

## O efeito de probióticos fúngicos adicionados a uma dieta rica em grãos no trato gastrointestinal de ovinos

*The effect of fungal probiotics added to a high-grain diet on the gastrointestinal tract of sheep*

Ronaildo Fabino Neto<sup>1\*</sup> , Flávia Oliveira Abrão Pessoa<sup>2</sup> , Thiago Dias Silva<sup>2</sup> , Eliane Sayuri Miyagi<sup>1</sup> , Victor Vieira Santana Neto<sup>2</sup> , Marcelo Marcondes de Godoy<sup>2</sup> , Danne Kelle Siqueira Lima<sup>3</sup> , Jose Roberto de Moura Silva<sup>2</sup> , Mônica Maria de Almeida Brainer<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil

<sup>2</sup>Instituto Federal Goiano (IFGoiano), Ceres, Goiás, Brasil

<sup>3</sup>Zooli Nutrição Animal, Jaraguá, Goiás, Brasil.

\*Correspondente: [ronaildofabino@discente.ufg.br](mailto:ronaildofabino@discente.ufg.br)

### Resumo

Objetivou-se avaliar as características microbiológicas e físico-químicas do fluido ruminal e histológicas do trato gástrico intestinal (TGI) de ovinos sob dieta de alto grão com probiótico fungos *Aspergillus terreus* e/ou *Rhizomucor* spp. Analisou-se quatro probióticos (sem inóculos, com *Rhizomucor* spp., com *Aspergillus terreus* e com mistura dos dois fungos) e dois processamentos de milho (moído/inteiro), em fatorial 4x2 em em Delineamento Inteiramente Casualizados (DIC). Borregos Santa Inês/Dorper foram alojados em oito baias com cinco borregos em cada, durante 75 dias. Coletou-se fluido ruminal para o estudo do perfil microbiológico do rúmen, da característica macroscópica, da concentração de nitrogênio amoniacal e da atividade microbiológica, além dos fragmentos do TGI para análises histológicas. Pelas análises dos fluidos, os animais apresentaram baixo índice de acidose. O odor aromático e a cor castanho-enegrecido predominaram, o que caracteriza ambiente com pH neutro. As amostras do fluido apresentaram alta atividade microbiana. O pH ruminal diferenciou-se ( $P < 0,05$ ) quanto ao tipo de processamento, sendo maior para milho grão moído (MGM). Não houve diferença para nenhuma das comunidades microbiológicas analisadas ( $P > 0,05$ ) (bactérias Lac+ e Lac-, fungos, leveduras e protozoários). Seis gêneros de fungos anaeróbicos facultativos foram identificados num total de 15 observações. O *Cladosporium* spp. foi o gênero mais prevalente (46,66%), seguido do *Aspergillus* spp. (26,66%). A largura da base das papilas ruminiais apresentou interação significativa, sendo maior para MGM ( $P < 0,05$ ) com *Rhizomucor* e o controle ( $P < 0,05$ ). O fluido ruminal de ovinos sob dieta de alto concentrado de grão com adição dos fungos *Aspergillus terreus* e *Rhizomucor* spp. não tiveram afetadas as características microbiológicas e físico-químicas.

**Palavra-chave:** bactéria ruminal; microbiota ruminal; pequenos ruminantes; protozoários; rúmen.

### Abstract

This study aimed to evaluate the microbiological and physicochemical characteristics of the ruminal fluid and histological characteristics of the gastrointestinal tract (GIT) of sheep on a high-grain diet containing the probiotic fungi *Aspergillus terreus* and *Rhizomucor* spp. The study included four treatment groups (without probiotic, with *Rhizomucor* spp., with *Aspergillus terreus*, and with a mixture of both fungi), and two types of corn (ground/whole), in a Completely Randomized Design (CRD) arranged in 4 x 2 factorial design. Santa Inês x Dorper lambs were housed in eight pens with five lambs each for 75 days. Rumen fluid was collected to study the rumen microbiological profile, macroscopic characteristics, ammonia nitrogen concentration, and microbiological activity. In addition, GIT samples were taken for histological analysis. Fluid analyses showed that the animals presented a low acidosis index. The samples presented a predominantly aromatic odor and blackish-brown color, indicating a neutral pH and high microbial activity. The rumen pH differed ( $P < 0.05$ ) according to the level of processed corn consumed, being higher for ground grain corn (GGC). There was no difference for any of the microbiological communities analyzed ( $P > 0.05$ ) (Lac+ and Lac- bacteria, fungi, yeasts, and protozoa). Six genera of facultative anaerobic fungi were identified in 15 observations. *Cladosporium* spp. was the most prevalent genus (46.66%), followed by *Aspergillus* spp. (26.66%). The width of the base of rumen papillae showed significant correlation being greater for GCG ( $P < 0.05$ ) with *Rhizomucor* and for the control ( $P < 0.05$ ). The rumen fluid of sheep on a high-grain diet with added *Aspergillus terreus* and *Rhizomucor* spp. showed no microbiological and physicochemical changes.

**Keywords:** rumen bacteria; rumen microbiota; protozoa; small ruminants; rumen.

Recebido: 20 de outubro de 2021. Aceito: 15 de fevereiro de 2022. Publicado: 21 de março de 2022.

[www.revistas.ufg.br/vet](http://www.revistas.ufg.br/vet) como citar - disponível no site, na página do artigo.

## Introdução

Dieta desafiadora como a de alto concentrado grão (DAG), que consiste em alimentar o animal com alta inclusão de carboidratos não estruturais, provoca grandes transformações no ambiente ruminal<sup>(1,2)</sup>. Esse tipo de dieta, quando mal manejada, pode levar os animais ruminantes a desenvolver graves problemas metabólicos<sup>(2,3)</sup>. O uso da

dieta de alto concentrado de grão demanda do profissional um bom conhecimento das alterações provocadas no rúmen e na microbiota<sup>(4,5)</sup>. Dessa forma, torna-se fundamental o estudo das ações de modulações ruminiais 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 ou reduzir distúrbios metabólicos.

Em animais submetidos à dieta de alto concentrado de grão o pH ruminal tende a ser baixo (<5,5)<sup>(6)</sup>, a diversidade microbiana é reduzida, populações de protozoários sofrem declínio e a população de bactérias são alteradas<sup>(3,7,8)</sup>, com redução ou total eliminação da população fúngica anaeróbica<sup>(5,9)</sup>. Se o pH ruminal continuar a cair, os *Lactobacillus* spp. podem substituir os *Streptococcus bovis*, iniciando um acúmulo excessivo de lactato, levando à acidose ruminal<sup>(8,10,11)</sup>. Dessa forma, evidencia-se a relevância da utilização de aditivos nutricionais na alimentação de ruminantes que ajuda a manter o pH em níveis adequados (>5,5), principalmente daqueles animais confinados por um período mais longo e arraçoados com alto teor de concentrado energético.

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>(12)</sup> quando animais são expostos a dietas com alta fibra de baixa digestibilidade ou alto grão com fornecimento de alta concentração amido<sup>(13)</sup>. Hill et al.<sup>(14)</sup> e Markowik e Slizewska<sup>(15)</sup> afirmaram que os ionóforos e antibióticos têm sido os aditivos mais empregados. No entanto, o uso desses aditivos tem sido condenado por apresentarem riscos 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>(14)</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>(13,16,17)</sup>.

Escassos são os trabalhos que avaliam a prevalência de fungos no TGI de ruminantes arraçoados somente com concentrado. Recentemente, Abrão et al.<sup>(5)</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 (<5,5).

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<sup>(18)</sup>. Além disso, possuem ação mecânica, com suas hifas que penetram no alimento, facilitando a ação de outros microrganismos como as bactérias<sup>(13,19)</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, influenciarem parâmetros

microbiológicos e macroscópicos do ambiente ruminal desses animais submetidos a dietas de alto grão, e se influenciam no equilíbrio o ambiente ruminal.

## Material e métodos

### *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 48 borregos com idade média de sete meses, ½ sangue Santa Inês x Dorper, com peso vivo inicial de aproximadamente 35 kg (±5,00 kg), os quais foram distribuídos aleatoriamente em oito baias coletivas de chão de concreto rústico, com dimensões de 5x5 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 probióticos (sem probiótico 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 em Delineamento Inteiramente Casualizados (DIC), sendo os tratamentos: Milho grão inteiro sem probiótico – MGI-TE; Milho grão moído sem probiótico - MGM-TE; Milho grão inteiro com *Rhizomucor* spp. – MGI-RZ; Milho grão moído com *Rhizomucor* spp. – MGM-RZ; Milho grão inteiro com *Aspergillus terreus* – MGI-AT; Milho grão moído com *Aspergillus terreus* – MGM-AT; Milho grão inteiro com mistura dos dois fungos – MGI-MX; Milho grão moído com mistura dos dois fungos – MGM-MX.

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.

Todos os tratamentos foram compostos com dieta de 85 % de milho (grão inteiro ou moído) e 15 % de núcleo comercial, e os animais de cada baia receberam os tratamentos descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição dos tratamentos

Tratamentos	Milho Grão	Milho Moído	Núcleo	Probióticos
	(%)			esporo/animal/dia <sup>a</sup>
MGI-TE	85	-	15	Sem
MGM-TE	-	85	15	Sem
MGI-RZ	85	-	15	<i>Rhizomucor spp.</i>
MGM-RZ	-	85	15	<i>Rhizomucor spp.</i>
MGI-AT	85	-	15	<i>Aspergillus terreus</i>
MGM-AT	-	85	15	<i>Aspergillus terreus</i>
MGI-MX	85	-	15	<i>Rhizomucor spp.</i> + <i>Aspergillus terreus</i>
MIM-MX	-	85	15	<i>Rhizomucor spp.</i> + <i>Aspergillus terreus</i>

<sup>a</sup>Concentração de  $9,33 \times 10^{11}$  esporo por animal por dia. MGI: milho grão inteiro; MGM: milho moído; TE: controle; RZ: *Rhizomucor spp.*; AT: *Aspergillus terreus*; MX: mistura dos dois fungos;

#### Análises de composição do núcleo peletizado e dieta total

O núcleo peletizado (Engordin<sup>®</sup>) usado nas dietas foi moído separadamente e em seguida misturado ao milho moído. Já para os tratamentos com grãos inteiros foi fornecido o núcleo misturado 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 ( $6000 \text{ mg kg}^{-1}$ ), cálcio (mínimo de  $34 \text{ g kg}^{-1}$ ), extrato etéreo ( $10 \text{ g kg}^{-1}$ ), fibra em detergente neutro (mínimo de  $220 \text{ g kg}^{-1}$ ), matéria mineral (mínimo  $200 \text{ g kg}^{-1}$ ), proteína bruta (mínimo  $380 \text{ g kg}^{-1}$ ), nitrogênio não proteico equiparado em proteína (mínimo  $116 \text{ g kg}^{-1}$ ), cobalto ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), cobre ( $175 \text{ mg kg}^{-1}$ ), cromo ( $1,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ), enxofre ( $4.500 \text{ mg kg}^{-1}$ ), iodo ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), manganês ( $180 \text{ mg kg}^{-1}$ ), magnésio ( $3.000 \text{ mg kg}^{-1}$ ), sódio (mínimo  $9700 \text{ mg kg}^{-1}$ ), potássio ( $15 \text{ g kg}^{-1}$ ), zinco (mínimo  $420 \text{ mg kg}^{-1}$ ), iodo ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), virginiamicina ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$ ), monensina ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$ ), vitaminas A ( $21.000 \text{ U.I kg}^{-1}$ ), D ( $3.600 \text{ U.I kg}^{-1}$ ) e E ( $135 \text{ U. I. kg}^{-1}$ ) e outros minerais essenciais com umidade de  $120 \text{ g kg}^{-1}$  (90 % de MS).

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

Componentes (g/kg)	Milho	Dieta milho grão inteiro	Dieta milho grão moído
Matéria seca	925,98	890,95	889,2
Matéria mineral	10,88	36,5	39,45
Matéria orgânica	989,12	963,5	960,55
Fibra em detergente neutro	323,18	250,24	183,63
Fibra em detergente ácido	242,73	31,57	38,1
Extrato etéreo	11	27	23,5
Carboidrato não fibroso <sup>4</sup>	572,59	562,94	620,23
Proteína bruta	82,35	123,33	124,09

<sup>4</sup>Carboidratos não fibrosos (CNF) calculados com base no FDN (CNF =  $100 - \text{MM} - \text{PB} - \text{EE} - \text{FDN}$ ).

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

animais confinados.

#### Coleta e preparo de amostras do fluido ruminal

A coleta do fluido ruminal foi realizada em cinco animais por tratamento, totalizando 40 amostras dos 48 animais do experimento, pois um animal macho por tratamento não foi abatido. Ao final do período de confinamento de 75 dias, os animais foram pesados (média de  $49,5 \text{ kg}$ ) e transportados para o abate no setor de Agroindústria do IF Goiano - Campus Ceres. O abate foi realizado por insensibilização elétrica com eletrodos e posterior sangria através do corte da veia jugular e artéria carótida. Foi adotado o manejo pré-abate com 12 horas de jejum e respeito às normas higiênica-sanitárias de bem-estar animal.

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 (região com maior concentração de microrganismos) 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 esterilizados de 120 mL e mantidos em caixa isotérmica resfriada, em temperatura abaixo de  $8^\circ\text{C}$ , por no máximo uma hora.

#### Avaliação microbiológica e parâmetros do metabolismo ruminal

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>(20)</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>(21)</sup>. Para a determinação da concentração de amônia ( $\text{NH}_3$ ) no líquido ruminal, uma amostra de 20 mL do conteúdo foi filtrada e mantida congelada à  $0^\circ\text{C}$  para posterior realização da análise conforme o método INCT-CA N006/1 descrito por Detmann et al<sup>(22)</sup>.

#### Análises de 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>(23)</sup>.

#### Bactérias Enterozoônicas

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 homogêneos 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 homogêneos com alças de Drigalski estéril e as placas foram incubadas em estufa BOD a 39°C e monitoradas para o crescimento de colônias bacterianas por até 21 dias<sup>(23)</sup>.

Para a identificação dos gêneros bacterianos mais prevalentes nas amostras de fluido ruminal, foi realizado o isolamento e o cultivo em placas contendo meio ágar Mac Conkey em estufa a 37°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>(24)</sup>. Os tubos foram incubados em estufa BOD a 39°C e posteriormente foi feita a leitura dos resultados após 24 horas, usando-se tabela ilustrativa para identificação presumida de Enterobacteriaceae, de acordo com Pessoa e Silva<sup>(24)</sup>.

#### *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 homogêneos 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 homogêneos com alças de Drigalski estéril e as placas foram incubadas em estufa BOD a 37°C e monitoradas para o crescimento de colônias fúngicas por até sete dias<sup>(25)</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>(25,26)</sup>.

#### *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>(27,28)</sup>.

#### *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 cm<sup>2</sup>, 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>(29)</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 óptico ligado à computador onde as imagens foram analisadas com uso do programa Image J<sup>(30)</sup>.

#### *Análises estatísticas*

Após análise exploratória, os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância pelo pacote estatístico EASYANOVA do R<sup>(31)</sup>, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Nas análises microbiológicas foram utilizados testes não-paramétricos pelo pacote estatístico EASYANOVA do R<sup>(31)</sup>, sendo Qui-Quadrado para taxas de detecção, Wilcoxon para análises de comparação de dois grupos, Friedman ou Kruskal-Wallis para dados de quantificação<sup>(31)</sup>. Foram realizadas análises descritivas das características sensoriais do fluido ruminal (cor, odor, viscosidade e PRAM).

## **Resultados e discussão**

### *Características do fluido ruminal*

Quanto às avaliações das análises macroscópicas do líquido ruminal, a coloração castanha enegrecida (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. Castanho (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 3). Essas tonalidades são caracterizadas em ambiente ruminal com pH mais neutro. Abrão et al.<sup>(5)</sup> e Vieira et al.<sup>(32)</sup> concordam com Dirksen<sup>(20)</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>(5,32+)</sup>. Dessa forma, pela avaliação das colorações do fluido, os animais do

experimento apresentaram baixo índice de acidose. Nesse sentido, as dietas mostraram estarem de acordo com as exigências fisiológicas dos animais, não causando problemas metabólicos, como 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 3). A maior manifestação desse odor (19,04%) foi para o tratamento da MGM associada à 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>(23)</sup> em 100% das amostras de animais se alimentando de pastagem e o odor levemente ácido para as amostras de animais sob DAG. Os animais que apresentaram odor AR, tendem a apresentar o pH mais adequado ao desenvolvimento da microbiota. Dessa forma, essas dietas são mais adequadas às exigências fisiológicas dos animais, apresentando menos distúrbios metabólicos.

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 03). 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>(23)</sup> verificaram em seu estudo que os animais em pastejo apresentavam as propriedades descritas por Dirksen<sup>(20)</sup>, no qual descreve fluido ruminal com característica espessa com intensa produção de bolhas de gases, indica intensa atividade microbiana<sup>(20)</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 03). Abrão et al.<sup>(5)</sup> observaram PRAM menor que um minuto para animais recebendo dieta de alto concentrado, contudo Dirksen<sup>(20)</sup> respalda que o baixo potencial de atividade microbiana apresenta tempo de PRAM maior que 15 minutos, em situações manifestadas por animais sob dietas pobres em energia e proteína, ou em ruminantes com inapetência prolongada.

**Tabela 3.** Análise físico-química predominante do fluido ruminal de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associados a probióticos fúngicos

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>											
Amoniacal – 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
Inosso 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.

### Concentração de $N-NH_3$ 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 4). Savari et al.<sup>33</sup> também não encontraram diferença significativa para o seu experimento com vacas leiteiras alimentadas com dietas de alto concentrado de milho moído ou floculado 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 concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen deve estar em torno de 15 mg/dl, dessa forma irá maximizar a produção<sup>(34)</sup>. Os resultados obtidos nesse experimento estão entre 8,14 a 9,66 mg/dl, acima do mínimo recomendado.

**Tabela 4.** Análise da concentração de 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	9,3	9,54	8,1473	0,786	0,808	0,554	33,32
pH	5,51 <sup>b</sup>	6,15 <sup>a</sup>	5,77	5,73	5,99	5,838	0,001	0,579	0,748	7,6

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. Proc: processamento; Prob: probiótico; Proc:Prob: processamento:probiótico

A não verificação das diferenças para flutuação do nitrogênio amoniacal no rúmen ao longo do tempo, após arraçoamento no presente estudo pode estar relacionada ao fato da 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 (mais ácido) para o fluido ruminal dos animais sob dieta de grão inteiro (P<0,01). A dieta rica em CNF pode elevar o crescimento microbiano, aumentando a taxa de passagem<sup>(34)</sup>. Dieta de grão moído aumenta a disponibilidade de CNF, quando comparado com a dieta de grão inteiro. Dessa forma, em animais 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 graxos da fermentação, e consequentemente ocorrendo a redução do pH<sup>(3)</sup>.

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

Nas análises de Gram observou-se um padrão

semelhante para os diferentes grupos de bactérias (Tabela 5). Independente do tratamento, todos apresentaram concentração semelhante em relação à variação de cocos e seus agrupamentos, assim como para espirilo, vibrião, bacilos e leveduras. Características semelhantes também foram observadas em bactérias Gram negativa e Gram positiva, sendo a maior concentração em todos os tratamentos para o grupo Gram positivo (P<0,05).

Foi realizada uma análise do perfil populacional dos microrganismos que constituem a microbiota ruminal (Tabelas 5 e 6). Não foram observadas diferenças significativas das populações bacterianas nas amostras analisadas quando considerou o fator probiótico fúngico (Tabela 5). Contudo, observou-se maior porcentagem da população de bactérias Gram positiva para todos os tratamentos (Tabela 5). Apesar de apresentado diferença significativa nos valores do pH entre os tipos de processamento (Tabela 4), não foi observado diferença para nenhuma das comunidades microbiológicas (bactérias Lac<sup>+</sup> e Lac<sup>-</sup>, fungos, leveduras e protozoários) analisadas entre os tratamentos (Tabela 6).

**Tabela 5.** Exame direto para detecção dos grupos bacterianos 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, %	82,8 <sup>a</sup>	69,7 <sup>a</sup>	72,5 <sup>a</sup>	80,1 <sup>a</sup>	86,4 <sup>a</sup>	70,1 <sup>a</sup>	80,2 <sup>a</sup>	76,5 <sup>a</sup>
Gram Negativa, %	17,2 <sup>b</sup>	33,5 <sup>b</sup>	30,7 <sup>b</sup>	26,5 <sup>b</sup>	25,1 <sup>b</sup>	25,0 <sup>b</sup>	26,3 <sup>b</sup>	25,1 <sup>b</sup>
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes 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 fungos – RZ+AT; TE: Controle. +++: concentração alta; ++: concentração média; e +: concentração baixa.

Nesse estudo, a população de protozoário grande quase que inexistente na maioria dos tratamentos, exceto no tratamento com milho moído onde houve a mistura dos fungos *Rhizomucor* spp. mais *Aspergillus terreus* (Tabela 6). Observou-se ainda uma maior predominância dos protozoários pequenos em praticamente todos os tratamentos, exceto para os tratamentos com *Aspergillus terreus* independente do processamento (Tabela 6). Dessa forma, à medida que se aumentou o tamanho do protozoário

menos sua população em dieta com alto concentrado de grão.

Trabalhos têm cancelado que em ambiente ruminal com característica de acidose a diversidade microbiana<sup>(3)</sup> é reduzida, e de acordo com Nagaraja e Titgemeyer<sup>(35)</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 ser favorecida pelo acúmulo de amido no rúmen, contudo, o pH ácido do rúmen impede o desenvolvimento de protozoários, podendo levar à morte, principalmente dos grandes<sup>(36,37)</sup>.

Não foi observada diferença significativa para as populações de Lac<sup>+</sup> e Lac<sup>-</sup> dentro do fator probiótico, contudo houve diferença estatística entre os tipos de

processamento (P<0,05) (Tabela 6 e 7) com maior população na dieta de milho grão moído (MGI: 1,29x10<sup>6</sup> e MGM: 1,75x10<sup>6</sup>; Tabela: 7). Foi observado também, uma maior concentração de bactérias fermentadoras de lactose (P<0,05) em todos os fatores (probiótico x processamento) (Tabela 7). 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>(3,9)</sup>.

**Tabela 6.** Avaliação da população da microbiota ruminal de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base de fungos

Variável	Milho Grão Inteiro UFC/mL <sup>-1</sup>				Média
	RZ	AT	MX	TE	
Bactérias lac <sup>+</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	6,3x10 <sup>4</sup>	7,4x10 <sup>4</sup>	3,8x10 <sup>4</sup>
Bactérias lac <sup>-</sup>	1,9x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	6,9x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>4</sup>	1,4x10 <sup>4</sup>
Fungos filamentosos	1,4x10 <sup>3</sup>	9,6x10 <sup>2</sup>	1,3x10 <sup>3</sup>	8,6x10 <sup>2</sup>	1,1x10 <sup>3</sup>
Leveduras	2,2x10 <sup>4</sup>	7,8x10 <sup>3</sup>	5,0x10 <sup>3</sup>	4,8x10 <sup>3</sup>	4,9x10 <sup>3</sup>
Protozoários pequenos	2,0x10 <sup>7</sup>	0	9,0x10 <sup>5</sup>	1,8x10 <sup>5</sup>	5,27x10 <sup>6</sup>
Protozoários médios	5,8x10 <sup>5</sup>	0	2,7x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>3</sup>	1,45x10 <sup>5</sup>
Protozoários grandes	0	0	0	2,6x10 <sup>3</sup>	6,50x10 <sup>3</sup>
	Milho Grão Moído UFC/mL <sup>-1</sup>				
Bactérias lac <sup>+</sup>	7,6x10 <sup>4</sup>	2,8x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>	6,87x10 <sup>4</sup>
Bactérias lac <sup>-</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	1,7x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>	1,72x10 <sup>4</sup>
Fungos filamentosos	2,8x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	1,9x10 <sup>3</sup>	1,85x10 <sup>3</sup>
Leveduras	8,3x10 <sup>3</sup>	2,8x10 <sup>3</sup>	6,7x10 <sup>3</sup>	1,7x10 <sup>3</sup>	4,87x10 <sup>3</sup>
Protozoários pequenos	2,6x10 <sup>4</sup>	0	8,7x10 <sup>4</sup>	2,0x10 <sup>5</sup>	7,82x10 <sup>4</sup>
Protozoários médios	60	0	1,0x10 <sup>4</sup>	2,2x10 <sup>2</sup>	2,57x10 <sup>3</sup>
Protozoários grandes	0	0	1,7x10 <sup>4</sup>	0	4,25x10 <sup>3</sup>

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

**Tabela 7.** 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 <sup>+</sup>	Lac <sup>-</sup>
Milho Grão Inteiro				
<i>Rhizomucor</i> spp.	2,27x10 <sup>5</sup>	17,59	57,92 <sup>a</sup>	42,07 <sup>b</sup>
<i>Aspergillus terreus</i>	2,22x10 <sup>5</sup>	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>	9,87 <sup>b</sup>
Controle	4,89x10 <sup>5</sup>	37,86	76,29 <sup>a</sup>	23,70 <sup>b</sup>
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>	19,25 <sup>b</sup>
<i>Aspergillus terreus</i>	2,38x10 <sup>5</sup>	13,61	58,26 <sup>a</sup>	41,74 <sup>b</sup>
Mix dos fungos	3,91x10 <sup>5</sup>	22,31	78,07 <sup>a</sup>	21,93 <sup>b</sup>
Controle	6,50x10 <sup>5</sup>	37,13	88,27 <sup>a</sup>	11,73 <sup>b</sup>
Total MGM	1,75x10 <sup>6</sup> B	100	-	-

significativas a 5% de significância pelo teste *Wilcoxon* entre Lac<sup>+</sup> e Lac<sup>-</sup>, e significativo para letras maiúsculas diferentes entre os tipos de processamentos pelo teste de *Kruskal-Wallis*. Lac<sup>+</sup>: bactéria fermentadora de lactose; Lac<sup>-</sup>: bactéria não fermentadora de lactose; UFC: unidade formadora de colônia; MGI: milho grão inteiro; MGM: milho grão moído.

### Distribuição dos gêneros de bactérias

Os gêneros de bactérias mais predominantes, em ordem decrescente, foram *Alcaligenes* (37), *Escherichia coli* (22), *Klebsiella* (11), *Shigella* (10) e *Enterobacter* (6) (Tabela 8). 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 arraoados com dieta com alto concentrado tem maior predominância de bactérias totais de *Escherichia coli* presentes no rúmen<sup>(23)</sup>. Com o pH próximo de 5,5, há aumento na população dos *Lactobacillus* spp. substituindo a bactéria *Streptococcus bovis*, o que leva o aumento da concentração de lactato, podendo levar o animal a desenvolver uma acidose ruminal<sup>(8,10,11)</sup>, dessa forma a uma redução de diversidade bacteriana<sup>(38)</sup>.

Vieira et al.<sup>(23)</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, verificando que a maior população de bactérias foi encontrada 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 entre os gêneros. Resultados dessa pesquisa corroboram com Vieira et al.<sup>(23)</sup> quanto à predominância dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* no

fluido ruminal de animais alimentados com dieta de alto concentrado.

A população *E. coli* é mais predominante 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 podem 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>(32,39)</sup>.

**Tabela 8.** 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 fungos

Bactérias	Total	Inteiro								Moído							
		RZ		AT		MX		TE		RZ		AT		MX		TE	
		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	-	-	1	10	3	30	1	10	-	-	1	10	3	30
<i>Enterobacter</i>	6	1	16,7	1	16,7	1	16,7	-	-	-	-	-	-	-	-	3	50
<i>Edwardsiella</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	100	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus</i>	1	-	-	1	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100	-	-	-	-	-	-
Total	91	11	12,1	14	15,4	10	11	7	7,7	15	16,5	10	11	10	11	13	14,3

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 responsáveis por causar intoxicação alimentar<sup>(23,40)</sup>. Esses dois gêneros, produtores de lactato, apresentam 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>(6,41)</sup>. Contudo, os animais da presente pesquisa não apresentaram sintomas de intoxicação (diarreia, perda de apetite e desidratação, por exemplo), em decorrência desses gêneros de bactérias, o que pode ser justificado pela baixa frequência desses gêneros encontrados nas amostras. E ainda, esses resultados corroboram com as análises histológicas apresentadas abaixo. Pois animais com sintomas de acidose podem apresentar lesões na mucosa ruminal com danos ao epitélio ruminal, o que pode ser observado em exame histológico das papilas ruminais<sup>(6,42)</sup> (Tabela 10).

#### Distribuição dos gêneros de fungos anaeróbios facultativos

Foram identificados seis gêneros de fungos para o total de 15 amostras observadas nas análises para

população de fungos anaeróbios. 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 manchas escuras, de tonalidade marrom e preta, com aspecto aveludado<sup>(43)</sup>. Segundo Hankin e Anagnostakis<sup>(44)</sup> são gêneros de fungos capazes de produzir as enzimas lipase, protease, urease e quitinase, que contribuem 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>(45)</sup>.

O segundo fungo mais prevalente foi do gênero *Aspergillus* spp., correspondendo a 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 a amarelada, semelhante ao algodão, com base amarelada com o centro mais escuro<sup>(43)</sup>. Esse gênero, é muito comum sendo encontrado em toda 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>(46-50)</sup> verificaram o potencial desse gênero para produção de enzimas 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>(51)</sup> confirmaram a eficiência do *Aspergillus terreus* na produção de enzima celulase em cultura de fungo filtrado do que em extrato 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%), pertencente à família do Mucoraceae, comumente encontrado em vegetais em

decomposição, sendo às vezes relacionado como causador de infecção em humanos<sup>(43)</sup>. Os gêneros *Rhizomucor* spp. e *Fusarium* spp. foram os menos observados, correspondendo as 6,66% do total observado para cada uma das identificações por microcultivo. O *Rhizomucor* spp. também pertence à família dos Mucoraceae<sup>(43)</sup>. Bernarde et al.<sup>(52)</sup> em seus estudos 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).

#### Distribuição dos gêneros de protozoários do rúmen

A quantificação da população de protozoários grande, médio e pequeno encontra-se relacionado na Tabela 06. Na identificação dos gêneros de protozoários (Tabela 9) só foi possível observar dois gêneros, *Entodinium* e *Charonina*, contudo não foi observada diferença significativa na população desses gêneros em função do tipo de probiótico e do processamento.

**Tabela 9.** 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	0,8	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. Proc: processamento; Prob: probiótico.

#### Análises histológicas do trato gastrointestinal

Na avaliação das variações das características histológicas 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 10). 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) ( $P<0,05$ ).

Esses achados favoráveis ao *Rhizomucor* spp. podem estar relacionados com característica do fungo em

desenvolver bem em ambiente com o pH entre 4,0 e 5,0 e temperatura a redor de 70 °C<sup>(52)</sup>. De acordo com Bernardes et al.<sup>(52)</sup>, esse fungo apresentou maior eficiência na produção de enzima alfa-amilase com o pH entre 4,0 e 5,0. A alfa-amilase atua na digestão ruminal do amido, principal componente em dieta de alto concentrado de grão<sup>(53)</sup>.

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 probióticos fúngicos, maior novamente para os tratamentos RZ e TE ( $P<0,05$ ) e menor nos tratamentos com *Aspergillus terreus* (AT). 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.

Esses resultados favoráveis para a dieta com grão inteiro podem estar correlacionados com a maior concentração de partículas maiores, pois em estudos que comparam o efeito de milho moído finamente com milho triturado grosso (quirela), tem-se observado os melhores resultados para quirela<sup>(54)</sup>. A presença de partículas

maiores que três milímetros no rúmen melhora o movimento peristáltico e assim estimula o desenvolvimento do músculo do epitélio ruminal<sup>(42)</sup>. Novamente, RZ demonstra melhor efeito do que o AT, o que pode estar correlacionada com capacidade desse fungo em se adaptar melhor às condições ambientais do TGI com maior produção de enzimas como  $\alpha$ -amilase<sup>(52)</sup>.

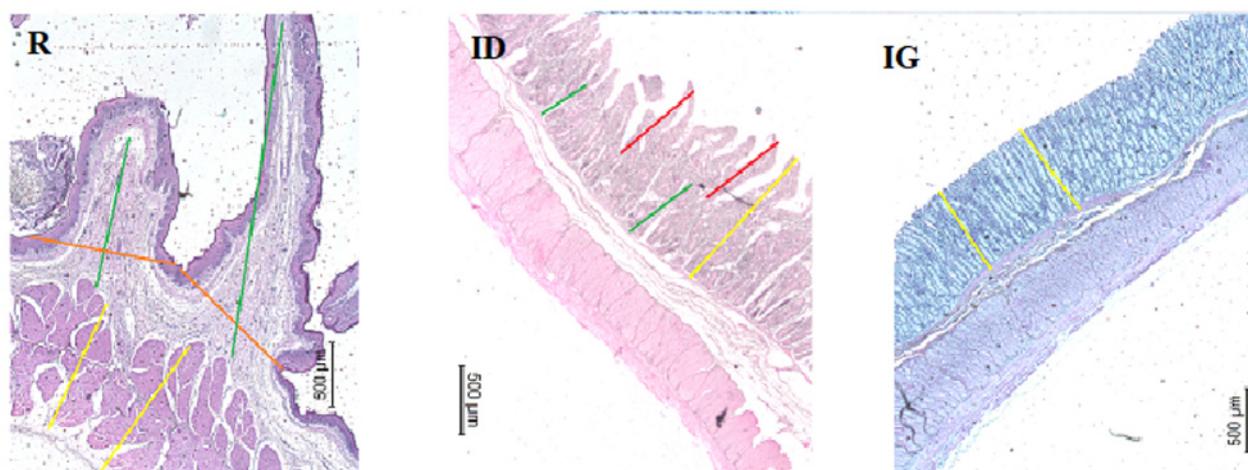
**Tabela 10.** Avaliação histológica do rúmen, intestino delgado e intestino grosso de ovinos confinados alimentados com dieta de alto grão associado a probióticos à base de fungo

Variáveis	Processamento ( $\mu\text{m}$ )		Probiótico ( $\mu\text{m}$ )				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	771 <sup>b</sup>	9774 <sup>a</sup>	1080 <sup>a</sup>	752 <sup>b</sup>	711 <sup>b</sup>	949 <sup>a</sup>	0,001*	0,001*	0,001	27,67
TMS	1530 <sup>a</sup>	1380 <sup>b</sup>	1596 <sup>a</sup>	1250 <sup>c</sup>	1403 <sup>b</sup>	1572 <sup>a</sup>	0,001*	0,001*	0,001	14,78
AVD	507 <sup>a</sup>	385 <sup>b</sup>	352 <sup>b</sup>	500 <sup>a</sup>	511 <sup>a</sup>	421 <sup>b</sup>	0,001*	0,001*	0,241	27,34
PCD	451 <sup>a</sup>	408 <sup>a</sup>	574 <sup>a</sup>	387 <sup>b</sup>	353 <sup>b</sup>	403 <sup>b</sup>	0,096	0,001*	0,463	28,9
PCG	564 <sup>b</sup>	753 <sup>a</sup>	520 <sup>b</sup>	652 <sup>a</sup>	755 <sup>a</sup>	706 <sup>a</sup>	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. Proc: processamento; Prob: probiótico; Proc:Prob: processamento:probiótico.

Gallo et al.<sup>(55)</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>(56)</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 das papilas. Porém, foi verificada diferença significativa para porcentagem de área papilar e superfície total de absorção.



**Figura 1.** Imagem de lâmina histológica (500 $\mu\text{m}$ ). 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.

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 ( $P < 0,05$ )

## Conclusão

Os fungos utilizados neste trabalho não demonstraram ações probióticas com influência na microbiota e nem nas características macroscópicas do ambiente ruminal.

## Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Contribuições do autor

**Conceituação:** R. Fabino Neto, F. O. A. Pessoa, M. M. Godoy; **E. S. Miyagi;** **Análise formal:** F. O. A. Pessoa, R. Fabino Neto; **Aquisição de financiamento:** F. O. A. Pessoa; M. M. Godoy; **Investigação:** F. O. A. Pessoa; R. Fabino Neto, T. D. Silva, V. V. Santana Neto, D. K. S. Lima, R. J. M. Silva; **Gerenciamento do projeto:** R. Fabino Neto, F. O. A. Pessoa, M. M. Godoy, E. S. Miyagi; **Recursos:** R. Fabino Neto, F. O. A. Pessoa; **Supervisão:** F. O. A. Pessoa, R. Fabino Neto, E. S. Miyagi; **Validação:** F. O. A. Pessoa, E. S. Miyagi; **Visualização:** F. O. A. Pessoa, M. M. A. Brainer, R. Fabino Neto; **Redação (esboço original):** F. O. A. Pessoa, M. M. A. Brainer, R. Fabino Neto; **Redação (revisão e edição):** F. O. A. Pessoa, M. M. A. Brainer, R. Fabino Neto.

## Agradecimentos

Agradecimento ao Instituto Federal Goiano Campus Ceres, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Goiás e à Agrocria Comercio e Industria LTDA, pelo apoio à pesquisa.

## Referências

- 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 Jan;247(November 2018):222–33. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.11.012>
- Brown MS, Ponce CH, Pulikanti R. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. *J Anim Sci* [Internet]. 2006 Apr 1;84(suppl 13):E25–33. Disponível em: [https://academic.oup.com/jas/article/84/suppl\\_13/E25/4776456](https://academic.oup.com/jas/article/84/suppl_13/E25/4776456)
- 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* [Internet]. 2018 Dec

19;12(12):2511–20. Disponível em: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S175173111800040X/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S175173111800040X/type/journal_article)

4. Paulino PVRP, Oliveira TST, Gionbeli MPM, Gallo SBS. Dietas Sem Forragem para Terminação de Animais Ruminantes. *Rev Científica Produção Anim* [Internet]. 2013 Dec 31;15(2):161–72. Disponível em: <http://www.bibliotekevvirtual.org/index.php/2013-02-07-03-02-35/2013-02-07-03-03-11/352-rcpa/v15n02/2877-v15n02a06.html>

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* [Internet]. 2015;37(1):7–14. Disponível em: <https://rbmv.org/BJVM/article/view/345>

6. Tavares NC, Barbosa AA, Bermudes RF, Rechsteiner SMEF, Cruz LA, Bruhn FRP, et al. Impact of high-energy diets on the rumen environment and digital cushion in confined cattle. *Pesqui Veterinária Bras* [Internet]. 2019 Dec [cited 2022 Feb 3];39(12):970–7. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2019001200970&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2019001200970&tlng=en)

7. 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* [Internet]. 2019 Sep 7;13(9):1855–64. Disponível em: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731118003671/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731118003671/type/journal_article)

8. Mao S-Y, Huo W-J, Zhu W-Y. Microbiome-metabolome analysis reveals unhealthy alterations in the composition and metabolism of ruminal microbiota with increasing dietary grain in a goat model. *Environ Microbiol* [Internet]. 2016 Feb;18(2):525–41. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12724>

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* [Internet]. 2019 Aug 18;13(8):1614–22. Disponível em: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731118003269/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731118003269/type/journal_article)

10. Russell JB, Hino T. Regulation of Lactate Production in *Streptococcus bovis*: A Spiraling Effect That Contributes to Rumen Acidosis. *J Dairy Sci* [Internet]. 1985 Jul;68(7):1712–21. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022032085810171>

11. Dong H, Wang S, Jia Y, Ni Y, Zhang Y, Zhuang S, et al. Long-Term Effects of Subacute Ruminal Acidosis (SARA) on Milk Quality and Hepatic Gene Expression in Lactating Goats Fed a High-Concentrate Diet. *White BA, editor. PLoS One* [Internet]. 2013 Dec 23;8(12):e82850. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0082850>

12. Nagaraja TG, Newbold CJ, van Nevel CJ, Demeyer DI, Nevel CJVAN, Demeyer DI. Manipulation of ruminal fermentation. In: Springer, editor. *The Rumen Microbial Ecosystem* [Internet]. Chophman &. Dordrecht: Springer Netherlands; 1997. p. 523–632. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-1453-7\\_13](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-1453-7_13)

13. McCann J c., Elolimy AA, Looor JJ. Rumen Microbiome, Probiotics, and Fermentation Additives. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* [Internet]. 2017 Nov;33(3):539–53. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.06.009>

14. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics

- and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2014 Aug 10;11(8):506–14. Disponível em: <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
15. Markowiak P, Śliżewska K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog* [Internet]. 2018 Dec 6;10(1):21. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>
16. 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* [Internet]. 2016 Dec;42:17–26. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996416300865>
17. 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* [Internet]. 2008 Aug;145(1–4):5–26. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840107002787>
18. Fabino Neto R, Silva TD, Abrão FO, Ferreira JC, Batista LHC, Silva BC da, et al. Avaliação *in vitro* de fungos ruminais como probiótico para ovinos em dieta de alto grão. *Brazilian J Dev* [Internet]. 2020;6(7):53642–56. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/14249/11866>
19. Ximenes E de A, Felix CR. O sistema celulolítico de microrganismos anaeróbios: uma mini-revisão sobre o celulosoma. *Univ Ciências da Saúde* [Internet]. 2008 Mar 26;1(2):269–75. Disponível em: <http://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/view/516>
20. Dirksen G. Exame Clínico dos Bovinos. In: Koonga G, editor. *Sistema digestivo*. Rio de Janeiro; 1993. p. 167–9.
21. Noorae SE, Alimon AR, Ho YW, Abdullah N. Characterization of *Kluyveromyces marxianus* as a potential feed additive for ruminants. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2010 Mar 11;50(6):578–84. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1472-765X.2010.02836.x>
22. Detmann E, Souza M, Valadares Filho S, Queiroz A, Berchielli T, Saliba E, et al. *Métodos para Análise de Alimentos*. 1st ed. Suprema, editor. Visconde do Rio Branco; 2012. 214 p.
23. Vieira EA, Abrão FO, Ribeiro ICO, Nigri AC de A, Silva KF da, 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 Veterinária Bras* [Internet]. 2015 Sep;35(9):811–6. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2015000900811&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2015000900811&lng=pt&tlng=pt)
24. Pessoa G, Silva E. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presumida de enterobactérias. *Rev Inst Adolfo Lutz* [Internet]. 1972;32:97–100. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/70/rial\\_321-2\\_1972/n372.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/70/rial_321-2_1972/n372.pdf)
25. 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. Disponível em: [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)
26. Brasil AN de VS (ANVISA). Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica [Internet]. Módulo VII. 2004. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/microbiologia/mod\\_7\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/microbiologia/mod_7_2004.pdf)
27. Dehority B. Microbial interactions in the rumen. *Rev la Fac Agron* [Internet]. 1998;15(1). Disponível em: <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/agronomia/article/view/11730>
28. Brossard L, Martin C, Chaucheyras-Durand F, Michalet-Doreau B. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reprod Nutr Dev* [Internet]. 2004 May;44(3):195–206. Disponível em: <http://www.edpsciences.org/10.1051/rnd:2004023>
29. Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia*. 1st ed. Kooga G, editor. Rio de Janeiro; 1999. 250 p.
30. 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 Dec 29;18(1):529. Disponível em: <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-017-1934-z>
31. Arnhold E. No TitlePackage in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. *Brazilian J Vet Res Anim Sci* [Internet]. 2013;50(6):488–92. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-789914>
32. Vieira EA, Abrão FO, Ribeiro ICO, Nigri AC de A, Silva KF da, 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 Veterinária Bras* [Internet]. 2015 Sep;35(9):811–6. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2015000900811&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2015000900811&lng=pt&tlng=pt)
33. 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]. 2018 Feb;101(2):1111–22. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217311050>
34. Detmann E, Valente EEL, Batista ED, Huhtanen 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. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871141314000833>
35. Nagaraja TG, Newbold CJ, Nevel CJVAN, Demeyer DI. Manipulation of ruminal fermentation. *Rumen Microb Ecosyst* [Internet]. 1997; Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-1453-7\\_13](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-1453-7_13)
36. Oliveira Abrão F, Oliveira Santos D, Dijkstra E, Fabino Neto R, Curcino Batista LH, Robson Duarte E. Efeito do processamento do grão sobre a população de protozoários ruminais de ovinos Santa Inês. *Arch Zootec* [Internet]. 2018 Oct 15;67(260):518–24. Disponível em: <https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/3882/2291>
37. Kozloski GV. *Bioquímica dos ruminantes*. 3rd ed. Editoraufsm, editor. Santa Maria; 2016. 216 p.
38. Andrade BGN, Bressani FA, Cuadrat RRC, Tizioto PC, de Oliveira PSN, Mourão GB, et al. The structure of microbial populations in Nelore GIT reveals inter-dependency of methanogens in feces and rumen. *J Anim Sci Biotechnol* [Internet]. 2020 Dec 24 [cited 2020 Sep 9];11(1):6. Disponível em: <https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40104-019-0422-x>

39. Russell J, Rychlik J. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* (80- ). 2001;292(5519):1119–22.
40. Sarmikasoglou E, Faciola AP. Ruminal Lipopolysaccharides Analysis: Uncharted Waters with Promising Signs. *Animals* [Internet]. 2021 Jan 15;11(1):195. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani11010195>
41. Uyeno Y, Shigemori S, Shimosato T. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environ* [Internet]. 2015;30(2):126–32. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/30/2/30\\_ME14176/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsme2/30/2/30_ME14176/article)
42. Jaramillo-López E, Itza-Ortiz MF, Peraza-Mercado G, Carrera-Chávez JM. Ruminal acidosis: strategies for its control. *Austral J Vet Sci* [Internet]. 2017 Sep;49(3):139–48. Disponível em: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0719-81322017000300139&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-81322017000300139&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
43. BIREME. Descritores em Ciências da Saúde: DeCS [Internet]. OPAS/OMS. 2017. Disponível em: <http://decs.bvsalud.org>
44. Hankin L, Anagnostakis SL. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycologia* [Internet]. 1975 May;67(3):597. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3758395?origin=crossref>
45. 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. Disponível em: <http://revistas.ufcg.edu.br/ActaBra/index.php/actabra/article/view/6/3>
46. 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 Nov 25;69(5):649–59. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-014-0633-5>
47. 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]. 2018 Dec;70(6):1833–9. Disponível em: [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)
48. Abrão FO, Duarte ER, Pessoa MS, Santos VL dos, Freitas Júnior LF de, 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. Yang S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Aug 29;12(8):e0183628. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0183628>
49. Oliveira Abrão F, Eduardo Silva Freitas C, Robson Duarte E, Sena Pessoa M, Henrique Curcino Batista L, Dias Silva T, et al. Enzimas microbiana: potencial biotecnológico E efeitos modulatórios em ruminantes. *Colloq Agrar* [Internet]. 2017 Jun 1;13(Especial 2):164–73. Disponível em: [http://revistas.unoeste.br/revistas/suplementos/agrariae/vol13nr2/enzimas\\_microbiana\\_potencial\\_biotecnol%3gico\\_e\\_efeitos\\_modulat%3rios\\_em\\_ruminantes.pdf](http://revistas.unoeste.br/revistas/suplementos/agrariae/vol13nr2/enzimas_microbiana_potencial_biotecnol%3gico_e_efeitos_modulat%3rios_em_ruminantes.pdf)
50. Pessoa FOA. Fungos do trato digestório de ruminantes como potencial probiótico para bovinos alimentados com forrageiras lignificadas [Internet]. [Belo Horizonte]: Universidade Federal de Minas Gerais; 2016. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-200060>
51. Mostafa FA, Abd El Aty AA, Hamed ER, Eid BM, Ibrahim NA. 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 Jan;5:116–22. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.01.005>
52. Bernardes AV, Martins EDS, Da Mata JF, Ferreira OE. Utilização de subprodutos agroindustriais para produção de  $\alpha$ -amilase por *Rhizomucor miehei*. *Rev Bras Tecnol Agroindustrial* [Internet]. 2014 Jun 23;8(2):1439–51. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rbta/article/view/1852>
53. Zilio EM, Del Valle TA, Ghizzi LG, Takiya CS, Dias MS, Nunes AT, et al. Effects of exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes on ruminal fermentation and performance of mid-lactation dairy cows. *J Dairy Sci* [Internet]. 2019;102:4179–89. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14949>
54. Gholami MA, Forouzmam M, Khajavi M, Hossienifar S, Naghiha R. Effect of different corn processing methods on enzyme producing bacteria, protozoa, fermentation and histomorphometry of rumen in fattening lambs. *Vet Res forum an Int Q J* [Internet]. 2018;9(1):43–8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29719663>
55. Gallo SB, Merlin F de A, Macedo CM de, Silveira RD de O. Whole grain diet for Feedlot Lambs. *Small Rumin Res* [Internet]. 2014; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.05.014>
56. 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]. 2015 Apr 23;45(7):1292–8. Disponível em: [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)