. Cytosolic enzymes with a mitochondrial ancestry from the anaerobic chytrid *Piromyces* sp. E2. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 1017-1027, Dec. 1998.

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

ATANASOVA-PANCEVSKA, N.; KUNGULOVSKI, D. Comparison of morphological and enzyme characteristics of anaerobic fungi isolated from *Cervus dama*. **Central European Journal of Biology**, v. 3, p. 69-74, Mar. 2008.

AUNG, A.; NGWE, T.; MEULEN, U.; GESSLER, F.; BÖHNEL, H. Control of *Leucaena* toxicosis in Myanmar using IBT-Goettinger Bioreactor grow mimosine degrading ruminal *Klebsiella* spp. In: **TROPENTAG 2006**: Conference on International Agricultural Research for Development. Alemanha: University of Bonn, 2006. Disponível em: < <http://www.tropentag.de/2006/abstracts/full/202.pdf>>. Acesso em: 23 fev. 2010.

BALL STATE UNIVERSITY. **MSA Slides**. USA: Ball State University, 2000. Disponível em: <<http://www.bsu.edu/classes/ruch/msa/wubah/10-10.jpg>>. Acesso em: 24 out. 2009.

BARBOSA, J. D.; ÁVILA, S. C.; DIAS, R. V. C.; PFEIFER, I. B.; OLIVEIRA, C. M. C. Estudo comparativo de algumas provas funcionais do fluido ruminal e de metabólitos sanguíneos de bovinos e bubalinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 33-37, 2003.

BARRETO-BERGTER, E.; SASSAKI, G. L.; WAGNER, R.; SOUZA, L. M.; SOUZA, M. V. A. R.; PINTO, M. R.; SILVA, M. I. D.; GORIN, P. A. J. The opportunistic fungal pathogen *Scedosporium prolificans*: carbohydrate epitopes of its glycoproteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, n. 2, p. 93-102, Mar. 2008.

BATA, J.; GERBI, C. Glycoside hydrolase production by an anaerobic rumen fungus *Caecomyces communis*. **Research in Microbiology**, v. 148, n. 3, p. 263-269, Mar./Apr. 1997.

BAUCHOP T. The rumen anaerobic fungi: colonizers of plant fibre. **Journal Annales de Recherches Veterinaires**, v. 10, p. 246-248, 1979.

BIENVENU, A. L.; RIGOLLET, L.; MARTINS-CARVALHO, C.; TRUY, E.; PICOT, S. Un cas d'otite externe compliquee d'une osteolyse due a *Scedosporium apiospermum*. **Journal of Medical Mycology**, v. 19, n. 2, p. 129-133, June, 2009.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 856 p.

BLUM, D. L.; LI, X. L.; CHEN, H.; LJUNGDAHL, L.G. Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. strain PC-2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3990-3995, Sep. 1999.

BODEY, G. P.; MARDANI, M.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; ABBAS, J.; GIRGAWY, E.; HACHEM, R. Y.; KONTOYIANNIS, D. P.; RAAD, I. I. The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer. **American Journal of Medicine**, v. 112, n. 5, p. 380-385, Apr. 2002.

BORGES, N. C.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTI, M. C. S.; CUNHA, P. H. J.; MORAES, R. R.; GUIMARÃES, P. L.; MARTINS, M. E. P. Avaliação do suco ruminal de bovinos "a fresco" e após 12 horas de conservação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 57-63, 2002.

BOXMA, B.; VONCKEN, F.; JANNINK, S.; VAN ALEN, T.; AKHMANOVA, A.; VAN WEELDEN, S. W. H.; VAN HELLEMOND, J. J.; RICARD, G.; HUYNEN, M.; TIELENS, A. G. M.; HACKSTEIN, J. H. P. The anaerobic chytridiomycete fungus *Piromyces* sp. E2 produces ethanol via pyruvate:formate lyase and an alcohol dehydrogenase E. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 5. p. 1389-1399, Mar. 2004.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; ARAUJO, J. M.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 686-688, nov./dez, 2008.

BROOKMAN, J. L.; MENNIM, G.; TRINCI, A. P.; THEODOROU, M. K.; TUCKWELL, D. S. Identification and characterization of anaerobic gut fungi using molecular methodologies based on ribosomal ITS1 and 18S rRNA. **Environmental Microbiology**, v. 146, p. 393-403, 2000.

CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; ZERVOUDAKIS, J. T.; SOUZA, A. L.; VELOSO, R. G. Eficiência microbiana e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas à base de volumosos tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p. 919-925, 2008.

CAMPOS, R.; GONZALEZ, F.; COLDEBELLA, A.; CARDOSO, F. Indicadores do ambiente ruminal e suas relações com a composição do leite e células somáticas em diferentes períodos da primeira fase da lactação em vacas de alta produção. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 525-530, mar./abr. 2006.

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

CERDÀ, A. R. **Fermentación ruminal, degradación protéica y sincronización energía-proteína en terneras en cebo intensivo**. 2003. 208 f. Tesis (Doctor en Veterinaria) – Programa de Producción Animal, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2003.

CHARNOCK, S. J.; BOLAM, D. N.; NURIZZO, D.; SZABÓ, L.; McKIE, V. A.; GILBERT, H. J.; DAVIES, G. J. Promiscuity in ligand-binding: The three-dimensional structure of a *Piromyces* carbohydrate-binding module, CBM29-2, in complex with cellobiose and mannohexaose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)**, v. 99, n. 22, p. 14077-14082, Oct. 2002.

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

CHEN, H.; TSAI, S. D.; CHENG, H. L.; CHIEN, C. Y.; HU, C. Y.; CHENG, T. Y. CelF of *Orpinomyces* PC-2 has an Intron and encodes a cellulase (CelF) containing a carbohydrate-binding module. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, United States, v. 108, p. 775-785, Mar. 2003.

CHEN, Y. C.; TSAI, S. D.; CHENG, H. L. *Caecomycetes sympodialis* sp. nov., a new rumen fungus isolated from *Bos indicus*. **Mycologia**, v. 99, n. 1, p. 125-130, 2007.

CHRISTENSEN, K. **Biology of the Goat: the biology of the goat**. Scientific Animation & Illustration, 2004. Animação. Disponível em: <www.goatbiology.com/animations/funguslc.html>. Acesso em: 3 mar. 2008.

CHROMEK, M.; STANKOWSKA, D.; DADFAR, E.; KACA, W.; RABBANI, H.; BRAUNER, A. Interleukin-8 response in cells from the human urinary tract induced by lipopolysaccharides of *Proteus mirabilis* O3 and O18. **Journal of Urology**, v. 173, n. 4, p. 1381-1384, Apr. 2005.

COKER, C.; POORE, C. A.; LI, X.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 12, p. 1497-1505, Oct. 2000.

CUNHA, F. F.; SOARES, A. A.; PEREIRA, O. G.; MANTOVANI, E. C.; SEDIYAMA, G. C.; ABREU, F. V. S. Composição bromatológica e digestibilidade “*in vitro*” da matéria seca do capim tanzânia irrigado. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, p. 25-33, abr./jun. 2007.

DACKS, J. B.; DYAL, P. L.; EMBLEY, T. M.; VAN DER GIEZEN, M. Hydrogenosomal succinyl-CoA synthetase from the rumen-dwelling fungus *Neocallimastix patriciarum*; an energy-producing enzyme of mitochondrial origin. **Gene**, London, v. 373, n. 1-2, p. 75-82, May, 2006.

DALRYMPLE, B. P.; CYBINSKI, D. H.; LAYTON, I.; McSWEENEY, C.; XUE, G. P.; SWADLING, Y. J.; LOWRY, J. B. **Three *Neocallimastix patriciarum* esterases associated with the degradation of complex polysaccharides are members of a new Family of Hydrolases.** *Microbiology*, v. 143, p. 2605-2614, 1997.

DANTAS, A. F. **Características da carcaça de ovinos Santa Inês terminados em pastejo e submetidos a diferentes níveis de suplementação.** 2006. 39 f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agrosilvipastoris no Semiárido) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural - UFCG, Campus de Patos – PB, 2006.

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

DEHORITY, B. A. Microbial interactions in the rumen. **Revista de La Facultad de Agronomía Luz**, v. 15, p. 69-86, 1998.

DEHORITY, B. A.; **Rumen microbiology.** Nottingham: Nottingham University Press, 2nd ed. 2004. 372 p.

DEHORITY, B. A.; TIRABASSO, P. A. Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, N. 7, p. 2921–2927, July, 2000.

DIJKERMAN, R.; LEDEBOER, J.; VERHAPPEN, A. B.; DEN CAMP, H. J.; DER DRIFT, C. V.; VOGELS, G. D. The anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2: nitrogen requirement and enzymes involved in primary nitrogen

metabolism. **Archives of Microbiology**, Khorea, v. 166, n. 6, p. 399-404, Jan. 1997. Disponível em: <www.springerlink.com/content/mrkc8p37mx199byk>. Acesso em: 15 nov. 2008.

DIJKERMAN, R.; VERVUREN, M. B. F.; OP DEN CAMP, H. J. M.; VAN DER DRIFT, C. Adsorption characteristics of cellulolytic enzymes from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 on microcrystalline cellulose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 20-25, Jan. 1996.

DIJKSTRA, J.; FRANCE, J.; DAVIES, D. R. Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, p. 3370-3384, 1998.

DIRKSEN, G. **Rosenberger exame clínico dos bovinos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c1993. 419 p.

DIRKSEN, G. Sistema digestivo. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. (Ed.). **Rosenberger: exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. Cap. 7, p.167-169.

DUARTE, E. R.; LACHANCE, M. A.; HAMDAN, J. S. Identifications of atypical strains of *Malassezia* spp. from cattle and dog. Canadian **Journal of Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 749-752, Aug. 2002.

DUKES, H. H.; SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.

EKINCI, M. S.; OZKOSE, E.; AKYOL, I. Effects of sequential sub-culturing on the survival and enzyme activity of *Neocallimastix hurleyensis*. **Turkish Journal of Biology**, v. 30, p. 157-162, Mar. 2006.

ELAD, D., BRENNER, J., MARKOVICS A., YAKOBSON, B., SHLOMOVITZ, S., BASAN, J. Yeasts in the gastrointestinal tract of preweaned calves and possible involvement of *Candida glabrata* in neonatal calf diarrhea. **Mycopathologia**, v. 141, p. 7-14, 1998.

ERASMUS, L. J.; BOTHA, P. M.; KISTNER, A. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 11, p. 3056-3065, 1992.

FANUTTI, C.; PONYI, T.; BLACK, G. W.; HAZLEWOOD, G. P.; GILBERT, H. J. The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 29314-29322, Dec. 1995.

FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS – FAEMG. Secretaria de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais – SEAPA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – CEPEA. Serviço de Apoio às Micro e Pequenas

Empresas de Minas Gerais - SEBRAE MINAS. **O PIB do Agronegócio Mineiro**. 2007. Cartilha. Disponível em: <<http://www.agricultura.mg.gov.br/pib.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2008.

FLIEGEROVÁ, K.; PAZOUTOVÁ, S.; MRÁZEK, J.; KOPECNY, J. Special Properties of Polycentric Anaerobic Fungus *Anaeromyces mucronatus*. **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 71, p. 441-444, 2002.

FLINT, H. J. Molecular genetics of obligate anaerobes from the rumen. **FEMS Microbiology Letters**, The Netherlands, v. 121, n. 17, p. 259-267, Jan. 1994. Disponível em: <www3.interscience.wiley.com/journal/119277032/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>. Acesso em: 6 mar. 2008.

FLIPPHI, M.; SUN, J.; ROBELLET, X.; KARAFFA, L.; FEKETE, E.; ZENG, A. P.; KUBICEK, C. P. Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 1, p. S19-S44, Mar. 2009. Suplemento 1.

FONDEVILA, M.; DEHORITY, B. A. Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 3, p. 678-684, 1996.

FONTY, G.; GOUET, P. H. Plant cell wall degradation by anaerobic fungi. In: PRINS, R. A.; STEWART, C. S. (Eds.). **Micro-organisms in ruminant nutrition**. Dalfsen: Nottingham University Press, 1994. Cap. 8, p. 97-112.

FONTY, G.; JOBLIN, K.N. Rumen Anaerobic Fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. In: TSUDA, T.; SASAKI, Y.; KAWASHIMA, R. (Eds.). **Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 655-680.

GAASTRA, W.; VAN OOSTEROM, R. A. A.; PIETERS, E. W. J.; BERGMANS, H. E. N.; VAN DIJK, L.; AGNES, A.; TER HUURNE, H. M. Isolation and characterisation of dog uropathogenic *Proteus mirabilis* strains. **Veterinary Microbiology**, v. 48, n. 1-2, p. 57-71, 1996.

GARRETT, E. F.; PEREIRA, M. N.; NORDLUND, K. V.; ARMENTANO, L. E.; GOODGER, W. J.; OETZEL, G. R. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1170-1178, 1999.

GERBI, C.; BATA, J.; BRETON, A.; PRENSIER, G. Polysaccharide hydrolase production by the rumen fungus *Caecomyces communis*. **Research in Microbiology**, v. 147, n. 5, p. 363-370, May, 1996.

GERDES, L.; WERNER, J. C.; COLOZZA, M. T.; POSSENTI, R. A.; SCHAMMASS, E. A. Avaliação de características de valor nutritivo das gramíneas forrageiras marandu, setária e tanzânia nas estações do ano.

Revista Brasileira de Zootecnia, v. 29, n. 4, p. 955-963, 2000.

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

GÓES, R. H. T. B.; MARSON, E. P. Leveduras e enzimas na alimentação de ruminantes. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, n. 43, p. 46-66, 2004.

GORDON, G. L. R.; PHILLIPS, M. W. The role of anaerobic gut fungi in ruminants. **Nutrition Research Reviews**, v. 11, p. 133-168, 1998.

GUARRO, J.; DEL PALACIO, A.; GENÉ, J.; CANO, J.; GONZÁLEZ, C. G. A case of colonization of a prosthetic mitral valve by *Acremonium strictum*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 2, p. 146-148, jun. 2009.

HAJDENWURCEL, J. R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte Comunicações, 1998. v. 1. 58 p.

HARHANGI, H. R.; FREELove, A. C. J.; UBHAYASEKERA, W.; VAN DINTHER, M.; STEENBAKKERS, P. J. M.; AKHMANOVA, A.; VAN DER DRIFT, C.; JETTEN, M. S. M.; MOWBRAY, S. L.; GILBERT, H. J.; OP DEN CAMP, H. J. M. Cel6A, a major exoglucanase from the cellulosome of the anaerobic fungi *Piromyces* sp. E2 and *Piromyces equi*. **Biochimica et Biophysica Acta: Gene Structure and Expression**, United States, v. 1628, p. 30-39, July, 2003.

HARMON, B. G.; BROWN, C. A.; TKALCIC, S.; MUELLER, P. O.; PARKS, A.; JAIN, A. V.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Fecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 6, p. 574-579, June, 1999.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHNDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, H. T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERS, J. A.; VILGALYS, R.; AIME, M. C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G. L.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; DAI, Y. C.; GAMS, W.; GEISER, D. M.; GRIFFITH, G. W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D. L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R. A.; HYDE, K. D.; IRONSIDE, J. E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C. P.; LARSSON, K. H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J. M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGERS, J. D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHÜßLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R. G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.;

YAO, Y. J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, May. 2007.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C.; COUTINHO, A. S.; LOPES, C. M. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c2003. 446 p.

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

HODROVÁ, B.; KOPEČNÝ, J.; KAS, J. Cellulolytic enzymes of rumen anaerobic fungi *Orpinomyces joyonii* and *Caecomyces communis*. **Research in Microbiology**, v. 149, n. 6, p. 417-427, June, 1998.

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3630-3644, 1991.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488 p.

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

KOPEČNÝ, J.; HODROVÁ, B. Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 312-316, May, 1995.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 4th ed. rev. and enlarged. Amsterdam: Elsevier, c1998. 1055 p.

LACAZ, C. S.; MELO, N. T.; HEINS-VACCARI, E. M.; MARTINS, J. E. C.; PORTO, E. **Tratado de micologia médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.

LACHANCE, M. A., BOWLES, J.M., STARMER, W.T. BARKER, S. F. *Kodamea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 172-177, 1999 *apud* DUARTE, E. R.; LACHANCE, M. A.; HAMDAN, J. S. Identifications of atypical strains of *Malassezia* spp. from cattle and dog. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 749-752, Aug. 2002.

LAVEZZO, O. E. N. M.; LAVEZZO, W.; WECHSLER, F. S. **Estádio de desenvolvimento do milho**. 3: avaliação de silagens por intermédio de parâmetros de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 1, p. 171-178, 1998.

LEE, S. S.; CHOI, C. K.; AHN, B. H.; MOON, Y. H.; KIM, C. H.; HA, J. K. *In vitro* stimulation of rumen microbial fermentation by a rumen anaerobic fungal culture. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, n. 3-4, p. 215-226, 2004.

LI, X. L.; LJUNGDAHL, L. G.; XIMENES, E. A.; CHEN, H.; FELIX, C. R.; COTTA, M. A.; DIEN, B. S. Properties of a recombinant β -glucosidase from polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and its application for cellulose hydrolysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, Alemanha, v. 113, p. 233-250, Mar. 2004.

LISBOA, B. B.; BOCHESE, C. C.; VARGAS, L. K.; SILVEIRA, J. R. P.; RADIN, B.; OLIVEIRA, A. M. R. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1255-1260, set./out. 2007.

LIU, J.-H.; TSAI, C.-F.; LIU, J.-W.; CHENG, K.-J.; CHENG, C.-L. The catalytic domain of a *Piromyces rhizinflata* cellulase expressed in *Escherichia coli* was stabilized by the linker peptide of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, United States, v. 28, n. 7-8, p. 582-589, May 7, 2001.

LOPES, F. C. F.; AROEIRA, L. J. M.; ARCURI, P. B.; DAYRELL, M. S.; VITTORI, A. Efeitos da defaunação em ovinos alimentados com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.) adicionada de uréia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 180-182, 2002.

LOPES, V. R. O.; SOUZA, C. G.; AMORIM, M. V. F. S.; MARTINS, C. M.; PINTO, G. A. S. Análise Enzimática de Fungos Isolados de Solo de Manguezal. ENCONTRO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO, 9., Fortaleza, 2009. **Anais...** Fortaleza, 2009.

LOWE, S. E.; THEODOROU, M. K.; TRINCI, A. P. Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1216-1223, 1987.

LUND, A. Yeasts and moulds in the bovine rumen. **Journal of General Microbiology**, v. 81, p. 453-462, 1974.

MARTILLOTTI, F.; TERRAMOCCIA, S.; TRIPALDI, C.; PUPPO, S.; DANESE, V. Microbial and chemical characterization of rumen contents of grazing dairy cows. In: PRINS, R. A.; STEWART, C. S. (Eds.). **Micro-organisms in Ruminant Nutrition**. Dalfsen: Nottingham University Press, 1994. Cap. 4, p. 43-48.

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

MCALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; CHENG, K. J. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Eds.) **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxon: Cab International, 2001. Cap. 11, p. 273-298.

MCCULLOUGH, M. J.; ROSS, B. C.; READE, P. C. *Candida albicans*: A review of its history, taxonomy, epidemiology virulence attributes, and methods of strain differentiation. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 25, n. 2, p. 136-144, Apr. 1996.

MCEVOY, J. M.; DOHERTY, A. M.; SHERIDAN, J. J.; BLAIR, I. S.; MCDOWELL, D.A. The prevalence of *Salmonella* spp. in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94, n. 4, p. 693-700, 2003.

MESTA, L.; HEYRAUD, A.; JOSELEAU, J. P.; COULET, P. R. Catalytic properties of endoxylanase fusion proteins from *Neocallimastix frontalis* and effect of immobilization onto metal-chelate matrix. **Journal of Biotechnology**, Germany, v. 101, p. 253-265, Mar. 2003.

MIR, Z.; MIR, P. S. Effect of the addition of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth and carcass quality of steers fed high-grain diets and on feed digestibility and in situ degradability. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 3, p. 537-545, 1994.

MIRANDA NETO, E. G.; AFONSO, J. A. B.; MENDONCA, C. L.; ALMEIDA, M. Z. P. R. B. Estudo clínico e características do suco ruminal de caprinos com acidose láctica induzida experimentalmente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n.2, p. 73-78, abr./jun. 2005.

MNGADI, P. T.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Co-occurring mycotoxins in animal feeds. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 13, p. 2239-2243, July, 2008.

MOO, D.; O'BOYLE, D.; MATHERS, W.; FROST, A. J. The isolation of *Salmonella* from jejunal and caecal lymph nodes of slaughtered animals. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, n. 4, p. 181-183, Apr. 1980.

MOREIRA, A. L.; PEREIRA, O. G.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S. C.; CAMPOS, J. M. S.; SOUZA, V. G.; ZERVOUDAKIS, J. T. Produção de leite, consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes, pH e concentração de amônia ruminal em vacas lactantes recebendo rações contendo silagem de milho e feno de alfafa e de capim-coastcross. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 1089-2001, maio/jun. 2001. Suplemento 1.

MOREIRA, J. N.; LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; ARAÚJO, G. G. L.; SILVA, G. C. Potencial de Produção de Capim Buffel na Época Seca no Semi-Árido Pernambucano. **Revista Caatinga**, v. 20, n. 3, p. 22-29, jul./set. 2007.

MORGAVI, D. P.; SAKURADA, M.; TOMITA, Y.; ONODERA, R. Presence in rumen bacterial and protozoal populations of enzymes capable of degrading fungal cell walls. **Microbiology**, v. 140, p. 631-636, 1994.

MOUNTFORT, D. O.; ASHER, R. A. Production of α -Amylase by the Ruminal Anaerobic Fungus *Neocallimastix frontalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2293-2299, Sep. 1988.

MOUNTFORT, D. O.; RHODES, L. L. Anaerobic growth and fermentation characteristics of *Paecilomyces lilacinus* isolated from mullet gut. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 1963-1968, July, 1991.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, c2006. 979 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academy of Sciences. 2001. 408 p.

NEWBOLD, C. J.; HILLMAN, K. The effect of ciliate protozoa on the turnover of bacterial and fungal protein in the rumen of sheep. **Letters in Applied Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 100-102, 1990.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; CHEN, X. B. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1811-1818, 1995.

NOLAN, J. V.; LENG, R. A. Dynamic aspects of ammonia and urea metabolism in sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 27, p. 177-194, 1972.

O'BRIEN, M.; O'KIELY, P.; FORRISTAL P. D.; FULLER H. T. Visible fungal growth on baled grass silage during the winter feeding season in Ireland and silage characteristics associated with the occurrence of fungi. **Animal Feed Science and Technology**, v. 139, n. 3-4, p. 234-256, Dec. 2007.

O'BRIEN, M.; O'KIELY, P.; FORRISTAL, P. D.; FULLER, H. T. Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, n. 2, p. 131-135, June, 2005.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista Eletrônica de Veterinária**, Espanha, v. 8, n. 1, jun. 2007. Disponível em: <www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060607/060703.pdf>. Acesso em: 8 jan. 2008.

ORPIN, C. G. Anaerobic Fungi: Taxonomy, biology, and distribution in nature. In: MOUNTFORT, D. O., ORPIN, C. G. (Eds.) **Anaerobic Fungi: biology, ecology and function**. New York: Marcel Dekker, 1994. Cap. 1, p. 1-46.

ORSKOV, E. R. **Protein nutrition in ruminants**. 2nd ed. San Diego: Academic, 1986. 175 p.

OSTLING, C.; LINDGREN, S. Influences of enterobacteria on the fermentation and aerobic stability of grass silages. **Grass and Forage Science**, v. 50, n. 1, p. 41-47, Apr. 2006.

OYELEKE, S. B., OKUSANMI, T. A. Isolation and characterization of cellulose hydrolyzing microorganism from the rumen of ruminants. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 10, p. 1530-1504, May. 2008.

OZKOSE, E.; THOMAS, B. J.; DAVIES, D. R.; GRIFFITH, G. W.; THEODOROU, M. K. *Cyllamyces aberensis* gen.nov. sp.nov., a new anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle. **Canadian Journal of Botany**, v. 79, n. 6, p. 666-673, 2001.

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

PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 32, p. 97-100, 1972.

PIRT, S. J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. **Proceedings of Royal Society**, n. 163, p. 224- 231, 1965.

PIVA, G.; BELLADONA, S.; FUSCONI, G. Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 9, p. 2717-2722, 1993.

PLATA, F. P.; GONZALEZ, S. S.; MENDOZA, G. Effect of a yeast culture *Saccharomyces cerevisiae* on nutritive value of oat straw based diets fed to Holstein steers. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 288, 1993. Suplemento 1.

RADOSTITIS, E. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine**, 9th ed. London: W. B. Saunders, 2000. 1881 p.

RIBEIRO, K. G.; GARCIA, R.; PEREIRA, O. G.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R. Eficiência microbiana, fluxo de compostos nitrogenados no abomaso, amônia e pH ruminais, em bovinos recebendo dietas contendo feno de capim-tifton 85 de diferentes idades de rebrota. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 581-588, 2001.

RICHARD, E.; HEUTTE, N.; BOUCHART, V.; GARON, D. Evaluation of fungal contamination and mycotoxin production in maize silage animal feed. **Science and Technology**, v. 148, n. 2-4, p. 309-320, Jan. 2009.

RUGAI, E.; ARAÚJO, A. Meio de cultura para identificação presuntiva de bacilos Gram-negativos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 28, p. 79-83, 1968.

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

RUSSELL, J. B. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 7, p. 1955-1963, 1998.

RUSSELL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; SNIFFEN, C. J. A net carbohydrate and protein system for evaluation cattle diets: I ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3551-3561, 1992.

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

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 295-310, 1994.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 1998. 221 p.

SCHMIDT, J. A.; ALBRIGHT, S.; TSAI, K.-P.; CALZA, G. M.; CHANG, J. S.; CALZA, R. E. Characterization of *Aspergillus oryzae* fermentation extract effects on the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*, EB 188. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 63, n. 4, p. 422-430, Jan. 2004.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: Ed. UFV, 2002. 235 p.

SISTEMA PARA ANÁLISES ESTATÍSTICAS – SAEG. **Versão 9.1**: Fundação Arthur Bernardes. Viçosa: UFV, 2007.

SPANAMBERG, A., SANCHES, E. M. C., SANTURIO, J. M., FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 282-290, ago. 2009.

SRINIVASAN, K.; MURAKAMI, M.; NAKASHIMADA, Y.; NISHIO, N. Efficient production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*, in a repeated batch culture. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 2, p.153-158, 2001.

SRIWANTHANA, B.; ISLAND, M. D.; MOBLEY, H. L. T. **Sequence** of the *Proteus mirabilis* urease accessory gene ureG. **Gene**, v. 129, n. 1, p. 103-106, July, 1993.

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

TABELEÃO, V. C.; GOULART, M. A.; SCHWEGLER, E.; WEISER, M. A.; MOURA, S. V.; SILVA, V. M.; PEREIRA, V. S.; PINO, F. A. B.; CORRÊA, M. N. Avaliação ruminal e metabólica de bovinos machos e fêmeas, mantidos em sistema de semi-confinamento. **Archivos de Zootecnia**, v. 57, n. 218, p. 147-154. 2008.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777-780, Apr. 1982.

THEODOROU, M. K.; MENNIM, G.; DAVIES, D. R.; ZHU, W.-Y.; TRINCI, A. P. J.; BROOKMAN, J. L. Anaerobic fungi in the digestive tract of mammalian herbivores and their potential for exploitation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 55, n. 3, p. 913-926, 1996.

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

TRIPATHI, V. K.; TRIPATHI, V. K.; SEHGAL, J. P.; PUNIYA, A. K.; SINGH, K. Hydrolytic Activities of Anaerobic Fungi from Wild Blue Bull (*Bosephalus tragocamelus*). **Anaerobe**, v. 13, n. 1, p. 36-39, Feb. 2007.

TUCKWELL, D. S.; NICHOLSON, M. J.; MCSWEENEY, C. S.; THEODOROU, M. K.; BROOKMAN, J. L. The rapid assignment of ruminal fungi to presumptive genera using ITS1 and ITS2 RNA secondary structures to produce group-specific fingerprints. **Microbiology**, v. 151, p. 1557-1567, 2005.

VAN KESSEL, J. S.; RUSSELL, J. B. The effect of amino nitrogen on the energetics of ruminal bacteria and its impact on energy spilling. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 7, p. 1237-1243, 1996.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. D.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharide in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

VELEZ, J. **Hongos**. 2008. Disponível em: <<http://www.academic.uprm.edu/~jvelezg/Hongos.ppt>>. Acesso em: 30 mar. 2008.

VONCKEN F. G. J.; BOXMA, B.; VAN HOEK, A. H. A. M.; AKHMANOVA, A. S.; VOGELS, G. D.; HUYNEN, M.; VEENHUIS, M.; HACKSTEIN, J. H. P. A hydrogenosomal [Fe]-hydrogenase from the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. L2. **Gene**, United States, v. 284, p.103-112, Feb. 2002.

WALLACE, R. J. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal Animal Science**, v. 72, n. 11, p. 2992-3003, Apr. 1994.

WESSOLOSSKY, M.; HARAN, J. P.; BAGCHI, K. *Paecilomyces lilacinus* olecranon bursitis in an immunocompromised host: case report and review. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, n. 3, p. 354-357, July, 2008.

WILLIAMS, A. G.; JOBLIN, K. N.; FONTY, G. Interactions between the rumen chytrid fungi and other microorganisms. In: MOUNTFORT, D. O., ORPIN, C. G. (Eds.) **Anaerobic fungi: biology, ecology and function**. New York: Marcel Dekker, 1994. Cap. 7, p. 191-228.

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

WOHLT, J. E.; FINKELSTEIN, A.D.; CHUNG, C. H. Yeast culture to improve intake digestibility nutrient, and performance by dairy cattle during early lactation. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 4, p.1395- 1400, 1991.

XIMENES, E. Fungos Anaeróbios. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n. 2, p. 269-275, 2003.

YUE, Q.; YANG, H. J.; CAO, Y. C.; ZHANG, D. F.; JIANG, Y. H.; WANG, J. Q. Feruloyl and acetyl esterase production of an anaerobic rumen fungus *Neocallimastix* sp. YQ2 effected by glucose and soluble nitrogen supplementations and its potential in the hydrolysis of fibrous feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 153, n. 3, p. 263-277, Set. 2009.