

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**PROBIÓTICO FÚNGICO PARA OVINOS ALIMENTADOS COM  
DIETAS DE ALTO GRÃO**

Ronaildo Fabino Neto

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliane Sayuri Miyagi Okada

GOIÂNIA  
2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:     Dissertação     Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Ronaldo Fabino Neto

Título do trabalho: Probiótico fúngico para ovinos alimentados com dietas de alto grão

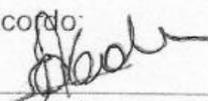
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 30 / 09 / 2019

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

RONAILDO FABINO NETO

**PROBIÓTICO FÚNGICO PARA OVINOS ALIMENTADOS COM  
DIETAS DE ALTO GRÃO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Zootecnia junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

**Área de concentração:**

Produção Animal

**Linha de pesquisa:**

Nutrição e produção animal

**Orientadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliane Sayuri Miyagi Okada – EVZ/UFG

**Comitê de orientação:**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Flávia Oliveira Abrão Pessoa – IF Goiano – Campus Ceres

Prof. Dr. Marcelo Marcondes de Godoy – IF Goiano – Campus Ceres

GOIÂNIA  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Fabino Neto, Ronaildo  
Probiótico fúngico para ovinos alimentados com dietas de alto grão  
[manuscrito] / Ronaildo Fabino Neto. - 2019.  
xvii, 82 f.: il.

Orientador: Prof. Eliane Sayuri Miyagi; co-orientador Flávia Oliveira Abrão; co-orientador Marcelo Marcondes de Godoy.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Goiânia, 2019.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

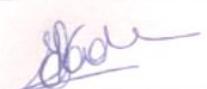
1. aditivos nutricionais. 2. confinamento. 3. dieta concentrada. 4. microbiota. 5. ovinocultura. I. Miyagi, Eliane Sayuri, orient. II. Título.

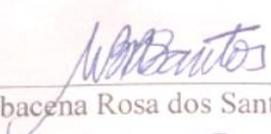
CDU 635

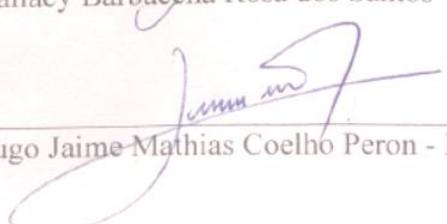
1 ATA NÚMERO 62 DA SESSÃO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
2 MESTRADO DO (A) ALUNO **Ronaildo Fabino Neto** do Programa de Pós-Graduação em  
3 Zootecnia da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Aos  
4 **04/09/2019**, a partir das **13h30min.** na sala de Reuniões do Departamento de Zootecnia da  
5 Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, nesta Capital, realizou-se  
6 a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "**Potencial probiótico fúngico para**  
7 **ovinos alimentados com dietas de alto grão**", apresentado para obtenção do título de **Mestre**  
8 **em Zootecnia**, junto à área de Concentração: Produção Animal. Os trabalhos foram instalados  
9 pelo (a) Presidente da Comissão Julgadora, Orientador (a) **Profa. Eliane Sayuri Miyagi**  
10 **Okada**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora, **Prof. Dr. Wallacy**  
11 **Barbacena Rosa dos Santos – IF-Goiano – Campus Ceres-Go** e **Prof. Dr. Hugo Jaime**  
12 **Mathias Coelho Peron - IF-Goiano – Campus Ceres-Go -**. Iniciando os trabalhos, a  
13 Presidente concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Ronaildo Fabino Neto**, para exposição em  
14 **QUARENTA MINUTOS** do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra,  
15 pela ordem, aos demais membros da banca, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a),  
16 durante o prazo máximo de **VINTE MINUTOS**, assegurando-se ao mesmo, igual prazo para  
17 responder aos Senhores Membros da Banca Examinadora. Ultimada a arguição, que se  
18 desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu  
19 Julgamento, considerando o (a) candidato (a) Aprovado  
20 (aprovado/reprovado) pelos seus membros. Proclamados os resultados da Banca Examinadora,  
21 foram encerrados os trabalhos e, para constar lavrou-se a presente ata que, após lida e achada  
22 conforme vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

23 A Banca Examinadora aprovou a seguinte modificação no título da dissertação:

24 Probiótico fúngico para ovinos alimen-  
25 tados com dietas de alto grão.  
26 \_\_\_\_\_  
27 \_\_\_\_\_  
28 \_\_\_\_\_  
29 \_\_\_\_\_  
30 \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Eliane Sayuri Miyagi Okada  
(Presidente da Banca)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Wallacy Barbacena Rosa dos Santos – IF-Goiano – Campus Ceres-Go

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Hugo Jaime Mathias Coelho Peron - IF-Goiano – Campus Ceres-Go -

## DEDICO

A minha família, esposa e filhos, pelo apoio e  
compreensão nos momentos de ausências, quando  
da minha dedicação aos estudos.

Em especial à minha irmã Solange e à minha  
mãe, Lázara, (*in memoriam*) que não estarão aqui  
para compartilhar da alegria desse momento  
especial de minha carreira.

**Obrigado Família!**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Eliane Sayuri Miyagi Okada, por ter acreditado no meu potencial e pelas orientações. Sou muito grato por ter conhecido a pessoa maravilhosa que é.

À professora Flávia Oliveira Abrão Pessoa, por todos os anos de orientação, por ter me apresentado a microbiologia ruminal e a estatística. Espero sermos parceiros em muitos estudos pela frente ainda.

Ao professor Marcelo Marcondes de Godoy, pelas orientações, por sempre estar disponível para ajudar e pelos conselhos que têm me ajudado nas minhas escolhas.

À minha esposa, Mônica Maria de Almeida Brainer, que mais que tudo é o meu norte, sempre me apoiando, razão das minhas conquistas.

Aos meus filhos, Caio e Gabriel, que foram compreensivos nos momentos que faltei quando da dedicação com o mestrado.

À Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, que por meio do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia disponibilizou o uso do laboratório para realizações das análises.

Ao Instituto Federal Goiano Campus Ceres, pela concessão da bolsa e das instalações e animais para a condução do experimento, assim como, disponibilização dos laboratórios para a realização das análises químicas e microbiológicas.

À Agrocria, empresa parceira que forneceu o núcleo para dieta de alto grão

À todos os colegas de trabalho da UDF e do IF Goiano Ceres, Laís Lima, Thiago Dias, Victor Vieira, Bruno Carvalho, Rafael, Jakcelly e Janaína, e muitos outros que aqui não citei. Muito obrigado pelo apoio e dedicação às atividades do projeto.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, que muitos contribuíram para os meus conhecimentos.

A PROPPI- IF Goiano, pelo financiamento do projeto através do Edital Inovação.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse projeto, meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xiii
Capítulo 1 – Considerações iniciais.....	1
1 Introdução.....	1
2 Revisão de literatura.....	4
2.1 Ovinocultura de corte.....	4
2.2 Dietas com alta concentração de grão energético .....	5
2.3 Tipos de grãos e processamentos .....	8
2.4 Dieta de alto grão: ambiente ruminal e alterações metabólicas .....	9
2.5 Uso de probiótico em dieta de alto grão .....	10
2.6 Fungos.....	11
2.7 Probióticos Fúngicos para Ruminantes.....	13
3 Objetivo Geral e específicos .....	17
3.1 Objetivo Geral.....	17
3.2 Objetivos Específicos .....	17
4 Hipótese.....	18
5 Referências .....	19
Capítulo 2 – Artigo científico.....	25
1 Introdução .....	27
2 Material e Métodos.....	28
2.1 Local do ensaio de viabilidade dos fungos .....	28
2.2 Obtenção dos isolados fúngicos.....	28
2.3 Identificação dos isolados obtidos .....	28
2.4 Avaliação da produção de amilase.....	29
2.5 Avaliação da produção de micotoxinas .....	29
2.6 Tolerância aos ácidos graxos de cadeia curta do rúmen.....	29
2.7 Ensaio de viabilidade fúngica no fluido ruminal .....	30
2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	30
2.9 Análises estatísticas .....	30
3 Resultados e Discussão .....	31
3.1 Isolados fúngicos .....	31

3.2	Produção de amilase .....	31
3.3	Produção de micotoxinas, viabilidade fúngica no fluido ruminal, tolerância aos AGCC e habilidade mecânica sobre grão de milho (MEV).....	32
4	Conclusão .....	37
5	Referências .....	38
Capítulo 3 – Artigo científico .....		41
1	Introdução.....	43
2	Material e Métodos.....	44
2.1	Ensaio de desempenho .....	44
2.2	Delineamento experimental .....	44
2.3	Manejo de arraçamento.....	45
2.4	Análises de composição da dieta .....	46
2.5	Desempenho animal e rendimento de carcaça .....	47
2.6	Análises estatísticas .....	47
3	Resultados e discussões.....	48
3.1	Ensaio de desempenho .....	48
4	Conclusão .....	53
5	Referências .....	54
Capítulo 4 – Artigo científico.....		57
1	Introdução.....	59
2	Material e Métodos.....	60
2.1	Ensaio com os potenciais probióticos fúngicos <i>in vivo</i> .....	60
2.2	Coleta e preparo de amostras do líquido ruminal .....	61
2.3	Avaliação do fluido e parâmetros do metabolismo ruminal .....	61
2.4	Análises Gram para os grupos bacteriano e levedura .....	61
2.5	Bactérias Enterozoonóticas .....	61
2.6	Fungos anaeróbios facultativos.....	62
2.7	Protozoários ruminais .....	62
2.8	Análises histológicas do sistema gastrointestinal .....	63
2.9	Análises estatísticas .....	63
3	Resultados e discussão .....	64
3.1	Características do fluido ruminal.....	64
3.2	Concentração de N-NH <sub>3</sub> e PH ruminal .....	65
3.3	Análises de Gram para os grupos bacteriano e levedura .....	66

3.4	Distribuição dos gêneros de bactérias.....	69
3.5	Distribuição dos gêneros de fungos anaeróbios facultativos .....	70
3.6	Distribuição dos gêneros de protozoários do rúmen.....	71
3.7	Análises histológicas do trato gastrointestinal.....	72
4	Conclusão.....	75
5	Referências.....	76
	Capítulo 4 - Considerações finais.....	81

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Hifas (círculo amarelo) com estrutura reprodutiva na extremidade, indicando presença de conidiósporo (círculo azul) e inúmeros esporos (círculo e seta vermelho) do gênero *Aspergillus* spp. sobre o grão de milho inteiro, sob aumento de 1500x, e distância..... 34
- FIGURA 2 - Hifas (círculo azul) e estrutura reprodutivas (círculo amarelo) e esporos (círculo e seta vermelho) características do gênero *Rhizomucor* spp. sobre grãos de milho inteiros, sob aumento de 800x, e distância de 5kv. .... 35
- FIGURA 3 - Colonização fúngica sobre a superfície do milho (seta vermelha), evidenciando um ponto de ruptura (seta azul) e aumento da superfície exposta, sob aumento de 650 x em microscopia de varredura, e distância de 5kV..... 36
- FIGURA 4 - Imagem das papilas ruminais dos ovinos recebendo dieta de alto grão de milho inteiro e moído com probiótico fúngico. As duas imagens da esquerda (A) são de animais com dieta de grão inteiro e as outras duas da direita de animais em dieta de grão moído (B). .... 52
- FIGURA 5 - Imagem de lâmina histológica (500 $\mu$ m). Em R: epitélio ruminal, as linhas de cor verde representam lâmina própria submucosa – LPS, a linhas laranja a largura da base da papila – LBP e a linha amarela representa a espessura da túnica muscular – TMS; em ID: epitélio intestino delgado, a linha vermelha representa a altura da vilosidade – AVD, e linha verde a profundidade de cripta - PCD; e em IG: epitélio intestino grosso, a linha amarela representa a profundidade de cripta - PCG..... 74

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Diâmetro médio da colônia (DMC), diâmetro médio do halo de degradação do amido (DMH) e índice de atividade enzimático (IAE), em três diferentes períodos de incubação.....	32
TABELA 2 - Composição química do milho e dietas experimentais (g/kg) na matéria natural. ....	46
TABELA 3 - Consumos de matéria seca e nutrientes por ovinos confinados recebendo dieta de alto grão inteiro ou moído, kg/kg.....	48
TABELA 4 - Dados de desempenho ovinos alimentados com dieta de alto grão associado a diferentes a probiótico a base de fungos.....	49
TABELA 5 - Características relacionada à carcaça de ovinos alimentados com dieta de alto grão associado a diferentes a probiótico a base de fungos.....	51
TABELA 6 - Análise físico-química predominante do fluido ruminal de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associados com probióticos à base de fúngicos.....	65
TABELA 7 - Análise da concentração nitrogênio amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ) e pH do fluido ruminal de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associada com probióticos à base fúngicos.....	66
TABELA 8 – Exame direto para detecção dos grupo bacteriano e levedura identificado pela técnica de Gram do rúmen de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base de fúngicos.....	67
TABELA 9 - Avaliação da população da microbiota ruminal de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base de fúngicos. ....	68
TABELA 10 - Análises da população de bactéria fermentadora de lactose no fluido de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base de fúngicos.....	68
TABELA 11 - Distribuição dos gêneros de bactérias Gram negativas presente nos fluidos do ruminal de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base de fúngicos. ....	70
TABELA 12 - Distribuição dos gêneros de protozoários presentes nos fluidos do ruminal de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base de fúngicos.....	72
TABELA 13 - Avaliação histológica do rúmen, intestino delgado e intestino grosso de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base fúngicos.....	73

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	-ácido
AE	-aquosa até espumosa
AGCC	-ácido graxos de cadeia curta
AI	-amoniacoal icoroso
AP	-ácido penetrante
AQ	-aquoso
AR	-aromático
AT	-tratamento com fungo <i>Aspergillus terreus</i>
AVD	-altura da vilosidade do intestino delgado
BDA	-meio ágar de dextrose batata
CE	-castanho enegrecido
CEUA	-Comissão de Ética no Uso de Animais
CMS	-consumo de matéria seca
CNF	-carboidrato não fibroso
CO	-castanho oliva
CTR	-consumo total de ração
CV	-coeficiente de variação
DAG	-dieta de alto grão
DMC	-diâmetro médio da colônia
DMH	-halo de degradação do amido
EA	-espessa até aquosa
EE	-extrato etéreo
EP	-espessa
EUA	-Estados Unidos da América
FAO	-Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA	-fibra em detergente ácido
FDN	-fibra em detergente neutro
GPMD	-ganho de peso médio diário
GT	-ganho de peso total
HE	-hematoxilina e eosina
IA	-insosso até ácido
IAE	-índice de atividade enzimática
IBGE	-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ID	-inodoro
INCT-CA	-Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal

ISAPP	-Associação Científica Internacional para Probiótico e Prebiótico
Lac-	-bactéria não fermentadora de lactose
Lac+	-bactéria fermentadora de lactose
LBP	-largura da base das papilas
LE	-leitoso acinzentado
LM	-leitoso marrom
LPS	-lâmina própria-submucosa
MGI	-milho grão inteiro
MGM	-milho grão moído
MM	-matéria mineral
MO	-matéria orgânica
MS	-matéria seca
MX	-tratamento com mistura dos fungos <i>Rhizomucor</i> spp. e <i>Aspergillus terreus</i>
NH <sub>3</sub>	-amônia
N-NH <sub>3</sub>	-nitrogênio amoniacal
O <sub>2</sub>	-oxigênio
OMS	-Organização Mundial da Saúde
PB	-proteína bruta
PC	-peso corporal
PCD	-cripta do intestino delgado
PCF	-peso de carcaça fria
PCG	-profundidade das criptas do intestino grosso
PCQ	-peso de carcaça quente
PDR	-proteína degradada no rúmen
PF	-peso final
PI	-peso inicial
PNDR	-proteína não degradada no rúmen
PRAM	-potencial de redução de azul de metileno
Prob.	-probiótico
Proc.	-processamento
PVA	-peso vivo ao abate
RCF	-rendimento de carcaça fria
RCQ	-rendimento de carcaça quente
RZ	-tratamento com fungo <i>Rhizomucor</i> spp.
SARA	-acidose ruminal subaguda
TE	-tratamento controle sem inóculo fúngico
TGI	-trato gastrointestinal

TMS	-espessura da túnica muscular
UFC	-unidade formadora de colônia
YNB	-meio básico de levedura com nitrogênio

## RESUMO

Objetivou-se selecionar fungos anaeróbios facultativos do rúmen de ovinos e avaliar sua capacidade probiótica em associação a dietas de alto grão (DAG) para ovinos Santa Inês/Dorper. Reativaram-se 30 isolados fúngicos provenientes do rúmen de ovinos submetidos à DAG, estocados em coleção fúngica no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal Goiano Campus Ceres, onde também foram conduzidos os ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os isolados foram classificados quanto à morfotipologia por microcultivo, submetidos a testes de produção de enzima amilase e micotoxinas, de tolerância aos principais ácidos graxos voláteis, de viabilidade no fluido ruminal e da capacidade de colonização dos grânulos de amido. No ensaio de desempenho adotou-se fatorial 4x2 em DIC, sendo quatro inoculantes (sem inóculos, com *Rhizomucor* spp., com *Aspergillus terreus* e com mistura dos dois fungos) e dois processamentos (grão moído ou inteiro). Utilizaram-se oito baias com cinco borregos/baia, durante 75 dias com 15 dias de adaptação. Dietas com 85% de milho mais 15% de núcleo vitamínico, mineral e proteico, foram fornecidas *ad libitum* duas vezes ao dia (7h e 16h), permitindo sobra de 5%, sendo os inóculos aspergidos na hora do arraçoamento. Realizaram-se cinco coletas de amostras dos ingredientes das dietas, das dietas e das sobras das dietas durante o ensaio para realização das análises centesimais. Os animais foram pesados quinzenalmente para avaliação dos índices de desempenho. Ao abate no final do ensaio, foram calculados os rendimentos de carcaça de cinco animais por tratamento, assim como, coletados os fluidos para estudo do perfil microbiológico ruminal, avaliação macroscópica do fluido, concentração de nitrogênio amoniacal, verificação da atividade microbiológica e análises histológicas do rúmen. Dados com distribuição paramétrica foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Nas variáveis do perfil microbiológico, usou-se os testes não paramétricos Qui-quadrado, Wilcoxon e Kruskal-Wallis, além das análises descritivas. Dos 30 isolados fúngicos selecionados, 21 são do gênero *Aspergillus* spp., seis do gênero *Rhizopus* spp. e três *Rhizomucor* spp., que foram avaliados quanto ao seu potencial probiótico *in vitro*. Todos os isolados foram capazes de degradar amido, e 19 são produtores de micotoxina. Não houve interação entre os fatores processamento e probióticos para as variáveis de desempenho ( $P>0,05$ ), assim como, não houve efeito da adição dos probióticos sobre o desempenho dos ovinos alimentados com os diferentes tratamentos ( $P>0,05$ ). Observou-se maior consumo de MS, MM, EE, FDN e CNF para os animais alimentados com milho grão inteiro (MGI) ( $P<0,05$ ). Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para o consumo de MO, PB, GPMD, CA e nem para eficiência alimentar. O odor aromático predominou no fluido ruminal, o que caracteriza ambiente com pH neutro. As amostras do fluido apresentaram alta atividade microbiana. O pH ruminal diferenciou-se ( $P<0,05$ ) quando considerado o tipo de processamento, sendo maior para milho grão moído (MGM). Não observou-se diferença para nenhuma das comunidades microbiológica analisadas ( $P>0,05$ ) (bactérias Lac+ e Lac-, fungos, leveduras e protozoários). Identificou-se seis gêneros de fungos anaeróbios facultativos para as todas amostras de fluido ruminal do total de 15 observações. *Cladosporium* spp. foi o gênero mais prevalente (46,66%), seguido por *Aspergillus* spp. (26,66%). Não houve diferença significativa na população de protozoários ( $P>0,05$ ). A largura da base das papilas ruminiais apresentou interação expressiva entre os fatores processamento e probiótico fúngico, sendo maior para MGM ( $P<0,05$ ) para o tratamento com *Rhizomucor* spp. e o controle ( $P<0,05$ ). Os fungos anaeróbios facultativos do rúmen são promissores para serem usados como probióticos em dieta de alto grão, contudo no ensaio desempenho o aumento da concentração dos fungos não demonstrou ser eficaz. Outros estudos fazem-se necessários para encontrar a situação adequada para máxima expressão probiótica dos isolados fungos selecionados.

**Palavras chaves:** aditivos nutricionais, confinamento, dieta concentrada, microbiota, ovinocultura

## ABSTRACT

The objective was to select facultative anaerobic fungi from the sheep rumen and to evaluate their probiotic capacity in association with high grain diets (DAG) for Santa Inês/Dorper sheep. It was obtained 30 fungal isolates from the sheep rumen submitted to DAG, which were part of the fungal collection stored in the Laboratory of Microbiology of the Federal Goiano Campus Ceres Institute, where the in vitro and in vivo assay was also conducted. The isolates were classified according to morphotyping by microculture, submitted to amylase and mycotoxin enzyme production tests, tolerance to the main volatile fatty acids, viability in the ruminal fluid and the colonization capacity of the starch granules. In the performance test, 4x2 factorial was used in CED, with four inoculants (no inoculum, *Rhizomucor* spp., *Aspergillus terreus* and mixed of two fungi) and two processing (ground or whole grain). Eight bays with five lambs/bay were used for 75 days with 15 days of adaptation. The diets with 85% corn plus 15% vitamin, mineral and protein nucleus were fed *ad libitum* twice a day (7h and 16h), allowed to be left over 5%, and the inocula sprinkled at the time of feeding. Five samples were taken of the ingredients of the diets, the diets and the leftovers of the diets during the test to perform the centesimal analyzes. The animals were weighed biweekly for evaluation of performance indices. At the end of the trial, the carcass yields of five animals per treatment were calculated, as well as the ruminal fluid for the study of the microbiological profile of the rumen, macroscopic evaluation of the ruminal liquid, ammonia nitrogen concentration and microbiological activity, in addition to the TGI fragments for histological analysis. The parametric data were submitted to ANOVA and the data averages compared by the Tukey test at 5%. For the variables of the microbiological profile, the non-parametric tests, Chi-square test, Wilcoxon and Kruskal-Wallis were used, besides the descriptive analyzes. Of the 30 selected fungal isolates, 21 are of the genus *Aspergillus*, six of the genus *Rhizopus* spp. and three *Rhizomucor* spp. which were evaluated for their probiotic potential in vitro. All the isolates were able to degrade starch, and 19 are mycotoxin producers, being initially not feasible as a probiotic. There was no interaction between probiotic and processing factors for the performance variables ( $P > 0.05$ ), nor was there any effect of the addition of probiotics on the performance of sheep fed the different treatments ( $P > 0.05$ ). Greater consumption of DM, MM, EE, NDF and CNF was observed for animals fed whole grain corn (MGI) ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference ( $P > 0.05$ ) for OM, PB, GPMD, CA and neither for food efficiency. Fluid staining showed a low rate of acidosis. The aromatic odor predominated, which characterizes environment with neutral pH. Fluid samples showed high microbial activity. The ruminal pH differed ( $P < 0.05$ ) when considered the type of processing, being higher for milled grain (MGM). No difference was observed in any of the analyzed microbiological communities ( $P > 0.05$ ) (Lac + and Lac- bacteria, fungi, yeasts and protozoa). Six genera of facultative anaerobic fungi were identified for all ruminal fluid samples from a total of 15 observations. *Cladosporium* spp. was the most prevalent genus (46.66%), followed by *Aspergillus* (26.66%). There was no significant difference in the protozoan population ( $P > 0.05$ ). The width of the base of the papillae presented expressive interaction between the fungal probiotic and processing factors, being higher for MGM ( $P < 0.05$ ) for *Rhizomucor* spp. treatment and control ( $P < 0.05$ ). Selected anaerobic fungi from the rumen are promising to be used as a probiotic on a high grain diet, however in the performance assay the increased fungi concentration has not been shown to be effective. Other studies are necessary to find the appropriate situation for maximum productive expression of the isolated selected fungi.

**Keyword:** concentrated diet, feedlot, microbiota, nutritional additive, sheep

# CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos fundamentos da produção animal é atender à alta demanda mundial por proteína de origem animal, o que tem exigido do setor pecuário altos índices de produtividade aliados a adoção de novas tecnologias no manejo nutricional, como por exemplo, as dietas sem volumoso na alimentação de animais ruminantes.

Uma das maiores preocupações dos produtores de ovinos em sistemas de terminação é a produção de forrageiras, que muitas vezes se tornam escassas em função das condições climáticas nas regiões tropicais de produção<sup>1,2</sup>. Novas tecnologias como o uso de alta concentração grãos inteiros associada ao núcleo nutricional peletizado em dieta de acabamento, já têm sido praticadas por muitos confinadores, tanto em ovinos quanto para bovinos de cortes confinados. Essa prática além de ser uma alternativa para a falta de forragem, tende a reduzir o custo com mão-de-obra, máquinas e equipamentos, podendo ainda reduzir o tempo de abate e melhorar o rendimento e padronização de carcaça<sup>3-5</sup>.

O milho é o principal alimento energético usado nas dietas de animais de produção, sendo também o principal componente em na dieta de alto grão (DAG). Sabe-se que a digestibilidade ruminal do amido do grão de milho é limitada pela matriz proteica, que é uma estrutura densa constituída de corpos proteicos estruturados poligonalmente, que envolve os grânulos de amido e impede que haja espaço vazio entre ambos<sup>6</sup>. Essa matriz proteica está presente principalmente no endosperma vítreo dos grãos<sup>6</sup> e a quebra da matriz proteica pode melhorar a velocidade e a extensão da digestão do amido<sup>7,8</sup>. Em função dessas propriedades, observa-se perdas significativas de amido nas fezes dos bovinos submetidos a sistemas de confinamento em DAG<sup>6</sup>.

Trabalhos como os de Parente et al.<sup>9</sup>, Caetano et al.<sup>4</sup> e Oliveira et al.<sup>10</sup> têm comprovado ganhos na terminação de animais alimentados com dieta contendo alta concentração de grãos e baixa concentração de volumoso de relação mais usada 85:15%, respectivamente. Contudo, frequentemente os mecanismos fisiológicos de homeostase são rompidos, ocorrendo redução do pH ruminal, com alterações que podem ser prejudiciais à microbiota do rúmen e deixam o animal mais susceptível a doenças metabólicas e infecciosas<sup>11-13</sup>. Entretanto, é válido respaldar que a notável capacidade de produção proteica nos ruminantes é dependente desse sistema de pré-estômagos, o qual alberga complexo ecossistema microbiano.

Quando o pH ruminal é baixo, a diversidade microbiana reduz, populações de protozoários sofrem declínio e as bacterianas são alteradas<sup>11,14,15</sup>, com redução ou total eliminação da população fúngica<sup>13,16</sup>. Se o pH ruminal continuar a cair, os *Lactobacillus* spp. podem substituir a bactéria *Streptococcus bovis*, iniciando um acúmulo excessivo de lactato, levando à acidose ruminal<sup>12,15,17</sup>. Dessa forma, evidencia-se a relevância da utilização de aditivos na alimentação de ruminantes, principalmente daqueles confinados por um período mais longo e arraçoados com alto teor de concentrado.

Diferentes moduladores (ionóforos, antibióticos, própolis, óleos essenciais, simbióticos, dentre outros) da microbiota ruminal têm sido estudados a fim de melhorar a atividade microbiana no rúmen<sup>18</sup> quando animais são expostos a dietas desafiadoras (alta fibra de baixa digestibilidade ou alto grão com fornecimento de amido)<sup>19</sup>. Hill et al.<sup>20</sup> e Markowik e 'Slizewska<sup>21</sup> afirmaram que os ionóforos e antibióticos têm sido os aditivos mais empregados. No entanto, o uso desses aditivos tem sido condenado por apresentar risco de resíduos em produto e subprodutos de origem animal. Como alternativa, muitos estudos têm sido conduzidos com aditivos naturais, como os probióticos e prebióticos. Diferente dos antibióticos, os probióticos são microrganismos que podem promover benefícios ao hospedeiro sem deixar resíduos<sup>20</sup>.

Sabe-se que a suplementação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tende a aumentar a população de protozoários ruminais, que são conhecidos por engolfarem rapidamente grânulos de amido, e esta ação contribui para uma estabilização mais eficiente do pH ruminal<sup>22</sup>. Além disso, as células leveduriformes possuem a capacidade de consumir o oxigênio que chega ao ambiente ruminal otimizando as condições de anaerobiose favoráveis para as bactérias celulolíticas, sendo um dos principais fatores implicados no efeito benéfico da levedura na degradação de fibra por bactérias ruminais<sup>23</sup>. Estudos relataram que o potencial redox de líquido ruminal foi menor na presença de leveduras probióticas em dietas de cordeiros<sup>24</sup>.

O conhecimento gerado em estudos com microbiota ruminal dos animais submetidos à dieta de alto grão, permite prever as principais espécies envolvidas na degradação dos grãos, quando estes encontram-se inteiros ou moídos, de forma a modular essa microbiota de maneira mais eficiente, agregando ganhos na produção animal<sup>19,23,25</sup>. Dehority<sup>26</sup> relatou que *Orpinomyces joyonii*, *Neocallimastix patriciarum* e *Piromyces communis* são três espécies fúngicas ruminais capazes de digerir 40-50% do amido presente no milho. Entretanto, somente a primeira digere mais de 20% do amido presente no trigo e na cevada. Esses fungos possuem a habilidade de penetrar com seus rizoides na matriz proteica do milho, mas não o fazem nos grânulos de amido. Amilases extracelulares são liberadas para a degradação destes<sup>27</sup>.

Escassos são os trabalhos que avaliam a prevalência de fungos no TGI de ruminantes arraçados somente com concentrado. Recentemente, Abrão et al.<sup>16</sup> demonstraram que dietas de alto grão eliminam a população de fungos anaeróbios estritos do rúmen, elevam a concentração de *Streptococcus* spp. e reduzem a diversidade microbiana no rúmen, provavelmente devido a redução significativa do pH (<5). Outros estudos têm mostrado que os fungos anaeróbios ruminais produzem uma grande variedade de enzimas que geralmente degradam maior quantidade de substrato que as bactérias do rúmen. Além disso, possuem ação mecânica das hifas que penetram no alimento, facilitando a ação de outros microrganismos como as bactérias<sup>19,28</sup>. Os fungos isolados da microbiota ruminal de ovinos em dieta de alto grão podem apresentar maior potencial, por já estarem adaptados às condições do ambiente ruminal.

Portanto, este estudo foi conduzido visando verificar se fungos anaeróbios do rúmen de ovinos podem apresentar ação probiótica e, conseqüentemente, influenciar parâmetros de desempenho e da microbiologia do ambiente ruminal desses animais submetidos a dietas de alto grão, garantindo assim, o bem-estar animal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### Probióticos fúngicos na dieta de alto grão para ruminantes

#### 2.1 Ovinocultura de corte

De acordo com Martins et al.<sup>29</sup> após análises do rebanho mundial da ovinocultura, observaram que o cenário apontava para um pequeno crescimento girando em torno de 1,5% ao ano. Em 2016 o rebanho de ovinos brasileiro ocupava a 18ª posição mundial<sup>29</sup>.

A partir da análise estatística de dados do último Censo Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2017, pesquisadores da Embrapa Caprino e Ovinos concluíram que o rebanho ovino nacional apresentou uma redução de 2,80% no período de 2006 a 2017, com rebanhos de 14.167.504 e 13.770.344, respectivamente. Na região Centro-Oeste essa queda foi ainda mais significativa, passando de 918.672 cabeças em 2006 para 595.628 em 2017, com uma redução de 35,16% do rebanho. A região Nordeste foi a única que apresentou um aumento do efetivo de seu rebanho em 15,94%<sup>30</sup>.

Contudo, apesar da queda nos rebanhos ovinos no país, os dados também apontaram que houve um aumento de 19,99% na quantidade de estabelecimentos de produção ovina e um aumento mais significativo ainda de 47,54% no volume de animais comercializados, passando de 2.285.983 em 2006 para 3.372.707 em 2017. De acordo com os pesquisadores da Embrapa Caprino e Ovinos, esse resultado expressa melhorias na atividade, que está deixando de ser apenas de subsistência e passando a ser uma atividade mais comercial<sup>30</sup>.

De acordo com Souza et al.<sup>31</sup> são poucas as informações técnicas científicas disponíveis que poderiam ajudar a alavancar o desenvolvimento da ovinocultura de corte na região Centro-Oeste, assim como, no país. O setor ainda encontra-se carente de informações sólidas que possam ajudar as organizações públicas e privadas a estruturar uma agenda comum voltada ao desenvolvimento da atividade<sup>29</sup>. Dessa forma, o investimento em pesquisa com tecnologia de produção no setor torna-se fundamental.

O manejo nutricional com dieta de alto concentrado para ovinos de corte em sistema de confinamento é uma tecnologia que contribui para melhorar os índices produtivo do setor<sup>2</sup>. O uso de dieta de alto grão para animais ruminantes de pequenos portes tem mostrado ser mais

eficiente do que para bovinos. Os ovinos são mais eficientes na mastigação e seleção dos grãos inteiros, melhorando assim seu aproveitamento<sup>9</sup>.

O uso de probiótico em dieta de alto grão é pouco usado, contudo estudos tem demonstrado que a adição de probiótico à dieta tem contribuído para o aumento de desempenho animal<sup>32</sup>. O desenvolvimento de um probiótico próprio para dieta com alta concentração de grão (inteiro ou moído), pode contribuir para melhorar o aproveitamento da dieta pelo animal, promovendo o bem-estar animal e melhorando os índices de produtividade.

## **2.2 Dietas com alta concentração de grão energético**

O uso de dieta com alta proporção de alimento concentrado energético, em que o grão de milho contribui com mais de 60%, pode ser considerado como um manejo nutricional normal em se tratando de animais monogástricos. Contudo, no caso de animais ruminantes, a utilização desse tipo de dieta que ainda possui limitações, e que desde a década de 70 tem sido estudada nos Estados Unidos, traz muita discussão sobre a sua aplicabilidade<sup>1,33</sup>.

No início do ano 2000, esse tipo de dieta ainda não era bem vista por alguns profissionais que atuam na área de nutrição de ruminantes, devido às condições anatômico-fisiológicas do trato gastrointestinal desses animais, que têm como principal característica uma alta eficiência no aproveitamento de alimentos com elevados teores de fibra, como as forragens<sup>33</sup>. O rúmen constituído por uma comunidade de microrganismo, na maioria bactérias, que tem a capacidade de transformar alimentos com baixo valor biológico em alto valor biológico.

Paulino et al.<sup>1</sup>, em revisão acerca do assunto, relatam que a dieta com alto grão de milho começou a ser praticada em larga escala no Brasil a partir de 2005, com o desenvolvimento por uma empresa de nutrição animal de um núcleo peletizado para ser usado misturado ao grão milho inteiro. Contadini<sup>33</sup> afirma que essa técnica começou a ser explorada na região Centro-Oeste e Norte devido à expansão da cultura do milho e ao baixo custo de sua produção e alta disponibilidade de grãos nessas regiões.

A dieta de alto concentrado também é bem conhecida como dieta sem volumoso, dieta sem fonte de fibra, dieta com baixa fibra ou dieta de alto grão. Baseado nos estudos, podemos definir a dieta de alto concentrado como sendo a dieta com mais de 40% de concentrado energético, com variações que podem chegar até 90%, fornecida para animais ruminantes, utilizando diversos tipos de grãos (milho, sorgo, aveia, milheto, cevada, azevém, arroz com casca e outros), e podendo ainda ser fornecido inteiro, moído, floculado, extrusado, e ainda na forma de grão úmido ou ensilado. Além dos processamentos mecânicos e térmicos há também

os tratamentos químicos<sup>7,34</sup>. Como esse tipo de dieta contém alta concentração energética, os alimentos com alto teor proteico, como a soja, caroço de algodão e outros, não são utilizados, sendo essa dieta também chamada de dieta concentrada energética.

Em trabalhos mais recentes sobre dietas com grão inteiro, principalmente milho, sorgo e milho, a relação grão: núcleo mineral, vitamínico e proteico de 85:15%, respectivamente<sup>9,35,36</sup>, complementa a deficiência do grão para atender às exigências dos ruminantes. Também são observadas outras relações, tais como, 60:40% - concentrado:núcleo<sup>14,25,37</sup> ou 65:20:15% - grão:volumoso:núcleo, sendo que nessa última condição o volumoso tem como objetivo aumentar a fonte de fibra na dieta<sup>10,36</sup>.

De acordo com Zhang et al.<sup>11</sup> a dieta de alto grão é conhecida por promover grandes alterações no rúmen modificando a composição da microbiota ruminal. Essas alterações ocorrem pela mudança da dieta à base de volumoso para uma dieta com alto teor de concentrado, podendo variar de 40% a 90% de concentrado energético<sup>4</sup>. Normalmente os animais ruminantes antes de receberem uma dieta de alto grão são mantidos em dieta com até mais de 90% de volumoso. A substituição da dieta de alto volumoso para alto concentrado é adotada, principalmente, com os bovinos, ovinos e caprinos de corte em fase de terminação em sistemas de confinamento e/ou vacas e cabras de alta produção de leite que demandam muito concentrado, principalmente no período de balanço energético negativo.

Contudo, considerando o bem-estar animal e os vários distúrbios metabólicos que essa mudança de dieta pode provocar nos animais<sup>12,15</sup> é necessário levar em conta o processo de adaptação, uma vez que a população microbiana do rúmen precisa habituar-se à nova dieta<sup>38</sup>. O período de adaptação consiste no processo de redução da proporção de volumoso e aumento da proporção de concentrado, em um período mínimo de 14 dias, segundo recomendação de vários estudos<sup>38-40</sup>. A adaptação pode ser do tipo escada ou por restrição<sup>27,38,40</sup>.

De acordo com Perdigão et al.<sup>40</sup> e Barducci et al.<sup>38</sup> o protocolo de adaptação tipo escada consiste no fornecimento à vontade da dieta mista com aumento gradual dos ingredientes concentrados de acordo com o tempo de adaptação, que pode ser de 9 a 14 dias, até que se atinja o nível desejável de concentrado para a dieta de acabamento, que normalmente é composta com 85% de grão energético e 15% núcleo.

O protocolo de adaptação tipo restrição tem como fundamento a restrição da quantidade ingerida da dieta final com aumento gradual até atingir o fornecimento *ad libitum*, sendo recomendado iniciar a restrição com fornecimento de 1,76% do peso corporal (PC)<sup>38</sup>.

Barducci et al.<sup>38</sup> avaliando os dois protocolos de adaptação, escada *versus* restrição, com dois períodos de adaptação, 9 e 14 dias, reforçaram a recomendação de Brown et al.<sup>39</sup>, de

utilizar, no mínimo, 14 dias de adaptação, e consideraram o protocolo escada como sendo o mais indicado, o que corrobora com Perdigão et al.<sup>40</sup> que verificaram melhor adaptação dos animais à dieta de alto grão utilizando o protocolo escada.

De 2005 até os dias atuais diversos trabalhos têm comprovado o aumento da eficiência, a melhoria na conversão alimentar e no acabamento da carcaça, assim como, a redução no custo de produção de ruminantes submetidos a dietas de alto grão<sup>9,10,36,41</sup>. Esses resultados têm servido como fatores instigadores para o aumento de confinamentos de bovinos de corte em dieta de alto grão no Brasil<sup>1,41,42</sup>.

Vários são os fatores que levaram os produtores a usar a dieta com alto concentração de grãos em suas propriedades. Sem dúvida, o fator que mais contribui é a redução no custo de produção. Dietas de alto concentrado são compostas basicamente de um grão (normalmente 85% da dieta) e um núcleo (participa com 15% da mistura), o que reduz muito o custo com mão-de-obra, com máquinas e equipamentos e com área para o cultivo de lavoura, pois o pecuarista pode adquirir os grãos diretamente com os agricultores, além de redução no gasto de transporte de ingrediente com alto teor de umidade<sup>1,41,43</sup>. Do mesmo modo, a seleção de alimentos de qualidade pelo produtor contribuirá para o máximo aproveitamento do alimento pelo animal melhorando a padronização na formação do lote, carcaças mais pesadas e com melhor acabamento<sup>10,43</sup>

Outras vantagens do uso da dieta de alto grão estão relacionadas às respostas de desempenhos dos animais confinados relatadas por inúmeros trabalhos da literatura. Fruet et al.<sup>36</sup> avaliando o desempenho, característica da carcaça e qualidade da carne de ovelhas descartes terminadas em sistema a pasto comparando com ovelhas recebendo dieta exclusiva de grão concluiu que ovelhas confinadas com dieta exclusiva de milho ou sorgo foram mais eficientes no ganho de peso, enquanto que as ovelhas terminadas a pasto de azevém apresentaram menor rendimento de carcaça.

Oliveira et al.<sup>10</sup>, Humer & Zebeli<sup>7</sup> e Caetano et al.<sup>4</sup>, concluíram que o grão de milho inteiro seco é economicamente mais viável quando comparado aos outros processos por não demandar custo de processamento e apresentar resultados satisfatório de desempenho.

Dias et al.<sup>35</sup> avaliaram desempenho e a viabilidade econômica de novilhos Nelore, castrados e não castrados, confinados recebendo dieta de alto grão por um período de 63 dias e com 15 dias de adaptação. Concluíram que esse sistema foi economicamente viável, e que os animais não castrados tiveram maior ganho de peso e lucro. Parente et al.<sup>9</sup> também avaliaram dados de desempenho e viabilidade econômica de cordeiros confinados recebendo dieta com

diferentes proporções de concentrados (40%, 60% e 80%) na dieta, e concluíram que a dieta com 80% de concentrado proporcionou maior margem de lucro.

### 2.3 Tipos de grãos e processamentos

Nos últimos cinco anos foram publicados diversos trabalhos sobre a avaliação do consumo e desempenho de animais alimentados com diferentes tipos de grãos em dieta sem volumoso. No Brasil, os grãos de cereais mais estudados foram o milho, sorgo, arroz com casca, milheto, centeio e aveia preta, com resultados mais satisfatórios para o milho e sorgo. Mais de 70% do milho usado no Brasil, apresenta endosperma vítreo<sup>44</sup>, morfologia atribuída ao milho dentado, característica dos principais tipos de milhos cultivados no país. Diferente do milho que é cultivado nos EUA, o qual apresenta característica farinácea, de fácil digestibilidade, porém sua produção é inviável para as condições climáticas do Brasil.

Bernardes et al.<sup>45</sup> realizaram um experimento com ovinos e avaliaram o consumo, desempenho e fizeram análises econômicas do grão de milho, grão de aveia branca, grão de aveia preta e grão de arroz com casca, e verificaram a superioridade do milho em todas as avaliações.

Oliveira et al.<sup>2</sup> avaliaram três tipos de processamentos do milho (grão inteiro, grão moído e grão úmido), e concluíram que animais alimentados com dieta de grão inteiro apresentaram maior peso final, maior número de papilas ruminais por área (cm<sup>2</sup>), maior conteúdo gástrico, menor pH ruminal e menor quantidade de protozoários em comparação à dieta de grão úmido. Esses autores sugeriram que as análises desses fatores em conjunto, indicaram que o milho inteiro tem baixa velocidade de degradação no rúmen, e que há diferenças no perfil de ácidos graxos em relação às outras dietas, mas que apesar de todas essas características favoráveis ao ambiente mais ácido, a dieta de grão inteiro não prejudicou o desempenho dos animais.

Caetano et al.<sup>4</sup> avaliaram o processamento (milho úmido ou milho moído seco e a concentração de amido do milho (300, 350, 400 e 450 g/kg da MS), no desempenho de bovinos na fase de terminação. Os autores observaram que não houve efeito do tipo de processamento sobre o peso final e ganho diário médio, mas o rendimento de carcaça (quente ou fria) foi maior para animais alimentados com grão úmido quando comparado aos alimentados com grão seco moído, nas concentrações de amido de 400 e 450 g/kg da MS.

Novas técnicas de tratamentos dos grãos com substâncias químicas, como formaldeído, amônia e ácidos orgânicos, têm surgido com o objetivo de complementar a técnica de processamento mecânico do grão ou até mesmo a sua substituição. Humer & Zibeli<sup>7</sup> afirmaram

que essas substâncias são adicionadas com o objetivo de reduzir a degradação ruminal do amido, reduzindo assim os riscos de distúrbios causados pela fermentação ruminal, e permitindo que o amido seja digerido no intestino.

Trabalho realizado por Vyas et al.<sup>46</sup> avaliando o uso de dois ácidos orgânicos (ácido málico e fumárico) em duas concentrações (baixa: 61g/dia e 59g/dia; e alta 125g/dia e 134g/dias, respectivamente) para o controle de acidose ruminal subaguda (SARA) de gado confinado recebendo dieta de alto grão, concluíram que os ácidos orgânicos usados não apresentaram efeitos significativos sobre os parâmetros fermentativos ruminais nem sobre o controle da SARA quando comparados ao tratamento controle.

#### **2.4 Dieta de alto grão: ambiente ruminal e alterações metabólicas**

De acordo com Humer & Zebeli<sup>7</sup>, o fornecimento de dietas com alto teor de grão para animais ruminantes tem como objetivo principal alterar a concentração de amido, permitindo que haja uma alta densidade energética, garantindo suporte ao aumento da produção.

Contudo, dieta com alta concentração energética é considerada de alto risco para animais ruminantes, pois condiciona o animal a desenvolver distúrbios metabólicos devido à alteração na característica da população microbiana do rúmen quanto à diversidade e composição<sup>11</sup>. Faniyi et al.<sup>47</sup> concluíram em sua pesquisa que é fundamental que ecologistas e nutricionistas de ruminantes entendam a mudança na microbiota ruminal e como essa população é afetada pelo tipo de dieta fornecida a qual é influenciada pela alteração no pH do ambiente ruminal.

Zhang et al.<sup>11</sup> avaliaram a alteração da microbiota ruminal, do metabolismo hepático e parâmetros sanguíneos de caprinos alimentados com dieta sem concentrado e com 65% de grãos na matéria seca usando a metodologia de cromatografia gasosa, e notaram alterações negativas nas variáveis estudadas.

Guo et al.<sup>48</sup> corroboram com Zhang et al.<sup>49</sup> ao afirmarem que o estresse oxidativo ocorre em vacas após a alimentação com dieta de alto concentrado. Do mesmo modo, Abaker et al.<sup>37</sup> verificaram que os lipopolissacarídeos derivados do trato digestivo poderiam provocar estresse oxidativo no fígado de ruminantes alimentados com DAG. Zhang et al.<sup>11</sup> também alegam que no ponto de vista metabólico, DAG aumenta as concentrações de cistina e glicina, mas diminui as concentrações de lisina e valina no fígado. Segundo esses autores, a alteração na concentração de aminoácidos pode ser indicativo de dano hepático, causado nos animais após alimentação observado em cabras sob DAG. A concentração de aminoácidos, está direta ou indiretamente relacionada à produção de anticorpos e reações antioxidantes.

Estudos têm sido realizados com o desenvolvimento de técnicas de processamento dos grãos, que pode ser mecânico levando-se em conta a granulometria ou tratamento térmico na tentativa de melhorar o aproveitamento do amido dos grãos pelo aparelho digestório dos animais ruminantes. Segundo Humer & Zebeli<sup>7</sup>, a digestibilidade e a utilização do amido presente nos grãos é fundamental para garantir o suporte energético. Contudo, o processamento mecânico do grão contribui também para acelerar o aumento na degradação ruminal do amido. O que pode elevar o risco de distúrbios devido ao aumento na fermentação ruminal causada por microrganismos capazes de usar esse carboidrato como fonte de energia produzindo ácido láctico e deixando o ambiente ruminal mais ácido<sup>7</sup>.

De acordo com Benninghoff et al.<sup>34</sup> os amidos de trigo, triticale (cruzamento de trigo e centeio), aveia e cevada apresentam taxa rápida de passagem e alta degradação no rúmen, enquanto que o milho e sorgo apresentam menores taxas de passagem e degradação. A baixa taxa de degradação ruminal do amido dificulta a liberação dos grânulos no rúmen evitando sua utilização por bactérias amilolíticas. As bactérias amilolíticas são capazes de fermentar o amido produzindo ácido láctico, o qual contribui com a redução do pH por aumentar a liberação de íons H<sup>+</sup><sup>13,34</sup>. Oliveira et al.<sup>2</sup>, Abrão et al.<sup>16</sup> e Seddik et al.<sup>13</sup> observaram que animais recebendo dieta de alto grão inteiro apresentaram fluido ruminal com características do ecossistema ruminal ácido, identificado por análises físico-químicas.

Seddik et al.<sup>13</sup> analisando os parâmetros de fermentação ruminal e a microbiota associada ao epitélio de ovelhas em período de adaptação para uma dieta de alto grão, observaram que o pH ruminal diminuiu drasticamente, enquanto que a concentração dos ácidos graxos voláteis totais (butirato, lactato e valerato) aumentaram.

## **2.5 Uso de probiótico em dieta de alto grão**

Em 2002, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) elaborou uma definição para probiótico que mais tarde, em 2013, por meio da Associação Científica Internacional para Prebiótico e Probiótico (ISAPP) criada pela FAO em parceria com a OMS, foi novamente analisada e mantida como sendo “cepas vivas de microrganismos estritamente selecionados que, quando administradas em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro”<sup>21</sup>.

Mais recentemente, Hill et al.<sup>20</sup> por meio da elaboração de um painel de estudo com a permissão da ISAPP, definiram o probiótico como “microrganismos vivos que quando

administrados em quantidade adequada, conferem um benefício à saúde do hospedeiro”, sendo esse o conceito mais recente usado.

Os microrganismos mais utilizados como probióticos são, principalmente, bactérias Gram-positivas, como os gêneros dos *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pedococcus* e *Streptococcus*. No entanto, alguns fungos e leveduras também são usados como probióticos nutricionais, sendo os principais as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces*<sup>21</sup>.

O uso de probiótico ganhou força a partir de 1º de janeiro de 2006, quando o uso de antibiótico como promotor de crescimento passou a ser proibido na União Europeia, pois os antibióticos em uso prolongado promovem resistência dos microrganismos aos fármacos<sup>20</sup>. Os probióticos e prebióticos por serem considerados produtos naturais e garantirem efeitos similares aos antibióticos<sup>50</sup> têm ganhado espaço como promotores de crescimento com uma ampla capacidade de estudo devido a vasta diversidade microbiana existente<sup>15</sup>.

Dessa maneira, devido aos problemas metabólicos que a DAG pode vir a causar aos ruminantes, estudos sobre o uso de probióticos para esta espécie submetidos à dieta com alto concentrado parecem promissores, com o objetivo de melhorar a eficiência produtiva dos ruminantes.

Raabis et al.<sup>51</sup> ressaltam que poucos são os trabalhos com o uso de probiótico com objetivo de melhorar as condições do ambiente ruminal. De acordo com Uyeno *et al.*<sup>52</sup> o uso dessa tecnologia em ruminantes está voltada à melhoria da saúde intestinal por meio de estimulação da microbiota intestinal benéfica que ajuda a melhorar a imunidade da mucosa e a prevenção de patógenos entéricos e que tipicamente colonizam o intestino de bezerros.

Os probióticos possuem potencial para melhorar a saúde intestinal, pois a sua adição à dieta ajuda a estimular o desenvolvimento de uma microbiota equilibrada com predominância de bactérias benéficas, o que ajuda a prevenir a colonização por enteropatogênicos, contribuindo assim, para o aumento da capacidade digestiva e aumento da imunidade da mucosa<sup>52</sup>.

## 2.6 Fungos

Os fungos podem ser macro ou microrganismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos que podem viver como parasitas atacando plantas, animais, algas, outros fungos e o homem. Podendo ser sapróbios, que se alimentam de matéria orgânica em decomposição, podendo esses mesmos fungos sapróbios apresentarem comportamento parasitário dependendo das condições ambientais em que vivem<sup>53</sup>. Também existem fungos de grande importância econômica, como

os cogumelos e leveduras, usados na indústria de alimentos podendo ser consumidos imaturos ou usados no processo de fabricação de bebida, respectivamente<sup>54</sup>. Com grande aplicação econômica, há ainda os fungos usados pela indústria farmacêutica na produção de antibióticos, e alimentícia na produção de enzimas, com várias aplicações, sendo mais comum sua utilização como aditivos nutricionais<sup>53,55</sup>.

Entre os fungos, existem ainda os que vivem em associação de mutualismo com plantas formando as micorrizas e servindo como reserva de nutrientes, os que vivem dentro do TGI dos animais, como os fungos anaeróbios filamentosos que atuam no TGI de animais ruminantes degradando as fibras, e os bolores ou mofo que atuam na decomposição da matéria orgânica, sendo eles conhecidos pelo seu papel importantíssimo de reciclagem<sup>55,56</sup>.

Os fungos possuem ciclos de vida que variam de simples a complexos. Os fungos filamentosos, geralmente conhecidos como “bolores”, referem-se àqueles que crescem como colônias multicelulares<sup>35</sup>. Os fungos podem ser classificados quanto à capacidade de sobreviverem na presença ou não de oxigênio, podendo ser aeróbio (desenvolve na presença de O<sub>2</sub>), anaeróbio (não necessita de O<sub>2</sub> para crescer) e anaeróbio facultativos (são capazes de usar o O<sub>2</sub> para crescer mas são capazes também de se desenvolver sem a presença de O<sub>2</sub>)<sup>57</sup>.

Os fungos são organismo eucariontes, podendo ser unicelulares ou multicelulares (leveduras e filamentosos, respectivamente), a sua parede celular contém quitina e  $\alpha$ -glucano e não apresenta plastos ou pigmentos fotossintéticos<sup>56</sup>. Além disso, não são capazes de formarem tecidos verdadeiros, não têm reserva de amido como fonte energética<sup>54</sup>.

A reprodução pode ser sexuada (por esporo) ou assexuada (conídios). Essas estruturas germinam formando um ou mais filamentos finos. Os filamentos se ramificam no substrato por todas direções formando o que chamamos de micélios. Os micélios podem ser vegetativos, responsáveis pelo desenvolvimento, fixação, crescimento e absorção de alimentos; ou podem ser de frutificação, responsáveis pela reprodução, sendo filamentos simples conhecidos como hifas. As hifas podem ser septadas, conhecidas como apocíticas, ou não septadas, as cenocíticas<sup>54,56,58</sup>.

Na identificação macroscópica, os fungos podem se diferenciar pelas características visuais, sendo possível identificar fungos bolores, que apresentam uma colônia filamentosa, e fungos leveduras com característica cremosa. Essa característica é fundamental no processo de identificação dos fungos<sup>54</sup>.

O reino Fungi possui oito filos: *Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota*, *Microsporídia*, *Glomeromycota*, *Ascomycota*, *Zygomycota* e *Basidiomycota*<sup>53,59</sup>. Os fungos encontrados no rúmen pertencem ao filo

*Neocallimastigomycota*, e têm como característica viverem em ambientes anaeróbios terrestres ou aquáticos, e o representante clássico desse grupo é o *Neocallimastix* spp.<sup>53,56</sup>. Os fungos anaeróbios isolados do trato gastrointestinal de animais ruminantes foram divididos em dois grupos, de acordo com a morfologia observada. São os monocêntricos, que contêm um esporângio (estrutura reprodutiva) e os policêntricos, que contêm vários esporângios. Os fungos *Neocallimastix*, *Caecomyce* e *Piromyces* pertencem aos grupos dos monocêntricos e outros fungos, como os *Ruminomyces*, *Orpinomyces* e *Aneromyces*, são policêntricos<sup>28</sup>.

Estudo realizado por Abrão et al.<sup>60</sup> para verificar a presença de estruturas com características de fungos anaeróbios no conteúdo ruminal de bovinos e caprinos de corte em pastejo, observou que 77,8% e 73,9% de estrutura fúngica foram encontradas no rúmen de caprinos e bovinos, respectivamente. O gênero *Neocallimastix* spp. apresentou taxa de detecção semelhante para ambos grupos animais, e os gêneros *Orpinomyces* e *Anaeromyces* spp. juntos foram encontrados em 50% e 26% das amostras de caprinos e bovinos, respectivamente. Abrão et al.<sup>16</sup> realizaram trabalho de investigação das características populacionais da comunidade de fungos ruminais de bovinos em dietas com fonte de volumoso ou de alto concentrado energético de milho. Os autores observaram maior predominância dos fungos *Aspergillus terreus* seguido do *A. fumigatus* em bovinos alimentados com forragem lignificada, contudo animais sob dieta com alto concentrado, apresentaram maior presença de fungos do gênero *Aspergillus* spp.

## 2.7 Probióticos Fúngicos para Ruminantes

Poucos são os trabalhos que destacam os fungos autóctones do rúmen como possíveis potenciais probióticos capazes de atuarem nas propriedades digestivas do alimento melhorando as condições ruminais. Fungos anaeróbios possuem a capacidade de degradar as fibras por serem capazes de produzir enzimas fibrolíticas e possuírem uma ação mecânica de ruptura<sup>61</sup>.

Wallace<sup>37</sup>, Goes et al.<sup>62</sup> e Oliveira et al.<sup>63</sup> em seus achados relataram que a adição do fungo *Aspergillus oryzae* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* poderia melhorar a produtividade de ruminantes em aproximadamente 7 a 8%. Trabalhos mais recentes, como os de Abrão et al.<sup>16</sup>, Duarte et al.<sup>60</sup> e Almeida et al.<sup>64</sup>, que trataram sobre o isolamento, caracterização, identificação e multiplicação de fungos com potencial de aditivos nutricionais para serem usados em determinado tipo de dieta de ruminantes estão ganhando atenção no meio científico, por destacar a expressiva habilidade de produção enzimática desses isolados microbianos.

Mao et al.<sup>14</sup> trabalhando com as técnicas de pirosequenciamento, espectrofotometria e cromatografia gasosa para estudar os efeitos do aumento da concentração de grão de milho na dieta de cabras (0%, 20% e 50%) sobre as mudanças causadas na microbiota ruminal e seu metabolismo, verificaram que o aumento da proporção de grãos teve efeito diretamente proporcional com número de protozoários ciliados e bactérias metanogênicas, e ao mesmo tempo diminuiu a densidade de fungos anaeróbios e a riqueza da comunidade de arqueas (seres vivos que também habitam o rúmen, morfologicamente semelhante às bactérias, mas bioquimicamente distintas). Esses mesmos autores afirmaram que 57% dos fungos anaeróbios predominantes detectados, com o aumento da concentração de grãos, foram dos gêneros *Neocallimastix*, *Orpinomyces* e *Piromyces*, e concluíram que esse aumento de concentrado reduziu a diversidade e a riqueza da comunidade fúngica anaeróbica no rúmen.

Almeida et al.<sup>64</sup> ao identificarem fungos anaeróbios celulolíticos potenciais isolados do trato digestório de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais, verificaram que o gênero *Aspergillus* spp. apresentou maior média de índice de atividade celulolítica, sendo que dentre os 49 fungos estudados, oito *Aspergillus* spp. e seis *Paecilomyces* spp. apresentaram o maior índice de atividade celulolítica, o que indica que possuem potencial para serem utilizados na nutrição de ruminantes em dieta com fonte de volumoso.

Abrão et al.<sup>16</sup> estudaram as características do ambiente ruminal para a população fúngica (aeróbios e anaeróbios) de 50 novilhos criados em sistema de pastejo e 20 novilhos confinados recebendo dieta sem fonte de volumoso e verificaram proporções semelhantes de fungos anaeróbios monocêntricos e policêntricos em novilhos em pastejo, no entanto, esses fungos anaeróbios estritos não foram encontrados em nenhum dos animais alimentados sem fonte de volumoso. Os mesmos autores ainda verificaram que a presença de fungos anaeróbios no fluido ruminal de novilhos confinados foi maior do que em animais criados à pasto, e que após a identificação por microcultivo o gênero prevalente foi o *Aspergillus* sp. em ambos os grupos de animais.

Para o uso de microrganismos oriundos da microbiota ruminal com potencial probiótico, é viável a realização de estudos *in vitro* para verificação da viabilidade. Nesse sentido Abrão et al.<sup>65</sup> realizaram um estudo para avaliar a viabilidade do fungo *Aspergillus* spp. como potencial probiótico para dieta com volumoso durante o armazenamento e diante da pressão da microbiota autóctone. Estes autores pesquisaram ainda a capacidade de produzir toxinas e tolerância aos ácidos graxos mais comuns no rúmen. Diante dos resultados, esses autores concluíram que, dos 20 isolados estudados dois *Aspergillus* spp. (*A. terreus* e *A. fumigatus*) demonstraram não produzir micotoxinas, serem tolerantes a diferentes proporções de ácidos

graxos de cadeia curta do rúmen e serem viáveis após incubação de 96 horas sobre pressão da microbiota autóctone do rúmen enquanto estocados por um período de dois anos.

McCann et al.<sup>19</sup> corroboram com Puniya et al.<sup>66</sup> ao afirmarem que a suplementação fúngica tem demonstrado potencial promissor, principalmente quando usada como aditivos na alimentação de animais ruminantes de alta produção sobre dieta de alto concentrado em fase de acabamento (bovinos, ovinos, caprinos de corte), assim como, vacas e cabras leiteira de alta produção em período de maior demanda energética.

Em outro trabalho foi verificado o potencial desses fungos quanto à capacidade da ação mecânica de suas hifas em aderirem às fibras e o potencial de produção da enzima celulase, capaz de degradar as fibras<sup>61,67</sup>. Sendo assim, esses isolados fúngicos apontam ter potencial para serem utilizados em dieta de volumoso ou de alto concentrado como probiótico para animais ruminantes.

O potencial probiótico dos fungos tem sido testado quanto a sua capacidade de produzirem enzimas que atuam na degradação da fibra. Nadim et al.<sup>68</sup> ao avaliarem a capacidade dos fungos *Tuber maculatum* e *Tuber aestivum* em produzir enzimas, observaram o potencial do primeiro fungo para produção de amilase, xilanase, lactase, lipase, peroxidase, celulase e catalase, sendo que o segundo fungo apresentou a capacidade de produzir amilase, peroxidase e catalase; evidenciando a variedade de enzimas produzidas por um mesmo gênero fúngico. Essas variações dos tipos de enzimas produzidas são dependentes dos tipos de substratos, das condições ambientais (presença de O<sub>2</sub> e valor do pH) onde os fungos estão se desenvolvendo.

Os fungos filamentosos são capazes de produzir um grupo de enzimas, como a celulase e a xilanase, com capacidade de atuarem na degradação da celulose, que podem ser produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus* spp.. Abedin et al.<sup>69</sup> em seu estudo mostraram ainda que o *Aspergillus* spp. apresentou potencial máximo para a degradação da lignina. Estudo realizado por Mostafa et al.<sup>45</sup> demonstrou que o *Aspergillus terreus* tem capacidade de produzir celulase, sendo essa uma das principais enzimas atuantes na degradação das fibras.

Abrão et al.<sup>70</sup> ao avaliarem o potencial dos fungos isolados do rúmen de bovinos em pastejo, esclareceram o potencial do *Aspergillus terreus* e *Aspergillus fumigatus* em produzirem as enzimas celulasas, xilanases e fenoloxidasas com atividade na degradação da lignina.

Poucos ainda são os trabalhos que foram realizados com o objetivo de avaliar a produção de enzimas por fungos com potencial probiótico, os quais podem ser usados na alimentação de ruminantes<sup>46</sup>. Ainda mais escassos são os trabalhos que estudaram a ação mecânica dos fungos no aumento do aproveitamento dos amidos dos grãos quando utilizados como aditivos em dietas

com alto concentrado. Almeida et al.<sup>71</sup> avaliaram a capacidade de atividade amilolítica de fungos filamentosos coletados da Floresta Atlântica Brasileira e observaram que os fungos *Aspergillus brasiliensis* e o *Rhizopus oryzae* são capazes de produzir a enzima amilase. Sendo a amilase uma enzima muito importante na degradação do amido presente no rúmen de animais em dieta de alto grão.

### **3 OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Selecionar fungos anaeróbios facultativos do rúmen de ovinos e avaliar esses isolados quanto à capacidade probiótica em associação a dietas de alto grão em ovinos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a capacidade de degradação do amido por fungos anaeróbios facultativos provenientes do rúmen de ovinos arraoados com dieta de alto grão (milho e sorgo) sem volumoso;
- Caracterizar o perfil de fungos amilolíticos facultativos no rúmen de ovinos Santa Inês e verificar o potencial toxigênico dos probióticos do estudo;
- Verificar a tolerância dos fungos selecionados frente aos principais ácidos graxos voláteis presentes no rúmen;
- Avaliar o desempenho produtivo de ovinos sob DAG e suplementados com fungos potenciais probióticos;
- Avaliar a biometria de carcaça de ovinos suplementados com probióticos à base de fungos em DAG;
- Verificar as alterações nas populações microbianas do rúmen de ovinos sob DAG suplementados com fungos com potencial probiótico;
- Determinar a influência desses isolados fúngicos sobre parâmetros de produção de ovinos sob DAG.

#### **4 HIPÓTESE**

Acredita-se que fungos isolados e selecionados da microbiota ruminal de ovinos em dieta de alto grão possam apresentar potencial para serem usados como probióticos em animais confinados submetidos a essas mesmas dietas, sem volumoso. Uma vez que esses microrganismos já são adaptados às condições ruminais, poderá haver redução de custo com a sua utilização. Nesse sentido, o probiótico à base de fungo, aumentaria a digestão do amido elevando a disponibilidade de energia, garantindo maior ganho de peso diário, melhor conversão alimentar, melhor rendimento de carcaça, melhor espessura de gordura de acabamento, sem prejuízo à saúde do ovino.

## 5 REFERÊNCIAS

1. Paulino P, Oliveira T, Gionbeli M, Gallo S. Dietas Sem Forragem para Terminação de Animais Ruminantes. *Rev Cient Prod Anim*. 2013;15(02):161–72.
2. Oliveira LS, Mazon MR, Carvalho RF, Pesce DMC, Silva S da L e, Nogueira Filho JCM, et al. Processamento do milho grão sobre desempenho e saúde ruminal de cordeiro. *Ciência Rural* [Internet]. 23 de abril de 2015;45(7):1292–8. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782015000701292&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782015000701292&lng=pt&tlng=pt)
3. Beltrame JM, Ueno RK. Dieta 100 % concentrado com grão de milho inteiro para terminação de bovinos de corte em confinamento [Internet]. [Guarapuava]: Universidade Tuituti do Paraná; 2011. Available at: <https://tcconline.utp.br/wp-content/uploads/2012/08/DIETA-100-POR-CENTO-CONCENTRADO-COM-GRAO-DE-MILHO-INTEIRO-PARA-TERMINACAO-DE-BOVINOS-DE-CORTE-EM-CONFINAMENTO.pdf>
4. Caetano M, Goulart RS, Rizzo PM, Silva SL, Drouillard JS, Leme PR, et al. Impact of flint corn processing method and dietary starch concentration on finishing performance of Nellore bulls. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2019;251:166–75. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840118302396>
5. Venturini RS, Carvalho S, Pires CC, Pacheco PS, Pellegrin ACRS, Moro AB, et al. Consumo e desempenho de cordeiros e borregos alimentados com dietas de alto concentrado de milho ou sorgo. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2016;68(6):1638–46.
6. Paes MCD. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho [Internet]. Sete Lagoas; 2006. (Circular Técnico). Report No.: 75. Available at: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489376/1/Circ75.pdf>
7. Humer E, Zebeli Q. Grains in ruminant rations and potentials to enhance their nutritive and health value by chemical processing. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2017;226:133–51. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.02.005>
8. McAllister TA, Phillippe RC, Rode LM, Cheng KJ. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *J Anim Sci*. 1993;71(1):205–12.
9. Parente HN, Parente M de OM, Gomes RM da S, Sodré W de J dos S, Moreira Filho MA, Rodrigues RC, et al. Increasing levels of concentrate digestibility, performance and ingestive behavior in lambs. *Rev Bras Saude e Prod Anim* [Internet]. 2016;17(2):186–94. Available at: <http://www.scielo.br/pdf/rbspa/v17n2/1519-9940-rbspa-17-2-0186.pdf>
10. Oliveira LS, Mazon MR, Carvalho RF, Pesce DMC, Silva S da LE, Gallo SB, et al. Effects of processing corn on the carcass traits and meat quality of feedlot lambs. *Trop Anim Health Prod*. 2015;47(5):883–7.
11. Zhang RY, Liu YJ, Yin YY, Jin W, Mao SY, Liu JH. Response of rumen microbiota, and metabolic profiles of rumen fluid, liver and serum of goats to high-grain diets. *Animal*. 2018;1–10.
12. Dong H, Wang S, Jia Y, Ni Y, Zhang Y, Zhuang S. Long-Term Effects of Subacute Ruminant

Acidosis ( SARA ) on Milk Quality and Hepatic Gene Expression in Lactating Goats Fed a High-Concentrate Diet. *PLoS One*. 2013;8(12).

13. Seddik H, Xu L, Wang Y, Mao SY. A rapid shift to high-grain diet results in dynamic changes in rumen epimural microbiome in sheep. *Animal*. 2018;1–9.

14. Zhang RY, Jin W, Feng PF, Liu JH, Mao SY. High-grain diet feeding altered the composition and functions of the rumen bacterial community and caused the damage to the laminae tissues of goats. *Animal*. 2018;12(12):2511–20.

15. Mao SY, Huo WJ, Zhu WY. Microbiome-metabolome analysis reveals unhealthy alterations in the composition and metabolism of ruminal microbiota with increasing dietary grain in a goat model. *Environ Microbiol*. 2016;18(2):525–41.

16. Abrão FO, Duarte ER, Carolina A, Nigri DA, Luiza M, Silva F, et al. Caracterização físico-química e microbiológica e população de fungos no conteúdo ruminal de novilhos de corte hípidos ou com acidose ruminal. *Rev Bras Med Vet*. 2015;37(1):7–14.

17. Russell JR, Hino T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: A spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *J Dairy Sci*. 1985;68(7):1712–21.

18. Nagaraja TG, Newbold CJ, Nevel CJVAN. Manipulation of ruminal fermentation. In: Springer, organizador. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Chapman & Durdrecht; 1997. p. 523–632.

19. McCann J c., Elolimy AA, Looor JJ. Rumen microbiome, probiotics, and fermentation additives. *Vet Clin NA Food Anim Pract [Internet]*. 2017; Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.06.009>

20. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506–14.

21. Markowiak P, Ślizewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog [Internet]*. 2018;10(1):1–20. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>

22. Brossard L, Chaucheyras-Durand F, Michalet-Doreau B, Martin C. Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: New type of interaction. *Anim Sci*. 2006;82(6):829–36.

23. Chaucheyras-Durand F, Walker ND, Bach A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim Feed Sci Technol*. 2008;145(1–4):5–26.

24. Chaucheyras-Durand F, Fonty G. Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentations in the rumen of newborn lambs. *Microb Ecol Health Dis*. 2002;14(1):30–6.

25. Grilli DJ, Fliegerová K, Kopečný J, Lama SP, Egea V, Sohaefer N, et al. Analysis of the rumen bacterial diversity of goats during shift from forage to concentrate diet. *Anaerobe*. 2016;42:17–26.

26. Dehority B. Microbial interactions in the rumen. *Rev la Fac Agron* [Internet]. 1998;15(1). Available at: <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/agronomia/article/view/11730>
27. Abrão FO, Duarte ER, Freitas CES, Vieira EA, Geraseev LC, da Silva-Hughes AF, et al. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. *Curr Microbiol* [Internet]. 2014;69(5):649–59. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-014-0633-5>
28. Ximenes E de A. Fungos anaeróbios. *Rev Cient Médica e Biol* [Internet]. 2003;2(2):269–75. Available at: <file:///C:/Users/Ronaildo/Downloads/4295-10689-1-PB.pdf>
29. Martins EC, Magalhães KA, Souza JDF, Guimarães VP, Barbosa, Caroline Malhado Pires Holanda Filho ZF. Cenários mundial e nacional da caprinocultura e da ovinocultura. *Ativos Ovins e Caprinos*. 2016;2:3–6.
30. Nóbrega A, Vergne M. Novo Censo Agropecuário mostra crescimento de efetivo de caprinos e ovinos no Nordeste [Internet]. Brazilian Agricultural Research Corporation - Embrapa. 2018. p. 6. Available at: <https://www.embrapa.br/en/modelo/busca-de-noticias/-/noticia/36365362/novo-censo-agropecuario-mostra-crescimento-de-efetivo-de-caprinos-e-ovinos-no-nordeste>
31. Souza JDF, Souza ORG, Campeão P. Mercado e comercialização na ovinocultura de corte no Brasil. *50° Congr da Soc Bras Econ Adm e Sociol Rural*. 2012;1–16.
32. Rigobelo EC, Machado OR, Cardozo M V. Efeito da utilização de probióticos em dietas para bovinos nelores terminados em confinamento. *Ars Vet*. 2014;30:57–62.
33. Contadini M de A. Níveis de volumoso em dietas de grão de milho inteiro para bovinos de corte confinado [Internet]. Universidade de São Paulo; 2015. Available at: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-03022016-105510/pt-br.php>
34. Benninghoff J, Paschke-beese M, Südekum K. In situ and in vitro ruminal degradation of maize grain and untreated or xylose-treated wheat , barley and rye grains. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2015;210:86–93. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.10.002>
35. Dias AM, Oliveira LB De, Ítavo LCV, Mateus RG, Gomes ENO, Coca FODCG, et al. Terminação de novilhos Nelore, castrados e não castrados, em confinamento com dieta alto grão. *Rev Bras Saude e Prod Anim*. 2016;17(1):45–54.
36. Fruet APB, Stefanello FS, Rosado Júnior AG, Souza ANM de, Tonetto CJ, Nörnberg JL. Whole grains in the finishing of culled ewes in pasture or feedlot: Performance, carcass characteristics and meat quality. *Meat Sci* [Internet]. 2016;113:97–103. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.11.018>
37. Abaker JA, Xu TL, Jin D, Chang GJ, Zhang K, Shen XZ. Lipopolysaccharide derived from the digestive tract provokes oxidative stress in the liver of dairy cows fed a high-grain diet. *J Dairy Sci* [Internet]. 2017;666–78. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030216307901>
38. Barducci RS, Sarti LMN, Millen DD, Putarov TC, Franzói MCS, Ribeiro FA, et al.

Restricted versus step-up dietary adaptation in Nellore bulls: Effects over periods of 9 and 14 days on feedlot performance, feeding behavior and rumen morphometrics. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2019;247(November 2018):222–33. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.11.012>

39. Brown MS, Ponce CH, Pulikanti R. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism. *J Anim Sci*. 2006;841(E. Suppl.):E25–33.

40. Perdigão A, Millen DD, Brichi ALC, Vicari DVF, Franzói MCS, Barducci RS, et al. Effects of restricted vs. step up dietary adaptation for 6 or 9 days on feedlot performance, feeding behaviour, ruminal and blood variables of Nellore cattle. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2018;102(1):224–34.

41. Mandarino RA, Barbosa FA, Lobo CF, Silva IS, Oliveira R V. Desempenho produtivo e econômico do confinamento de bovinos zebuínos alimentados com três dietas de alto concentrado. *Arq Bras Med Vet e Zootec* [Internet]. 2013;65(5):1463–71. Available at: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v65n5/a27v65n5.pdf>

42. Valadares Filho S de C, Silva LFC e, Gionbelli MP, Rotta PP, Marcondes MI, Chizzotti ML, et al. Exigência Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados BR-Corte [Internet]. 3º ed. UFV, organizador. Viçosa; 2016. 327 p. Available at: <http://www.brcorte.com.br/br/livro2016/br>

43. Gallo SB, Merlin F de A, Macedo CM de, Silveira RD de O. Whole grain diet for Feedlot Lambs. *Small Rumin Res* [Internet]. 2014; Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.05.014>

44. Cruz JC, Queiroz LR, Pereira Filho IA. Mais de 210 cultivares transgênicas são disponibilizadas no mercado de sementes do Brasil para a safra 2012/13. *Embrapa Milho e Sorgo* [Internet]. 2012;4. Available at: [http://www.apps.agr.br/upload/ax10\\_3007201206195700\\_cultivaresdemilhoparaasafra2012\\_2013.pdf](http://www.apps.agr.br/upload/ax10_3007201206195700_cultivaresdemilhoparaasafra2012_2013.pdf)

45. Bernardes GMC, Carvalho S, Pires CC, Motta JH, Teixeira WS, Borges LI, et al. Consumo, desempenho e análise econômica da alimentação de cordeiros terminados em confinamento com o uso de dietas de alto grão [ ]. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2015;67(6):1684–92.

46. Vyas D, Beauchemin KA, Koenig KM. Using organic acids to control subacute ruminal acidosis and fermentation in feedlot cattle fed a high-grain diet. *J Anim Sci*. 2015;(August):3950–8.

47. Faniyi TO, Adegbeye MJ, Elghandour MMY, Pilego AB, Salem AZM, Olaniyi TA, et al. Role of diverse fermentative factors towards microbial community shift in ruminants. *J Appl Microbiol*. 2019;1–10.

48. Guo Y, Xu X, Zou Y, Yang Z, Li S, Cao Z. Changes in feed intake , nutrient digestion , plasma metabolites , and oxidative stress parameters in dairy cows with subacute ruminal acidosis and its regulation with pelleted beet pulp. *J Anim Sci Biotechnol* [Internet]. 2013;4(13):1–10. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3765726/>

49. Zhang RY, Liu YJ, Yin YY, Jin W, Mao SY, Liu JH. Response of rumen microbiota, and metabolic profiles of rumen fluid, liver and serum of goats to high-grain diets. *Animal*. 2018;1–

10.

50. Freitas CES, Abrão FO, Silva KL, Almeida PNM, Duarte ER. Fungos aeróbios no intestino grosso de borregos e de ovelhas criados em pastagens tropicais. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 2012;64(1):225–7.

51. Raabis S, Li W, Cersosimo L. Effects and immune responses of probiotic treatment in ruminants. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. 2019;208(2019):58–66. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.12.006>

52. Uyeno Y, Shigemori S, Shimosato T. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environ Environ.* 2015;30(2):126–32.

53. Moreira CG, Schoenlein-Crusius IH. Fungos em ambientes aquáticos continentais. 2010.

54. Paula CR. Fungos [Internet]. Definição. São Paulo; 2001. p. 43. Available at: [http://www.icb.usp.br/~crpmicol/materiais/apostila\\_fungos.pdf](http://www.icb.usp.br/~crpmicol/materiais/apostila_fungos.pdf)

55. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia médica. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2002;44(5):297–8. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652002000500013&lng=en&nrm=iso&tlng=fr](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652002000500013&lng=en&nrm=iso&tlng=fr)

56. Moraes AML de, Paes R de A, Holanda VL de. Capítulo 4: Micologia. In: *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.* EPSJV; IOC. Rio de Janeiro; 2009. p. 399–496.

57. BIREME. Descritores em Ciências da Saúde: DeCS [Internet]. OPAS/OMS. 2017. Available at: <http://decs.bvsalud.org>

58. Brasil AN de VS (ANVISA). Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica [Internet]. Módulo VII. 2004. 27 p. Available at: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod\\_7\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_7_2004.pdf)

59. Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, J.C. & Stalpers JA. *No Title Dictionary of the Fungi.* 10<sup>o</sup> ed. Wallingford: CAB International; 2008.

60. Abrão FO, Brreto SMP, Geraseev LC, Duarte ER. Fungos anaeróbios do rúmen de bovinos e caprinos de corte criados em pastagens tropicais. *Aquivo Bras Med Veterinária e Zootec.* 2010;62(3):757–60.

61. Pessoa FOA. Fungos do trato digestório de ruminantes como potencial probiótico para bovinos alimentados com forrageiras lignificadas. [Belo Horizonte]: Universidade Federal de Minas Gerais; 2016.

62. Goes RHTB, Alves DD, Valadares Filho SC, Marson ÉP. Utilização de aditivos alimentares microbianos na alimentação de bovinos de corte e leite: revisão. *Arq Ciêncai Veterinária e Zool da UNIPAR* [Internet]. 2005;000:47–56. Available at: <http://revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/67>

63. Oliveira BML, Bitencourt LL, Silva JRM, Júnior GSD, Branco ICC, Pereira RAN, et al. Suplementação de vacas leiteiras com *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500. *Arq Bras Med*

Veterinária e Zootec [Internet]. 2010;62(5):1174–82. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352010000500021&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352010000500021&script=sci_abstract&tlng=pt)

64. Almeida PNM, Freitas CE silva, Abrão FO, Ribeiro ICO, Vieira EA, Geraseev LC, et al. Atividade celulolítica de fungos aerobios isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. Riv Caatinga. 2014;27(4):202–7.

65. Abrão FO, Duarte ER, Pessoa MS, Santos VL, Rodriguez NM. Inocuidade micotóxica e viabilidade de *Aspergillus* spp. com potencial probiótico provenientes do trato digestório bovino. Arq Bras Med Veterinária e Zootec. 2018;70(6):1833–9.

66. Puniya AK, Salem AZM, Kumar S, Dagar SS, Griffith GW, Puniya M, et al. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity: A review. J Integr Agric [Internet]. 2015;14(3):550–60. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60837-6](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60837-6)

67. Mostafa FA, Abd AA, Aty E, Hamed ER, Eid BM, Ibrahim NA. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Enzymatic , kinetic and anti-microbial studies on *Aspergillus terreus* culture filtrate and *Allium cepa* seeds extract and their potent applications. Biocatal Agric Biotechnol [Internet]. 2016;5:116–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.01.005>

68. Nadim M, Deshaware S, Saidi N, Abd-elhakeem MA. Extracellular Enzymatic Activity of *Tuber maculatum* and *Tuber aestivum* Mycelia. Adv Microbiol [Internet]. 2015;(July):523–30. Available at: <https://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=57817>

69. Nooraee SE, Alimon AR, Ho YW, Abdullah N. Characterization of *Kluyveromyces marxianus* as a potential feed additive for ruminants. Lett Appl Microbiol. 2010;50(6):578–84.

70. Abrão FO, Duarte ER, Pessoa MS, Santos VL dos, Júnior LF de F, Barros K de O, et al. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp . isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. PLoS One [Internet]. 2017;12(8):1–13. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0183628>

71. Almeida PZ de, Pereira MG, Cavalho CC de, Heinen PR, Ziotti LS, Messias JM, et al. Bioprospection and characterization of the amylolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. Biota Neotrop. 2017;17(3):0–5.

## CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO

### **Avaliação *in vitro* de fungos ruminais como probiótico para ovinos em dieta de alto grão**

Neto RF<sup>1</sup>, Silva TD<sup>2</sup>, Abrão FO<sup>3</sup>, Ferreira JC<sup>2</sup>, Batista LHC<sup>2</sup>, Silva BC<sup>2</sup>, Miyagi ES<sup>4</sup>, Vieira RIM<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestrando em Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Escola de Veterinária em Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO.

<sup>2</sup>Aluno do curso de Bacharelado em Zootecnia, Instituto Federal Goiano Campus Ceres, Ceres-GO;

<sup>3</sup>Docente no Curso de Bacharelado em Zootecnia, Instituto Federal Goiano Campus Ceres, Ceres-GO;

<sup>4</sup>Docente no Curso de Bacharelado em Zootecnia, Escola de Veterinária em Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO

**RESUMO:** Fungos com potencial probiótico surgem como uma alternativa para melhorar a digestibilidade em dietas de alto grão de milho para ruminantes, pois aumentam a disponibilização de amido no rúmen. Um fungo potencial probiótico deve possuir uma boa atividade enzimática e não ser produtor de micotoxinas. Sendo assim, na pesquisa conduzida no laboratório de microbiologia do Instituto Federal Goiano – Campus Ceres, utilizou-se 30 fungos provenientes da microbiota ruminal de ovinos Santa Inês arraçoados com alto grão, sendo avaliados em três tempos de incubação (24, 42 e 72 horas) quanto à produção de enzimas que degradam o amido. Foi mensurada a atividade amilolítica dos isolados fúngicos em meio YBN com 0,2% de amido solúvel, a partir da ação da amilase no meio, realizado o microcultivo para identificação de gêneros fúngicos, teste de vapor de amônia para identificação de isolados produtores de micotoxinas, ensaio de viabilidade no fluido ruminal e microscopia eletrônica de varredura para verificação de colonização do grão de milho. Todos os isolados foram capazes de sobreviver no fluido ruminal em ensaio *in vitro* e apresentaram atividade amilolítica, contudo apenas oito destes não foram micotoxigênicos. Dos 30 isolados testados, 21 são do gênero *Aspergillus* spp., seis do gênero *Rhizopus* spp. e três *Rhizomucor* spp., sendo que 70,53% são produtores de micotoxina, inviabilizando-os como futuros potenciais probióticos. Alguns dos isolados apresentaram potencial para serem usados como probióticos na dieta de alto concentrado de grão para ovinos.

**Palavras-chave:** amido, dieta de alto concentrado, fungo anaeróbio, probiótico ruminantes.

**ABSTRACT:** Fungi with probiotic arises with an alternative to increase digestibility in high grain corn diets for ruminants as they increase the availability of starch in the rumen. A potential probiotic fungus must have a good enzymatic activity, not being a producer of mycotoxins. Therefore, the research carried out in the microbiology laboratory of Institute Federal Goi ano - Campus Ceres, used 30 fungi from the ruminal microbiota of Santa In es sheep grazed with high grain and evaluated in three incubation times (24, 42 and 72 hours) for the production of starch-degrading enzymes. The amylolytic activity of the fungal isolates was measured in YBN medium with 0.2% soluble starch, from the action of the amylase in the environment, the microculture was done to identify fungal genus, ammonia vapor test to identify mycotoxin-producing isolates, viability assay in the ruminal fluid and scanning electron microscopy to verify the colonization of the corn grain. All isolates showed amylolytic activity, however only eight of these were not mycotoxigenic. Of these, all were able to survive in ruminal fluid in *in vitro* assays. Of the 30 that were tested in isolation, 21 are of the genus *Aspergillus* spp., six of the genus *Rhizopus* spp. and three *Rhizomucor* spp., 70.53% are mycotoxin producers, making, thou, impossible to used as potential future probiotics. Some of the isolates presented potential to be used as probiotics in the high concentrate grain diet for sheep.

**Keywords:** anaerobic fungus, high concentrated diet, probiotic, ruminants, starch

## 1 INTRODUÇÃO

A digestibilidade ruminal do amido do grão de milho é limitada pela matriz proteica que é uma estrutura amorfa com função estrutural do grão que encapsula os grânulos de amido<sup>6</sup>. Essa matriz está presente principalmente no endosperma vítreo dos grãos<sup>6</sup> e a sua degradação pode melhorar a velocidade e a extensão da digestão do amido<sup>7</sup>. Em função da matriz proteica, observa-se perdas significativas de amido nas fezes dos animais submetidos a sistemas de arração de alto grão<sup>72</sup>. Os fungos do TGI penetram com seus rizoides na matriz proteica do milho, mas não tem ação nos grânulos de amido, enquanto que enzimas amilases extracelulares são liberadas para a degradação destes<sup>61</sup>.

Apesar dos ganhos comprovados com animais em fase de terminação confinados alimentados com dieta de alto grão e pouca fibra<sup>5,9,45</sup>, observa-se que, frequentemente, os mecanismos fisiológicos de homeostase são rompidos, ocorrendo redução do pH ruminal, causado pela alteração da ecologia microbiana do rúmen. Desse modo, o animal fica mais susceptível a doenças metabólicas e infecciosas<sup>12,13,49</sup>. Contudo, é válido respaldar que a notável capacidade de produção proteica nos ruminantes é dependente do sistema de pré-estômagos, o qual alberga complexo ecossistema microbiano (bactérias, protozoários, fungos e outros), responsáveis por sínteses das principais fontes energéticas (AGCC) além de serem uma das principais fontes proteica dos ruminantes (proteína microbiana)<sup>73</sup>.

Dessa forma, evidencia-se a relevância da utilização de aditivos microbianos na alimentação de ruminantes, principalmente daqueles confinados por um período mais longo, arraçoados com alto teor de concentrado, tais como os probióticos de caráter fúngico, que são capazes de produzir e liberar enzimas extracelulares, tais como, a amilase, melhorando a digestibilidade e, conseqüentemente, o desempenho animal<sup>70,74-76</sup>.

De acordo com Soares et al.<sup>77</sup> e Abrão et al.<sup>65</sup> fungos para serem usados com probiótico devem apresentar as seguintes características: capazes de sobreviverem as condições ruminais, não ser patogênicos ou toxocos, capaz de produzir emzimas digestivas, capazes de se multiplicarem mantendo uma relação de simbiose com as demais populações microbianas ruminais e com o próprio hospedeiro e participara dos processo de digestão e fermentação ruminal melhorando assim a utilização dos alimentos.

Estudos têm sido realizados com objetivo de evidenciar a capacidade de alguns microrganismos de serem usados como potenciais probióticos. Pesquisa tem mostrado os potenciais dos fungos como produtores de enzimas capazes de degradar os grânulos de amido, sendo eles os principais microrganismo usados na produção de enzima, responsável por 64%,

superior às bactérias, que respondem por apenas 24% das enzimas produzidas comercialmente<sup>77</sup>. Os fungos isolados do TGI de animais já são adaptados às condições ruminais, o que pode garantir maiores respostas como probióticos para ruminantes<sup>65</sup>.

Objetivou-se isolar e identificar fungos do rúmen de ovinos sob dieta de alto grão, e selecionar os gêneros com características desejáveis para ser usado como probióticas com simulação *in vitro*.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local do ensaio de viabilidade dos fungos**

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal Goiano - Campus Ceres, localizado na Rodovia GO 154, km 3, Zona Rural, no município de Ceres-GO, coordenadas geográficas: latitude 15°21'00" S e longitude 49°36'05" W altitude de 542 m acima do nível do mar. O ensaio de viabilidade dos fungos em *in vitro* foi realizado no primeiro semestre de 2017.

O projeto foi submetido à apreciação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Goiano, com aprovação em 20/09/2016 com número de protocolo 9356170616.

### **2.2 Obtenção dos isolados fúngicos**

Os microrganismos que foram utilizados neste experimento foram isolados de ovinos confinados recebendo dieta de alto grão (sem volumoso), 85% milho, milheto e/ou sorgo e 15% de núcleo. Os isolados fúngicos foram obtidos em trabalhos prévios conduzidos por Neto et al.<sup>74</sup> e Abrão et al.<sup>78</sup> e fazem parte de uma coleção de fungos estocada no laboratório de Microbiologia do Instituto Federal Goiano, Campus Ceres.

### **2.3 Identificação dos isolados obtidos**

Trinta isolados fúngicos provenientes do rúmen de ovinos foram agrupados por morfotipologia (cor, borda, superfície, fundo, aspecto, etc.) e posteriormente, um representante

de cada morfotipo foi identificado até gênero por técnica de microcultivo, conforme metodologia descrita por Lacaz et al.<sup>55</sup>.

#### **2.4 Avaliação da produção de amilase**

A habilidade de degradar amido foi usada como critério para determinação da produção de enzimas amilolíticas. Foi utilizado meio YNB acrescido de 0,2% de amido solúvel, como única fonte de carbono.

Os fungos foram cultivados no centro da placa com meio de cultura, em triplicata. Os cultivos foram incubados a 37°C, para medição do tamanho da colônia, tamanho do halo enzimático e verificação do índice de atividade enzimática, em cada um dos tempos de avaliação (24, 48 e 72 horas). Após a medição do tamanho da colônia, foi adicionado corante Vermelho Congo em cada um desses tempos, para medição da zona clara ao redor da colônia (correspondente ao halo de degradação enzimático pela ação da amilase). Todas as medições foram realizadas com o auxílio de paquímetro. O restante do meio (não degradado) permaneceu corado de vermelho<sup>79</sup>.

#### **2.5 Avaliação da produção de micotoxinas**

Para avaliação da produção de micotoxinas, foi utilizado o método descrito por Saito e Machida<sup>80</sup>, que faz uso do vapor de amônia para identificação de cepas produtoras e não produtoras. Os fungos (em triplicata) foram cultivados em placa de Petri com ágar BDA, incubados a 37°C por 120 horas e depois foi adicionado dois mL de hidróxido de amônio nas tampas das placas. Em seguida, as placas com os fungos foram vedadas e incubadas novamente por mais 24 horas, e posteriormente foram feitas as leituras da coloração da base das colônias crescidas. De acordo com Baptista et al.<sup>81</sup> fungos produtores de micotoxina apresentam mudanças na coloração no verso da colônia após adição da amônia.

#### **2.6 Tolerância aos ácidos graxos de cadeia curta do rúmen**

Dez mL de uma mistura constituída por ácidos acético, propiônico e butírico foram adicionados a 990 mL de caldo composto por 3,5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona e 10 g/L de uma forma de glicose. A concentração final de AGCC no meio foi de 101,4; 31,4 e 23,4 mmol/L de ácidos acético, propiônico e butírico (proporção de 65:20:15), respectivamente.

Um mL de cada isolado testado foi adicionado a 9 mL da mistura descrita anteriormente e, incubados a 39°C, em jarras de anaerobiose por 24 h, em triplicata<sup>69</sup>. Também foi testada a proporção 50:40:10 dos respectivos ácidos; sendo esta comumente encontrada no rúmen de animais arraçados com alto concentrado. Após o período de incubação foi realizada a recuperação e identificação dos inóculos.

## **2.7 Ensaio de viabilidade fúngica no fluido ruminal**

Para verificar a viabilidade e a capacidade de multiplicação dos inóculos fúngicos em associação com a microbiota autóctone ruminal, foi realizado o teste de recuperação dos fungos ao longo de diferentes tempos de incubação. Em frascos de penicilina foram adicionados 0,5 mL de uma solução padronizada de esporos fúngicos e 4,5 mL de fluido ruminal e, em seguida os frascos foram levados à estufa a 39°C.

Foram retiradas alíquotas de 1 mL dos frascos nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas e os inóculos foram plaqueados em meio Ágar Sabouraud. Posteriormente, os isolados que se desenvolveram no meio de cultura e que apresentaram morfotipologia semelhante ao aditivo inoculado foram repicados para tubos contendo o mesmo meio para posterior identificação confirmatória.

## **2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Soluções padronizadas de esporos dos fungos viáveis foram adicionadas aos frascos de penicilina acrescidos de fluido ruminal autoclavado ou não com grãos de milho inteiro. A capacidade de colonização sobre o grão foi evidenciada por microscopia eletrônica conforme metodologia descrita por Lempp<sup>22</sup>. As imagens geradas foram registradas digitalmente com diferença de potencial variável de 2,5 a 5 Kv e distância focal de trabalho de 14-16 mm.

## **2.9 Análises estatísticas**

Foram utilizados testes não-paramétricos, sendo Qui-Quadrado para taxas de detecção, Wilcoxon para análises de comparação de dois grupos, Friedman ou Kruscall-Wallis para dados de quantificação<sup>82</sup>. Foram realizadas análises descritivas das características sensoriais do fluido ruminal (cor, odor, viscosidade e PRAM).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Isolados fúngicos

Dos 30 isolados fúngicos selecionados e identificados, 21 foram do gênero *Aspergillus* spp., seis do gênero *Rhizopus* spp. e três *Rhizomucor* spp., os quais foram avaliados quanto ao seu potencial probiótico. Abrão et al.<sup>16</sup> comparando as características físico-químicas e a população fúngica do conteúdo ruminal de novilhos em pastejo de capim *Brachiaria* spp. com novilhos confinados sob dieta de alto grão com milho e núcleo (85:15) observaram a predominância dos fungos do gênero *Aspergillus* spp. tanto para animais em pastejo quanto para confinados. Flipphi et al.<sup>83</sup> justificaram a predominância desse gênero por ser versátil e eficiente em catabolizar diferentes fontes de carboidratos solúveis, assim como, polímeros complexos.

Os fungos do gênero *Rhizopus* spp. são considerados pela FAO<sup>84</sup> seguros para uso alimentar<sup>85</sup>. De acordo com Miyaoka<sup>86</sup>, fungos do gênero *Rhizopus* spp. são capazes de se desenvolver em diferentes substratos. Esse gênero de fungo é largamente utilizado na Ásia para produzir produtos alimentícios e compostos fenólicos<sup>86</sup>.

Bernardes et al.<sup>87</sup> avaliaram a capacidade do fungo da espécie *Rhizomucor miehei* em produzir  $\alpha$ -amilase sobre diferentes tipos de substrato (quirera de arroz, quirera de milho e farelo de sorgo), e evidenciaram o potencial desse fungo para a produção de  $\alpha$ -amilase a partir de subproduto agroindustrial em tempo de incubação de 48h, para pH entre 4,0 a 5,0 e temperatura de até 70°C.

Dessa forma, as características manifestadas pelos gêneros foram os fatores levados em consideração para as suas escolhas nesse estudo, pois são características que os apontaram como prováveis potenciais probióticos a serem usados na dieta de alto grão para ruminantes.

#### 3.2 Produção de amilase

Todos os isolados foram capazes de degradar amido, demonstrando que todas as cepas avaliadas possuem relevante atividade amilolítica ( $P > 0,05$ ). Como era esperado, o diâmetro médio da colônia (DMC) teve aumento gradativo, conforme o passar do tempo, diferindo entre si pelo teste de Friedman a 1% de significância. No período correspondente a 72 horas, observou-se o maior tamanho relativo das colônias. O mesmo pode ser verificado para o halo de degradação do amido (DMH), que também diferiu estaticamente entre si ( $P < 0,01$ ) (Tabela

1). O halo cresce em proporção maior quando comparado com o crescimento da colônia de forma proporcional.

TABELA 1 - Diâmetro médio da colônia (DMC), diâmetro médio do halo de degradação do amido (DMH) e índice de atividade enzimático (IAE), em três diferentes períodos de incubação.

Variáveis	Tempo de observação		
	24 horas	48 horas	72 horas
DMC, mm	0,374 <sup>c</sup>	1,426 <sup>b</sup>	3,285 <sup>a</sup>
DMH, mm	0,751 <sup>c</sup>	3,096 <sup>b</sup>	5,704 <sup>a</sup>
IAE	2,169 <sup>a</sup>	2,320 <sup>a</sup>	1,980 <sup>a</sup>

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa no tempo pelo teste de Friedman ( $\alpha = 1\%$ ).

Contudo, para o índice de atividade enzimática (IAE), que mede a relação DMH/DMC, não houve diferença significativa entre os tempos testados. Não obstante, a sua ocorrência se dá desta maneira porque conforme o halo de degradação da amilase aumenta, o tamanho da colônia também aumenta, fazendo com que o índice de atividade enzimática se mantenha equivalente nos três períodos de visualização. Soares et al.<sup>77</sup>, também verificaram que os índices enzimáticos para a amilase, medidos pela mesma relação, também não diferiram entre si com e sem refrigeração, ao se utilizar um meio completo e BDA, com e sem celulose.

Segundo Lealem & Gashe<sup>88</sup>, a habilidade do microrganismo em degradar o amido é estabelecida pelo índice de atividade enzimática, recomendando que o mesmo seja igual ou superior a dois para que a habilidade em degradar o amido seja considerada boa. Mesmo não havendo diferença significativamente estatística entre os IAE nos três períodos de incubação, é possível observar que após as primeiras 48 horas, o poder de degradação do amido dos inóculos diminuiu. No entanto isso não reflete uma menor habilidade na produção de amilase, e sim um crescimento proporcional de colônias e halos de degradação, o que leva a IAE's próximos a dois. Dessa forma podemos observar que a partir de 72h o IAE tende a diminuir.

### 3.3 Produção de micotoxinas, viabilidade fúngica no fluido ruminal, tolerância aos AGCC e habilidade mecânica sobre grão de milho (MEV)

Para os 30 inóculos estudados no experimento, 19 são produtores de micotoxina, representando um percentual de 63,33%. Estes, inicialmente, não são recomendados para compor um probiótico, pois as micotoxinas produzidas pelos mesmos podem causar efeitos indesejáveis ao metabolismo animal. Segundo Maziero e Bersot<sup>89</sup>, as micotoxinas são

metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, com baixo peso molecular, que apresentam efeito tóxico para os animais, plantas e outros microrganismos.

Abrão et al.<sup>65</sup> avaliando inocuidade micotoxicológica de algumas espécies do gênero *Aspergillus* ssp., sob as condições do seus estudos, confirmaram que as espécies investigadas não produziram aflotoxinas, sendo estas um tipo de micotoxina comumente produzida pelo *A. flavus*. No entanto, estudos têm mostrado que outras espécies como o *Aspergillus niger*, além de outros gêneros, como *Fusarium solani*, *Penicillium fumiculosum* e *P. rubrum* podem ser capazes de realizar ações opostas impedido o crescimento do *A. flavus*, em meio de cultura combinado. Já Baptista et al.<sup>81</sup> em seus achados observaram que os fungos *Rhizopus stolonifer*, *R. oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Brevibacterium linens* podem inibir o desenvolvimento do *A. flavus*. Sendo esse relato importante, pois um dos fungos investigados nesse estudo é o *Aspergillus terreus*, que pode auxiliar no controle de outros fungos indesejáveis produtores de micotoxinas. Farag et al.<sup>90</sup> confirmaram que a enzima quitinase purificada produzida por *Aspergillus terreus* inibiu o crescimento de *A. niger*, *A. oryzae*, *Penicillium oxysporium*, *Rhizocotonia solani*, *Candida albicans* e *Fusarium solani*, não apresentando efeito inibitório para o crescimento do fungo *Rhizopus oryzae*. Esses mesmos autores verificaram a ação antibacteriana contra bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*, porém não apresentou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*.

Das oito cepas que não produziram micotoxinas, todas sobreviveram às condições do fluido ruminal diante da comunidade autóctone existente no rúmen de animais submetidos à dieta de alto grão, em todos os tempos de incubação. A capacidade do fungo sobreviver mantendo uma relação simbiótica com demais microrganismos ruminais contribui para a manutenção de sua comunidade dentro do ecossistema, estabelecendo assim, equilíbrio entre as populações microbianas. Segundo Záborský et al.<sup>91</sup> esse equilíbrio da comunidade autóctone do rúmen contribui para aumento na imunidade do hospedeiro melhorando o desempenho.

Abrão et al.<sup>65</sup> verificaram a capacidade do *Aspergillus terreus* e do *Aspergillus fumigatus* em resistir à pressão da comunidade microbiológica do rúmen de bovinos sob dieta com fonte de volumoso, concluindo que devido a essa característica, associada ao potencial celulolítico e a não produção de micotoxina, esses dois fungos apresentam potenciais para serem utilizados como probióticos na nutrição de bovinos alimentados com forragem.

Todos os isolados testados foram viáveis após incubação de 24 h no meio Sabouraud, com as diferentes concentrações dos principais ácidos graxos voláteis do rúmen (acético:

propiónico: butírico, nas proporções de 65: 20: 15 e 50: 40: 10, respectivamente). Os resultados desse trabalho corroboram com de Abrão et al.<sup>65</sup> que avaliaram a viabilidade do fungo *Aspergillus* spp. em três diferentes proporções dos AGCC (65:20:15, 72:20:08 e 50:40:10), em três tempos de recuperação (0, 24 e 96 h), e verificaram que todos os isolados apresentaram viabilidade após o período de incubação nos diferentes tempos. A capacidade dos isolados de tolerar as concentrações dos AGCC é importante para confirmar a viabilidade dos fungos em manter a atividade constante na degradação do grão.

Um representante de cada um dos gêneros *Aspergillus* spp. e *Rhizomucor* spp. que se destacaram na produção de enzimas seguiram para a verificação da colonização do grão de milho sob microscopia eletrônica de varredura. Nas Figuras 01 e 02 é possível observar as hifas do micélio e estrutura reprodutiva formada por centenas de esporos fúngicos de duas cepas de interesse. Ainda na Figura 03, é possível identificar a capacidade de desenvolvimento dos fungos sobre o milho inteiro e a habilidade na ruptura da superfície dos grãos. Segundo Tortora et al.<sup>92</sup>, as hifas aéreas são as responsáveis por sustentar os esporos reprodutivos, os quais se encontram numa estrutura denominada micélio, formada por um conjunto de hifas. Segundo Paixão et al.<sup>93</sup>, as hifas de fungos do gênero *Aspergillus* spp. são septadas e se ramificam dicotomicamente em ângulos agudos.

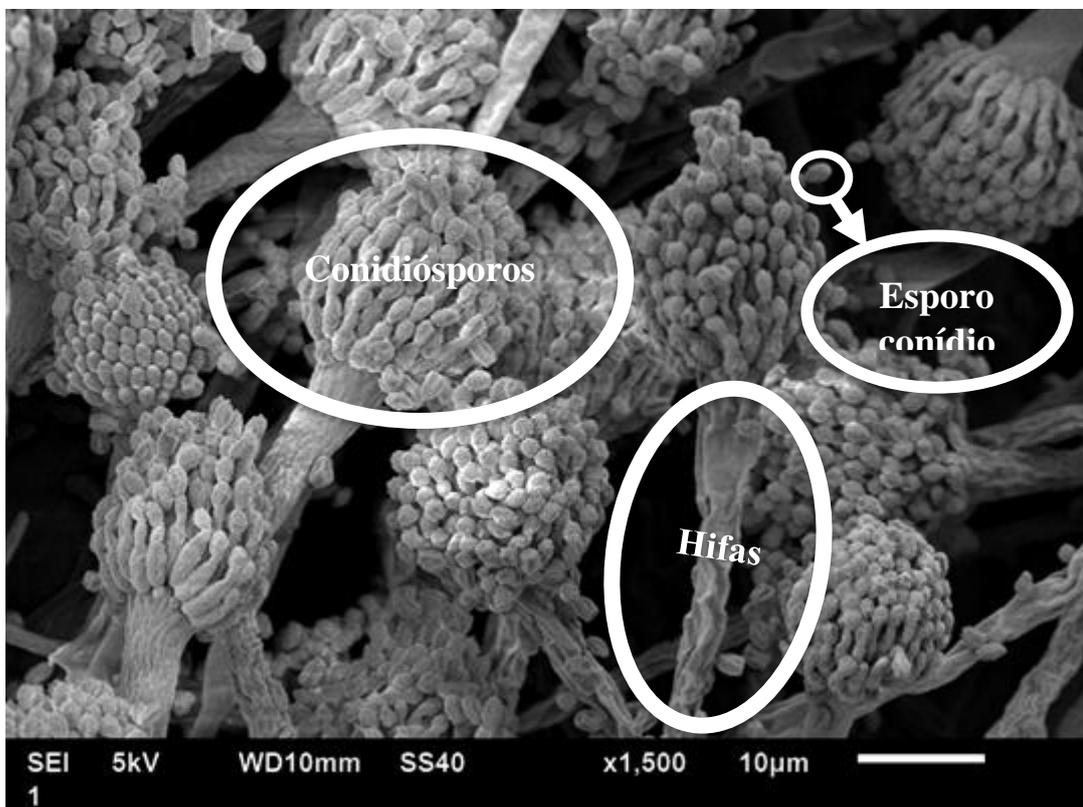


FIGURA 1 - Hifas com estrutura reprodutiva na extremidade, indicando presença de conidiósporos e inúmeros esporos do gênero *Aspergillus* spp. sobre o grão de milho inteiro, sob aumento de 1500x, e distância.

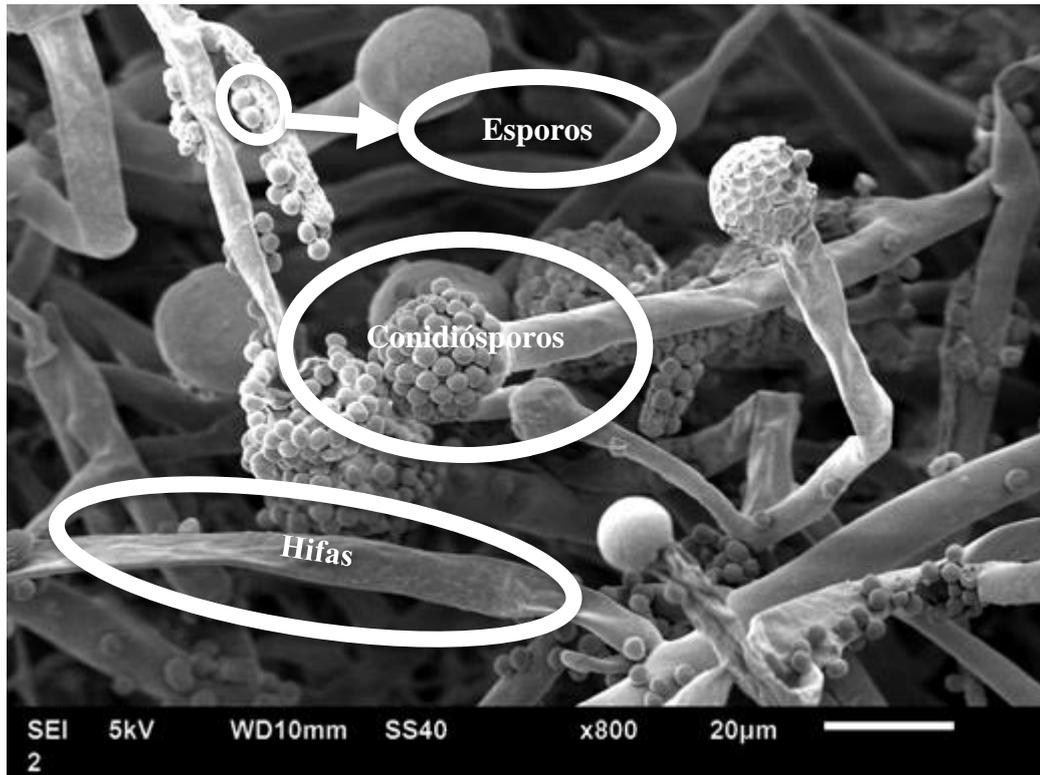


FIGURA 2 - Hifas e estrutura reprodutivas e esporos características do gênero *Rhizomucor* spp. sobre grãos de milho inteiros, sob aumento de 800x, e distância de 5kv.

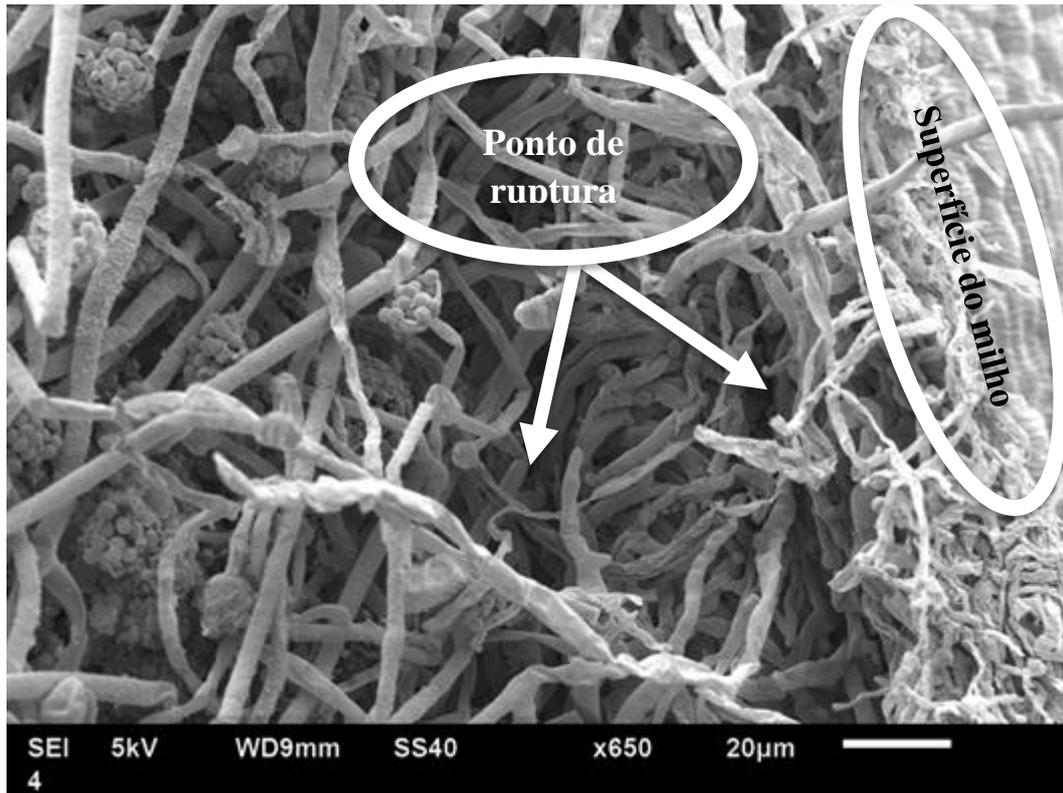


FIGURA 3 - Colonização fúngica sobre a superfície do milho, evidenciando um ponto de ruptura e aumento da superfície exposta, sob aumento de 650 x em microscopia de varredura, e distância de 5kV.

Nesse estudo foi possível observar pelo ensaio *in vitro* que os fungos anaeróbios do rúmen de ovinos selecionados são promissores para serem usados como probióticos em dieta de alto grão, como demonstrado pela ação enzimática na degradação do amido, verificada pela capacidade de produzir a enzima amilase, assim como, pela ação mecânica sobre os grãos de milho, evidenciada nas imagens de microscopia de varredura. Os gêneros de fungos selecionados demonstraram ainda, a não produção de micotoxinas e de serem capazes de sobreviver à pressão da microbiota autóctone do rúmen, além de serem tolerantes aos principais ácidos graxos de cadeia curta.

#### 4 CONCLUSÃO

Os fungos *Aspergillus terreus* e *Rhizomucor* foram os que se destacaram nas condições dessa pesquisa, apresentando características para serem usados como probióticos promissor para ovinos sob dieta de alto grão. Contudo ensio *in vivo* faz se necessário para validar esse resultado.

## 5 REFERÊNCIAS

1. Paes MCD. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho [Internet]. Sete Lagoas; 2006. (Circular Técnico). Report No.: 75. Available at: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489376/1/Circ75.pdf>
2. Humer E, Zebeli Q. Grains in ruminant rations and potentials to enhance their nutritive and health value by chemical processing. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2017;226:133–51. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.02.005>
3. Paulino PVR, Oliveira MPM, Gionbeli MP, Gallo SB. Dietas Sem Forragem para Terminação de Animais Ruminantes. *Rev Cient Produção Anim*. 2013;15(2):161–72.
4. Pessoa FOA. Fungos do trato digestório de ruminantes como potencial probiótico para bovinos alimentados com forrageiras lignificadas. [Belo Horizonte]: Universidade Federal de Minas Gerais; 2016.
5. Venturini RS, Carvalho S, Pires CC, Pacheco PS, Pellegrin ACRS, Moro AB, et al. Consumo e desempenho de cordeiros e borregos alimentados com dietas de alto concentrado de milho ou sorgo. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2016;68(6):1638–46.
6. Parente HN, Parente M de OM, Gomes RM da S, Sodré W de J dos S, Moreira Filho MA, Rodrigues RC, et al. Increasing levels of concentrate digestibility, performance and ingestive behavior in lambs. *Rev Bras Saude e Prod Anim* [Internet]. 2016;17(2):186–94. Available at: <http://www.scielo.br/pdf/rbspa/v17n2/1519-9940-rbspa-17-2-0186.pdf>
7. Bernardes GMC, Carvalho S, Pires CC, Motta JH, Teixeira WS, Borges LI, et al. Consumo, desempenho e análise econômica da alimentação de cordeiros terminados em confinamento com o uso de dietas de alto grão [. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2015;67(6):1684–92.
8. Dong H, Wang S, Jia Y, Ni Y, Zhang Y, Zhuang S. Long-Term Effects of Subacute Ruminant Acidosis ( SARA ) on Milk Quality and Hepatic Gene Expression in Lactating Goats Fed a High-Concentrate Diet. *PLoS One*. 2013;8(12).
9. Seddik H, Xu L, Wang Y, Mao SY. A rapid shift to high-grain diet results in dynamic changes in rumen epimural microbiome in sheep. *Animal*. 2018;1–9.
10. Zhang RY, Liu YJ, Yin YY, Jin W, Mao SY, Liu JH. Response of rumen microbiota, and metabolic profiles of rumen fluid, liver and serum of goats to high-grain diets. *Animal*. 2018;1–10.
11. Arcuri PB, Lopes FCF, Carneiro J da C. Microbiologia do rúmen. In: Fanep, organizador. *Nutrição de Ruminantes*. 2o ed Jaboticabal; 2011. p. 115–47.
12. Abrão FO, Duarte ER, Pessoa MS, Santos VL dos, Júnior LF de F, Barros K de O, et al. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp . isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(8):1–13. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0183628>

13. Neto RF, Oliveira ARJ De, Dijkstra D, Curcino LHB, Godoy MM De, Castro FGF, et al. População fúngica ruminal em cordeiros com dietas de alto grão submetidas a diferentes processamentos. *Zootec Trop*. 2017;35(1–2):25–34.
14. Vieira EA, Abrão FO, Ribeiro ICO, Nigri AC de A, da Silva KF, Careli RT, et al. Bastonetes Gram-negativos aeróbios e anaeróbios facultativos no fluido ruminal de bovinos de corte alimentados em pastagem lignificada e em novilhos com acidose ruminal. *Pesqui Vet Bras*. 2015;35(9):811–6.
15. Arcuri PB, Lopes FCF, Carneiro J da C. Microbiologia do rúmen. In: Berchielli TT, Pires AV, Oliveira SG de, organizadores. *Nutrição de Ruminantes*. 2o ed Jaboticabal; 2011. p. 115–60.
16. Soares IA, Flores AC, Zanettin L, Pin HK, Mendonça MM, Barcelos RP, et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Tecnol Aliment* [Internet]. 2010;30(3):700–5. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612010000300021](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000300021)
17. Abrão FO, Duarte ER, Pessoa MS, Santos VL, Rodriguez NM. Inocuidade micotoxicológica e viabilidade de *Aspergillus* spp. com potencial probiótico provenientes do trato digestório bovino. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec* [Internet]. dezembro de 2018;70(6):1833–9. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352018000601833&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352018000601833&lng=pt&tlng=pt)
18. Abrão FO, Santos EO, Dijkstra D, Neto RF, Batista LHC, Duarte ER. Efeito do processamento do grão sobre a população de protozoários ruminais de ovinos Santa Inês. *Arch Zootec* [Internet]. 2018;67(260):518–24. Available at: <https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/3882/2291>
19. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia médica. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2002;44(5):297–8. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652002000500013&lng=en&nrm=iso&tlng=fr](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652002000500013&lng=en&nrm=iso&tlng=fr)
20. Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. 1975;67(3):597–607.
21. Saito M, Machida S. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience*. 1999;40(2):205–8.
22. Baptista AS, Horii J, Baptista AS. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. *Bio CEPPA*. 2004;22(1):1–14.
23. Noorae SE, Alimon AR, Ho YW, Abdullah N. Characterization of *Kluyveromyces marxianus* as a potential feed additive for ruminants. *Lett Appl Microbiol*. 2010;50(6):578–84.
24. Arnhold E. No TitlePackage in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Brazilian J Vet Res Anim Sci*. 2013;50(6):488–92.

25. Abrão FO, Duarte ER, Carolina A, Nigri DA, Luiza M, Silva F, et al. Caracterização físico-química e microbiológica e população de fungos no conteúdo ruminal de novilhos de corte hígidos ou com acidose ruminal. *Rev Bras Med Vet.* 2015;37(1):7–14.
26. Flippi M, Sun J, Robellet X, Karaffa L, Fekete E, Zeng A, et al. Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2009;46(1):S19–44. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2008.07.018>
27. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. [Internet]. 2016. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>
28. Miyaoka MF. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DOS FUNGOS DO GÊNERO *Rhizopus* ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS [Internet]. Universidade Federal do Paraná; 2012. Available at: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/29080/R - D - MITIYO FUKUDA MIYAOKA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
29. Randhir R, Shetty K. Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Sci Direct* [Internet]. 2007;8:197–204. Available at: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/29080/R - D - MITIYO FUKUDA MIYAOKA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
30. Bernardes AV, Martins S, Ferreira J, Emerenciano O. UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASE POR *Rhizomucor miehei*. *Rev Bras Tecnol Agroindustrial* [Internet]. 2014;8(2):1439–51. Available at: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rbta/article/view/1852>
31. Lealem F, Gashe BA. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). *J Appl Bacteriol.* 1994;77:348–52.
32. Maziero MT, Bersot LS. Micotoxinas Em Alimentos Produzidos No Brasil. *Rev Bras Prod Agroindustriais.* 2015;12(1):89–99.
33. Farag AM, Abd-Elnabey HM, Ibrahim HAH, El-Shenawy M. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. *Egypt J Aquat Res* [Internet]. 2016;42(2):185–92. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejar.2016.04.004>
34. Záborský L, Hada V, Šoch M, Bohuslav Č, Smutný L, Novotná I, et al. Influence of Probiotic Feed Additives on Rumen Microflora of Cattle. *Sci Pap Anim Sci Biotechnol.* 2016;49(2):246–8.
35. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia* [Internet]. 12o ed. Artemed, organizador. Porto Alegre; 2017. Available at: <http://www.ufrgs.br/bibicbs/livros-novos/tortora-microbiologia>
36. Paixão TA da, Nascimento EF do, Parra PNS, Santos R de L. Aspergilose em avestruz (*Struthio camelus*) no Brasil. *Ciência Rural.* 2004;2004(2):573–6.

## CAPÍTULO 3 – ARTIGO CIENTÍFICO

### Probiótico fúngico para ovinos confinados recebendo dieta de alto grão de milho

Neto RF<sup>1</sup>, Silva BC<sup>2</sup>, Godoy MM<sup>3</sup>, Abrão FO<sup>3</sup>, Castro FGF<sup>4</sup>, Miyagi ES<sup>5</sup>, Souza SM<sup>2</sup>,  
Shikasho ILS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestrando em Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Escola de Veterinária em Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO;

<sup>2</sup>Aluno do curso de Bacharelado em Zootecnia, Instituto Federal Goiano Campus Ceres, Ceres-GO;

<sup>3</sup>Docente no Curso de Bacharelado em Zootecnia, Instituto Federal Goiano Campus Ceres, Ceres-GO;

<sup>4</sup>Gerente de Produção da Agrocria Comércio e Industria LTDA, Goiânia-GO

<sup>5</sup>Docente no Curso de Bacharelado em Zootecnia, Escola de Veterinária em Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO

**RESUMO:** Objetivou-se avaliar o potencial probiótico de fungos ruminais em associação a dietas de alto grão (DAG) no desempenho e rendimento de carcaça de borregos meio sangue Santa Inês/Dorper. No ensaio de desempenho adotou-se fatorial 4x2 em DIC, sendo quatro inoculantes (sem inóculos, com *Rhizomucor* spp., com *Aspergillus terreus* e com mistura dos dois fungos) e dois processamentos (grão moído ou inteiro). Utilizou-se oito baias com cinco borregos/baia, durante 75 dias com 15 dias de adaptação. As dietas com 85% de milho mais 15% de núcleo vitamínico, mineral e proteico, foram fornecidas *ad libitum* duas vezes ao dia (7h e 16h), permitido sobra de 5%, sendo os inóculos aspergidos na hora do arraçoamento. Realizou-se cinco coletas de amostras dos ingredientes das dietas, das dietas e das sobras das dietas durante o ensaio para realização das análises centesimais. Os animais foram pesados quinzenalmente para avaliação dos índices de desempenho. Ao final do ensaio, na ocasião do abate, foi calculado os rendimentos de carcaça de cinco animais por tratamento. Os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA e as médias dos dados comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Não houve interação entre os fatores processamento e probióticos para as variáveis de desempenho ( $P>0,05$ ), assim como, não houve efeito da adição dos probióticos sobre o desempenho dos ovinos alimentados com os diferentes tratamentos ( $P>0,05$ ). Foi observado maior consumo de MS, MM, EE, FDN e CNF para os animais alimentados com milho grão inteiro (MGI) ( $P<0,05$ ). Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para o consumo de MO, PB, GPMD, CA e nem para eficiência alimentar. No ensaio desempenho o aumento da concentração dos fungos não demonstrou ser eficaz. Outros estudos fazem-se necessários para encontrar a situação adequada para máxima expressão produtiva dos isolados fungos selecionados.

**Palavra-chave:** borrego, carcaça, confinamento, dieta sem volumoso, desempenho

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the probiotic potential of ruminal fungi in association with high grain diets (DAG) on performance and carcass yield of Santa Inês/Dorper half blood lambs. In the performance test, a 4x2 CRD factorial was adopted, being four inoculants (without inoculum, *Rhizomucor* spp., *Aspergillus terreus* and mixture of the two fungi) and two processing (ground or whole grain). Eight pen with five lambs/pen were used for 75 days with 15 days of adaptation. Diets with 85% corn plus 15% of vitamin, mineral and protein nuclei were provided *ad libitum* twice a day (7h and 16h), allowing a 5% surplus, and inoculants were sprayed at the time of feeding. Five samples of dietary ingredients, diets and dietary leftovers were taken during the assay to perform the centesimal analyzes. The animals were weighed fortnightly to evaluate the performance indexes. At the end of the test, at the time of slaughter, the carcass yields of five animals per treatment were calculated. Parametric data were submitted to ANOVA and data averages compared by Tukey test at 5%. There was no interaction between processing and probiotic factors for the performance variables ( $P>0.05$ ), and there was no effect of the addition of probiotics on the performance of sheep fed the different treatments ( $P>0.05$ ). Higher intake of DM, MM, EE, NDF and CNF was observed for animals fed whole grain corn (MGI) ( $P<0.05$ ). There was no significant difference ( $P>0.05$ ) for the intake of OM, CP, GPMD, CA nor for food efficiency. In the performance test the increase in fungal concentration did not prove to be effective. Further studies are necessary to find the appropriate situation for maximum productive expression of the selected fungal isolates.

**Keywords:** carcass, feedlot, lamb, roughage diet, performance

## 1 INTRODUÇÃO

Tecnologias de manejo nutricional, como o uso de grãos inteiros associados apenas a um núcleo nutricional peletizado, já têm sido praticadas por muitos pecuaristas, em especial para bovinos de corte confinados em fase final com o objetivo de acelerar o ganho médio diário e reduzir custo. Essa prática, além de ser uma alternativa para a falta de forragem, tende a reduzir o custo com mão-de-obra, máquinas e equipamentos, podendo ainda reduzir o tempo de abate e melhorar o rendimento e padronização de carcaça<sup>3-5</sup>.

Dieta sem fonte de volumoso, mais conhecida como dieta de alto grão (DAG), vem sendo muito utilizada nas criações de ovino de corte com borregos confinado em fase de terminação, os quais têm demonstrado serem mais eficiente em DAG quando comparado com bovinos<sup>2,72</sup>. Contudo, o uso da DAG tem causado muitas discussões devido aos problemas metabólicos que ela pode causar aos animais<sup>3,38,40</sup>. Dieta desafiadora como essa rompe os mecanismos fisiológicos de homeostasia do animal deixando o animal mais susceptível a outras doenças por reduzir a imunidade<sup>14,37,94</sup>.

Com o intuito de eliminar os problemas metabólicos em ocasião do uso de DAG, há muitos aditivos nutricionais comerciais disponíveis para serem utilizado no preparo de ração para ruminantes. No entanto alguns desses aditivos, como os antibióticos, são proibidos de serem utilizado por deixarem resíduos no produtos e subprodutos de origem animal<sup>52</sup>. Dessa forma a busca por aditivos naturais, como os probióticos, que não deixam resíduos tem aumentado<sup>20,95</sup>. A maiorias dos probióticos utilizados na nutrição animal são bacterianos. Pouco são os probióticos à base de fungos. Contudo, trabalhos têm evidenciado o potencial dos fungos filamentosos como aditivo para bovinos sob dieta com pastagem lignificada<sup>65,96</sup>.

Os fungos são capazes de romper as paredes lignificadas com seus rizoides se ramificando, melhorando assim sua ação e abrindo caminho para ação de outros microrganismos ruminais como as bactérias<sup>64</sup>, elevando então a degradação ruminal dos alimentos e melhorando o desempenho animal. Poucos são os trabalhos que evidenciam a ação dos fungos sobre os grãos em animais sobre DAG. O grão do milho produzido no país apresenta característica “flint” (duro) com presença de uma matriz proteica protegendo os grânulos de amido, dificultando assim a digestão do amido no intestino<sup>6</sup>. Dessa maneira, acredita-se que o aumento na concentração dos fungos anaeróbios facultativos do rúmen possa romper essa matriz proteica, facilitando a digestão intestinal do amido.

Dessa forma, o objetivo foi verificar o potencial dos fungos *Aspergillus terreus* e *Rhizomucor* spp. como aditivos nutricionais em dieta de alto grão para melhoria no desempenho e rendimento de carcaça de borregos confinados em fase final.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Ensaio de desempenho

O experimento foi conduzido no setor de ovinocultura do Instituto Federal Goiano–Campus Ceres, localizado na Rodovia GO 154, km 3, Zona Rural, no município de Ceres-GO, coordenadas geográficas: latitude 15°21'00" S e longitude 49°36'05" W altitude de 542 m acima do nível do mar. As instalações do confinamento eram todas coberta com telhas de barro, pé direito de três metro, com piso em concreto. O confinamento teve início em 15 de setembro e terminou em 29 de novembro de 2017 com duração de 75 dias, sendo 15 dias de adaptação e 60 dias para coleta de dados, com quatro períodos experimentais de 15 dias.

O projeto foi submetido à apreciação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Goiano, com aprovação em 20/09/2016 com número de protocolo 9356170616.

### 2.2 Delineamento experimental

Inicialmente, todos os animais foram pesados, identificados com colar numerado e vermifugados. Foram utilizados 40 borregos ½ sangue Santa Inês x Dorper, com peso vivo inicial de aproximadamente 35 kg ( $\pm 5,00$  kg), os quais foram distribuídos aleatoriamente em oito baias coletivas com dimensões de cinco x cinco m, sendo seis animais por baia (três machos e três fêmeas). Os tratamentos experimentais consistiram em dois tipos de processamentos do grão de milho (inteiro e moído) e quatro tipos de inoculantes (sem inóculo fúngico - TE; com *Rhizomucor* spp. - RZ; com *Aspergillus terreus* - AT e com mix dos dois fungos - MX). Foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso em um arranjo fatorial 4x2. Ao final dos 75 dias de confinamento, foi selecionado um animal (o mais pesado) por baia, o qual foi conduzido para o ensaio de digestibilidade, e os cinco animais restantes de cada baia foram abatidos para determinação do rendimento de carcaça.

Todos os tratamentos eram compostos com dieta de 85% de milho (grão inteiro ou moído) e 15% de núcleo comercial, e os animais de cada baia recebiam o respectivo tratamento, sendo eles:

- MGI-TE: 85% de grão de milho inteiro e 15% do núcleo comercial na dieta; sem adição de fungos.
- MGM-TE: 85% de grão de milho moído e 15% do núcleo comercial na dieta; sem adição de fungos.
- MGI-RZ: 85% de grão de milho inteiro e 15% do núcleo comercial na dieta; com adição de *Rhizomucor* spp.
- MGM-RZ: 85% de grão de milho moído e 15% do núcleo comercial na dieta; com adição de *Rhizomucor* spp.
- MGI-AT: 85% de grão de milho inteiro e 15% do núcleo comercial na dieta; com adição de *Aspergillus terreus*.
- MGM-AT: 85% de grão de milho moído e 15% do núcleo comercial na dieta; com adição de *Aspergillus terreus*.
- MGI-MX: 85% de grão de milho inteiro e 15% do núcleo comercial na dieta; com adição do mix dos dois fungos.
- MGM-MX: 85% de grão de milho moído e 15% do núcleo comercial na dieta; com adição do mix dos dois fungos.

### 2.3 Manejo de arraçoamento

A adaptação dos animais foi realizada com a substituição gradativa da fonte de volumoso pela dieta total de grão (inteiro ou moído) misturado ao núcleo de acordo com os tratamentos e seguindo o protocolo escada descrito por Brow et al.<sup>39</sup>, Perdigão et al.<sup>40</sup> e Barducci et al.<sup>38</sup>. Dessa forma, de acordo com o protocolo de adaptação o arraçoamento consistiu em: do 1º ao 5º dia: 60% volumoso (feno de Tifton 85: *Cynodon* spp.) na matéria natural e 40% dieta total; do 6º ao 10º dia: 50 % volumoso e 50% dieta total; do 11º dia ao 15º dia: 15% volumoso e 85% dieta total; do 16º dia em diante: 0% volumoso e 100% da dieta total.

Durante o período experimental a alimentação foi fornecida duas vezes ao dia às 7:00h e 16:00h, controlando o consumo e permitindo sobra de 5% da dieta ofertada.

Os inóculos foram fornecidos na dieta no momento do arraçoamento por aspersão com inclusão de aproximadamente  $14 \times 10^{11}$  esporos por bacia de cocho de alimentação (10 borrifadas por bacia de cocho). Como cada baia continha quatro bacias por cocho, foram aspergidos em solução líquida o total de  $56 \times 10^{11}$  esporos por baia e aproximadamente  $9,33 \times 10^{11}$  esporos por animal por dia, garantindo assim o acesso dos animais a uma maior concentração dos microrganismos selecionados como possíveis potenciais probióticos.

## 2.4 Análises de composição da dieta

O núcleo peletizado (Engordin<sup>®</sup>) usado nas dietas foi moído separadamente e em seguida misturado ao milho moído nos tratamentos com grãos moídos e nos tratamentos com grãos inteiros foi fornecido misturando como pellet inteiro. O Engordin<sup>®</sup> é um núcleo próprio para uso em dieta de alto grão, e segundo informações do fabricante é composto por fósforo (6000 mg/kg), cálcio (mínimo de 34 g/kg), fibra em detergente neutro (mínimo de 220 g/kg), matéria mineral (mínimo 200 g/kg), proteína bruta (mínimo 380 g/kg), nitrogênio não proteico equiparado em proteína (mínimo 116 g/kg), sódio (mínimo 9700 mg/kg), virginiamicina (mínimo 150 mg/kg), zinco (mínimo 420 mg/kg), iodo (5 mg/kg), vitaminas A D e E e outros minerais com umidade de 100 g/kg (90% de MS).

Para determinação da composição bromatológica das dietas dos tratamentos foram realizadas análises da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e carboidrato não fibroso (CNF), conforme a metodologia descrita por Detmann *et al.*<sup>97</sup>. Os ingredientes da ração (agrupadas por tratamento) foram secas a 60°C por 72 h, moídas em um moinho Willey em peneira de 2 mm (modelo padrão 4; Arthur M. Thomas, Filadélfia, PA). Foram realizadas as análises para MS (método INCT-CA G-003/1), cinzas (método INCT-CA M-001/1), PB (método INCT-CA N-001/1) e EE (método INCT-CA G-004/1). As concentrações de FDA e FDN com a inclusão de  $\alpha$ -amilase utilizando autoclave (método INCT-CA F-004/1 e INCT-CA F-002/1, respectivamente)<sup>97</sup> sendo o CNF estimado pela equação  $CNF = 100 - MM - PB - EE - FDN$ <sup>98</sup>.

Na tabela 2 estão relacionadas a composição química do alimento (milho) usado nas dietas experimentais como também a composição das dietas experimental a base de milho grão inteiro (MGI) e milho grão moído (MGM), com base na matéria natural fornecida aos animais confinados.

TABELA 2 - Composição química do milho e dietas experimentais (g/kg) na matéria natural.

Componentes (g/kg)	Milho	Dieta Milho Grão	
		Inteiro	Moído
Matéria seca	925,98	890,95	889,20
Matéria mineral	10,88	36,50	39,45
Matéria orgânica	989,12	963,50	960,55
Fibra em detergente neutro	323,18	250,24	183,63
Fibra em detergente ácido	242,73	31,57	38,10
Extrato etéreo	11,00	27,00	23,50
Carboidrato não fibroso	572,59	562,94	620,23
Proteína bruta	82,35	123,33	124,09

Carboidratos não fibrosos (CNF) calculados com base no FDN ( $CNF = 100 - MM - PB - EE - FDN$ ).

## 2.5 Desempenho animal e rendimento de carcaça

Foram realizadas pesagens dos animais ao final de cada período, totalizando cinco pesagens. Antes da pesagem, os animais foram mantidos em jejum com acesso direto à água por durante 12 horas. A partir dos dados coletados com as pesagens foram determinados o consumo total de ração (CTR), consumo de matéria seca (CMS), peso inicial (PI), peso final (PF), ganho de peso total (GPT), ganho de peso diário médio (GPMD).

Após a finalização do período de confinamento (75 dias), após um jejum de 12h, os animais foram abatidos no setor de Agroindústria do IF Goiano - Campus Ceres por insensibilização elétrica com eletrodos e posterior sangria através do corte das vias jugulares e artéria carótida, considerando os manejo pré-abate com 12 horas de jejum e normas higiênica-sanitárias e bem-estar animal. Foram então determinados os dados de peso vivo ao abate (PVA), peso de carcaça quente (PCQ), peso de carcaça fria (PCF), rendimento de carcaça quente (RCQ) e rendimento de carcaça fria (RCF), de acordo com metodologia descrita por Cezar e Souza<sup>99</sup>, com adaptações de Oliveira et al.<sup>10</sup>.

Após o abate, sangria e evisceração foi determinado o PCQ para avaliação do RCQ ( $PCQ/PVA * 100$ ). Em seguida, as carcaças foram refrigeradas em câmara fria à 2° C por 24h e posteriormente foram pesadas para a avaliação do RCF ( $PCF/PVA * 100$ )<sup>2,100</sup>. Após pesagem, as carcaças foram divididas ao meio e avaliadas o comprimento de carcaça e perna, circunferência de perna, profundidade de tórax, largura torácica e garupa segundo Xenofonte et al<sup>100</sup>. As carcaças foram seccionadas em sete regiões anatômicas para medida de peso das regiões do pescoço, costelas, lombo e serrote<sup>101</sup>.

## 2.6 Análises estatísticas

Após análise exploratória dos dados e descritivas, dados paramétrico foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo pacote estatístico EASYANOVA do R<sup>82</sup>, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Ensaio de desempenho

Não houve interação entre os fatores processamento dos grãos e adição de probióticos para as variáveis de desempenho ( $P>0,05$ ), assim como, não houve efeito da adição dos probióticos sobre o desempenho dos ovinos alimentados com os diferentes tratamentos ( $P>0,05$ ). Sendo assim, os dados foram analisados de forma independente analisando os efeitos do processamento dos grãos.

Os consumos matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e fibra em detergente neutro (FDN) foram maiores para os tratamentos com grão milho inteiro ( $P<0,01$ ) (Tabela 4). Este resultado pode estar relacionado com a baixa disponibilidade dos nutrientes contidos no grão inteiro, o que dificulta o acesso da microbiota ruminal aos nutrientes necessários ao desenvolvimento microbiano levando ao aumento no consumo de alimento pelo hospedeiro. De acordo com Humer e Zibeli<sup>7</sup> o processamento mecânico do grão de milho aumenta a disponibilidade de nutrientes que podem estar presos à matriz proteica, aumentando, portanto, a disponibilidade de proteína e de amido disponível para serem ingerido no intestino delgado, e assim, reduzindo o consumo de alimento.

TABELA 3 - Consumos de matéria seca e nutrientes por ovinos confinados recebendo dieta de alto grão inteiro ou moído, kg/kg.

Variáveis	Processamento		P-valor	CV
	Inteiro	Moído	Proc	
Consumo de Matéria Seca, kg/dia	1,219 <sup>a</sup>	1,009 <sup>b</sup>	0,001*	24,77
Consumo de Matéria Mineral, kg/kg	0,042 <sup>a</sup>	0,037 <sup>b</sup>	0,001*	28,26
Consumo de Matéria Orgânica, kg/kg	1,177	1,173	0,873	24,69
Consumo de Extrato Etéreo, kg/kg	0,034 <sup>a</sup>	0,029 <sup>b</sup>	0,001*	22,90
Consumo de Proteína Bruta, kg/kg	0,147	0,146	0,739	26,54
Consumo de Fibra em Detergente Neutro, kg/kg	0,299 <sup>a</sup>	0,207 <sup>b</sup>	0,001*	27,90
Consumo de Fibra em Detergente Acido, kg/kg	0,047	0,047	0,712	24,02
Consumo de Carboidrato Não Fibroso, kg/kg	0,995 <sup>a</sup>	0,994 <sup>b</sup>	0,001*	0,13
Conversão Alimentar, kg/kg	5,344	4,8274	0,395	41,02
Eficiência Alimentar, kg/kg	0,221	0,230	0,706	35,72

Médias seguidas de letras minúscula diferente na linha, apresenta diferença significativa 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Proc: processamento, CV: coeficiente de variação

Os animais no tratamento com grão de milho inteiro apresentaram maior consumo médio diário de matéria seca do que os animais sob dieta de grão moído, sendo 1,219 kg/dia e 1,009 kg/dia, respectivamente ( $P<0,01$ ) (Tabela 3). Esses achados podem justificar o maior consumo de FDN, MM e EE na dieta de MGI ( $P<0,04$ ). Os maiores consumos relacionam-se com o fato dos nutrientes necessários para ativação da saciedade estarem presos na matriz proteica, dessa forma os hormônios de saciedade não são mobilizados fazendo com o animal consuma mais alimento, sendo esse um dos fatores controladores do consumo da dieta (mecanismo quimiorreceptor)<sup>102</sup>.

Devido ao maior consumo de MS, os animais sob dieta de GMI apresentaram maior PF, PVA, PCQ, PCF ( $P<0,01$ ) (Tabelas 4 e 5). Bernardes et al.<sup>45</sup> avaliaram a terminação de cordeiros machos castrados sobre dieta de alto grão de milho (concentração de 72,83% da MS), de arroz com casca (69,95% da MS), de aveia preta (81,60 da MS) e aveia branca (77,89% da MS), ambos associado a um núcleo mineral (15% da MS). Os autores observaram que os animais submetidos à dieta com grão de milho apresentaram maior consumo de MS, MO, PB, carboidratos totais e de NDT, contudo, apresentaram melhor escore de condição corporal, GPMD e conversão alimentar.

O fato do grão de milho tem menor concentração de fibra do que arroz com casca, aveia preta e aveia branca pode ter contribuído para o seu maior consumo, pois alimento com maior teor de fibra tem maior tempo de degradação ruminal<sup>97</sup>. Sendo assim, o maior consumo de MS dos animais sob dieta com GMI pode ser justificado por conter menor teor de fibra. Alimentos fibrosos são mais difíceis de serem digeridos, o que reduz o consumo por proporcionar efeito de enchimento no rúmen, sendo esse um outro fato que controla o consumo pela capacidade limite de distensão do rúmen (mecanismo de distensão ruminal)<sup>102</sup>.

TABELA 4 - Dados de desempenho ovinos alimentados com dieta de alto grão associado a diferentes a probiótico a base de fungos.

Variáveis (kg)	Processamento		Probiótico				P-valor		EPM	CV
	Inteiro	Moído	RZ	AT	TE	MX	Proc	Prob		
Desempenho										
GPMD	0,270	0,232	0,246	0,258	0,241	0,259	0,065	0,857	0,013	27,37
GTP	15,12	13,02	13,79	14,45	13,51	14,51	0,067	0,857	0,740	27,40
PI	36,52	34,35	35,00	35,50	35,40	35,85	0,086	0,959	0,855	12,06
PF	51,64 <sup>a</sup>	47,37 <sup>b</sup>	48,79	49,96	48,92	50,37	0,015*	0,885	1,404	11,74

\*Médias seguidas de letras minúsculas diferente na linha, apresenta diferença significativa 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. EPM: erro padrão da média; CV: coeficiente de variação; Proc: processamento do grão; Prob: probióticos fúngicos; *Rhizomucor* spp.(RZ), *Aspergillus terreus* (AT),

controle (TE) mistura dos dois fungos (MX), GPMD: ganho de peso médio diário; PI: peso inicial; PF: peso final; e GTP: ganho total de peso no período.

As variáveis de desempenho PI, GPMD, GTP (Tabela 4), assim como as variáveis relacionadas às características de carcaças como RCQ, RCF, peso do pescoço, do pernil, da paleta, serrote e das costelas, comprimento da carcaça (CC), largura torácica e garupa (LT e LG), profundidade de tórax (PT), comprimento de perna (CP), circunferência de perna (CirP), espessura da gordura subcutânea (EGS), marmoreio, pH de carcaça quente e fria (pHCQ e pHFQ) (Tabela 5), não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ( $P>0,05$ ).

Contudo, PF, PVA, PCQ, PCF, peso do lombo e fraldinha foram maiores ( $P<0,05$ ) para dieta de grão inteiro (Tabelas 4 e 5). Segundo Oliveira et al.<sup>2</sup>, ao avaliarem o efeito do processamento do milho em dieta de alto grão para ovinos confinados, observaram que os animais em dieta MGI apresentaram maior conteúdo gástrico, o que justifica um maior PVA. Turgeon et al.<sup>103</sup> comparando a dieta de alto grão com dieta com volumoso para novilhos confinados em terminação concluíram que a dieta de alto concentrado tende a diminuir o CMS e o GPMD, no entanto melhora a eficiência alimentar e energética.

Na avaliação de diferentes tipos de processamentos de grãos (inteiro ou moído, úmido ou seco) na dieta de cordeiros confinados, Oliveira et al.<sup>10</sup> concluíram que o processamento do grão não influenciou nas características da carcaça, que grão seco fornecido inteiro ou moído fornece carcaça mais pesadas e que dieta de grão inteira seco, resulta em animais mais pesados. O uso de milho grão inteiro seco torna se economicamente mais conveniente por apresentar menor custo no seu fornecimento aos animais<sup>10</sup>.

TABELA 5- Características relacionada à carcaça de ovinos alimentados com dieta de alto grão associado a diferentes a probiótico a base de fungos.

Variáveis	Processamento		Probiótico				P-valor		EPM	CV
	Inteiro	Moído	RZ	AT	TE	MX	Proc	Prob		
PVA, kg	50,33 <sup>a</sup>	46,51 <sup>b</sup>	46,58	49,63	47,68	49,8	0,015*	0,360	1,078	9,94
PCQ, kg	27,50 <sup>a</sup>	25,20 <sup>b</sup>	25,31	27,25	25,68	27,16	0,010*	0,257	0,644	27,00
PCF, kg	27,05 <sup>a</sup>	24,70 <sup>b</sup>	24,08	26,67	25,34	26,68	0,010*	0,318	0,653	27,00
RCQ, %	54,87	54,19	54,42	54,95	54,1	54,65	0,212	0,717	0,292	27,00
RCF, %	53,92	53,09	53,31	53,74	53,29	53,67	0,143	0,907	0,285	3,26
Peso Pescoço, kg	1,31	1,17	1,24	1,19	1,26	1,26	0,309	0,980	0,060	33,18
Peso Pernil, kg	3,50	3,36	3,28	3,54	3,40	3,50	0,442	0,717	0,083	16,36
Peso Paleta, kg	2,03	1,98	1,95	2,11	1,94	2,03	0,658	0,552	0,044	14,92
Peso Lombo, kg	1,11 <sup>a</sup>	0,94 <sup>b</sup>	1,00	1,01	0,99	1,09	0,011*	0,611	0,032	18,89
Peso Serrote, kg	0,66	0,60	0,61	0,69	0,55	0,67	0,283	0,216	0,025	24,60
Peso Fraldinha, kg	1,15 <sup>a</sup>	0,94 <sup>b</sup>	0,94	1,05	1,03	1,17	0,034*	0,447	0,049	29,36
Peso Cos 1 <sup>a</sup> à 5 <sup>a</sup> , kg	0,91	0,83	0,91	0,83	0,89	0,86	0,386	0,921	0,039	30,65
Peso Cos 6 <sup>a</sup> à 13 <sup>o</sup> , kg	1,87	1,76	1,69	1,94	1,83	1,79	0,375	0,606	0,063	22,90
CC, cm	68,00	67,18	66,57	68,23	67,75	67,80	0,605	0,893	0,721	7,36
LT, cm	18,57	18,12	17,70	19,30	18,05	18,35	0,468	0,306	0,297	10,56
LG, cm	17,67	17,07	16,60	18,00	17,30	17,6	0,377	0,514	0,319	12,18
PT, cm	29,25	28,97	29,57	28,30	29,18	29,40	0,632	0,399	0,262	0,03
CP, cm	45,35	46,22	44,80	47,26	45,75	45,35	0,426	0,427	0,514	7,47
CirP, cm	47,35	47,07	45,85	47,65	47,55	47,80	0,746	0,333	0,424	5,64
EGS, mm	6,52	6,21	5,60	6,29	6,80	6,75	0,502	0,235	0,220	22,59
Marmoreio	3,4	3,4	3,4	3,7	3,2	3,3	0,780	0,673	0,167	33,37
pHCQ	6,55	6,53	6,46	6,53	6,55	6,62	0,866	0,839	0,059	6,27
pHCF	5,81	5,88	5,86	5,87	5,78	5,88	0,577	0,941	0,061	7,24

\*Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha, apresenta diferença significativa 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. EPM: erro padrão da média; CV: coeficiente de variação; Proc: processamento do grão; Prob: probióticos fúngicos; *Rhizomucor* spp.(RZ), *Aspergillus terreus* (AT), controle (TE) mistura dos dois fungos (MX), PVA: peso vivo ao abate; PCQ: peso de carcaça quente; PCF: Peso de carcaça fria; RCQ: rendimento de carcaça quente; RCF: rendimento de carcaça fria; CC: comprimento da carcaça; LT: largura torácica; LG: largura de garupa; CP: comprimento de perna; CirP: circunferência de perna; PT: profundidade de tórax; Peso Cos 1<sup>a</sup> à 5<sup>a</sup>: peso do corte de costela da 1<sup>a</sup> a 5<sup>a</sup>; Peso Cos. 6<sup>a</sup> às 13<sup>a</sup>: peso do corte de costela da 6<sup>a</sup> à 13<sup>a</sup> costela; EGS: espessura da gordura subcutânea; pHCQ: pH da carcaça quente; pHCF: pH da carcaça fria.

Durante o ensaio de desempenho não foi observado nenhum quadro de acidose nos animais, assim como, não foi observado durante o abate descamações das papilas ruminais, como pode ser observado na figura 4. Na imagem foi possível observar que os animais alimentados com grão inteiro (A) apresentaram coloração das papilas mais escuras enquanto que os animais com dieta de grão moído (B) com a coloração mais clara.



FIGURA 4 - Imagem das papilas ruminais dos ovinos recebendo dieta de alto grão de milho inteiro e moído com probiótico fúngico. As duas imagens da esquerda (A) são de animais com dieta de grão inteiro e as outras duas da direita de animais em dieta de grão moído (B).

Animais submetidos a dieta de alto grão com milho moído (MGM) apresentam maiores condições para desenvolver acidose. Segundo Abrão et al.<sup>16</sup>, Vieira et al.<sup>75</sup> e Neto et al.<sup>74</sup>, o rúmen de animais nessas condições apresentam o líquido ruminal mais claro e pH mais ácido, o que sugere acidose. Contudo, apesar das papilas dos animais que receberam dieta de milho moído estarem mais claras (Figura 4-B), os borregos não se encontravam em estado de acidose subclínica, pois não foram observadas ocorrências de lesões nas papilas. Provavelmente, tal fato pode estar relacionado ao uso do núcleo com aditivos (virginiamicina = mínimo 150 mg/kg) capazes de promover o equilíbrio do pH<sup>45</sup>, o que contribuiu para a maior população de protozoários.

No presente trabalho, o aumento da concentração do fungo *Aspergillus terreus* ou *Rhizomucor* spp. como probióticos não foi eficaz, o que pode estar relacionado com o método de aplicação do inóculo, dosagem utilizada e/ou categoria animal estudada.

#### 4 CONCLUSÃO

O aumento da concentração do fungo *Aspergillus terreus* ou *Rhizomucor* spp. como probióticos não foi eficaz.

A dieta com milho grão inteiro foi melhor para garantir maior peso final dos animais e maior peso de carcaça quente e fria.

## 5 REFERÊNCIAS

1. Beltrame JM, Ueno RK. Dieta 100 % concentrado com grão de milho inteiro para terminação de bovinos de corte em confinamento [Internet]. [Guarapuava]: Universidade Tuituti do Paraná; 2011. Available at: <https://tcconline.utp.br/wp-content/uploads/2012/08/DIETA-100-PORCENTO-CONCENTRADO-COM-GRAO-DE-MILHO-INTEIRO-PARA-TERMINACAO-DE-BOVINOS-DE-CORTE-EM-CONFINAMENTO.pdf>
2. Caetano M, Goulart RS, Rizzo PM, Silva SL, Drouillard JS, Leme PR, et al. Impact of flint corn processing method and dietary starch concentration on finishing performance of Nellore bulls. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2019;251:166–75. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840118302396>
3. Venturini RS, Carvalho S, Pires CC, Pacheco PS, Pellegrin ACRS, Moro AB, et al. Consumo e desempenho de cordeiros e borregos alimentados com dietas de alto concentrado de milho ou sorgo. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2016;68(6):1638–46.
4. Oliveira LS, Mazon MR, Carvalho RF, Pesce DMC, Silva S da L e, Nogueira Filho JCM, et al. Processamento do milho grão sobre desempenho e saúde ruminal de cordeiro. *Ciência Rural* [Internet]. 23 de abril de 2015;45(7):1292–8. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782015000701292&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782015000701292&lng=pt&tlng=pt)
5. Paulino PVR, Oliveira MPM, Gionbeli MP, Gallo SB. Dietas Sem Forragem para Terminação de Animais Ruminantes. *Rev Cient Produção Anim*. 2013;15(2):161–72.
6. Barducci RS, Sarti LMN, Millen DD, Putarov TC, Franzói MCS, Ribeiro FA, et al. Restricted versus step-up dietary adaptation in Nellore bulls: Effects over periods of 9 and 14 days on feedlot performance, feeding behavior and rumen morphometrics. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2019;247(November 2018):222–33. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.11.012>
7. Perdigão A, Millen DD, Brichi ALC, Vicari DVF, Franzói MCS, Barducci RS, et al. Effects of restricted vs. step up dietary adaptation for 6 or 9 days on feedlot performance, feeding behaviour, ruminal and blood variables of Nellore cattle. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2018;102(1):224–34.
8. Abaker JA, Xu TL, Jin D, Chang GJ, Zhang K, Shen XZ. Lipopolysaccharide derived from the digestive tract provokes oxidative stress in the liver of dairy cows fed a high-grain diet. *J Dairy Sci* [Internet]. 2017;666–78. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030216307901>
9. Zhang RY, Jin W, Feng PF, Liu JH, Mao SY. High-grain diet feeding altered the composition and functions of the rumen bacterial community and caused the damage to the laminae tissues of goats. *Animal*. 2018;12(12):2511–20.
10. Liu JH, Bian GR, Zhu WY, Mao SY. High-grain feeding causes strong shifts in ruminal epithelial bacterial community and expression of Toll-like receptor genes in goats. *Front Microbiol*. 2015;6(MAR).

11. Uyeno Y, Shigemori S, Shimosato T. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environ Environ*. 2015;30(2):126–32.
12. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506–14.
13. Angelakis E. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals. *Microb Pathog* [Internet]. 2017;106:162–70. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.002>
14. Abrão FO, Duarte ER, Pessoa MS, Dos Santos VL, De Freitas LF, Barros KDO, et al. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. *PLoS One*. 2017;12(8).
15. Abrão FO, Duarte ER, Pessoa MS, Santos VL, Rodriguez NM. Inocuidade micotóxica e viabilidade de *Aspergillus* spp. com potencial probiótico provenientes do trato digestório bovino. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec*. 2018;70(6):1833–9.
16. Almeida PNM, Freitas CE silva, Abrão FO, Ribeiro ICO, Vieira EA, Geraseev LC, et al. Atividade celulolítica de fungos aeróbios isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. *Riv Caatinga*. 2014;27(4):202–7.
17. Paes MCD. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho [Internet]. Sete Lagoas; 2006. (Circular Técnico). Report No.: 75. Available at: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489376/1/Circ75.pdf>
18. Brown MS, Ponce CH, Pulikanti R. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism. *J Anim Sci*. 2006;84I(E. Suppl.):E25–33.
19. Detmann E, Souza M, Valadares Filho S, Queiroz A, Berchielli T, Saliba E, et al. Métodos para Análise de Alimentos. 1o ed. Suprema, organizador. Visconde do Rio Branco; 2012. 214 p.
20. Mertens DR. Creating a System for Meeting the Fiber Requirements of Dairy Cows. *J Dairy Sci* [Internet]. 1997;80(7):1463–81. Available at: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76075-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76075-2)
21. Cezar MF, Sousa WH. Carcaças ovinas e caprinas: obtenção-avaliação-classificação. 1o ed. Agropecuária ET, organizador. Uberaba; 2007. 232 p.
22. Oliveira LS, Mazon MR, Carvalho RF, Pesce DMC, Silva S da LE, Gallo SB, et al. Effects of processing corn on the carcass traits and meat quality of feedlot lambs. *Trop Anim Health Prod*. 2015;47(5):883–7.
23. Xenofonte ARB, Carvalho FFR de, Batista ÂMV, Medeiros GR de. Características de carcaça de ovinos em crescimento alimentados com rações contendo farelo de babaçu. *Rev Bras Zootec*. 2009;38(2):392–8.
24. Colomer Rocher F, Morand-Fehr P, Kirton AH, Delfa Belenguer R, Sierra Alfranca I. Métodos normalizados para el estudio de los caracteres cuantitativos y cualitativos de los

canales caprinas y ovinas [Internet]. INIA, organizador. Madrid; 1988. 41 p. Available at: <http://hdl.handle.net/10532/1424>

25. Arnhold E. No TitlePackage in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Brazilian J Vet Res Anim Sci*. 2013;50(6):488–92.

26. Humer E, Zebeli Q. Grains in ruminant rations and potentials to enhance their nutritive and health value by chemical processing. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2017;226:133–51. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.02.005>

27. Silva JFC. Mecanismos reguladores de consumo. In: Funep, organizador. *Nutrição de Ruminantes*. 2o ed Jaboticabal; 2011. p. 61–82.

28. Bernardes GMC, Carvalho S, Pires CC, Motta JH, Teixeira WS, Borges LI, et al. Consumo, desempenho e análise econômica da alimentação de cordeiros terminados em confinamento com o uso de dietas de alto grão []. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2015;67(6):1684–92.

29. Turgeon OA, Szasz JI, Koers WC, Davis MS, Vander Pol KJ. Manipulating grain processing method and roughage level to improve feed efficiency in feedlot cattle. *J Anim Sci*. 2009;88(1):284–95.

30. Abrão FO, Duarte ER, Carolina A, Nigri DA, Luiza M, Silva F, et al. Caracterização físico-química e microbiológica e população de fungos no conteúdo ruminal de novilhos de corte hígdidos ou com acidose ruminal. *Rev Bras Med Vet*. 2015;37(1):7–14.

31. Vieira EA, Abrão FO, Ribeiro ICO, Nigri AC de A, da Silva KF, Careli RT, et al. Bastonetes Gram-negativos aeróbios e anaeróbios facultativos no fluido ruminal de bovinos de corte alimentados em pastagem lignificada e em novilhos com acidose ruminal. *Pesqui Vet Bras*. 2015;35(9):811–6.

32. Neto RF, Oliveira ARJ De, Dijkstra D, Curcino LHB, Godoy MM De, Castro FGF, et al. População fúngica ruminal em cordeiros com dietas de alto grão submetidas a diferentes processamentos. *Zootec Trop*. 2017;35(1–2):25–34.

## CAPÍTULO 4 – ARTIGO CIENTÍFICO

### Trato gástrico intestinal de ovinos sob dieta de alto grão com adição de fungos como probiótico

Neto RF<sup>1</sup>, Silva TD<sup>2</sup>, Santana Neto VV<sup>2</sup>, Godoy MM<sup>3</sup>, Abrão FO<sup>3</sup>, Miyagi ES<sup>4</sup>, Silva RJM<sup>2</sup>,  
Lima DKS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestrando em Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Escola de Veterinária em Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO;

<sup>2</sup>Aluno do curso de Bacharelado em Zootecnia, Instituto Federal Goiano Campus Ceres, Ceres-GO;

<sup>3</sup>Docente no Curso de Bacharelado em Zootecnia, Instituto Federal Goiano Campus Ceres, Ceres-GO;

<sup>4</sup>Docente no Curso de Bacharelado em Zootecnia, Escola de Veterinária em Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO

**RESUMO:** Objetivou-se avaliar as características microbiológicas e físico-químicas do fluido ruminal e alterações histológicas do trato gástrico intestinal de ovinos sob dieta de alto grão com aditivos de fungos *Aspergillus terreus* e/ou *Rhizomucor* spp. como probiótico. No ensaio *in vivo* adotou-se fatorial 4x2 em DIC, sendo quatro inoculantes (sem inóculos, com *Rhizomucor* spp., com *Aspergillus terreus* e com mistura dos dois fungos) e dois processamentos (grão moído ou inteiro). Os borregos meio-sangue Santa Inês/Dorper foram alojados em oito baias com cinco borregos/baia, durante 75 dias com 15 dias de adaptação. Ao final do ensaio, na ocasião do abate, foi realizada a coleta do fluido ruminal para o estudo do perfil microbiológico do rúmen, avaliação macroscópica do líquido ruminal, concentração de nitrogênio amoniacal e verificação da atividade microbiológica, além dos fragmentos do TGI para análises histológicas. Os dados paramétricos foram submetidos à ANOVA e as médias dos dados comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Para as variáveis do perfil microbiológico, foram usados os testes não paramétricos Qui-quadrado, Wilcoxon e Kruscall-Wallis, além das análises descritivas. Pelas colorações dos fluidos, os animais apresentaram baixo índice de acidose. O odor aromático predominou, o que caracteriza ambiente com pH neutro. As amostras do fluido apresentaram alta atividade microbiana. O pH ruminal diferenciou-se ( $P < 0,05$ ) quando considerado o tipo de processamento, sendo maior para milho grão moído (MGM). Não houve diferença para nenhuma das comunidades microbiológica analisadas ( $P > 0,05$ ) (bactérias Lac+ e Lac-, fungos, leveduras e protozoários). Identificou-se seis gêneros de fungos anaeróbicos facultativos para as todas amostras de fluido ruminal do total de 15 observações. O *Cladosporium* spp. foi o gênero mais prevalente (46,66%), seguido do *Aspergillus* spp. (26,66%). Não houve diferença significativa na população de protozoários ( $P > 0,05$ ). A largura da base das papilas ruminiais apresentou interação expressiva entre os fatores processamento e probiótico fúngico, sendo maior para MGM ( $P < 0,05$ ) para o tratamento com *Rhizomucor* e o controle ( $P < 0,05$ ). O fluido ruminal dos animais sob dieta de alto grão com adição dos fungos *Aspergillus terreus* e *Rhizomucor* spp. apresentaram característica semelhantes a de animais em

condições de pastejo. Outros estudos fazem-se necessários para elucidar melhor os as ações dos fungos como probiótico em ruminante sob DAG.

**Palavra-chave:** ruminal bacteria, rumen microbiota, rumen, protozoa, small ruminants

**ABSTRACT:** The objective of this study was to evaluate the microbiological and physicochemical characteristics of ruminal fluid and histological changes of the intestinal gastric tract of sheep under high grain diet with *Aspergillus terreus* an or *Rhizomucor* spp. as a probiotic. In the in vivo test, a 4x2 completely randomized design factorial was adopted, being four inoculants (without inoculum, *Rhizomucor* spp., *Aspergillus terreus* and mix of the two fungi) and two processing (ground or whole grain). Santa Inês/Dorper half-blood lambs were housed in eight stalls with five lambs/stall for 75 days with 15 days of adaptation. At the end of the trial, at the time of slaughter, ruminal fluid was collected to study the rumen microbiological profile, macroscopic ruminal fluid assessment, ammonia nitrogen concentration and microbiological activity verification, as well as gastrointestinal tract fragments for histological analysis. Parametric data were submitted to ANOVA and data averages compared by Tukey test at 5%. For the microbiological profile variables, the non-parametric Chi-square test, Wilcoxon and Kruscall-Wallis tests were used, as well as descriptive analyzes. Due to the fluid coloration, the animals presented low acidosis index. Aromatic odor predominated, which characterizes environment with neutral pH. The fluid samples showed high microbial activity. Ruminal pH differed ( $P < 0.05$ ) when considering the type of processing, being higher for ground grain corn (MGM). There was no difference for any of the microbiological communities analyzed ( $P > 0.05$ ) (Lac + and Lac- bacteria, fungi, yeast and protozoa). Six facultative anaerobic fungal genera were identified for all ruminal fluid samples from a total of 15 observations. *Cladosporium* spp. was the most prevalent genus (46.66%), followed by *Aspergillus* spp. (26.66%). There was no significant difference in the protozoan population ( $P > 0.05$ ). The base width of the rumen papillae showed a significant interaction between the processing and fungal probiotic factors, being higher for MGM ( $P < 0.05$ ) for *Rhizomucor* treatment and control ( $P < 0.05$ ). The ruminal fluid of animals under high grain diet with the addition of fungi *Aspergillus terreus* and *Rhizomucor* spp. presented similar characteristics to animals under grazing conditions. Further studies are needed to better elucidate the actions of fungi as probiotic in ruminant under DAG.

**Keyword:** ruminal microbiota, rumen, small ruminants, ruminal bacteria, protozoa

## 1 INTRODUÇÃO

Dieta desafiadora com a dieta de alto grão (DAG) provoca grandes transformação no ambiente ruminal<sup>38,39</sup>. Esse tipo de dieta quando mal manejada, pode levar os animais ruminantes a desenvolver graves problema metabólicos<sup>14,39</sup>. O uso da DAG demanda do profissional um bom conhecimento das alterações provocado no rúmen<sup>1,16</sup>. Dessa forma, torna fundamental o estudo das ações de modulações ruminais causadas em animais sob dieta sem fonte de volumoso com alto concentrado energético, com objetivo de entender essas alterações e realizar ações no manejo nutricional para evitar distúrbios metabólicos.

Em animais submetido à DAG o pH ruminal tende a ser baixo (<5,5), a diversidade microbiana é reduzida, populações de protozoários sofrem declínio e as bacterianas são alteradas<sup>11,14,15</sup>, com redução ou total eliminação da população fúngica anaeróbica<sup>13,16</sup>. Se o pH ruminal continuar a cair, os *Lactobacillus* spp. podem substituir a bactéria *Streptococcus bovis*, iniciando um acúmulo excessivo de lactato, levando à acidose ruminal<sup>12,15,17</sup>. Dessa forma, evidencia-se a relevância da utilização de aditivos na alimentação de ruminantes, principalmente daqueles confinados por um período mais longo e arraçados com alto teor de concentrado.

Diferentes moduladores (ionóforos, antibióticos, própolis, óleos essenciais, simbióticos, dentre outros) da microbiota ruminal têm sido estudados a fim de melhorar a atividade microbiana no rúmen<sup>18</sup> quando animais são expostos a dietas desafiadoras (alta fibra de baixa digestibilidade ou alto grão com fornecimento de amido)<sup>19</sup>. Hill et al.<sup>20</sup> e Markowik e 'Slizewska<sup>21</sup> afirmaram que os ionóforos e antibióticos têm sido os aditivos mais empregados. No entanto, o uso desses aditivos tem sido condenado por apresentar risco de resíduos em produto e subprodutos de origem animal. Como alternativa, muitos estudos têm sido conduzidos com aditivos naturais, como os probióticos. Diferente dos antibióticos, os probióticos são microrganismos que podem promover benefícios ao hospedeiro sem deixar resíduos<sup>20</sup>.

O conhecimento gerado em estudos com microbiota ruminal dos animais submetidos à dieta de alto grão, permitirá prever as principais espécies envolvidas na degradação dos grãos, quando estes encontram-se inteiros ou moídos, de forma a modular essa microbiota de maneira mais eficiente, agregando ganhos na produção animal<sup>19,23,25</sup>.

Escassos são os trabalhos que avaliam a prevalência de fungos no TGI de ruminantes arraçados somente com concentrado. Recentemente, Abrão et al.<sup>16</sup> demonstraram que dietas de alto grão eliminam a população de fungos anaeróbios estritos do rúmen, elevam a

concentração de *Streptococcus* spp. e reduzem a diversidade microbiana no rúmen, provavelmente devido à consequente redução significativa do pH (<5).

Outros estudos têm mostrado que os fungos anaeróbios ruminais produzem uma grande variedade de enzimas que geralmente degradam maior quantidade de substrato que as bactérias do rúmen. Além disso, possuem ação mecânica, com suas hifas que penetram o alimento, facilitando a ação de outros microrganismos como as bactérias<sup>19,28</sup>.

Portanto, este estudo foi conduzido com o objetivo de examinar se fungos *Aspergillus terreus* e *Rhizomucor* spp. naturais do rúmen de ovinos podem apresentar ação probiótica e consequentemente, influenciar parâmetros microbiológicos e macroscópicos do ambiente ruminal desses animais submetidos a dietas de alto grão, com influência no conforto ruminal.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Ensaio com os potenciais probióticos fúngicos *in vivo*

O ensaio *in vivo* foi conduzido no setor de ovinocultura do Instituto Federal Goiano–Campus Ceres, localizado na Rodovia GO 154, km 3, Zona Rural, no município de Ceres-GO, coordenadas geográficas: latitude 15°21'00" S e longitude 49°36'05" W altitude de 542 m acima do nível do mar. O confinamento teve início em 15 de setembro e terminou em 29 de novembro de 2017 com duração de 75 dias, sendo 15 dias de adaptação e 60 dias para coleta de dados, com quatro períodos experimentais de 15 dias.

O projeto foi submetido à apreciação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Goiano, com aprovação em 20/09/2016 com número de protocolo 9356170616.

Foram utilizados 40 borregos ½ sangue Santa Inês x Dorper, com peso vivo inicial de aproximadamente 35 kg ( $\pm 5,00$  kg), os quais foram distribuídos aleatoriamente em oito baias coletivas com dimensões de cinco x cinco m, sendo seis animais por baia (três machos e três fêmeas). Os tratamentos experimentais consistiram em dois tipos de processamentos do grão de milho (inteiro e moído) e quatro tipos de inoculantes (sem inóculo fúngico - TE; com *Rhizomucor* spp. - RZ; com *Aspergillus terreus* - AT e com mix dos dois fungos - MX). Foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso em um arranjo fatorial 4x2. Ao final dos 75 dias de confinamento, foi selecionado um animal (o mais pesado) por baia, o qual foi conduzido para o ensaio de digestibilidade, e os cinco animais restantes de cada baia foram abatidos para a coleta do fluido ruminal e de segmentos do trato gástrico intestinal dos animais.

## **2.2 Coleta e preparo de amostras do líquido ruminal**

Visando elucidar o possível efeito modulador dos probióticos sobre a microbiota autóctone do rúmen foi realizada a coleta do líquido ruminal dos animais abatidos de cada tratamento.

Imediatamente após a evisceração de cada animal foi localizada e exposta a região ventral do rúmen e realizada assepsia com álcool a 75%, e com um bisturi estéril feito um corte de aproximadamente cinco cm de extensão. O conteúdo ruminal foi filtrado com gazes esterilizadas para cada amostragem, armazenada em tubos falcon de 120 mL esterilizados e mantidos em caixa isotérmica resfriada, com temperatura abaixo de 8°C, por no máximo uma hora.

## **2.3 Avaliação do fluido e parâmetros do metabolismo ruminal**

As análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal Goiano Campus Ceres.

A análise macroscópica do líquido coletado foi realizada imediatamente após a coleta, em um tubo de vidro contendo cinco mL do suco ruminal coletado, onde foram avaliados os parâmetros cor, odor e viscosidade<sup>104</sup>. Para a avaliação da atividade microbiana no rúmen foi realizado o teste que mede o tempo de redução do azul de metileno na concentração 0,03% (potencial redox). O pH do líquido ruminal foi estimado, utilizando um potenciômetro digital<sup>69</sup>. E para a determinação da concentração de amônia (NH<sub>3</sub>) no líquido ruminal, uma amostra de 20 mL do conteúdo foi filtrada e mantida congelada à 0°C para posterior realização da análise conforme o método INCT-CA N006/1 descrito por Detmann et al.<sup>97</sup>.

## **2.4 Análises Gram para os grupos bacteriano e levedura**

As características micro morfológicas e tintoriais dos grupos bacterianos e leveduriformes predominantes no líquido coletado foram observadas após a realização de esfregaços secos, fixados e corados em lâmina de microscopia pelo método de Gram<sup>75</sup>.

## **2.5 Bactérias Enterozoonóticas**

Com o objetivo de verificar a influência dos probióticos sobre a população de enterobactérias no rúmen, diluições decimais do líquido ruminal foram preparadas em tubos

contendo nove mL de solução salina estéril. Após cada diluição, os tubos foram homogeneizados durante três minutos e alíquotas de 100 microlitros das diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  foram inoculadas em placas estéreis e incorporadas com meio ágar Mac Conkey. Os inóculos foram homogeneizados com alças de Drigalski estéril e as placas foram incubadas em estufa BOD a  $39^{\circ}\text{C}$  e monitoradas para o crescimento de colônias bacterianas por até 21 dias<sup>75</sup>.

Para a identificação dos gêneros bacterianos mais prevalentes nas amostras de fluido ruminal, foi realizado o reisolamento e o cultivo em placas contendo meio ágar Mac Conkey em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após o crescimento exponencial, cada isolado era inoculado em tubos contendo meio Rugai e Araújo, modificado por Pessoa e Silva<sup>105</sup>. Os tubos foram incubados em estufa BOD a  $39^{\circ}\text{C}$  e posteriormente foi feita a leitura dos resultados após 24 horas, usando-se tabela ilustrativa para identificação presuntiva de Enterobacteriaceae, de acordo com Pessoa e Silva<sup>105</sup>.

## **2.6 Fungos anaeróbios facultativos**

Diluições decimais seriadas do líquido ruminal foram preparadas em tubos contendo nove mL de solução salina estéril. Após cada diluição, os tubos foram homogeneizados durante três minutos e alíquotas de 100 microlitros das diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  foram inoculadas em placas estéreis contendo o meio ágar Sabouraud. Os inóculos foram homogeneizados com alças de Drigalski estéril e as placas foram incubadas em estufa BOD a  $37^{\circ}\text{C}$  e monitoradas para o crescimento de colônias fúngicas por até sete dias<sup>55,106</sup>.

As colônias de fungos micelianos isoladas foram identificadas pela técnica de microcultivo e as características micromorfológicas, evidenciadas ao microscópio óptico, foram associadas àquelas descritas para fungos de interesse biotecnológico e médico-veterinário<sup>55,58</sup>.

## **2.7 Protozoários ruminais**

Após filtragem do fluido ruminal, uma alíquota de um mL foi diluída em nove mL de solução de formaldeído a 10%, para a conservação das estruturas micromorfológicas dos protozoários. Quando necessário, eram realizadas diluições decimais em solução salina. Para a quantificação de protozoários pequenos, médios e grandes foi inoculado um mL da solução em câmara de Sedgwick-Rafter, para visualização e quantificação sob a luz do microscópio óptico, utilizando a objetiva de 103.

Para identificação dos gêneros desses microrganismos era utilizada uma gota da diluição  $10^{-1}$  descrita anteriormente juntamente com uma gota de lugol em lâmina de microscopia. Nesta lâmina era acoplada uma lamínula, seguindo posteriormente para visualização em microscópio óptico das microestruturas dos protozoários<sup>26,107</sup>.

## **2.8 Análises histológicas do sistema gastrointestinal**

Cortes de rúmen, intestino delgado e intestino grosso foram lavados em água corrente e pré-fixados em solução de formalina a 10% por seis horas. A seguir, foi extraído um fragmento de cada uma dessas partes, com aproximadamente  $1 \text{ cm}^2$ , sendo que do rúmen foi coletado na parte ventral e do intestino delgado e grosso um metro contado do início dos mesmos. Em seguida, os tecidos foram conservados em álcool a 70% até o momento de montagem das lâminas, que foi realizado com, no máximo, dez dias após a colheita. Os procedimentos na montagem das lâminas histológicas consistem em imersão dos fragmentos de tecidos em cubos de parafina e cortes dos cubos com 5 mm de espessura em micrótomo seguido de coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina<sup>108</sup>.

Com as lâminas histológicas montadas, foi realizada a leitura e medição da altura da vilosidade e profundidade de cripta para os fragmentos de intestino delgado, profundidade da cripta para o intestino grosso e largura da base das papilas e espaço entre papilas do fragmento de rúmen. A leitura foi realizada por meio de um microscópio eletrônico ligado à um computador onde as imagens foram analisadas com uso do programa Image J<sup>109</sup>.

## **2.9 Análises estatísticas**

Após análise exploratória, os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância pelo pacote estatístico EASYANOVA do R<sup>82</sup>, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Nas análises microbiológico foram utilizados testes não-paramétricos pelo pacote estatístico EASYANOVA do R<sup>82</sup>, sendo Qui-Quadrado para taxas de detecção, Wilcoxon para análises de comparação de dois grupos, Friedman ou Kruscall-Wallis para dados de quantificação<sup>82</sup>. Foram realizadas análises descritivas das características sensoriais do fluido ruminal (cor, odor, viscosidade e PRAM).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Características do fluido ruminal

Quanto às avaliações das análises macroscópicas do líquido ruminal, a coloração CE foi a mais predominante para o total de amostras coletadas (14 amostras de 40 = 35%), sendo sua maior manifestação em nove amostras do tratamento com dieta milho grão moído e cinco amostras para milho grão inteiro. O CS foi a segunda cor mais encontrada (11 amostras de 40 = 27%), sendo cinco para milho grão moído e seis para milho grão inteiro (Tabela 7). Essas tonalidades são caracterizadas em ambiente ruminal com pH mais neutro. Abrão et al.<sup>16</sup> e Vieira et al.<sup>110</sup> concordam com Dirksen<sup>104</sup> ao afirmarem que o fluido ruminal mais claro sugere a condição de ambiente mais ácido. Também foi possível observar que os líquidos ruminais com menores quantidades de cor CE foram provenientes de animais tratados com *Aspergillus terreus* (AT) e controle de grão inteiro (0% e 10%, respectivamente) e *Rhizomucor* spp. (RZ) e *Aspergillus terreus* dos tratamentos de grão moído com 10% cada. A coloração mais escura é característica de fluido ruminal de animais sob dieta com fonte de volumoso<sup>16,110</sup>. Dessa forma, pela avaliação das colorações do fluido, os animais do experimento apresentaram baixo índice de acidose.

A predominância para a característica odor aromático (AR) se manifestou em 21 do total de 40 amostras (52%), com 11 (27%) amostras para MGI e 10 (25%) para a MGM (Tabela 6). A maior manifestação desse odor (19,04%) foi para o tratamento da MGM associada a mistura dos dois fungos (MX). Os odores que menos se manifestaram entre as amostras obtidas foram os descritos como ácido penetrante (AP) com uma amostra na MGI-AT, seguido de inosso a ácido com uma para MGI-TE e outra MGM-RZ. O odor aromático foi descrito por Vieira et al.<sup>75</sup> em 100% das amostras de animais se alimentando de pastagem e levemente ácido para as amostras de animais sob DAG.

A viscosidade aquosa (AQ) foi observada em 16 das 40 (40%) amostras, sendo nove para animais em MGI e sete para MGM. Entre o fator probiótico fúngico a maior manifestação aquosa foi para o tratamento controle e mistura dos fungos na dieta de grão inteiro (três para cada) (Tabela 06). A segunda maior viscosidade foi para a espessa (EP), que se manifestou em 13 amostras (32%) sendo sete para dieta MGI e seis para dieta MGM. Vieira et al.<sup>75</sup> verificaram em seu estudo que os animais em pastejo apresentavam as propriedades descrita por Dirksen<sup>104</sup>, no qual descreve fluido ruminal com característica espessa com intensa produção de bolhas de gases, indica intensa atividade microbiana<sup>104</sup>.

As amostras desse estudo, mesmo sendo de maioria aquosa, apresentavam grande formação de bolhas, sendo essa atividade confirmada pelo potencial de redução do azul de metileno (PRAM), onde foi observado com tempo menor que três minutos para 100% de todas as mostras (Tabela 07). Abrão et al.<sup>16</sup> observaram PRAM menor que um minuto para animais recebendo dieta de alto concentrado, contudo Dirksen<sup>104</sup> respalda que o baixo potencial de atividade microbiana apresenta tempo de PRAM maior que 15 minutos, situações manifestadas em animais sob dietas pobres em energia e proteína, ou em ruminantes com inapetência prologada.

TABELA 6 - Análise físico-química predominante do fluido ruminal de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associados com probióticos à base de fungos.

Fator físico-químico	Inteiro				Moído				TOTAL		Total
	RZ	AT	TE	MX	RZ	AT	TE	MX	MGI	MGM	
<b>Cor</b>											
Castanho enegrecido – CE	2	0	1	2	1	1	4	3	5	9	14
Castanho – CS	1	2	1	2	1	2	0	2	6	5	11
Castanho esverdeado – CV	0	1	0	0	1	1	1	0	1	3	4
Leitosa acinzentada – LE	0	2	3	1	0	0	0	0	6	0	6
Leitosa marrom – LM	2	0	0	0	2	1	0	0	2	3	5
<b>Odor</b>											
Amoniaca – AI	1	1	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Ácido – AC	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2
Aromático – AR	3	3	2	3	1	2	3	4	11	10	21
Ácido penetrante – AP	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Insosso até ácido – IA	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	2
Inodoro – ID	1	0	2	2	1	3	2	1	5	7	12
<b>Viscosidade</b>											
Aquosa – AQ	1	2	3	3	2	2	1	2	9	7	16
Aquosa até espumosa – AE	2	1	0	1	1	0	1	0	4	2	6
Espessa – EP	2	2	2	1	0	2	2	2	7	6	13
Espessa até aquosa - EA	0	0	0	0	2	1	1	1	0	5	5
PRAM (min)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

MGI: milho grão inteiro; MGM: milho grão moído; RZ: *Rhizomucor* spp.; AT: *Aspergillus terreus*; TE: controle; MX: mistura dos dois fungos; e PRAM: potencial de redutor de azul de metileno/potencial de atividade.

### 3.2 Concentração de N-NH<sub>3</sub> e PH ruminal

Não foi observada distinção ( $P>0,05$ ) na avaliação da concentração de nitrogênio amoniacal no fluido ruminal dos animais submetidos aos diferentes tratamentos (Tabela 7). Savari et al.<sup>111</sup> também não encontraram diferença significativa para o seu experimento com vacas leiteiras alimentadas com dietas de alto concentrado de milho moído ou flocculado com baixa ou alta relação de PDR:PNDR (proteína degradada no rúmen: proteína não degradada no rúmen).

Para aumento do consumo de matéria seca o nível de nitrogênio amoniacal ruminal deve estar na concentração acima de 8 mg/dℓ, no entanto, para elevar a disponibilidade de proteína microbiana no intestino, o nível de nitrogênio amoniacal no rúmen deve estar em torno de 15 mg/dℓ, dessa forma irá maximizar a produção<sup>112</sup>. Os resultados obtidos nesse experimento estão entre 8,14 a 9,66 mg/dℓ, acima do mínimo recomendado.

TABELA 7 - Análise da concentração nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) e pH do fluido ruminal de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associada com probióticos à base fúngicos.

Variáveis	Processamento		Probióticos				P-valor			Cv
	Inteiro	Moído	RZ	AT	MX	TE	Proc	Prob	Proc:Prob	
N-NH <sub>3</sub> , mg/dℓ	8,99	9,34	9,66	9,30	9,54	8,1473	0,786	0,808	0,554	33,32
pH	5,51b	6,15a	5,77	5,73	5,99	5,838	0,001	0,579	0,748	7,60

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas, apresentam diferenças significativas a 5% de significância pelo teste Tukey. MGI: milho grão inteiro; MGM: milho grão moído; RZ: *Rhizomucor* spp.; AT: *Aspergillus terreus*; TE: controle; MX: mistura dos dois fungos – RZ+AT.

Outros estudos devem ser feitos visando verificar a flutuação do nitrogênio amoniacal no rúmen ao longo do tempo após arraçoamento. A não diferença encontrada no presente estudo poderia ser justificada pela análise ter sido realizada em um só tempo, após o abate dos mesmos, acondicionados inicialmente a um jejum prolongado.

O pH ruminal foi mais baixo para o fluido ruminal dos animais sob dieta de grão inteiro (P<0,01). Dieta rica em CNF pode elevar o crescimento microbiano aumentando a taxa de passagem<sup>112</sup>. Dieta de grão moído aumenta a disponibilidade de CNF, quando comparado com dieta de grão inteiro. Dessa forma, animal em jejum, a taxa de passagem do grão inteiro é menor que a dieta de grão moído, então mesmo com a restrição alimentar, a fermentação do grão inteiro permanece ocorrendo no rúmen, produzindo os ácidos da fermentação, e consequentemente ocorre a redução do pH.

### 3.3 Análises de Gram para os grupos bacteriano e levedura

Nas análises de Gram observou um padrão semelhante para os diferentes grupos de bactéria (Tabela 9). Independente do tratamento, todos apresentaram concentração semelhante de relação para cocos e seus agrupamentos, para espirilo, vibrião, bacilos e leveduras. Características semelhantes também foram observadas bactéria Gram negativa e Gram positiva, sendo maior concentração em todos tratamento para o grupo Gram negativo (P<0,05).

Foi realizada uma análise do perfil populacional de microrganismo que constitui a microbiota ruminal e a variação do pH ruminal (Tabelas 7, 8, e 9). Não foram observadas

diferenças significativas das populações bacterianas nas amostras analisadas quando foi considerado o fator probióticos fúngicos (Tabela 07), contudo quando considerado o fator tipo de processamento, onde houve diferença para pH ruminal ( $P < 0,05$ ) (Tabela 7), observou maior população de bactérias para o tratamento com MGM. Apesar de apresentado diferença significativa nos valores do pH entre os tipos de processamento, não foi observado diferença para nenhuma das comunidades microbiológica analisadas (bactérias Lac+ e Lac-, fungos, leveduras e protozoários) (Tabela 9).

TABELA 8 – Exame direto para detecção dos grupo bacteriano e levedura identificado pela técnica de Gram do rúmen de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base de fúngicos.

Variáveis	Inteiro				Moído			
	RZ	TA	MX	TE	RZ	TA	MX	TE
Cocos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Diplococos	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Streptococcus	+	++	+	++	+	++	++	+
Estafilococos	-	+	+	+	+	+	+	+
Espirilo	++	++	++	++	++	+	++	++
Vibrião	+	++	++	+	++	+	+	+
Bacilos	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
Levedura	++	+	+	++	++	++	++	+
Gram Positiva, %	82,8a	69,7a	72,5a	80,1a	86,4 <sup>a</sup>	70,1a	80,2a	76,5a
Gram Negativa, %	17,2b	33,5b	30,7b	26,5b	25,1b	25,0b	26,3b	25,1b
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

Médias seguidas de letras minúsculas diferente na coluna, indicam diferenças significativas a 5% de significância pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. RZ: *Rhizomucor* spp.; AT: *Aspergillus terreus*; MX: mistura dos dois fundos – RZ+AT; TE: Controle. +++: concentração alta; ++: concentração média; e +: concentração baixa.

O ambiente ruminal com característica de acidose reduz a diversidade microbiana<sup>14</sup>, e de acordo com Nagaraja e Titgemeyer<sup>113</sup> a redução na população dos protozoários ruminais no rúmen de animais recebendo DAG, onde o pH encontra se próximos de 5,5, pode ser considerado como um bom indicador de acidose ruminal. Os protozoários são reconhecidos por serem capazes de engolfar o amido e poderem contribuir com até 45% da atividade microbiana, ajudando assim no controle do pH e servindo como tamponante, além disso, sabe-se que em ambientes ruminais muito ácidos as atividades dos ciliados são reduzidas. Sendo assim a população de protozoários deveria se favorecida pelo acúmulo de amido no rúmen, contudo, o pH ácido do rúmen impede o desenvolvimento de protozoários, podendo levar a morte, principalmente os grandes<sup>78,114</sup>.

De acordo com Arcuri et al.<sup>73</sup>, os protozoários são predadores de bactérias, dessa forma o aumento na população de protozoário pode reduzir a biomassa bacteriana livres, reduzindo assim proteína microbiana

Não foi observada diferença significativa para as populações de Lac+ e Lac- dentro do fator probiótico, contudo houve diferença estatística entre os tipos de processamento ( $P < 0,05$ ) (Tabela 9) com maior população na dieta de milho grão moído (MGI:  $1,29 \times 10^6$  e MGM:  $1,75 \times 10^6$ ; Tabela: 10). Foi observado também, uma maior concentração de bactéria fermentadoras de lactose ( $P < 0,05$ ) em todos fatores (probiótico x processamento) (Tabela 10). A maior concentração de bactérias fermentadoras em animais tratados com dieta de grão moído pode ser justificada pela maior disponibilidade de amido altamente fermentável no rúmen capaz de ser utilizado por essa bactéria como fonte de energia com consequente liberação de lactato<sup>13,14</sup>.

TABELA 9 - Avaliação da população da microbiota ruminal de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base de fúngicos.

Variável	Milho Grão Inteiro UFC/mL-1				Média
	RZ	AT	MX	TE	
Bactérias lac+	$2,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$	$7,4 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4$
Bactérias lac-	$1,9 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$6,9 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
Fungos filamentosos	$1,4 \times 10^3$	$9,6 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$	$8,6 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$
Leveduras	$2,2 \times 10^4$	$7,8 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3$	$4,9 \times 10^3$
Protozoários pequenos	$2,0 \times 10^7$	0	$9,0 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$5,27 \times 10^6$
Protozoários médios	$5,8 \times 10^5$	0	$2,7 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$	$1,45 \times 10^5$
Protozoários grandes	0	0	0	$2,6 \times 10^3$	$6,50 \times 10^2$
Milho Grão Moído UFC/mL-1					
Bactérias lac+	$7,6 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$6,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$6,87 \times 10^4$
Bactérias lac-	$1,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$1,72 \times 10^4$
Fungos filamentosos	$2,8 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$1,85 \times 10^3$
Leveduras	$8,3 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$4,87 \times 10^3$
Protozoários pequenos	$2,6 \times 10^4$	0	$8,7 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$	$7,82 \times 10^4$
Protozoários médios	60	0	$1,0 \times 10^4$	$2,2 \times 10^2$	$2,57 \times 10^3$
Protozoários grandes	0	0	$1,7 \times 10^4$	0	$4,25 \times 10^3$

RZ: *Rhizomucor* spp; AT: *Aspergillus terreus*; MX: mistura dos dois fundos – RZ+AT; TE: Controle; Lac+: bactéria fermentadora de lactose; Lac-: bactéria não fermentadora de lactose.

TABELA 10 - Análises da população de bactéria fermentadora de lactose no fluido de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base de fúngicos.

Tratamento	Quantificação UFC/mL	Positividade em cultivo (%)		
		Total	Lac+	Lac-
Milho Grão Inteiro				
<i>Rhizomucor</i> spp.	$2,27 \times 10^5$	17,59	57,92 <sup>a</sup>	42,07 <sup>b</sup>
<i>Aspergillus terreus</i>	$2,22 \times 10^5$	17,23	58,36 <sup>a</sup>	41,64 <sup>b</sup>

Mistura dos fungos	3,52x10 <sup>5</sup>	27,31	90,12 <sup>a</sup>	9,87b
Controle	4,89x10 <sup>5</sup>	37,86	76,29 <sup>a</sup>	23,70b
Total MGI	1,29x10 <sup>6</sup> A	100	-	-
Milho Grão Moído				
<i>Rhizomucor</i> spp.	4,72x10 <sup>5</sup>	26,95	80,75 <sup>a</sup>	19,25b
<i>Aspergillus terreus</i>	2,38x10 <sup>5</sup>	13,61	58,26 <sup>a</sup>	41,74b
Mix dos fungos	3,91x10 <sup>5</sup>	22,31	78,07 <sup>a</sup>	21,93b
Controle	6,50x10 <sup>5</sup>	37,13	88,27 <sup>a</sup>	11,73b
Total MGM	1,75x10 <sup>6</sup> B	100	-	-

Variáveis seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas, apresenta diferenças significativas a 5% de significância pelo teste Wilcoxon entre Lac+ e Lac-, e significativo para letras maiúsculas diferentes entre os tipos de processamentos pelo teste de Kruskal Wallis. Lac+: bactéria fermentadora de lactose; Lac-: bactéria não fermentadora de lactoses; UFC: unidade formadora de colônia, MGI: milho grão inteiro; MGM: milho grão moído.

### 3.4 Distribuição dos gêneros de bactérias

Os gêneros de bactérias mais predominantes, em ordem decrescente, foram *Alcaligenes* (37), *Escherichia coli* (22), *Klebsiellai* (11), *Shigella* (10) e *Enterobacter* (6) (Tabela 11). A menor manifestação de *Alcaligenes* entre os tratamentos foi para tratamento controle do grão inteiro (2,7%) e o *Aspergillus terreus* (5,4%) e controle (8,1%) do milho moído. As bactérias do gênero *Escherichia coli* se manifestaram em menor proporção nos tratamentos com *Rhizomucor* spp. (0,0%) e mistura dos fungos (4,5%) do processamento com grão moído e *Aspergillus terreus* (9,1%) do processamento inteiro (Tabela 11). De acordo com a literatura, animais ruminantes arraçoados com dieta com alto concentrado tem maior predominância de bactérias totais de *Escherichia coli* presentes no rúmen<sup>75</sup>.

Vieira et al.<sup>75</sup> avaliaram a distribuição dos gêneros de Bastonete Gram-negativos aeróbios e anaeróbios facultativos no fluido ruminal de bovinos mantidos em pastagem tropical ou com dieta de alto concentrado, verificaram que a maior população de bactérias foi encontrado nos animais alimentados sem fonte de volumoso, e que a população de *Escherichia* foi significativamente maior (71,6% comparado entre os tratamentos) para o tratamento para animais sob DAG (P<0,05) tanto na comparação entre os tratamentos quanto entres os gêneros. Resultados dessa pesquisa corroboram com Vieira et al.<sup>75</sup> quanto da predominância dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* no fluido ruminal de animais alimentados com dieta de alto concentrado.

A população *E. coli* são mais predominantes no fluido ruminal de animais alimentados com alta concentração de grão do que animais alimentados com fonte de volumoso. Animais sob dieta de alto concentrado pode apresentar acidose ruminal subaguda e a população de *E. coli* significativamente maior, o que caracteriza com sendo ambiente mais favorável ao

desenvolvimento desse gênero, considerado como principal agente zoonoses do TGI de animais ruminantes<sup>115</sup>.

TABELA 11 - Distribuição dos gêneros de bactérias Gram negativas presente nos fluidos do ruminal de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base de fúngicos.

Bactérias	Total	Inteiro								Moído							
		RZ		AT		MX		TE		RZ		AT		MX		TE	
		N*	n %	N %	n %	N %	n %	N %	n %	n %	n %	N %	n %	N %	n %		
<i>Alcaligenes</i>	37	4 10,8	8 21,6	4 10,8	1 2,7	9 24,3	2 5,4	6 16,2	3 8,1								
<i>Escherichia coli</i>	22	4 18,2	2 9,1	3 13,6	3 13,6	- -	6 27,3	1 4,5	3 13,6								
<i>Klebsiella</i>	11	1 9,1	2 18,2	1 9,1	- -	2 18,2	2 18,2	2 18,2	1 9,1								
<i>Shigella</i>	10	1 10,0	- -	1 10,0	3 30,0	1 10,0	- -	1 10,0	3 30,0								
<i>Enterobacter</i>	6	1 16,7	1 16,7	1 16,7	- -	- -	- -	- -	3 50,0								
<i>Edwardsiella</i>	2	- -	- -	- -	- -	2 100	- -	- -	- -								
<i>Proteus</i>	1	- -	1 100	- -	- -	- -	- -	- -	- -								
<i>Salmonella</i>	1	- -	- -	- -	- -	1 100	- -	- -	- -								
<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>13</b>								

RZ: *Rhizomucor* spp.; AT: *Aspergillus terreus*; MX: mistura dos dois fundos – RZ+AT; TE: Controle; n: número de observação dos gêneros. \*Se refere à soma das observações entre os gêneros de bactérias.

No presente estudo a população dos gêneros *Salmonella* e *Proteus* foram observados com menor frequência. A *Salmonella* assim como *E. coli* são gêneros de bactéria responsável por causar intoxicação alimentar. Esses dois gêneros, produtores de lactato, apresenta um crescimento em ambiente ruminal com alta concentração de carboidrato de alta disponibilidade, o que promove uma diminuição no pH podendo levar o animal a desenvolver acidose ruminal<sup>52</sup>.

### 3.5 Distribuição dos gêneros de fungos anaeróbios facultativos

Foi identificado seis gêneros de fúngicos para o total de 15 amostras observações nas análises para população de fungos anaeróbicos. O *Cladosporium* foi o gênero mais prevalente, com sete observações o que corresponde a 46,66% do total. O *Cladosporium* é um fungo caracterizado por apresentar machas escuras, de tonalidade marrom até preta, com aspecto aveludado<sup>57</sup>. Segundo Hankin e Anagnostakis<sup>79</sup> são gênero de fungos capazes de produzir as enzimas lipase, protease, uréase e quitinase, que contribuir no processo de digestibilidade da dieta com alta concentração de milho inteiro. São caracterizados por apresentarem crescimento lento, com maturidade atingida de 14 a 21 dias; por apresentar colônias efusas ou casualmente puntiformes, com a superfície plana, circulares, enrugada e de coloração que vai do verde oliva a marrom escura<sup>116</sup>.

O segundo fungo que foi mais observado foi do gênero *Aspergillus* spp., correspondendo 26,66% do total dos fungos identificados. O *Aspergillus* spp. é gênero que contém por volta de 100 espécies e onze teleomorfos (tipo de reprodução sexuada dos fungos) diferentes, pertencente à família dos Trichocomaceae (família dos fungos bolores), o qual se apresenta com coloração branca à amarelada, semelhante ao algodão, com base amarelada com o centro mais escuro<sup>57</sup>. Esse gênero, é muito comum sendo encontrado em toda a parte do mundo e em ambiente mais adversos, com variáveis ações, causador de inúmeras enfermidades, porém muito aplicado em indústrias para produção de antibióticos. É um importante decompositor de alimentos, tendo sua aplicação também na indústria de alimentos.

Abrão et al.<sup>27,65,70,117,61</sup>, verificaram o potencial desse gênero para produção de enzima celulolíticas, sendo ele capaz de sobreviver às diversidades do ambiente ruminal, sobre a presença dos principais ácidos graxos voláteis e que possui viabilidade após incubação por 96h depois de ter sido armazenado por até dois anos. Do mesmo modo, Mustafa et al.<sup>67</sup> confirmaram a eficiência do *Aspergillus terreus* na produção de enzima celulase em cultura de fungo filtrado do que em estrado de semente de cebola, sendo as atividades maiores em temperatura de 60 °C e 55°C em pH 5,5 e 6,0 para uma produção de 15 e 12,5 mg/mL, respectivamente.

O terceiro grupo mais observado nas análises foi o gênero *Absidia* spp. (13,33%), pertence à família do Mucoraceae, comumente encontrado em vegetais em decomposição, sendo às vezes relacionado como causador de infecção em humanos<sup>57</sup>. Os gêneros *Rhizomucor* spp. e *Fusarium* spp. foram os menos observados, correspondendo as 6,66% do total de observado cada um nas identificações por microcultivo. O *Rhizomucor* spp. também pertence à família dos Mucoraceae<sup>57</sup>. Bernarde et al.<sup>87</sup> em seus estudo para comprovar o potencial do *Rhizomucor miehei* para produção de enzima  $\alpha$ -amilase estabilizada, verificaram o seu potencial específico em processo que necessita de pH em torno de 4,0 a 5,0 e alta temperatura (70 °C).

### **3.6 Distribuição dos gêneros de protozoários do rúmen**

A quantificação da população de protozoários grande, médio e pequeno encontra-se ilustrada nas tabelas 09 e 10. Na identificação dos gêneros de protozoário (Tabela 12), só foi possível observar dois gêneros, *Entodinium* e *Charonina*, contudo não foi observada diferença significativa na população desses gêneros levando-se em conta os fatores: tipo de probiótico e processamento.

TABELA 12 - Distribuição dos gêneros de protozoários presentes nos fluidos do ruminal de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base de fúngicos.

Protozoário	Tratamentos - UFC/mL-1										P-valor	
	Processamento		Milho Grão Inteira				Milho Grão Moída				Proc	Prob
	Inteiro	Moído	RZ	AT	MX	TE	RZ	AT	MX	TE		
<i>Entodinium</i>	51,65	23,61	110,6	-	16	80	3	-	2,5	80	0,80	0,63
<i>Charonina</i>	8	-	24	-	2	6	-	-	-	-	0,74	0,84

Variáveis seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas, apresenta diferenças significativas a 5% de significância pelo teste Kuskal-Wallis. RZ: *Rhizomucor* spp.; AT: *Aspergillus terreus*; MX: mix dos dois fundos – RZ+AT; TE: Controle.

### 3.7 Análises histológicas do trato gastrointestinal

Na avaliação das variações das características histológica do sistema gastrointestinal, não foram verificadas variações significativas para a altura da lâmina própria-submucosa (LPS) do rúmen de borregos alimentados com os diferentes tratamentos (Tabela 13). Não houve diferença significativa para profundidade de cripta do intestino delgado (PCD) com relação ao fator processamento, contudo houve alteração expressiva para PCD quanto observação entre o fator probiótico fúngico ( $P < 0,05$ ) sendo maior para o tratamento com fungo *Rhizomucor* spp. (RZ).

A largura da base das papilas (LBP) apresentou interação expressiva entre os fatores processamento e probiótico fúngico ( $P < 0,05$ ), sendo significativamente maior para dieta de grão moído ( $P < 0,05$ ) e entre os probióticos, maior para o tratamento com *Rhizomucor* spp. e o controle (TE) ( $P < 0,05$ ).

Houve interação significativa entre os fatores ( $P < 0,05$ ) para espessura da túnica muscular do epitélio ruminal (TMS), com diferença expressiva entre os processamentos sendo maior para os tratamentos de grão inteiro ( $P < 0,05$ ), e entre os probiótico fúngico, maior novamente para os tratamentos RZ e TE ( $P < 0,05$ ) e menor nos tratamentos com *Aspergillus terreus*. A altura da vilosidade do intestino delgado (AVD) também apresentou ter relação interativa ( $P < 0,05$ ), sendo que entre os fatores processamento, teve o mesmo comportamento da TMS, no entanto para o fator probiótico fúngico também mostrou efeito com diferença expressiva ( $P < 0,05$ ), mas com o comportamento oposto do TMS, os maiores valores foram para os tratamentos com *Aspergillus terreus* e a mistura dos fungos.

TABELA 13 - Avaliação histológica do rúmen, intestino delgado e intestino grosso de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base fúngicos.

Variáveis	Processamento (µm)		Probiótico (µm)				P-Valor			CV
	Inteiro	Moído	RZ	AT	MX	TE	Proc	Prob	Proc:Prob	
LPS	2093	2267	1920	2224	22880	2288	0,297	0,346	0,128	34,84
LBP	771b	9774a	1080a	752b	711b	949a	0,001*	0,001*	0,001	27,67
TMS	1530 <sup>a</sup>	1380b	1596a	1250c	1403b	1572a	0,001*	0,001*	0,001	14,78
AVD	507 <sup>a</sup>	385b	352b	500a	511a	421b	0,001*	0,001*	0,241	27,34
PCD	451 <sup>a</sup>	408a	574a	387b	353b	403b	0,096	0,001*	0,463	28,90
PCG	564b	753a	520b	652a	755a	706.a	0,001*	0,001*	0,015	27,62

\*Variável seguida de letras minúsculas diferente na linha, apresenta diferença significativa 5% de probabilidade pelo teste Tukey. LPS: altura da lâmina própria submucosa do epitélio ruminal; LBP: largura da base das papilas ruminais; TMS: espessura da túnica muscular do epitélio ruminal; AVD: altura das vilosidades do intestino delgado; PCD: profundidade das criptas do intestino delgado; e PCG: profundidade das criptas do intestino grosso.

Gallo et al.<sup>43</sup> realizaram um experimento com ovinos confinados submetido a dieta de alto grão de milho inteiro (80% milho e 20% núcleo) comparando com controle (dieta convencional com fonte de volumoso), concluíram que comprimento e largura das papilas ruminais não foram afetadas ( $P > 0,05$ ) pelo tipo da dieta. Oliveira et al.<sup>2</sup> também avaliaram características anatômicas ruminais (número de papilas/cm<sup>2</sup> presentes em cada fragmento, área média das papilas, % área papilar e superfície total de absorção por cm<sup>2</sup> de parede) para ovinos confinado recebendo dieta de alto concentrado de grão (MGI, MGM e milho grão umedecido) e não observaram diferença ( $P > 0,05$ ) para o número de papilas/cm<sup>2</sup> e nem para área média da papilas. Porém, foi verificado diferença significativa para % área papilar e superfície total de absorção).

A profundidade de cripta do intestino grosso (PCG) também apresentou interação significativa entre os fatores ( $P < 0,05$ ), sendo maior para dieta MGM. Contudo, mostrou comportamento diferente para o fator processamento quando comparado com TMS, AVD e PCD sendo maior para os tratamentos com MGI ( $P < 0,05$ ), e entre o segundo fator probiótico foi maior o tratamento com *Rhizomucor* spp. ( $P < 0,05$ ) que apresentou a menor PCG ( $P < 0,05$ ) (Tabela 13).

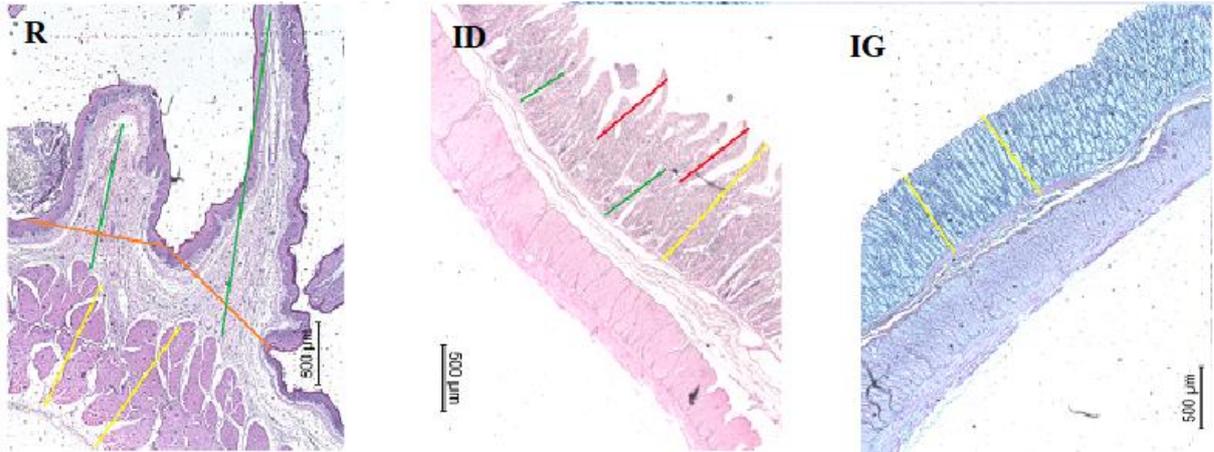


FIGURA 5 - Imagem de lâmina histológica (500 $\mu$ m). Em R: epitélio ruminal, as linhas de cor verde representam lâmina própria submucosa – LPS, a linhas laranja a largura da base da papila – LBP e a linha amarela representa a espessura da túnica muscular – TMS; em ID: epitélio intestino delgado, a linha vermelha representa a altura da vilosidade – AVD, e linha verde a profundidade de cripta - PCD; e em IG: epitélio intestino grosso, a linha amarela representa a profundidade de cripta - PCG.

#### **4 CONCLUSÃO**

Os fungos usados utilizados nesse trabalho não demonstraram ações probióticas com influencia na microbiota e nem nas características macroscópicas do ambiente ruminal. Contudo, mais pesquisas deverão ser conduzidas com objetivo confrontar os resultados encontrados com outras condições de investigações.

## 5 REFERÊNCIAS

1. Barducci RS, Sarti LMN, Millen DD, Putarov TC, Franzói MCS, Ribeiro FA, et al. Restricted versus step-up dietary adaptation in Nellore bulls: Effects over periods of 9 and 14 days on feedlot performance, feeding behavior and rumen morphometrics. *Anim Feed Sci Technol* [Internet]. 2019;247(November 2018):222–33. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.11.012>
2. Brown MS, Ponce CH, Pulikanti R. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism. *J Anim Sci*. 2006;84l(E. Suppl.):E25–33.
3. Zhang RY, Jin W, Feng PF, Liu JH, Mao SY. High-grain diet feeding altered the composition and functions of the rumen bacterial community and caused the damage to the laminae tissues of goats. *Animal*. 2018;12(12):2511–20.
4. Paulino P, Oliveira T, Gionbeli M, Gallo S. Dietas Sem Forragem para Terminação de Animais Ruminantes. *Rev Cient Prod Anim*. 2013;15(02):161–72.
5. Abrão FO, Duarte ER, Carolina A, Nigri DA, Luiza M, Silva F, et al. Caracterização físico-química e microbiológica e população de fungos no conteúdo ruminal de novilhos de corte hípidos ou com acidose ruminal. *Rev Bras Med Vet*. 2015;37(1):7–14.
6. Zhang RY, Liu YJ, Yin YY, Jin W, Mao SY, Liu JH. Response of rumen microbiota, and metabolic profiles of rumen fluid, liver and serum of goats to high-grain diets. *Animal*. 2018;1–10.
7. Mao SY, Huo WJ, Zhu WY. Microbiome-metabolome analysis reveals unhealthy alterations in the composition and metabolism of ruminal microbiota with increasing dietary grain in a goat model. *Environ Microbiol*. 2016;18(2):525–41.
8. Seddik H, Xu L, Wang Y, Mao SY. A rapid shift to high-grain diet results in dynamic changes in rumen epimural microbiome in sheep. *Animal*. 2018;1–9.
9. Russell JR, Hino T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: A spiraling effect that contributes to rumen acidosis. *J Dairy Sci*. 1985;68(7):1712–21.
10. Dong H, Wang S, Jia Y, Ni Y, Zhang Y, Zhuang S. Long-Term Effects of Subacute Ruminal Acidosis ( SARA ) on Milk Quality and Hepatic Gene Expression in Lactating Goats Fed a High-Concentrate Diet. *PLoS One*. 2013;8(12).
11. Nagaraja TG, Newbold CJ, Nevel CJVAN. Manipulation of ruminal fermentation. In: Springer, organizador. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Chapman & Durdrecht; 1997. p. 523–632.
12. McCann J c., Elolimy AA, Loor JJ. Rumen microbiome, probiotics, and fermentation additives. *Vet Clin NA Food Anim Pract* [Internet]. 2017; Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.06.009>

13. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(8):506–14.
14. Markowiak P, Ślizewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog* [Internet]. 2018;10(1):1–20. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
15. Grilli DJ, Fliegerová K, Kopečný J, Lama SP, Egea V, Sohaefer N, et al. Analysis of the rumen bacterial diversity of goats during shift from forage to concentrate diet. *Anaerobe*. 2016;42:17–26.
16. Chaucheyras-Durand F, Walker ND, Bach A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim Feed Sci Technol*. 2008;145(1–4):5–26.
17. Ximenes E de A. Fungos anaeróbios. *Rev Cient Médica e Biol* [Internet]. 2003;2(2):269–75. Available at: <file:///C:/Users/Ronaildo/Downloads/4295-10689-1-PB.pdf>
18. Dirksen G. Exame Clínico dos Bovinos. In: Koonga G, organizador. *Sistema digestivo*. Rio de Janeiro; 1993. p. 167–9.
19. Nooraee SE, Alimon AR, Ho YW, Abdullah N. Characterization of *Kluyveromyces marxianus* as a potential feed additive for ruminants. *Lett Appl Microbiol*. 2010;50(6):578–84.
20. Detmann E, Souza M, Valadares Filho S, Queiroz A, Berchielli T, Saliba E, et al. *Métodos para Análise de Alimentos*. 1o ed. Suprema, organizador. Visconde do Rio Branco; 2012. 214 p.
21. Vieira EA, Abrão FO, Ribeiro ICO, Nigri AC de A, da Silva KF, Careli RT, et al. Bastonetes Gram-negativos aeróbios e anaeróbios facultativos no fluido ruminal de bovinos de corte alimentados em pastagem lignificada e em novilhos com acidose ruminal. *Pesqui Vet Bras*. 2015;35(9):811–6.
22. Pessoa G, Silva E. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobacterias. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1972;32:97–100.
23. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de Micologia médica*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2002;44(5):297–8. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652002000500013&lng=en&nrm=iso&tlng=fr](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652002000500013&lng=en&nrm=iso&tlng=fr)
24. Kurtman C, Fell J. *The yeasts a taxonomic study*. Elsevier, organizador. Amsterdam; 1998. 1055 p.
25. Brasil AN de VS (ANVISA). *Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica* [Internet]. Módulo VII. 2004. 27 p. Available at: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod\\_7\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_7_2004.pdf)

26. Dehority B. Microbial interactions in the rumen. *Rev la Fac Agron* [Internet]. 1998;15(1). Available at: <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/agronomia/article/view/11730>
27. Brossard L, Martin C, Chaucheyras-durand F, Late T, Brossard L, Martin C, et al. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reprod Nutr Dev*. 2004;44(2004):195–206.
28. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia*. 1o ed. Kooga G, organizador. Rio de Janeiro; 1999. 250 p.
29. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2 : ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2017;1–26. Available at: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-017-1934-z>
30. Arnhold E. No TitlePackage in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Brazilian J Vet Res Anim Sci*. 2013;50(6):488–92.
31. Vieira EA, Abrao FO, Ribeiro ICO, Nigri C de A, da Silva KF, Careli RT, et al. Aerobes and anaerobe facultative Gram-negative rod-shaped bacteria in the ruminal fluid of beef cattle fed lignified pasture and steers with ruminal acidosis. *Pesqui Vet Bras*. 2015;35(9):811–6.
32. Savari M, Khorvash M, Amanlou H, Ghorbani GR, Ghasemi E, Mirzaei M. Effects of rumen-degradable protein:rumen-undegradable protein ratio and corn processing on production performance, nitrogen efficiency, and feeding behavior of Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* [Internet]. 2017;1–12. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217311050>
33. Detmann E, Valente ÈEL, Batista ED, Huhtanem P. An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. *Livest Sci* [Internet]. 2014;162:141–53. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871141314000833>
34. Nagaraja TG, Newbold CJ, Nevel CJVAN, Demeyer DI. Manipulation of ruminal fermentation. *Rumen Microb Ecosyst*. 1997;
35. Abrão FO, Santos EO, Dijkstra D, Neto RF, Batista LHC, Duarte ER. Efeito do processamento do grão sobre a população de protozoários ruminais de ovinos Santa Inês. *Arch Zootec* [Internet]. 2018;67(260):518–24. Available at: <https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/3882/2291>
36. Kozloski GV. *Bioquímica dos ruminantes*. 3o ed. Editoraufsm, organizador. Santa Maria; 2016. 216 p.
37. Arcuri PB, Lopes FCF, Carneiro J da C. Microbiologia do rúmen. In: Fanep, organizador. *Nutrição de Ruminantes*. 2o ed Jaboticabal; 2011. p. 115–47.

38. Russell J, Rychlik J. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* (80- ). 2001;292(5519):1119–22.
39. Uyeno Y, Shigemori S, Shimosato T. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environ Environ*. 2015;30(2):126–32.
40. BIREME. Descritores em Ciências da Saúde: DeCS [Internet]. OPAS/OMS. 2017. Available at: <http://decs.bvsalud.org>
41. Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. 1975;67(3):597–607.
42. Menezes CP De, Pérez ALA de L, Lima E de O. *Cladosporium* spp: Morfologia, infecções e espécies patogênicas. *Acta Bras* [Internet]. 2017;1(1):23–7. Available at: <http://revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/view/6/3>
43. Abrão FO, Duarte ER, Freitas CES, Vieira EA, Geraseev LC, da Silva-Hughes AF, et al. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. *Curr Microbiol* [Internet]. 2014;69(5):649–59. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-014-0633-5>
44. Abrão FO, Duarte ER, Pessoa MS, Santos VL, Rodriguez NM. Inocuidade micotóxica e viabilidade de *Aspergillus* spp. com potencial probiótico provenientes do trato digestório bovino. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec*. 2018;70(6):1833–9.
45. Abrão FO, Duarte ER, Pessoa MS, Santos VL dos, Júnior LF de F, Barros K de O, et al. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp . isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(8):1–13. Available at: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0183628>
46. Abrão FO, Freitas CES, Duarte ER, Pessoa MS, Batista LHC, Silva TD, et al. Enzimas microbiana: potencial biotecnológico e efeitos modulatórios em ruminantes. *Colloq Agrar*. 2017;13(Especial):164–73.
47. Pessoa FOA. Fungos do trato digestório de ruminantes como potencial probiótico para bovinos alimentados com forrageiras lignificadas. [Belo Horizonte]: Universidade Federal de Minas Gerais; 2016.
48. Mostafa FA, Abd AA, Aty E, Hamed ER, Eid BM, Ibrahim NA. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Enzymatic , kinetic and anti-microbial studies on *Aspergillus terreus* culture filtrate and *Allium cepa* seeds extract and their potent applications. *Biocatal Agric Biotechnol* [Internet]. 2016;5:116–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.01.005>
49. Bernardes AV, Martins S, Ferreira J, Emerenciano O. UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE  $\alpha$ -AMILASE POR *Rhizomucor miehei*. *Rev Bras Tecnol Agroindustrial* [Internet]. 2014;8(2):1439–51. Available at: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rbta/article/view/1852>

50. Gallo SB, Merlin F de A, Macedo CM de, Silveira RD de O. Whole grain diet for Feedlot Lambs. *Small Rumin Res* [Internet]. 2014; Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.05.014>

51. Oliveira LS, Mazon MR, Carvalho RF, Pesce DMC, Silva S da L e, Nogueira Filho JCM, et al. Processamento do milho grão sobre desempenho e saúde ruminal de cordeiro. *Ciência Rural* [Internet]. 23 de abril de 2015;45(7):1292–8. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782015000701292&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782015000701292&lng=pt&tlng=pt)

## CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de ovinos de corte está em plena transformação, deixando de ser uma atividade de subsistência e passando a ser vista como atividade lucrativa, com produtores preocupados em melhorar os índices produtivos e a qualidade dos produtos finais.

A tecnologia de manejo alimentar com o confinamento de ovinos sob dieta de alto grão tem mostrado ser uma prática promissora. Essa técnica tem demonstrado vantagens superiores aos manejos tradicionais, pois reduz custo com mão de obra, tempo de engorda, além de garantir melhor padronização dos lotes e melhor acabamento de carcaça.

Contudo, dieta de alto grão representa risco do ponto de vista metabólico. Esse tipo de dieta quando mal manejada pode levar o animal a desenvolver quadro de acidose, podendo levá-lo à morte. Em dieta de alto de grão é preciso garantir o bem-estar animal, atendendo à exigência do consumidor. Nesse contexto, o nutricionista deve formular dieta para que o animal não desenvolva sintomas de acidose. Para esse controle, aditivos nutricionais podem ser aplicados.

O processamento do grão pode melhorar o aproveitamento do amido, porém a liberação desse amido no rúmen pode contribuir para o aumento de bactérias fermentadoras de lactose, que aumenta a disponibilidade de íons  $H^+$ , o que irá contribuir para a redução do pH. Nesse sentido, técnicas de processamentos químicos e o uso de aditivos pode melhorar o aproveitamento dos grânulos de amido evitando que o ambiente ruminal fique ácido, estabelecendo condições desejáveis para promover um equilíbrio ruminal.

O uso de probiótico é uma alternativa viável para o controle dos distúrbios metabólicos, garantindo o bem-estar dos animais. Apesar dos fungos serem poucos utilizados como probiótico que atuem no rúmen, estudos têm comprovado seu potencial. Sendo assim, os fungos podem ser uma alternativa como aditivos nutricionais.

Com essa pesquisa foi possível verificar que os fungos selecionados apresentam potencial para serem usados como probióticos para ruminantes, demonstrado pela ação de degradação dos grãos de milho, contribuindo assim para melhorar a digestibilidade do amido. Esses achados foram confirmados pelas análises laboratoriais: capacidade de produção de enzimas amilase, tolerância aos AGCC e capacidade de resistir à população autóctone do rúmen, além desses fungos não serem produtores de microtoxina, e por fim pela visualização em microscopia de varredura da ação mecânica dos fungos.

O experimento realizado com os animais com objetivo de evidenciar os resultados encontrado *in vitro*, não mostraram ação de melhoria no desempenho animal pela atuação dos probióticos à base de fungos. Contudo, todos os animais submetidos às condições experimentais

dessa pesquisa apresentaram características macroscópicas e microscópicas do fluido ruminal, semelhantes a de animais alimentados com dieta convencional, com alta concentração de volumoso. Dessa maneira, a dieta experimental não afetou o ambiente ruminal. Porém, no ensaio de desempenho não foi possível com essa pesquisa evidenciar a eficácia do aumento da concentração dos fungos selecionados na dieta, provavelmente devido ao método de aplicação, dosagem adotada e/ou categoria animal testada.

Quando analisado o processamento do milho (fornecido inteiro ou moído) foi observado resultado significativo para maior peso vivo ao abate, maior peso de carcaça quente e fria, maior peso de lombo e fraldinha para os animais alimentados com milho grão inteiro. No entanto, para as demais variáveis de desempenho e características de carcaça não foi observado efeito significativo.

Diante desses resultados, outros estudos fazem-se necessários para encontrar a situação ótima para a máxima expressão produtiva dos isolados fúngicos selecionados.