

# Caracterização físico-química e microbiológica e população de fungos no conteúdo ruminal de novilhos de corte hígidos ou com acidose ruminal\*

Flávia Oliveira Abrão<sup>1</sup>, Eduardo Robson Duarte<sup>2+</sup>, Ana Carolina de Araujo Nigri<sup>3</sup>, Maria Luiza França Silva<sup>3</sup>, Izabella Carolina Oliveira Ribeiro<sup>3</sup>, Kellerson Luiz da Silva<sup>3</sup>, Carlos Augusto Rosa e Norberto Mário Rodriguez<sup>1</sup>

**ABSTRACT.** Abrão F.O., Duarte E.R., Nigri A.C.A., Silva M.L.F., Ribeiro I.C.O., Silva K.L., Rosa C.A. & Rodriguez N.M. [Physicochemical and microbiological characterization and fungal population in the rumen contents of hidig beef steers or with ruminal acidosis.] Caracterização físico-química e microbiológica e população de fungos no conteúdo ruminal de novilhos de corte hígidos ou com acidose ruminal. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(1):7-14, 2015. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Universitária, 1000, Universitário, Montes Claros, MG 39404-006, Brasil. E-mail: duartevet@hotmail.com

In cattle fed with diets without vegetable fibers the development of fungi and other microorganisms in the rumen environment can be altered. The objective of this study was to evaluate physicochemical, microbiological characteristics and fungal population in the rumen contents of steers raised on lignified pasture or in feedlot without forage. The experimental design was completely randomized, 50 steers were randomly bred in mature pasture and 20 steers fed without forage. Immediately after collection of ruminal fluid, its physicochemical characteristics were evaluated. Micromorphological examination, direct examination for the detection of strict anaerobes fungi and culture, quantification, identification of aerobic fungi were performed. On direct examination, anaerobic fungi of the rumen, monocentric and polycentric were detected in similar proportions ( $P > 0.05$ ) for rumen fluid of steers raised in tropical pastures during the dry season. However, structures of these microorganisms were not identified for any of the samples obtained from steers fed without vegetal fiber. The average colony-forming units of aerobic fungi by ml of ruminal fluid from confined calves was significantly higher than that of animals raised on pasture ( $P < 0.05$ ). After microculture, the genus *Aspergillus* was the most frequently identified among the isolates obtained for both bovine groups. The ruminal environment of feedlot steers without forage is compatible with characteristics of rumen acidosis, showing absence of anaerobic ruminal fungi and yeasts and predominance of *Streptococcus* spp. and mycelian fungi.

**KEY WORDS.** Beef cattle. confinement, ruminal microflora, ruminant nutrition, *Brachiaria* spp.

---

\* Recebido em 7 de dezembro de 2012.

Aceito para publicação em 18 de fevereiro de 2014.

<sup>1</sup> Zootecnista, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil. E-mails: flavia\_abrao2005@yahoo.com.br; norberto.bhe@terra.com.br

<sup>2</sup> Médico-veterinário, DSc., Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Universitária, 1000, Montes Claros, MG 39404-006, Brasil. <sup>+</sup> Autor para correspondência, E-mail: duartevet@hotmail.com

<sup>3</sup> Curso de Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Universitária, 1000, Montes Claros, MG 39404-006. E-mails: carolnigri@hotmail.com; malu.franca89@gmail.com; kellerson\_silva@hotmail.com

<sup>4</sup> Biólogo, DSc., Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Presidente Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901. E-mail: carlosrosa@icb.ufmg.br

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

**PALAVRAS-CHAVE.** Pecuária de corte, confinamento, microbiota ruminal, nutrição de ruminantes, *Brachiaria* spp.

## INTRODUÇÃO

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

Ruminantes e a microbiota ruminal possuem relação simbiótica que permite a digestão da fibra

vegetal. Como os alimentos fibrosos são a base da alimentação dos ruminantes, o ecossistema microbiano passa a assumir fundamental importância (Stewart 1994, Oliveira et al. 2007). A população microbiana no rúmen está distribuída em grupos de microrganismos, os quais estabelecem entre si diversas interações positivas ou negativas. Essas relações garantem a utilização mais eficiente do alimento fornecido e, conseqüentemente, melhor desempenho animal (Dehority 2003, Kamra 2005).

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

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

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

Entretanto bovinos em terminação, frequentemente, são alimentados com alto teor de grãos e pouca fibra. Nessas condições, os mecanismos fisiológicos de homeostase são rompidos, ocorre redução do pH ruminal, alteração da ecologia microbiana e o animal pode ficar mais suscetível a doenças metabólicas e infecciosas (Russell & Rychlick 2001). A influência dessas dietas na população de fungos no trato gastrointestinal (TGI) de ruminantes tem sido pouco respaldada na literatura científica.

Dessa forma, objetivou-se, com o presente tra-

balho, avaliar a população de fungos no rúmen de novilhos de corte alimentados com forragens tropicais ou com dieta sem volumoso.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem, tratamentos e coletas

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

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

No segundo tratamento, foram avaliados 20 novilhos mestiços Nelore confinados durante 71 dias, sendo 11 dias para adaptação e 60 dias para período experimental. Antes da execução do experimento, esses animais estavam em pasto de *Brachiaria* spp. com suplementação mineral. Durante o período da pesquisa, receberam somente concentrado peletizado, vitamínico e mineral (15% da dieta) e grãos de milho inteiros (85% da dieta), com dois tratamentos diários. O consumo médio por animal por dia foi de 8,58kg. O produto comercial, na forma de peletes, era constituído por fosfato bicálcio, farelo de algodão, carbonato de cálcio, casca de soja moída, farelo de soja, sulfato de cálcio, ureia pecuária, monensina sódica e premix mineral vitamínico, como reportado pelo fabricante. A amostragem desse grupo de novilhos foi realizada no mês de maio, período de abate dos animais. A Tabela 1 apresenta valores nutricionais da dieta

Tabela 1. Composição bromatológica de forragens do gênero *Brachiaria* provenientes de propriedades rurais dos municípios de Montes Claros e de Coração de Jesus fornecidas aos animais desse experimento e da dieta sem volumoso fornecida para os novilhos durante 71 dias de confinamento.

Parâmetros	<i>Brachiaria</i> spp. Montes Claros	<i>Brachiaria</i> spp. Coração de Jesus	Dieta confinamento*
MS (% na MN)	67,75	54,65	90,23
FDN (% na MS)	74,42	80,18	20,04
FDA (% na MS)	39,20	45,93	6,22
Lignina (% na MS)	10,37	9,01	-
PB (% na MS)	2,61	5,51	17,85
EE (% na MS)	1,71	1,17	3,61
Minerais (% na MS)	8,68	5,70	8,00

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

\*Dieta completa com milho grão e concentrado peletizado e sem volumoso.

completa fornecida aos novilhos do segundo tratamento, conforme análise realizada no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (AOAC 2005).

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

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

### Análises físico-químicas e microbiológicas

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

Para a avaliação micromorfológica dos grupos bacterianos e leveduriformes, foram realizados esfregaços com o auxílio de swabs, sendo fixados e corados em lâminas, conforme método de coloração de Gram (Dirksen 1993). Na leitura das lâminas preparadas foram atribuídas cruzes para representar a densidade microbiana nos que ocorrem nos campos de visualização, onde uma cruz (+) representa algumas células (0-50 por campo foi visualizado), duas cruzes (+ +) indica moderada ocorrência (50-100 células por campo foi visualizado) e três cruzes (+ + +) elevada densidade de população microbiana (> 100 células por campo).

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

Foi realizado o cultivo para avaliar a positividade de fungos micelianos e leveduras presentes no suco do rú-



men de 20 novilhos criados a pasto e 20 novilhos confinados recebendo dieta com alta concentração de grãos e sem volumoso. Utilizou-se um *swab* estéril para inocular o suco ruminal em placas de petri (90 x150mm) contendo meio Ágar Dextrose Sabouraud, acrescido de cloranfenicol (150 mg/l). Após a inoculação por estriação, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e monitoradas para o crescimento de colônias fúngicas por até 21 dias (Lacaz et al. 2002).

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

Os gêneros dos fungos filamentosos foram identificados com a técnica de microcultivo (Lacaz et al. 2002). Posteriormente, um representante de cada morfotipo foi selecionado para o processo de identificação por técnica de biologia molecular, para determinação das espécies dos fungos.

### Biologia molecular

A extração do DNA total foi realizada de acordo com Rosa et al. (2009). Os iniciadores ITS1 (TCCGTA-GGTAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região ITS do rDNA, conforme descrito por White et al. (1990). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 2,0 µL de DNA, 1,0 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 µmol-1 (MWG Biotech), 5,0 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,3 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água ultrapura estéril. O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55°C e 1 minuto de extensão a 72°C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5 X, eluídos durante aproximadamente 1 hora a 120 V. Os géis foram corados com solução de gel red (0.2%), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (*Vilber Lourmat*, France). Os amplicons produzidos foram purificados e dosados em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies). As reações de sequenciamento foram realizadas em DYE-namic™ (*Amersham Biosciences*, USA) associado ao sistema de seqüenciamento automatizado MegaBACETM 1000 (Lachance et al. 1999).

As seqüências dos fragmentos do DNAr foram analisadas no programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool* - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal National Center for Biotechnology (Altschul et al. 1997). Isolados com similaridade igual ou superior a 99% em

relação a outro já anteriormente depositado foram considerados como pertencentes à espécie indicada.

### Delineamento e análise estatística

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

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

A redução do azul de metileno foi maior que seis minutos para 62% dos animais a pasto e menor que um minuto para o restante deles e para 100% os animais em confinamento. Dietas com níveis elevados de concentrado podem resultar em tempo de redução de apenas um minuto. Por outro lado, o tempo de redução do azul de metileno prolonga-se

para até mais de 15 minutos em animais alimentados com dietas pobres em energia e proteína ou em bovinos com inapetência prolongada (Dirksen 1993). Os dados observados para todas as amostras do segundo tratamento demonstram características macroscópicas e físico-químicas de animais com acidose ruminal e com microbiota ruminal inatensamente ativa.

As médias de pH diferiram estatisticamente, como demonstrado na tabela 2. A análise do pH ruminal também sugere acidose ruminal para os novilhos com a dieta sem volumoso. A média do pH para o segundo tratamento foi 5,06 e poderia estar ainda mais reduzida após a alimentação dos animais, uma vez que, na coleta, os animais estavam em jejum de 12 horas e, possivelmente, sob efeito tamponante da saliva, durante esse período.

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

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

Os resultados dos exames diretos das amostras provenientes dos novilhos recebendo forragem lignificada foram semelhantes aos obtidos por Vieira

Tabela 2. Médias de pH e da concentração de fungos aeróbios por ml de suco ruminal de novilhos de corte criados em pastagem tropical, no período seco e de novilhos confinados e alimentados somente com concentrado.

	pH	UFC/ml*
Com volumoso	7,43 A	6,0 x 10 <sup>2</sup> B
Sem volumoso	5,06 B	1,6 x 10 <sup>4</sup> A

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

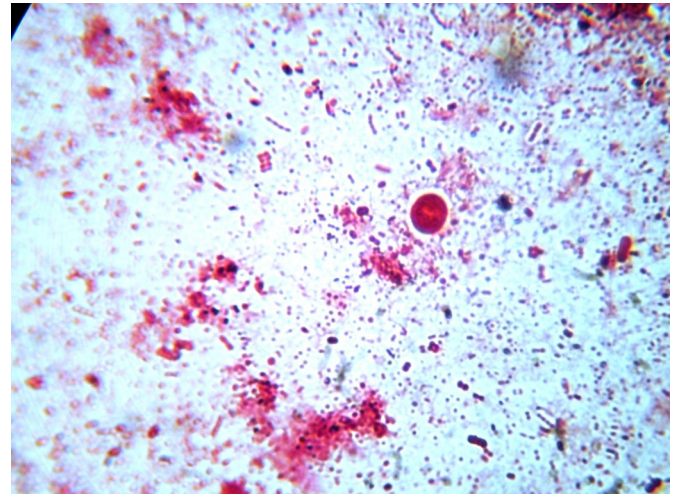


Figura 1. Diversidade microbiana observada após a coloração de Gram do fluido ruminal de novilhos de corte criados extensivamente em pastagens tropicais, no período seco, no Norte de Minas Gerais.

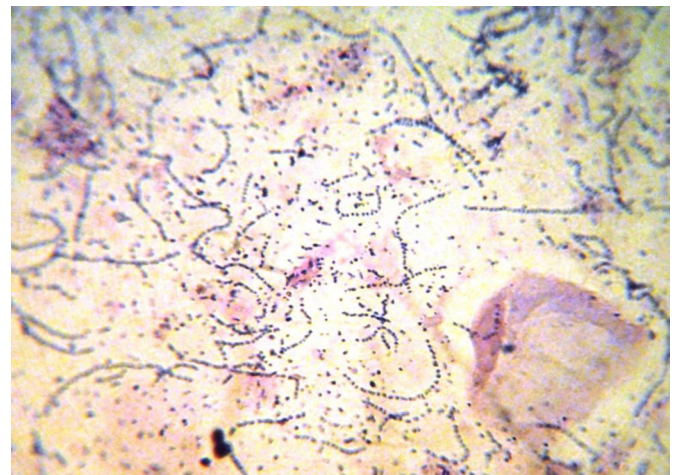


Figura 2. Predomínio de *Streptococcus* spp. após coloração de Gram do fluido ruminal de novilhos confinados e alimentados somente com concentrado, objetiva de 100X.

et al. (2007), onde bactérias Gram-negativas predominaram no conteúdo ruminal de ovinos criados em pastagem de *Brachiaria* spp., durante o período seco. Kamra (2005) relata que a maioria das bactérias ruminais é Gram-negativas, porém o número de bactérias Gram positivas tende a se elevar em dietas com altos teores de energia na dieta. Pesquisas evidenciam que a adição de grãos à dieta promove crescimento rápido de *Streptococcus bovis* e, conseqüentemente, aumento na produção de lactato, predispondo o animal à acidose ruminal (Martin & Nisbet 1992).

Os dados encontrados no presente estudo também corroboram com os de Miranda-Neto et al. (2011) que, observaram alteração da microbiota do fluido ruminal após indução da acidose, indicando modificações do padrão morfotintorial, com maior



predomínio de bactérias Gram-positivas. Esses autores relatam que com a recuperação clínica dos animais, observou-se o restabelecimento gradual da microbiota bacteriana do conteúdo ruminal, voltando a predominar o grupo de bactérias Gram-negativas ao final do experimento.

Após o exame micológico direto, foi observada a presença de estruturas fúngicas típicas de fungos anaeróbios do rúmen para 60% das amostras dos novilhos em pastagem. Fungos policêntricos foram detectados em 34 % (17) das amostras e os monocêntricos foram detectados em 46 % (23) dos exames. Não houve diferença significativa na taxa de detecção de monocêntricos e policêntricos ( $P>0,05$ ). Observou-se a presença concomitante de fungos monocêntricos e policêntricos em amostras de dez novilhos criados em pastagens tropicais.

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

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

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

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

Foram identificados 15 isolados fúngicos provenientes do conteúdo ruminal de novilhos criados em pastagens tropicais. Constatou-se que 86,7 % dos isolados ruminais desse grupo apresentaram características compatíveis com o gênero *Aspergillus* e 13,3% com *Trichoderma* spp. Após o sequenciamento do DNA ribossomal, foram identificadas as espécies *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum*.

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

Algumas espécies do gênero *Lichtheimia* têm sido reportadas como causadoras de mucormicose, patogenicidade que acomete indivíduos imunocomprometidos, transmitida por contato desses com solos contaminados com esse fungo (Garcia-Hermoso et al. 2009). Possivelmente esse fungo estaria presente no solo onde foi cultivado o milho fornecido aos novilhos confinados e, no momento do arraçamento, contaminado o ambiente ruminal desses animais.

Os isolados de fungos provenientes dos bovinos alimentados com pastagem tropical poderiam apresentar atividade de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, importantes na degradação da parede celular vegetal. Isolados fúngicos com tais características e adaptados às condições tropicais poderiam ser suplementados como aditivos. Futuros estudos

poderão contribuir para elucidar o papel benéfico desses microrganismos no trato digestório de ruminantes ou na saúde do ambiente ruminal, contribuindo para maximizar a produção de ruminantes em pastagens tropicais, em regiões semiáridas.

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

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

## CONCLUSÃO

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

**Agradecimentos.** Este trabalho teve apoio da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Pró-reitoria de pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

## REFERÊNCIAS

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

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zheng Zhang J.Z., Miller W. & Lipman D.J. Gapped BLAST nad PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Aci. Res.*, 25:3389-3402, 1997.

AOAC. Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists. 18<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.

Arcuri P.B., Lopes F.C.F. & Carneiro J.C. Microbiologia do rúmen, p.111-140. In: Berchielli T.T., Pires A.V. & Oliveira S.G. (Eds), *Nutrição de ruminantes*. Funep, Jaboticabal, 2006.

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

Chaudhry A.S. Microscopic studies of structure and ruminal fungal colonization in sheep of wheat straw treated with different alkalis. *Anaer.* 6:155-161, 2000.

Dehority B.A. Microbial Interactions in the Rumen. *Rev. Facult. Agron.* 15:69-86, 1998.

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

Export Hub. Exportação Brasil: Demanda mundial por carne bovina pode alavancar leilões na Superagro Minas, 2011. Disponível em: <<http://export-hub.com>>. Acessado em: 17 mai. 2011.

Focus. Visão Brasil: Pecuária Bovina no Brasil: Maior Produtividade com Menor Impacto Socioambiental, 2010. Disponível em: <<http://www.visaobrasil.org>>. Acessado em: 05 mai. 2011.

Flippin 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. *Fung. Gen. Biol.*, 46:S19-S44, 2009.

Gao J., Weng H., Zhu D., Yuan M., Guan F. & Xi Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bior. Technol.*, 99:7623-7629, 2008.

Garcia-Hermoso D., Hoinard D., Gantier J., Grenouillet F., Dromer F. & Dannaoui E. Molecular and Phenotypic Evaluation of *Lichtheimia corymbifera* (Formerly *Absidia corymbifera*) Complex Isolates Associated with Human Mucormycosis: Rehabilitation of *L. ramose*. *J. Clin. Microbiol.*, 47:3862-3870, 2009.

Goes R.H.T.B.G., Alves D.D., Valadares Filho S.C. & Marson E.P. Utilização de aditivos alimentares microbianos na alimentação de bovinos de corte e leite: revisão. *Arq. Ciênc. Vet. Zool.*, 8:47-56, 2005.

Kamra D.N. Rumen Microbial Ecosystem. *Curr. Sci.*, 89:125-135, 2005.

Lacaz C.S., Porto E., Martins J.E.C., Heins-Vaccari E.M. & Melo N.T. *Tratado de Micologia Médica*. 9<sup>a</sup> ed. Savier, São Paulo, 2002. 1120p.

Lachance M.A., Bowles J.M. & Starmer W.T. *Kodamea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Canad. J. Microbiol.*, 45:172-177, 1999.

Martin A.S. & Nisbet D.J. Effect of direct-feed microbial on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 75:1736-1744, 1992.

Minerva. A indústria mundial de carne bovina, 2011. Disponível em: <<http://www.mzweb.com.br>>. Acessado em: 10 jan. 2012.

Miranda-Neto E.G., Silva S.T.G., Mendonça C.L., Drummond A.R.F. & Afonso J.A.B. Aspectos clínicos e a bioquímica ruminal de caprinos submetidos à acidose láctica experimental e suplementados ou não com monensina sódica. *Pesq. Vet. Bras.*, 31:416-424, 2011.

Obispo N.E. & Dehority B.A. Factores affecting the concentration and cellulolytic activity of sheep rumen fungi. *Livest. Res. Rural Develop.*, 14:5-10, 2002.

Oliveira J.S., Zanine A.M. & Santos E.M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. *Rev. Eletr. Vet.*, 8:1-12, 2007.

Oliveira B.M.L., Bitencourt L.L., Silva J.R.M., Dias Junior G.S., Branco I.C.C. & Pereira M.N. Suplementação de vacas leiteiras com *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500. In: Anais 45<sup>a</sup> Reunião Anual da sociedade brasileira de zootecnia, Lavras, MG, 2008. P.1-3.

Orpin C.G. Invasion of plant tissue in the rumen by the flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.*, 98:423-430, 1977.

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. *Reprod. Nutrit. Develop.*, 44:313-319, 2004.

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

- Sampaio I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2ª ed. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 1998. 263p.
- Schmidt J.A., Albright S., Tsai K.P., Calza G.M., Chang J.S. & Calza R.E. Characterization of *Aspergillus oryzae* fermentation extract effects on the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*, EB 188. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63:422-430, 2004.
- Stewart C.S. Plant-Animal and Microbial Interactions in Ruminant Fibre Degradation, p.13-28. In: Prins R.A. & Stewart C.S. (Eds), *Micro-organisms in Ruminant Nutrition*. Nottingham University Press, Dalfsen, 1994.
- Rosa L.H., Vaz A.B.M., Caligiorne R.B., Campolina S. & Rosa C.A. A Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biol.*, 32:161-167, 2009.
- Russell J.B. & Wilson D.B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dai. Sci.*, 79:1503-1509, 1996.
- Russell J.R. & Rychlik J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. *Sci.*, 292:1119-1122, 2001.
- Vieira A.C.S., Afonso J.A. & Mendonça C.L. Características do fluido ruminal de ovinos Santa Inês criados extensivamente em Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.*, 27:110-114, 2007.
- Wallace R.J. Ruminal microbiology, biotechnology and ruminant nutrition: progress and problems. *J. Anim. Sci.*, 72:2992-3003, 1994.
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p.315-322. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, 1990.