



**POTENCIAL DE FUNGOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE
OVINOS PARA UTILIZAÇÃO COMO PROBIOTICO**

CLÁUDIO EDUARDO SILVA FREITAS

2018



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**POTENCIAL DE FUNGOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE
OVINOS PARA UTILIZAÇÃO COMO PROBIOTICO**

Autor: Cláudio Eduardo Silva Freitas

Orientador: Prof. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
2018

CLÁUDIO EDUARDO SILVA FREITAS

**POTENCIAL DE FUNGOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE
OVINOS PARA UTILIZAÇÃO COMO PROBIOTICO**

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

Co-orientadores: Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte
Prof. Dr. Herimá Giovanne de Oliveira Silva

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
MARÇO DE 2018

636.085 Freitas, Cláudio Eduardo Silva.

F936f Potencial de fungos do trato digestório de ovinos para utilização como probiótico. / Cláudio Eduardo Silva Freitas. – Itapetinga-BA: UESB, 2017.

79f.

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof^a. D.Sc. Mara Lúcia Albuquerque Pereira e coorientação do Prof. D.Sc. Eduardo Robson Duarte e Prof. D.Sc. Herimá Giovanne de Oliveira Silva.

1. Ovinos – Aditivo microbiano. 2. Forragem - Fermentação. 3. Nutrição de ruminantes – Probióticos - Rúmen. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Zootecnia, *Campus* de Itapetinga. II. Pereira, Mara Lúcia Albuquerque. III. Duarte, Eduardo Robson. IV. Silva, Herimá Giovanne de Oliveira. V. Título.

CDD(21): 636.085

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5^a Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Ovinos – Aditivo microbiano
2. Forragem - Fermentação
3. Nutrição de ruminantes – Probióticos - Rúmen

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Área de Concentração: Produção de Ruminantes

Campus Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "Potencial de fungos do trato digestório de ovinos para utilização como probiótico".

Autor (a): Cláudio Eduardo Silva Freitas

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

Co-orientador (a): Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte

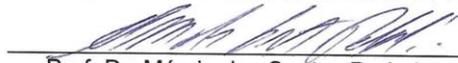
Prof. Dr. Herymá Giovane de Oliveira Silva

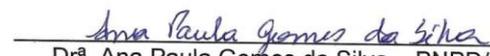
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:


Prof^a. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira – UESB
Orientadora


Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte - UFMG


Prof. Dr. Junio Cota Silva - UFMG


Prof. Dr. Márcio dos Santos Pedreira – UESB


Dr^a. Ana Paula Gomes da Silva – PNP/UESB

Data de realização: 01 de março de 2018.

DEDICO

A toda a minha família, em especial a minha mãe (Laura), meu pai (Beijamim) in memoriam, aos meus irmãos (Alencar, Cláudia, Alexsandro e Carlos), a minha amada esposa (Angélica), aos meus sobrinhos (Sofia, Caio, Alice, David e Miguel) e a minha Avó (Almerinda) in memoriam.

Muito obrigado por me apoiarem nos momentos mais importantes da minha vida.

Que Deus os Abençoe sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por essa vitória e por estar presente em cada momento da minha vida.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela realização dos estudos e pesquisa.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À Fapemig e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais por ceder os laboratórios para a realização dos experimentos.

A todos os professores, pelos ensinamentos proporcionados.

A professora Mara, pela orientação, compreensão, confiança e amizade.

Ao professor Eduardo Robson, pela coorientação, incentivo e amizade.

Ao professor Herimá, pela coorientação e ensinamentos.

À professora Luciana Gerassev, pela colaboração.

A Weiber, pela amizade e ajuda na condução do experimento.

A Aline e Larisse, pela amizade e pela graça de Deus por ter conhecido essas pessoas maravilhosas.

Aos amigos do laboratório que ajudaram na realização dos experimentos, Higor, Fernando, Valdo, André, e Sabrina.

A Minha esposa, Angélica, pela ajuda desde o início das análises laboratoriais, sua ajuda foi importantíssima.

Obrigado, Senhor, por ter colocado no meu caminho pessoas tão maravilhosas!

Muito Obrigado!

“TUDO POSSO NAQUELE QUE ME FORTALECE” (Filipenses 4:13)

BIOGRAFIA

CLÁUDIO EDUARDO SILVA FREITAS, filho de Laura Ribeiro da Silva e Beijamim Silva Freitas, nasceu em 06 de setembro de 1987, em Montes Claros, Minas Gerais. Em março de 2007, iniciou o curso de graduação em **ZOOTECNIA** na Universidade Federal de Minas Gerais, em Montes Claros – MG, finalizando o mesmo em dezembro de 2011.

Em março de 2012, iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia - Mestrado, área de concentração em Produção Animal, na Universidade Estadual de Montes Claros, finalizando o mesmo em fevereiro de 2014.

Em março de 2014, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, área de concentração Produção de Ruminantes, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I – REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
1. Introdução geral	1
1.1 Microbiota ruminal	2
1.2 Qualidade das forragens e degradação ruminal	3
1.3 Fungos anaeróbios facultativos do rúmen	4
1.4 Suplementação com fungos em dietas de ruminantes	6
1.5 Mecanismos de ação dos aditivos microbianos	9
Referências Bibliográficas	11
II – OBJETIVO GERAL	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
III – CAPÍTULO I	17
FUNGOS ANAERÓBIOS FACULTATIVOS DO RÚMEN COMO PRODUTORES DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICAS A PARTIR DE <i>Urochloa decumbens</i>	17
Resumo	17
Abstract.....	18
Introdução	19

Material e métodos.....	21
Resultados e discussão.....	28
Conclusões.....	41
Referências bibliográficas.....	42
IV – CAPÍTULO II.....	47
DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE <i>Urochloa decumbens</i> INOCULADA COM ISOLADOS FÚNGICOS DO TRATO GASTROINTESTINAL DE OVINOS	47
Resumo	47
Abstract.....	48
Experimento 1	49
Introdução	50
Material e métodos.....	51
Resultados e discussão.....	55
Conclusão.....	62
Referências Bibliográficas	63
Experimento 2	66
Introdução	67
Material e métodos.....	69
Resultados e discussão.....	72
Conclusão.....	76
Referências Bibliográficas	77

LISTA DE TABELAS

		Página
Capítulo 1		
Tabela 1.	Composição química do feno de <i>Urochloa decumbens</i> amostrada durante o período de seca.....	24
Tabela 2.	Identificação molecular de fungos micelianos e leveduriformes isolados do rúmen de ovinos criados em pastagens tropicais.....	29
Tabela 3.	Atividade específica para carboximetilcelulase e xilanase produzidas por fungos micelianos e leveduriformes provenientes do trato digestório de ovinos até 96 horas de fermentação <i>in vitro</i> com <i>Urochloa decumbens</i> como substrato.....	30
Tabela 4.	Atividades de carboximetilcelulases e xilanases ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) produzidas por dois fungos micelianos e dois leveduriformes provenientes do trato digestório de ovinos.....	33
Tabela 5.	Unidades de atividade (U/mL) de carboximetilcelulases e xilanases produzidas por dois fungos micelianos e dois leveduriformes provenientes do trato digestório de ovinos.....	35
Tabela 6.	Produção de biomassa fúngica (g) de provenientes do trato digestório de ovinos	38
Tabela 7.	Médias do pH final e variação de pH, no decorrer do processo fermentativo, com pH inicial médio de 5,38 por fungos do trato digestório de ovinos com <i>Urochloa decumbens</i>	40
Capítulo 2		
Tabela 1.	Identificação molecular de fungos micelianos isolados do trato digestório de ovinos criados em pastagens tropicais.....	56

Tabela 2.	Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de <i>Urochloa decumbens</i> inoculada com fungos micelianos provenientes do trato digestório de ovinos.....	58
Tabela 3.	Unidades formadoras de colônias (n ^o /ml) de fungos micelianos durante a digestão <i>in vitro</i> do feno de <i>Urochloa decumbens</i> inoculado ou não com cepas de fungos provenientes do trato digestório de ovinos.....	60
Tabela 4.	Identificação molecular de fungos leveduriformes isolados do trato digestório de ovinos criados em pastagens tropicais.....	73
Tabela 5.	Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de <i>Urochloa decumbens</i> acondicionada em saquinhos (F57-Ankon) ou tecido não tecido (TNT) e inoculada com fungos leveduriformes provenientes do trato digestório (ou do rúmen) de ovinos.....	73
Tabela 6.	Unidades formadoras de colônias (n ^o /ml) durante o processo de fermentação <i>in vitro</i> do feno de <i>Urochloa decumbens</i> inoculado ou não com leveduras do fluido ruminal de ovinos.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Composição da parede celular vegetal.....	03
------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CNF - Carboidratos Não Fibrosos

EE - Extrato Etéreo

FDA - Fibra em Detergente Ácido

FDN - Fibra em Detergente Neutro

MS - Matéria Seca

NRC - National Research Council

PB - Proteína Bruta

pH - Potencial Hidrogênionico

PIDA - Nitrogênio Insolúvel em Detergente Ácido

PIDN - Nitrogênio Insolúvel em Detergente Neutro

TNT - Tecido Não Tecido

Ca – Cálcio

P – Fósforo

K – Potássio

Mg – Magnésio

S – Enxofre

DIVMS - Digestibilidade *in vitro* da matéria seca

DIVFDN - Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro

RESUMO

FREITAS, Cláudio Eduardo Silva. **Potencial de fungos do trato digestório de ovinos para utilização como probiótico** Itapetinga, BA: UESB, 2018. 79p. Tese. (Doutorado em Zootecnia, Área de Concentração em Produção de Ruminantes).*

A ovinocultura é uma importante fonte de renda para a população rural do semiárido brasileiro, porém o longo período de estiagem é um fator limitante para a pecuária, neste contexto surge o interesse de pesquisas que utilizam aditivos microbianos na alimentação de ruminantes. Nesta pesquisa objetivou-se quantificar a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas de fungos anaeróbios facultativos do rúmen e avaliou-se a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) da *Urochloa decumbens*, inoculados com quatro espécies de fungos. Foram selecionados quatro cepas, as cepas foram cultivadas em meio de cultura contendo *Urochloa decumbens* como única fonte de carbono. A atividade celulolítica e xilanolítica foi estimada pela capacidade hidrolítica do extrato enzimático dos fungos cultivados em *Urochloa decumbens* sobre os substratos carboximetilcelulose e xilana. Observou-se que houve interação (fungos x tempos) ($P < 0,001$). A cepa ICA/UFMG LA 005 destacou-se quanto à atividade específica de carboximetilcelulose ($P < 0,001$). As enzimas das cepas ICA/UFMG LT 001 e ICA/UFMG LA 001 foram mais ativas para xilanases ($P < 0,001$). A atividade enzimática para carboximetilcelulase e xilanase difere entre as espécies avaliadas. ICA/UFMG LT 001 e ICA/UFMG LA 005 foram mais ativos para produção de xilanases. ICA/UFMG LA 005 destacou-se quanto a produção das carboximetilcelulases. Porém, a produção enzimática dos leveduriformes não se mostrou expressiva. Para a digestibilidade *in vitro*, a DIVFDN não foi influenciada pela inclusão dos inóculos contendo os fungos. Entretanto, a DIVMS foi maior ($P < 0,05$) quando utilizou-se o fungo ICA/UFMG LT 001 (47,31%) em comparação ao controle (41,94%) indicando potencial promissor para elaboração de probiótico ou aditivo microbiano para ovinos alimentos em pastagem tropical. Em relação DIVMS constatou-se média inferior para levedura ICA/UFMG LR 016 ($P < 0,005$), tanto no saco (F57-Ankon) quanto no TNT. Constatou-se a presença de fungos micelianos e leveduriformes nos cultivos realizados em ambos os períodos de coleta de fluido ruminal para amostras avaliadas no início da fermentação, 24 e 72h a população de ICA/UFMG LT 001 e ICA/UFMG LR 016 foi significativamente maior após a digestão ácida ($P < 0,05$). As cepas ICA/UFMG LT 001 e ICA/UFMG LA 005 apresentam potencial para produção de probiótico para ruminantes alimentados com forragens de baixo valor nutricional.

Palavras-chave: aditivo microbiano, fermentação, forragem, nutrição de ruminantes, probióticos, rúmen.

* Orientadora: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, Dr. UESB e Co-orientadores: Eduardo Robson Duarte, Dr. UFMG e Herymá Giovane de Oliveira Silva, Dr. UESB.

ABSTRACT

FREITAS, Cláudio Eduardo Silva. **Potential of fungi of the digestive tract of sheep for use as probiotic** Itapetinga, BA: UESB, 2018. 79p. Thesis. (Doctor in Animal Science, Area of Concentration in Ruminant Production). *

Sheep breeding is an important source of income for the rural population of the Brazilian semi-arid region, but the long period of drought is a limiting factor for livestock breeding. In this context, the interest of research that uses microbial additives in ruminant feeding appears. The objective of this research was to quantify the cellulolytic and xylanolytic enzymes production of facultative anaerobic rumen fungi and to evaluate the in vitro digestibility of dry matter (IVDMD) and neutral detergent fiber (IVDNDF) of *Urochloa decumbens* inoculated with four species of fungi. Four strains were selected, the strains were cultured in culture medium containing *Urochloa decumbens* as the only carbon source. The cellulolytic and xylanolytic activity was estimated by the hydrolytic capacity of the enzymatic extract of the fungi grown in *Urochloa decumbens* on the substrates carboxymethylcellulose and xylan. It was observed that there was interaction (fungi x times) ($P < 0.001$). Strain ICA/UFMG LA 005 was highlighted for the specific activity of carboxymethylcellulose ($P < 0.001$). Enzymes of strains ICA/UFMG LT 001 and ICA/UFMG LR 016 were more active for xylanases ($P < 0.001$). The enzymatic activity for carboxymethylcellulose and xylanase differs among the species evaluated. ICA/UFMG LR 016 and ICA/UFMG LA 005 were more active for xylanase production. ICA/UFMG LA 005 highlighted the production of carboxymethylcelluloses. However, the enzymatic production of yeasts did not show significant expression. For in vitro digestibility, the IVDNDF was not influenced by the inclusion of the inoculums containing the fungi. However, the IVDMD was higher ($P < 0.05$) when ICA/UFMG LR 016 (47.31%) fungus was used in comparison with the control (41.94%) indicating promising potential for the preparation of probiotic or microbial additive for ovine food in tropical pasture. In relation to IVDMD, lower mean values were found for yeast ICA/UFMG LR 016 ($P < 0.005$), both in the bag (F57-Ankon) and TNT. The presence of mycelial and yeast fungi in the cultures performed in both periods of ruminal fluid collection for samples evaluated at the beginning of the fermentation was verified, 24 and 72h the ICA/UFMG LR 016 and ICA/UFMG LR 016 population was significantly higher after the acid digestion ($P < 0.05$). The strains ICA/UFMG LR 016 and ICA/UFMG LA 005 present potential for probiotic production for ruminates fed with feeds of low nutritional value.

Keywords: fermentation, forage, microbial additive, ruminant nutrition, probiotics, rumen.

* Orientador: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, Dr. UESB e Co-orientadores: Eduardo Robson Duarte, Dr. UFMG e Herymá Giovane de Oliveira Silva, Dr. UESB.

I – REFERENCIAL TEÓRICO

1. Introdução Geral

A habilidade dos microrganismos para degradar polissacarídeos estruturais, como a celulose, é uma característica de grande interesse, tanto na microbiologia industrial quanto na ecologia microbiana do rúmen e do ambiente geral. Em diferentes países, tem se caracterizado a microbiota do trato digestório e registrado a importante participação desses microrganismos na digestão e no equilíbrio do ecossistema e na saúde dos ruminantes (Tarso, 2017).

O interesse em modificar o ecossistema ruminal tem fomentado pesquisas para maximizar a produção animal (Barbosa et al., 2004). Esses estudos têm avaliado a melhora da atividade microbiana ruminal e, conseqüentemente, a eficiência digestiva dos ruminantes (França & Rigo, 2011). Entretanto, os aditivos químicos antimicrobianos têm sido proibidos em muitos países devido à preocupação com a saúde pública, para evitar resíduos em alimentos de origem animal e a seleção de populações antibacterianas.

Os fungos anaeróbios facultativos do rúmen, entre estes as leveduras representam alternativa promissora como aditivo microbiano, pois podem melhorar a eficiência alimentar dos ruminantes, e podem atender as exigências da maioria dos mercados importadores de carne (Abrão et al., 2017; Gattass et al. 2008; Zeoula et al. 2011).

Pesquisa em região semiárida reportou a ocorrência de fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* isolados do trato digestório de cordeiros criados em capim *Panicum maximum* cv. Tanzânia (Freitas et al., 2012). Esses gêneros de fungos apresentaram alta atividade celulolítica e pode crescer em ambientes aeróbicos sob diferentes condições de cultivos (Abrão et al., 2017; Toth et al., 2013; Schuster; Schmoll, 2010).

Em futuros estudos, microrganismos com tais características poderão ser utilizados como probióticos para ruminantes. Essa suplementação poderá reduzir o período de adaptação para digestão de diferentes forragens, reduzindo a perda de peso e aumentando a produtividade desses animais.

1.1 Microbiota ruminal

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

No interior do rúmen, há uma complexa mistura de fragmentos alimentares e de microrganismos. A população microbiana no rúmen geralmente está distribuída da seguinte forma: bactérias ($10^{10} \cdot \text{mL}^{-1}$), protozoários ciliados ($10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$), fungos anaeróbios ($10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$), micoplasmas (indeterminado) e bacteriófagos ($10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$), esses estabelecem entre si diversas interações positivas ou negativas (Kamra, 2005; Ruiz-Lacaz et al., 1992). As populações microbianas podem sofrer flutuações de acordo com as estações do ano e isso pode ser associado aos níveis de ácidos graxos voláteis (AGV's) e amônia (NH_3), disponibilizados no rúmen (Martillotti et al., 1994). Grandes populações de bactérias e fungos têm sido observadas quando altas concentrações de NH_3 e AGV's estão presentes no rúmen. O estabelecimento e a manutenção da estabilidade das populações microbianas no rúmen são dependentes principalmente da dieta, da qualidade da alimentação e da sua frequência de distribuição, bem como das interações microbianas (Dehority, 1998).

Os microrganismos habitantes do rúmen possuem relação de simbiose com o hospedeiro. A microbiota ruminal atua sinergicamente para bioconverter substâncias menos aproveitáveis como a celulose, a hemicelulose e a amônia em compostos utilizáveis pelo ruminante, como os AGV's, os aminoácidos, as vitaminas e outras substâncias necessárias ao crescimento e à produção de carne, leite e lã (Kamra, 2005; Oliveira et al., 2007).

O ecossistema ruminal é considerado estável, por possuir uma população microbiana bem estabelecida, capaz de produzir proteínas de alto valor nutricional a partir de compostos de qualidade inferior. Esse ecossistema também é dinâmico e pode ser fisiologicamente alterado em função da adaptação e da composição da dieta disponibilizada ao animal. A microbiota autóctone do rúmen foi selecionada e adaptada para sobreviver a determinadas flutuações presentes no ambiente ruminal.

Microrganismos incapazes de sobreviver a essas variações são eliminados desse sítio (Kamra, 2005).

1.2 Qualidade das foragens tropicais e degradação ruminal

As foragens são imprescindíveis na dieta dos ruminantes, como fonte de nutrientes e energia no ambiente ruminal. A maior eficiência no aproveitamento da energia dos alimentos fibrosos pelos ruminantes em relação aos monogástricos, resulta das adaptações anatômicas e fisiológicas do trato digestório (Pourazad et al., 2017; Van Soest, 1994).

Intrínsecamente as forageiras tropicais apresentam menor valor nutritivo em comparação as de origem temperada. Entretanto, frequentemente compreendem a única fonte de alimento para os ruminantes nos trópicos o que resulta em baixa produtividade dos ruminantes criados em pastagens em regiões semiáridas (Díaz et al., 2014).

A parede celular das forageiras é uma estrutura complexa, constituída em sua maior parte por fibras (Figura 1), que podem representar fonte de energia para os microrganismos ruminais, e são fundamentais para o funcionamento do rúmen (Alves et al., 2016). As proporções dos componentes na célula vegetal variam de acordo com a espécie vegetal e maturidade da planta (Gibson, 2012).

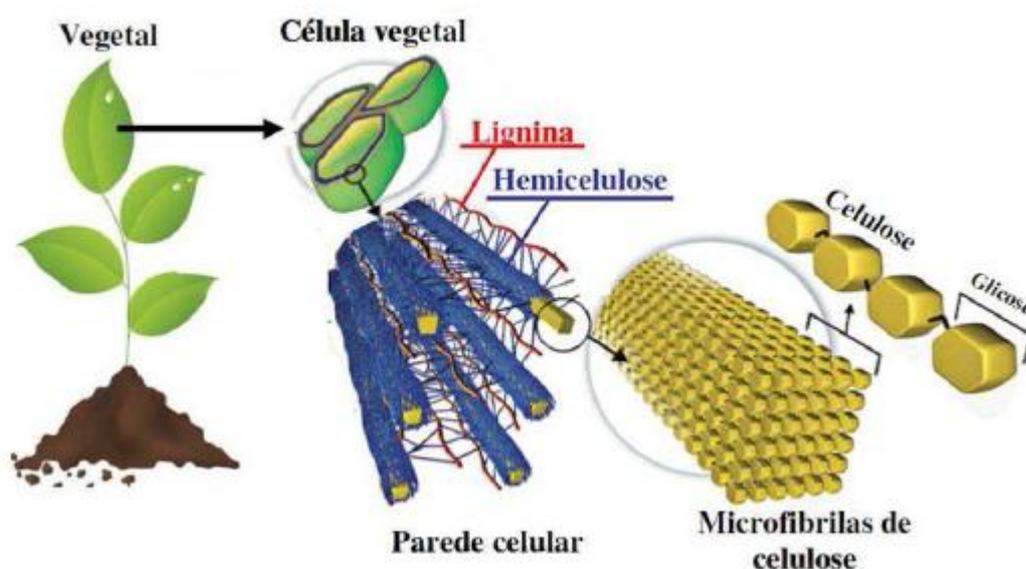


Figura 1: Composição da parede celular vegetal

Fonte: Adaptado de RITTER, 2008

Nos trópicos, a quantidade e a qualidade das foragens varia ao longo do ano. Com a maturidade, as plantas apresentam menor valor nutritivo pelo aumento fisiológico dos teores de lignina na parede celular (Gibson, 2012) e redução da relação folha:caule (Van Soest, 1994).

O aumento do teor de lignina na foragem resulta na redução do consumo de matéria seca e da digestibilidade da fibra (Harper; MCneill, 2015), pois esse polímero forma ligações complexas com outras estruturas da parede celular resultando em menor taxa de digestão e redução na energia alimentar disponível (Raffrenato et al., 2017).

A baixa disponibilidade de nutrientes nas forageiras tropicais reduzem o potencial fermentativo no rúmen que atendem apenas aos requisitos de manutenção da microbiota ruminal (Leng, 1990; Van Soest, 1994). Dessa forma, as características das foragens podem interferir na atividade fibrolítica e na degradação de nutrientes no rúmen. A participação da microbiota ruminal para a fermentação de forageiras de baixa qualidade irá requerer diversos mecanismos envolvendo diferentes grupos microbianos (Li et al., 2014; Malmuthuge; Guan, 2017).

Contudo, maximizar a utilização da fibra pode proporcionar melhores resultados na nutrição de ruminantes. Estratégias de manipulação do ecossistema ruminal são utilizadas para aprimorar a utilização de alimentos de menor qualidade pelos ruminantes, melhorar a produtividade, a saúde e a segurança alimentar (Elghandour et al., 2015; Pérez-Ruchel; Repetto; Cajarville, 2017).

A adição direta de microrganismos ou de enzimas exógenas na dieta de ruminantes proporciona benefícios e modificações ao ecossistema ruminal, melhorando as características fermentativas (Díaz et al., 2014; Elghandour et al., 2015). Todavia, essas estratégias podem variar considerando as características do clima, manejo, características dos alimentos e propósito da produção (Elghandour et al., 2015).

1.3 Fungos anaeróbios facultativos do rúmen

Por não serem estritos do rúmen, os fungos micelianos aeróbios podem ser encontrados em muitos outros ambientes e têm sido utilizados, em processos simples de fermentação de alimentos. Todavia, no último século, tem-se descoberto o potencial biotecnológico desses microrganismos para os mais diversos fins, como a produção de enzimas (Pinto *et al.* 2001), antibióticos, vitaminas, componentes farmacêuticos, fungicidas, reguladores do crescimento de plantas, hormônios e proteínas (Kavanagh,

2005), e são capazes de utilizar o oxigênio ou um componente orgânico como aceptor de elétrons. Essa característica permite a sobrevivência desses fungos sobreviver em distintos ambientes (Midingan et al., 2016).

As propriedades enzimáticas, fisiológicas e metabólicas dos fungos isolados do rúmen indicam que esses microrganismos desenvolvem importante papel na digestão e no ecossistema do trato digestório de ruminantes. Esses são encontrados em amostras provenientes de bovinos, ovinos, caprinos, cervilídeos e equinos. Em ovinos, estão presentes no ambiente ruminal desde as primeiras semanas de vida até a morte dos animais (Fonty; Gouet, 1994).

A degradação enzimática dos polissacarídeos atrai atenção de pesquisadores para aplicações biotecnológicas. Fungos filamentosos têm a capacidade de produzir complexo de enzimas como as celulases e as xilanases. As celulases microbianas são mundialmente estudadas por vários pesquisadores com o objetivo de aumentar a liberação de glicose dos substratos, maximizando a fermentação e produção de etanol (Rembrandt *et al.*, 1997). Genes que codificam as enzimas celulolíticas e xilanolítica foram isolados de fungos do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* (Marui, 2002). Novas linhagens de *Trichoderma reesei* têm sido desenvolvidas e podem constituir uma ferramenta útil para melhorar a atividade ou produção das celulases (Zhang *et al.*, 2010).

Almeida *et al.* (2012) avaliaram a microbiota aeróbica do líquido ruminal de vacas e novilhas holandesas alimentadas com forragem tropical. Não foram observadas diferenças significativas comparando as concentrações de fungos micelianos no líquido ruminal de vacas alimentadas com diferentes volumosos. Populações de leveduras no rúmen de novilhas alimentadas com cana foram maiores em comparação com aqueles que receberam silagem de sorgo. A levedura *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*) foi a mais frequente e entre os fungos micelianos, o gênero *Aspergillus* foi o mais observado, correspondendo a 56 % das amostras. Em estudo anterior, Lund (1974) também isolou *C. Krusei* de 49 amostras de fluido ruminal de vacas leiteiras híbridas, correspondendo à espécie mais frequentemente identificada.

Em uma análise desses microrganismos no fluido ruminal de bovinos zebuínos de corte criados exclusivamente em pastagens tropicais no Brasil, Abrão et al. (2014) observaram maior ocorrência do gênero *Aspergillus* em vacas, bezerros e novilhos, em comparação a outros gêneros. Fungos leveduriformes das espécies *Torulaspota*

globosa, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia kudriavzevii*, *Cryptococcus laurentii* também foram detectados em isolados das três categorias, e apresentam habilidade comprovada em catabolizar grande diversidade de fontes de carbono e nitrogênio (Abrão et al., 2014).

Baseando-se no sequenciamento de fragmentos ITS1 do gene rRNA e características morfológicas de fungos isolados aerobicamente do fluido de vacas, novilhos e bezerros criados em pastagens do gênero *Urochloa* foram identificadas as espécies *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger* nas três categorias e o gênero *Trichoderma* apenas foi identificado em novilhos (Abrão et al., 2014). Os isolados de *Aspergillus* spp. apresentaram elevada produção de avicelase, xilanase, carboximetil celulase e produtos fenoloxidasas, com importante potencial de aplicação biotecnológico e na alimentação animal (Abrão et al., 2017). Adicionalmente, os fungos do gênero *Aspergillus* foram também os mais frequente em animais alimentados apenas com concentrado (Abrão et al., 2015).

Ao avaliar a microbiota ruminal em bovinos leiteiros, Almeida et al. (2014) detectaram a ocorrência de fungos dos gêneros *Aspergillus*; *Gliocladium*; *Paecilomyces*; *Rhizophus* e *Scedosporium* em vacas alimentadas apenas com pastagem de *Urochloa brizanta*, em bezerras alimentados com silagem de sorgo, e bezerras alimentados com cana-de-açúcar (Almeida et al., 2014).

Brewer e Taylor (1969) estudaram a população de fungos isolados aerobicamente do fluido ruminal de ovelhas criadas sob regime extensivo na Inglaterra. Esses pesquisadores constataram a presença de estruturas fúngicas típicas de *Aspergillus fumigatus* e *Sporomia* spp. no suco do rúmen desses animais.

1.4 Suplementação com fungos em dietas de ruminantes

Culturas microbianas vivas dos fungos exógenos *Aspergillus oryzae* e *Saccharomyces cerevisiae* e os seus respectivos extratos têm sido utilizados como suplementos alimentares na dieta dos animais. Aditivos microbianos podem melhorar a produtividade de ruminantes em aproximadamente sete a oito por cento (Martin; Nisbet, 1992; Wallace, 1994).

A ação desses microrganismos no ambiente ruminal associa-se ao aumento da ingestão de matéria seca, sendo proporcionada por uma elevação significativa na taxa de degradação da fibra, especialmente em dietas ricas em concentrado. Há aumento

expressivo no número total de bactérias anaeróbias celulolíticas e as utilizadoras de lactato. Tem sido observada maior estabilidade no ambiente ruminal, reduzindo-se variações de pH, de amônia e de ácidos graxos voláteis ao longo do dia (Wallace, 1994).

Abdelrahman e Hunaiti (2008) relatam que a suplementação com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e com o aminoácido metionina em dietas para cordeiros em crescimento melhora a biodisponibilidade de cobre, zinco e cobalto, reduz a conversão alimentar, e promove aumento no ganho de peso total e ganho de peso médio diário. Outra pesquisa avaliando a suplementação dessa levedura para ovelhas alimentadas com cana-de-açúcar destaca aumento na concentração de AGV, e nenhum efeito sobre a proporção molar de AGV, população de protozoários e digestibilidade (Arcos-García et al., 2000).

Quando vacas leiteiras são mantidas a situações de estresse por calor, a administração da cultura de *Aspergillus oryzae* promove aumento na produção de leite e redução da temperatura retal durante o verão (Huber et al., 1994). De acordo com Caton et al. (1993), a suplementação com extrato de *Aspergillus oryzae* promove aumento no consumo de forragens. Esse fungo aeróbio aumenta a digestibilidade *in vitro* da matéria seca, contudo, não altera as proporções e concentração de AGV's, pH ruminal e amônia total (Caton et al., 1993).

O efeito de um produto contendo *Saccharomyces cerevisiae* foi avaliado em função da colonização microbiana do rúmen de cordeiros recém-nascidos. Foi constatado que o aditivo tende a estimular o crescimento de bactérias celulolíticas. A quantificação desses microrganismos foi superior em cordeiros recebendo suplementação quando comparada ao grupo controle. O estabelecimento de protozoários também ocorreu mais cedo no rúmen de cordeiros recebendo probiótico diariamente. Durante a primeira semana de nascimento os animais passaram a ingerir alimentos sólidos e os parâmetros físico-químicos e fermentativos foram alterados no rúmen de cordeiros que tinham recebido levedura, sugerindo processos de fermentação mais eficientes. Os efeitos foram em parte devido à capacidade de redução do potencial redox no rúmen de cordeiros tratados. Esses resultados representam bons argumentos para indicar que a suplementação com aditivos microbianos possa acelerar a funcionalidade ruminal, ou melhorar a estabilidade microbiana do rúmen em animais jovens (Chaucheyras-Durand; Fonty, 2002).

Em ovelhas, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* não influenciaram na concentração de ácidos graxos voláteis, população de protozoários, N-amoniaco, aminoácidos duodenais e digestibilidade total de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) (Angeles et al., 1998). Segundo Cabrera et al. (2000), o fornecimento dessa levedura não melhora o desempenho de novilhos criados em pastagens tropicais e nem a disponibilidade dos carboidratos fibrosos.

Diferenças de resultados encontrados com a suplementação microbiana no rúmen são atribuídos à utilização de cepas distintas, diferenças nos aditivos comerciais e composição da dieta (Wallace, 1995; Angeles et al., 1998; Arcos-García et al., 2000). Chaucheyras-Durand et al. (2008) referenciam que efeitos de leveduras secas podem variar dependendo de fatores bióticos como a viabilidade da cepa, mas também de fatores abióticos, como a natureza da dieta ou manejo animal.

Os efeitos positivos mais consistentes da atividade de leveduras secas foram reportados sobre a atividade microbiana ruminal em ruminantes jovens, a estabilização do pH ruminal e prevenção de acidose, bem como a estimulação de crescimento e atividade de degradação da fibra por bactérias (Chaucheyras-Durand et al., 2008).

Poucos estudos na literatura avaliaram o efeito da administração de culturas com fungos da microbiota autóctone do rúmen na dieta de ruminantes. A adição de culturas viáveis de *P. communis*, um filtrado de sua cultura ou seu extrato autoclavado aumentou a produção de gás, a digestão da celulose, o número total de bactérias, de bactérias celulolíticas e de fungos anaeróbios. Observou-se o aumento da atividade das enzimas carboximetilcelulase e xilanase, quando comparado com sistemas fermentativos controles não suplementados. A adição de produtos celulares do fungo, presentes nos filtrados e nos extratos autoclavados, demonstrou ser favorável ao crescimento de culturas mistas de microrganismos ruminais (Lee et al., 2000).

A adição direta de *P. communis* no rúmen de ovinos melhorou a digestibilidade de nutrientes e a retenção de nitrogênio, aumentou o número de bactérias e fungos e, conseqüentemente, incrementou a produção de ácidos graxos voláteis. Esse fungo, diferentemente do *Aspergillus oryzae* e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, é anaeróbio e continua sua multiplicação no rúmen após a inoculação (Lee et al., 2000).

A suplementação com *Saccharomyces cerevisiae* ou *Lactobacillus acidophilus* promoveu a morte de cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina *Shiga* durante a

incubação prolongada no conteúdo ruminal (Chaucheyras-Durand et al., 2010). O compartimento do rúmen atua como um reservatório importante de enterobactérias e pode ser um alvo relevante para diminuir o número de células viáveis de *E. coli* e conseqüentemente, contaminação de alimentos (Chaucheyras-Durand et al., 2010).

Em outro estudo, a administração de um produto contendo essa mesma combinação microbiana para bezerros mestiços não interferiu no número de bactérias lácticas, leveduras e coliformes presente rúmen e no intestino. Foi constatado também que a atividade das enzimas carboximetilcelulase, xilanase, β -glicosidase, α -glicosidase, α -amilase, protease, urease e pH ruminal apresentam-se inalterados pós-administração desses microrganismos (Agarwal et al., 2002).

1.5 Mecanismo de ação dos aditivos microbianos

Vários estudos tem respaldado efeitos de anaeróbios facultativos no rúmen na estabilização do pH. De fato, tem sido demonstrado *in vitro* que uma cepa de *S. cerevisiae* foi capaz de reduzir a prevalência de *Streptococcus bovis*, quando concorrem para a utilização de açúcares, o que conseqüentemente limitou a quantidade de lactato produzida por esta espécie bacteriana. Além disso, a estimulação do metabolismo de lactato, e maior crescimento de bactérias, como *Megasphaera elsdenii* ou *Selenomonas ruminantium*, tem sido observado *in vitro* na presença de leveduras (Chaucheyras et al., 1996).

Suplementação com a levedura *S. cerevisiae* tende a aumentar a população de protozoários ruminais, que são conhecidos por engolfarem rapidamente grânulos de amido. Este fator contribui para uma estabilização mais eficiente do pH ruminal (Brossard et al., 2006).

Quando o pH ruminal é baixo, a diversidade microbiana reduz, populações de protozoários sofrem declínio e as bacterianas são alteradas (Martin et al., 2006). Se o pH ruminal continua a cair, os *Lactobacillus* spp. podem substituir a bactéria *S. bovis*, iniciando um acúmulo excessivo de lactato, levando à acidose metabólica (Russell; Hino, 1985). 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.

Fungos anaeróbios do rúmen também podem auxiliar na degradação da fibra vegetal. A germinação de zoósporos de fungos anaeróbios *Neocallimastix frontalis* foi

estimulada por cepas de *S. cerevisiae* (Chaucheyras et al., 1995). *In vitro*, cepas de *S. cerevisiae* incrementaram o crescimento de *Fibrobacter succinogenes* S85 e reduziu a fase lag de crescimento de *Ruminococcus albus* 7, *Ruminococcus flavefaciens* FD1 e *Butyrivibrio fibrisolvens* D1 (Girard; Dawson, 1995). Os efeitos benéficos sobre a digestão da fibra pode ser em parte responsável pelo aumento no consumo de MS, frequentemente observado com a administração microbiana na dieta (Jouany, 2006).

Um dos principais fatores implicados no efeito benéfico da degradação de fibra por bactérias é a capacidade das células leveduriformes consumirem o oxigênio que chega no ambiente ruminal, otimizando as condições de anaerobiose para as bactérias celulolíticas (Chaucheyras-Durand et al., 2008). Estudos relataram que o potencial redox de líquido ruminal foi menor na presença de leveduras em dietas de cordeiros (Chaucheyras-Durand; Fonty, 2002).

Alterações no metabolismo de nitrogênio por microrganismos ruminais na presença de leveduras tem sido registrados. Achados *in vitro* indicaram que uma cepa de *S. cerevisiae* reduziu o crescimento e a atividade de bactérias proteolíticas no rúmen, limitando a ação bacteriana sobre proteínas e peptídeos (Chaucheyras-Durand et al., 2005). Outro estudo evidenciou a redução na concentração de amônia com administração dessa levedura (Chaucheyras-Durand; Fonty, 2002).

Dutta et al. (2009) em um revisão bibliográfica reporta como efeitos da suplementação de leveduras na fermentação ruminal a estabilização da fermentação e do pH ruminal, a alteração na produção de ácidos graxos voláteis, a redução na concentração de amônia, o aumento na concentração de bactérias anaeróbias, bactérias celulolíticas, leveduras e síntese de proteína microbiana, a redução na produção de metano, o decréscimo na concentração de ácido láctico. Descreveu também que ocorre alteração no padrão digestivo com redução na concentração de açúcares solúveis, aumento na concentração de etanol, aumento do propionato e redução do acetato.

Referências Bibliográficas

ABDELRAHMAN, M. M.; HUNAITI, D. A. The effect of dietary yeast and protected methionine on performance and trace minerals status of growing Awassi lambs. **Livestock Science**, v. 115, p. 235–241, 2008.

ABRÃO, F. O.; DUARTE, E.R., PESSOA, M.S. DOS SANTOS, V.L., FREITAS JÚNIOR, L.F., BARROS, K.O., HUGHES A.F.S., SILVA, T.D., RODRIGUEZ, N.M. 2017. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. **Plos ONE**, 12, 1-13.

ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; FREITAS, C. E. S.; VIEIRA, E. A.; GERASEEV, L. C.; SILVA-HUGHES, A. F.; ROSA, C. A.; RODRIGUES, N. M. Characterization of Fungi from Ruminant Fluid of Beef Cattle with Different Ages and Raised in Tropical Lignified Pastures. **Current Microbiology**, v. 69, p. 649-59, 2014.

ABRÃO, F.O; et al. Caracterização físico-química e microbiológica e população de fungos no conteúdo ruminal de novilhos de corte hípidos ou com acidose ruminal. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37. p. 7-14, 2015.

ALMEIDA, P. N. M.; FREITAS, C. E. S.; ABRÃO, F. O.; RIBEIRO, I. C. O.; VIEIRA, E. A.; GERSEEV, L. C.; DUARTE, E. R. Atividade celulolítica de fungos aeróbios isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. **Revista Caatinga**, v. 27, p. 202-207, 2014.

ALVES, A. R. et al. Fibra para ruminantes: Aspecto nutricional, metodológico e funcional. **PUBVET**, v. 10, n. 7, p. 568-579, 2016.

AGARWAL, N.; KAMRA, D. N.; CHAUDHARY, L. C.; AGARWAL, I.; SAHOO, A.; PATHAK, N. N. Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 329–336, 2002.

ANGELES, S. C.; MENDOZA, G. D.; COBOS, M. A.; CROSBY, M. M.; CASTREJÓN, F. A. Comparison of two commercial yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal fermentation and digestion in sheep fed on corn-stover diet. **Small Ruminant Research**, v. 31, p. 45-50, 1998.

ARCOS-GARCÍA, J. L.; CASTREJÓN, F. A.; MENDOZA, G. D.; PÉREZ-GAVILÁN, E. P. Effect of two commercial yeast cultures with *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. **Livestock Production Science**, v. 63, p. 153–157, 2000.

BARBOSA, F.A; FARIA,G.A; VILELA,H. Leveduras vivas na nutrição de bovinos. **Bioscience Journal**, v.20, n.1, p.143-150, 2004.

BREWER, D.; TAYLOR, A. *Aspergillus Fumigatus* and *Sporormia Minima* Isolated from the Rumen of Sheep. **Journal of General Microbiology**, London, v. 59, p. 137-139, 1969.

BROSSARD, L.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; THE LATE MICHALET-DOREAU, B.; MARTIN, C. Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: newtype of interaction. **Animal Science**, v. 82, p. 1- 8, 2006.

CABRERA, E. J. I.; MENDOZA, M. G. D.; ARANDA, I. E.; GARCIA-BOJALIL, C.; BÁRCENA, G. R.; RAMOS, J. J. A. *Saccharomyces cerevisiae* and nitrogenous supplementation in growing steers grazing tropical pastures. **Animal Feed Science and Technology**, v. 83, p. 49-55, 2000.

CATON, J. S.; ERICKSON, D. O.; CAREY, D. A.; ULMER, D. L. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on forage intake, site of digestion, in situ degradability, and duodenal amino acid flow in steers grazing cool-season pasture. **Journal Animal Science**, v. 71, p. 779-787, 1993.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; FAQIR, F.; AMEILBONNE, A.; ROZAND, C.; MARTIN, C. Fates of acid-resistant and non-acid-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli* Strains in ruminant digestive contents in the absence and presence of probiotics. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, p. 640–647, 2010.

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. **Microbial Ecology in Health and Disease**, p. 30- 36, 2002.

CHAUCHEYRAS, F., FONTY, G., BERTIN, G., GOUET, P. Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on zoospore germination, growth, and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* MCH3. **Current Microbiology**, v. 31, p. 201–205, 1995.

CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G.; BERTIN, G.; SALMON, J. M.; GOUET, P. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. **Canadian Journal Microbiology**, v. 42, p. 927–933, 1996.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; MASSEGLIA, S.; FONTY, G. Effect of the microbial feed additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 on protein and peptide degrading activities of rumen bacteria grown in vitro. **Current Microbiology**, v. 50, p. 96–101, 2005.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; WALKER, N. D.; BACH, A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 5–26, 2008.

DEHORITY, B. A. Microbial Interactions in the Rumen. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 15, p. 69-86, 1998.

DÍAZ, A. et al. Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: effects on chemical composition and in vitro rumen fermentation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, p. 345-355, 2014.

DUTTA, T. K.; KUNDU, S. S.; KUMAR, M. Potential of direct-fed-microbials on lactation performance in ruminants - a critical review. **Livestock Research for Rural Development**, v. 21, 2009.

ELGHANDOUR, M. M. Y. et al. Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 3, p. 526-533, 2015.

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

FRANÇA, R.A; RIGO, E.J. Utilização de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) na nutrição de ruminantes – uma revisão. **FAZU em Revista**. Uberaba, n. 8, p. 187-195, 2011.

FREITAS, C.E.S.; ABRÃO, F.O.; SILVA, K.L.; ALMEIDA, P.N.M.; DUARTE, E.R. Fungos aeróbios no intestino grosso de borregos e de ovelhas criados em pastagens tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, p.225-227, 2012.

GATTASS, C.B.A. et al. Consumo, digestibilidade aparente e ganho de peso em bovinos de corte confinados e suplementados com cultura de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026). **Ciência Animal Brasileira**. v. 9, n. 3, p. 535-542, 2008.

GIBSON, L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 9, p. 2749-2766, 2012.

GIRARD, I. D.; DAWSON, K. A. Effect of a yeast culture on growth characteristics of representative ruminal bacteria. **Journal Animal Science**, v. 73, p. 264, 1995.

HARPER, K. J.; MCNEILL, D. M. The Role of iNDF in the Regulation of Feed Intake and the Importance of Its Assessment in Subtropical Ruminant Systems (the Role of iNDF in the Regulation of Forage Intake). **Agriculture**, v. 5, p. 778-790, 2015.

HUBER, J. T.; HIGGINBOTHAM, G.; GOMEZ-ALARCON, R. A.; TAYLOR, R. B.; CHEN, K. H.; CHAN, S. C.; WU, Z. Heat stress interactions with protein, supplemental fat, and fungal cultures. **Journal Dairy Science**, v. 77, p. 2080–2090, 1994.

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

KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. Chichester: John Wiley And Sons Editors, 2005. 267 p.

LEE S. S.; HA, J. K.; CHENG, K. J. Influence of an anaerobic fungal culture administration on in vivo ruminal fermentation and nutrient digestion. **Animal Feed Science and Technology**, v. 88, p. 201-217, 2000.

LENG, R. A. Factors Affecting the Utilization of “Poor-Quality” Forages by ruminants Particularly under Tropical Conditions. **Nutrition Research Reviews**, v. 3, p. 277-303, 1990

LI, J.; HEATH, I. B.; PACKER, L. The phylogenetic relationships of the anaerobic chytridiomycetous gut fungi (*Neocallimasticaceae*) and the *Chytridiomycota*. II. Cladistic analysis of structural data and description of Neocallimasticales ord. nov. **Canadian Journal of Botany**, v. 71, p. 393-407, 1993.

LI, F. et al. Subacute ruminal acidosis challenge changed in situ degradability of feedstuffs in dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 5101-5109, 2014.

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

MALMUTHUGE, N.; GUAN, L. L. Understanding host-microbial interactions in rumen: searching the best opportunity for microbiota manipulation. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, p. 1-8, 2017.

MARTILLOTTI, F. et al. Microbial and Chemical Characterization of Rumen Contents of Grazing Dairy Cows. In: PRINS, R. A.; STEWART, C. S. (Ed.). **Micro-organisms in Ruminant Nutrition**. Dalfsen: Nottingham University Press, 1994.

MARTIN, C.; BROSSARD, L.; DOREAU, M. Mécanismes d'apparition de l'acidose ruminale latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. **INRA Productions Animales**, v. 19, p. 93–108, 2006.

MARUI, J. *et al.* Transcriptional activator, AoXlnR, Mediates Cellulose-Inductive Expression of the Xylanolytic and Cellulolytic Genes in *Aspergillus Oryzae*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 528, p. 279-282, 2002.

MICKDAM, E. et al. Rumen microbial abundance and fermentation profile during severe subacute ruminal acidosis and its modulation by plant derived alkaloids in vitro. **Anaerobe**, v. 39, p. 4-13, 2016.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista eletrônica de Veterinaria (REDVET)**, v. 8, 2007.

PÉREZ-RUCHEL, A.; REPETTO, J. L.; CAJARVILLE, C. Supplementing high quality fresh forage to growing lambs fed a total mixed ration diet led to higher intake without altering nutrient utilization. **Animal**, v. 11, n. 12, p. 2175-2183, 2017.

PINTO, G. A. S. *et al.* Selection of Tannase-Producing *Aspergillus Niger* Strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 24-26, 2001.

POURAZAD, P. et al. Restoration of in situ fiber degradation and the role of fibrolytic microbes and ruminal pH in cows fed grain-rich diets transiently or continuously. **Animal**, v. 11, n. 12, p. 2193-2202, 2017.

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

REMBRANDT, D.; BAHNSING, D. C. P.; CAMP, H. J. M. O.; DRIFT, C. V.; VOGELS, G. Degradation of structural polysaccharides by the plant cell-wall degrading enzyme system from anaerobic fungi. **Enzyme Microbial Technology**, v. 21, p. 130-136, 1997.

RUIZ-LACAZ, R., et al. Microbiologia do rúmen e do biodigestor. In: RUIZ-LACAZ, R. **Microbiologia zootécnica**. São Paulo: Roca, p. 123-167, 1992.

RUSSELL, J. B.; HINO, T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiraling effect that contributes to rumen acidosis. **Journal Dairy Science**, v. 68, p. 1712-1721, 1985.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 787-799, 2010.

TARSO, S. G. S. The rúmen as a health thermometer: Importance of ruminal function to the metabolic balance in ruminants. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 5, p. 1-3, 2017.

TRINCI, A. P. J. et al. Anaerobic Fungi: Their Distribution and Life Cycle. In: PRINS, R.A.; STEWART, C.S. (Ed.). **Micro-organisms in Ruminant Nutrition**. Dalfsen: Nottingham University Press, 1994.

TOTH, K. et al. Diversity in Production of Xylan-Degrading Enzymes among Species Belonging to the *Trichoderma Section Longibrachiatum*. **Bioenergy Research**, v. 6, p. 631-643, 2013.

VAN SOEST, P.J. Nutritional Ecology of the Ruminant. **Cornell University**, 2nd Edition, 1994.

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

WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. Microbial feed additives for ruminants. In: **Probiotics: Prospects of Use in Opportunistic Infections**. Editado por FULLER, R.; HEIDT, P.; RUSCH, V.; VAN DER WAIJ, D. Germany: Institute for Microbiology and Biochemistry, p. 101-125, 1995.

ZEOULA, L.M. et al. Levedura ou monensina na dieta de bovinos e bubalinos sobre a fermentação ruminal e eficiência microbiana. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, n. 4, p. 379-386, 2011.

ZHANG, J. et al. Development of the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* strain with enhanced β -glucosidase and filter paper activity using strong artificial cellobiohydrolase 1 promoter. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9815-9818, 2010.

II – OBJETIVO GERAL

Objetivou-se avaliar o potencial probiótico de isolados fúngicos provenientes do trato gastrointestinal de ovinos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar por biologia molecular isolados fúngicos do trato digestório de ovinos.
2. Avaliar a atividade celulolítica e xilanolítica de *Aspergillus terreus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Pichia kudriavzevii* e *Rhodotorula mucilaginosa* isolados de ovinos utilizando a *U. decumbens*.
3. Determinar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro do feno de *U. decumbens* com inoculação de fungos.
4. Determinar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro do feno de *U. decumbens* com inoculação de fungos comparando tipo de sacos de fermentação.

III – CAPÍTULO I

FUNGOS ANAERÓBIOS FACULTATIVOS DO RÚMEN COMO PRODUTORES DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICAS A PARTIR DE *Urochloa decumbens*

Resumo – Fungos anaeróbios facultativos do rúmen têm demonstrado capacidade significativa em hidrolisar materiais lignocelulósicos promovendo a produção de açúcares fermentescíveis, neste contexto surge o interesse de pesquisas que utilizam alimentos com elevado teor de lignina na alimentação de ruminantes. Objetivou-se quantificar a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas de fungos anaeróbios facultativos do rúmen. Avaliou-se o efeito da fermentação em incubadora de CO₂ nos tempos de 24, 48, 72 e 96h. Foram selecionados dois fungos filamentosos e dois leveduriformes, que foram cultivados em meio de cultura contendo *Urochloa decumbens* como única fonte de carbono. A atividade celulolítica e xilanolítica foi estimada pela capacidade hidrolítica do extrato enzimático dos fungos cultivados em *U. decumbens* sobre os substratos carboximetilcelulose e xilana. Observou-se que houve interação (fungos x tempos) (P<0,001). A cepa ICA/UFMG LA 005 destacou-se quanto à atividade específica de carboximetilcelulase, quando se considera a unidade de atividade de celulase por mg de proteína total (P<0,001). As enzimas da cepa ICA/UFMG LA 005 e cepa ICA/UFMG LT 001 foram mais ativas para xilanases, capazes de converter o substrato em produto de forma mais rápida e eficiente (P<0,001). A atividade enzimática para carboximetilcelulase e xilanase difere entre as espécies avaliadas. Não houve interação entre (fungos x enzimas) para produção de biomassa fúngica (g) (P<0,001). ICA/UFMG LT 001 e ICA/UFMG LA 005 foram mais ativos para produção de xilanases. ICA/UFMG LA 005 destacou-se quanto a produção das carboximetilcelulases. Porém, a produção enzimática dos leveduriformes não se mostrou expressiva. A produção de xilanase por ICA/UFMG LT 001 e de CMCase e xilanase de ICA/UFMG LA 005 e suas aplicações na hidrólise de material lignocelulósico são promissoras para elaboração de probiótico ou aditivo microbiano.

Palavras-chave: celulases, fungos, *Urochloa*, xilanases.

IV - CHAPTER I

**RUMEN FACULTATIVE ANAEROBIC FUNGI AS PRODUCERS
OF CELLULITHIC AND XYLANOLYTIC ENZYMES FROM**

Urochloa decumbens

Abstract – The objective of this study was to quantify the production of cellulolytic and xylanolytic enzymes of facultative anaerobic fungi of the rumen. The effect of fermentation in a CO₂ incubator at 24, 48, 72 and 96 hours was evaluated. Two filamentous and two yeast fungi were selected, the fungi were grown in culture medium containing *Urochloa decumbens* as the only carbon source. The cellulolytic and xylanolytic activity was estimated by the hydrolytic capacity of the enzymatic extract of fungi grown in *U. decumbens* on the substrates carboxymethylcellulose and xylan. It was observed that there was interaction (fungi x times) (P<0.001). The fungus ICA/UFMG LA 005 was highlighted for the specific activity of carboxymethylcellulase, when the unit of cellulase activity per mg of total protein (P<0.001) was considered. The enzymes of the fungi ICA/UFMG LA 005 and ICA/UFMG LT 001 were more active for xylanases, capable of converting the substrate into product more quickly and efficiently (P<0.001). The enzymatic activity for carboxymethylcellulose and xylanase differs between the evaluated specimens. There was no interaction between (fungi x enzymes) for the production of fungal biomass (g) (P<0.001). ICA/UFMG LT 001 and ICA/UFMG LA 005 were more active for xylanase production. ICA/UFMG LA 005 was noted for the production of the carboxymethylcellulases. However, the enzymatic production of yeasts did not show significant expression.

Keywords: cellulases, fungi, *Urochloa*, xylanases.

Introdução

As foragens são imprescindíveis na dieta dos ruminantes, como fonte de nutrientes e energia no ambiente ruminal. Intrinsecamente as forageiras tropicais apresentam menor valor nutritivo em comparação às de origem temperada. Entretanto, frequentemente compreendem a única fonte de alimento para os ruminantes nos trópicos o que resulta em baixa produtividade dos ruminantes criados em pastagens em regiões semiáridas (Díaz et al., 2014). Portanto, alternativas para melhorar a eficiência econômica e produtiva dos ruminantes em condições tropicais devem ser avaliadas (Abdelrahman et al., 2016).

Estudos relatam que a utilização de fungos e suas enzimas como aditivos na dieta dos ruminantes podem estimular o consumo de matéria seca e favorecer a utilização de dietas contendo altos teores de fibras, bem como aprimorar o desempenho e melhorar a rentabilidade na criação desses animais (Abdelrahman et al., 2016; López-Aguirre et al., 2016; Mohamed et al., 2013; Vallejo et al., 2016).

Sabe-se também que, além da população de fungos anaeróbios estritos são encontrados fungos anaeróbios facultativos no ambiente ruminal (Abrão et al., 2017). Os fungos anaeróbios facultativos do rúmen podem assumir importância fundamental na degradação das foragens tropicais, pois produzem enzimas com atividade para degradar celulose (Almeida et al., 2014; Abrão et al., 2017). Estudo prévio promovido por Freitas et al. (2012) apontou ocorrência dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* isolados do trato digestório de cordeiros criados em capim *Panicum maximum* cv. Tanzânia que poderiam representar candidatos para a elaboração de aditivos microbianos ou probióticos.

Pesquisas utilizando o fungo *A. Niger* Cunha et al. (2012) e *A. Flavus* Gomatchi et al. (2012) para produção de CMCase e xilanase utilizando material lignocelulósico como fonte de carbono indicam que esses fungos produzem enzimas para degradar a parede celular vegetal. Fungos do gênero *Trichoderma* também expressão genes de CMCase e xilanases enzimas importantes na degradação de estruturas complexas constituintes dos alimentos (Li et al., 2016; Basso et al., 2010)

A atividade metabólica microbiana e a produção de enzimas são alteradas por fatores ambientais, como pH, tempo de cultivo, temperatura de incubação, concentração

do inóculo e principalmente pelo substrato utilizado (Fadel, 2000). A escolha do substrato deve ser apropriada para o sucesso na produção de celulases e xilanases, pois este não somente serve como fonte de carbono e energia, mas também provê os compostos de indução necessários para o organismo produzir as enzimas (Haltrich et al., 1996).

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a atividade celulolítica e xilanolítica em cultivo anaeróbico *in vitro* de fungos anaeróbios facultativos isolados do trato digestório de ovinos criados em pastagens tropicais utilizando *Urochloa decumbens* como substrato.

Material e métodos

Isolados fúngicos avaliados e Identificação molecular

Os fungos *Trichoderma sp.* (B13 M2) isolado das fezes, *Aspergillus sp.* (O45 M1), *Pichia sp.* (O151) e *Rhodotorula sp.* (O166), foram isolados do trato digestório de ovinos mestiços Santa Inês. Esses animais foram criados em pastagens de *Panicum maximum* cv. Tanzânia ou feno de *Cynodon dactylon* cv. Vaqueiro e isolados durante o período seco do ano, em uma propriedade no município de Francisco Sá e na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Montes Claros, localizada no município de Janaúba, Norte do Estado de Minas Gerais (Freitas et al., 2012; Freitas et al., 2017). Essas regiões localizam-se respectivamente a 16° 28' 33" e 15° 49' 53" de latitude e 43° 29' 16" e 43° 16' 20" de longitude e apresentam clima tropical úmido com verão seco (As) e de acordo com a classificação de Köppen (Alvares et al., 2014), é marcada por longa estação seca de maio a setembro e período chuvoso em janeiro e fevereiro. Esses municípios estão inseridos no Norte do Estado de Minas Gerais, dentro da região conhecida como "Polígono da Seca".

Isolados avaliados

Neste estudo foram avaliados dois isolados leveduriformes provenientes do rúmen de ovinos alimentados com feno de *Cynodon dactylon* cv. Vaqueiro no norte de Minas Gerais, Brasil, durante a estação seca (Freitas et al., 2017). Essas leveduras foram cultivadas em caldo Sabouraud e armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

Para identificação dos isolados procedeu-se a análise das sequências dos domínios D1 e D2 do gene 26S do RNA ribossomal, amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração do DNA total foi realizada de acordo com Hoffman e Winston (1987) e os iniciadores NL1 (5'-GCA TAT CAA AAG GAA GAG TAA GCC-3') e NL4 (5'-GGT AAG CTT CGC TGT CCG G-3') foram usados para a amplificação da região do DNAr como descrito por Burgaud et al. (2013), com modificações. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada numa solução contendo 2,0 µL de DNA (aproximadamente 100 ng); 2,0 µL de cada iniciador, NL1 e NL4 a 10 µmol-1; 5,0 µL tampão PCR 5X; 2,0 µL de MgCl₂, 25 mM; 1,5 µL de dNTP, 10 mM; e 0,3 µL de polimerase Taq DNA; com água ultrapura esterilizada para um volume final de 50 µL. O protocolo consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C

durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 54°C, e 2 minutos de extensão a 72°C e uma extensão final de 2 min a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (0,5 ug ml⁻¹), em tampão TBE 1X, sob voltagem de 70V por aproximadamente 1 hora.

Os géis foram, visualizado sob luz UV e fotografados pelo equipamento ProteinSimple, Alphamager HP system. Os *amplicons* produzidos foram purificados com utilização de EDTA e etanol absoluto quantificados em NanodropTM 1000 a 260 e 280 nm. As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas e comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa Blast N (Altschul et al. 1997). Para ser considerado pertencente a uma determinada espécie, o isolado teria que apresentar similaridade de 97% a outra já depositada no GenBank (Stackebrandt e Goebel, 1994).

Os fungos filamentosos foram cultivados durante sete dias em ágar Sabouraud, e a extração de DNA foi conduzida de acordo com Rosa et al. (2009). O material extraído foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR). Os iniciadores utilizados para a amplificação da região ITS de rDNA foram ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), conforme descrito por White et al. (1990). O produto foi quantificado em NanoDrop 1000ND (NanoDrop Technologies) e ajustado para 100 ng µl⁻¹ para ser utilizado em reações de sequenciação.

As reações de sequenciação foram realizadas em DYEnamicTM (Amersham Biosciences, EUA) utilizando o sistema de sequenciação automatizado MegaBACETM 1000 no Genome Analysis Center e Gene Expression of UFMG. As sequências de DNA obtidas foram analisadas utilizando BLASTn v. 2.2.15 de BLAST 2.0, disponível no sítio eletrônico do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul et al., 1997). Considerou-se como essa espécie o isolado com similaridade de 99% ou mais às sequências depositadas no GenBank.

Material avaliado

O feno de *Urochloa decumbens* foi adquirido durante o período de seca (março a outubro) em uma fazenda localizada na região de Montes Claros, Norte de Minas Gerais. Foram realizadas análises em duplicatas, para determinação da matéria seca

(MS), cinzas; fibra em detergente neutro (FDN); fibra em detergente ácido (FDA); proteína bruta (PB); extrato etéreo (EE); lignina; cálcio (Ca); fósforo (P); potássio (K); magnésio (Mg); enxofre (S); açúcares (carboidratos solúveis em etanol); proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN); proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA), Celulose (Cel) e Hemicelulose (Hem); (Método Combs – Goeser) e CNF (Near Infrared Spectroscopy - NIRS) (Tabela 1) (AOAC, 2010).

Tabela 1. Composição química do feno de *Urochloa decumbens* amostrada durante o período de seca

Constituintes	<i>Urochloa decumbens</i> (g. 100 g ⁻¹)
Matéria seca	95,38
Proteína Bruta	3,06
PIDN	21,57
PIDA	20,59
FDN	82,26
FDA	53,04
Lignina	7,50
Açúcares Totais	3,02
EE	1,02
Cinzas	5,89
Ca	0,14
P	0,10
K	0,58
Mg	0,20
S	0,06
Celulose	45,54
Hemicelulose	29,22
CNF	8,43

MS=Matéria Seca; PIDN=Proteína insolúvel em detergente neutro; PIDA= Proteína insolúvel em detergente ácido; FDN=Fibra em detergente neutro; FDA=Fibra em detergente ácido; EE=Extrato etéreo; Ca=Cálcio; P=Fósforo; K=Potássio; Mg=Magnésio; S=Enxofre; CNF=Carboidratos não fibrosos.

Fermentação

Os ensaios *in vitro* de fermentação e de atividade enzimática foram realizados no laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, BA.

Os fungos selecionados *Trichoderma sp.* (B13 M2), *Aspergillus sp.* (O45 M1), *Pichia sp.* (O151) e *Rhodotorula sp.*(O166), foram crescidos em meio ágar-batata-

dextrose (Acumedia, Lansing, Michigan) acrescido de cloranfenicol (150 mg/L) por até sete dias a 37°C. A cultura esporulada dos fungos micelianos e células leveduriformes foram suspensas em solução de Tween 80 a 0,01%, onde foi efetuada a contagem do número de esporos ou células em suspensão utilizando câmara de Neubauer com auxílio do microscópio binocular. Após esse período, cada isolado foi reinoculado em meio (C).

A fermentação ocorreu em Erlenmeyers com 50 mL de meio líquido (meio C) contendo 0,5% de sulfato de amônio, 0,1% de fosfato monobásico de potássio, 0,05% sulfato de magnésio heptahidratado e 1% da fonte de carbono (feno de *Urochloa decumbens*) adicionado dos inóculos contendo aproximadamente 10^7 UFC/mL, o feno foi moído em moinho tipo Willey e padronizado a 1mm de diâmetro.

As fermentações submersas foram conduzidas a 39°C em incubadora de CO₂, com o tempo fermentativo de 24, 48, 72 e 96 horas. Aferiu-se o pH do meio previamente e posteriormente à incubação com auxílio de um potenciômetro digital. Após o processo fermentativo o extrato enzimático foi recolhido e centrifugado a 11.000 g durante 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzimas microbianas.

Determinou-se a biomassa fúngica baseada em peso seco, que foi obtida após o processo de filtração em tamiz do caldo de cultivo (extrato enzimático) e lavagem em água corrente, seguidos de secagem em estufa de circulação (modelo TE-394/3, Tecnal, São Paulo, Brasil) durante quatro dias a 55°C até apresentarem peso constante. Para o peso seco das leveduras, após a obtenção do extrato enzimático com centrifugação a 11.000 rpm, foi desprezada a fase líquida, e as leveduras foram transferidas para cadinhos e seguidos de secagem em estufa de circulação (modelo TE-394/3, Tecnal, São Paulo, Brasil) durante quatro dias a 55°C até apresentarem peso constante.

Determinação de atividades enzimáticas

A carboximetilcelulase (CMCase) foi determinada de acordo com a metodologia adaptada de Ghose (1987). Uma solução de carboximetilcelulose 1% (m/v) (Vetec, Brasil, São Paulo) foi utilizada como substrato na dosagem de CMCase. Foram adicionados em tubos de ensaio 0,5 mL de solução de substrato de carboximetilcelulose 1% (m/v), 0,5 mL de extrato enzimático e 1,0 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M;

pH 6,8). A reação foi incubada a 39°C durante 60 minutos e a quantificação de açúcares redutores foi estimada conforme a metodologia adaptada de Miller (1959).

Para medir a atividade da xilanase, foi preparada uma mistura contendo 1 mL de tampão fosfato (0,1M; pH 6,8), 0,5 mL do sobrenadante e 0,5 mL de xilana (D-Xilana, Vetec, Brasil, São Paulo) (0,25%). A reação foi incubada por 15 minutos, a 39°C minutos e a quantificação de açúcares redutores foi estimada conforme a metodologia adaptada de Miller (1959).

Todas as amostras foram testadas em triplicata e 1 mL das misturas foram retiradas para determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART) e colocados em tubos de ensaios juntamente com 1 mL de DNS. Os tubos foram agitados e aquecidos em banho Maria a 96°C por cinco minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados em banho de gelo por cinco minutos, adicionando em seguida 16 mL de tartarato duplo de potássio e sódio. Os brancos de cada leitura foram realizados com os extratos enzimáticos avaliados sem a adição dos respectivos carboidratos a serem degradados. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Shimatzu, UV-VIS – Mini) a 540 nm, após o aparelho ter sido zerado com água destilada, as concentrações de glicose foram expressas em g/L. Uma unidade de atividade ou produtividade de celulase e xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um micromol (1 µmol) de glicose ou xilose mililitro por minuto (U/mL), sob as condições descritas (Miller, 1959; Ghose, 1987). Os cálculos de produtividade foram realizados por meio da fórmula:

$$U = Abs_{média} \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{V_i} \times 10^3 \times V_f$$

Em que:

U = Unidade de atividade

Abs = absorbância

ϵ = absortividade da glicose ou xilose: a x M (a = coeficiente obtido da reta padrão da glicose e xilose, M = massa molecular da glicose ou xilose)

t = tempo de reação

10^3 = transformação de mg para µg

V_i = volume de extrato enzimático

V_f = volume final da reação.

Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada empregando-se o método de Bradford, onde foram adicionados 1 mL do reagente de Bradford (Amresco®, Ohio - EUA) e 100 µL de extrato enzimático em tubos de ensaio, a reação foi processada por dois minutos em temperatura de 25°C, uma curva analítica de albumina sérica foi construída adotando-se as seguintes concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 µg/mL para determinar a concentração da amostra. Após a reação, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimatzu UV-VIS Mini) em comprimento de onda de 595 nm e as quantificações foram expressas em µg/mL (Bradford, 1976).

Análise estatística

O experimento foi conduzido com delineamento experimental inteiramente casualizado em fatorial (4 x 2 x 4), com os seguintes fatores: quatro fungos, duas enzimas e quatro tempos de fermentação com três repetições, em que cada tratamento foi constituído por uma cepa fúngica. Os dados foram submetidos à análise de variância e as interações não significativas foram retiradas do modelo estatístico adotando-se nível de significância $0,05 < P < 0,10$, com o Mixed Procedure no Software SAS (SAS, INSTITUTE, 2000). As médias para os fatores qualitativos foram comparadas pelo teste de Tukey e foi utilizado contraste polinomial para o tempo, adotando-se nível de 5% de probabilidade para o erro Tipo I. Foi realizada análise de regressão utilizando o PROC GLM do SAS para as variáveis em função do tempo de incubação que apresentaram efeito significativo para os componentes Linear, Quadrático ou Cúbico dos contrastes polinomiais. Os dados foram processados no Software SAS (SAS INSTITUTE, 2000).

Resultados e discussão

Identificação dos microrganismos avaliados

Nesta pesquisa, a análise das sequências da região ITS e D1 identificou *Aspergillus terreus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Pichia kudriavzevii* e *Rhodotorula mucilaginosa* (Tabela 2). Essas espécies também têm sido detectadas no fluido ruminal de ruminantes alimentados com forragens tropicais. Em estudo realizado na região semiárida do Brasil, verificou-se a presença dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* no intestino grosso de ovinos criados em capim *Panicum maximum* cv. Tanzânia (Freitas et al., 2012). Marrero et al. (2013) isolaram *R. mucilaginosa* do rúmen de vacas Holandesas alimentadas com forragem tropical. Em outra pesquisa realizada no norte de Minas Gerais com bovinos de corte zebuínos de diferentes idades e criados em pastagem tropical, 56% dos isolados foram identificados como *P. kudriavzevii* (Abrão et al., 2014).

Produção de (Carboximetilcelulase e xilanase)

No ensaio enzimático utilizado para avaliar a quantificação de enzimas produzidas por *Aspergillus terreus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Pichia kudriavzevii* e *Rhodotorula mucilaginosa* (Tabela 3) provenientes do trato digestório de ovinos, foi observado que houve interação (fungos x tempos) ($P < 0,0001$) para atividade específica e produção de enzimas. Com o desdobramento dos resultados, para os tempos de incubação, obteve-se efeito ($P < 0,0001$) linear e quadrático para as variáveis avaliadas (Tabela 3).

Tabela 2. Identificação molecular de fungos micelianos e leveduriformes isolados do rúmen de ovinos criados em pastagens tropicais

Identificação [n° Acc. Genbank]	Identificação dos isolados	N° de pb analisados	Similaridade (%)	Abrangência (%)	Resultado BLAST [n° acc. GenBank] e número de acesso
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	B13M2	1136	100%	100%	<i>T. longibrachiatum</i> SKF-3 [KX463453.1]
<i>Aspergillus terreus</i>	O45M1	1062	100%	100%	<i>A. terreus</i> Ef6
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	O166	587	99%	100%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> SM6-1 [KU316790.1]
<i>Pichia kudriavzevii</i>	O151	580	10%	100%	<i>Pichia kudriavzevii</i> JW2-1 [KU316741.1]

*Identificação conduzida usando pesquisas BLAST do ITS e ITS1 do gene rRNA de fungos micelianos e BLASTN do D/D2 do gene rRNA de levedura

Tabela 3. Atividade específica para carboximetilcelulase e xilanase produzidas por fungos micelianos e leveduriformes provenientes do trato digestório de ovinos até 96 horas de fermentação *in vitro* com *Urochloa decumbens* como substrato

		Fungo								Valor de P		
		<i>Aspergillus</i>		<i>Trichoderma</i>		<i>Pichia</i>		<i>Rhodotorula</i>		Fungo	Enzima	Tempo
		Enzima										
		CMCase	Xilanase	CMCase	Xilanase	CMCase	Xilanase	CMCase	Xilanase			
Atividade específica ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$)										<0,0001	0,155	0,004
Tempo de fermentação												
24 h		0,00	2,11	0,00	0,00	0,00	0,21	0,34	3,83			
48 h		17,20	12,03	0,73	5,39	1,80	0,28	0,53	0,52			
72 h		6,06	9,76	2,46	12,19	0,81	0,82	0,70	0,07			
96 h		7,82	3,01	1,54	13,20	0,36	0,51	0,00	0,31			
Interação	Valor de P	Médias										
E x F	0,050	7,77a	6,73a	1,18b	7,69 ^a	0,74b	0,46b	0,39b	1,19b			
Contraste Polinomial												
T x F	<0,0001	<0,0001 ¹		<0,0001 ²		n.s.		n.s.				

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas linhas diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

$$^1Y = -2,15 + 0,110 X$$

$$^2Y = -14,41 + 0,862 X - 0,007 X^2$$

Foi possível observar grande variabilidade entre as médias de produção de CMCase e xilanase ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$) determinadas pela liberação de açúcares redutores pela ação específica das enzimas. *Aspergillus terreus* apresentou maior atividade para CMCase e xilanase. *Trichoderma longibrachiatum* apresentou apenas 16% da atividade de CMCase quando comparada ao *A. terreus*, enquanto a de xilanase foi semelhante (Tabela 3). O tempo de fermentação com maior atividade das enzimas fibrolíticas diferiu entre os fungos filamentosos. *Aspergillus terreus* apresentou atividade crescente em função do tempo de incubação e *Trichoderma longibrachiatum* com aproximadamente 62 horas.

Essa variação poderia ser justificada pelas diferenças genéticas entre as espécies e cepas desses gêneros analisados, já que fatores ambientais, como pH inicial, tempo de cultivo, temperatura de incubação, concentração do inóculo e principalmente pelo substrato utilizado foram os mesmos. Observa-se, portanto, que os mecanismos de controle da síntese enzimática variam consideravelmente entre os diferentes microrganismos devido a sua natureza não específica (De Vries et al., 2000).

Sabe-se que fungos do gênero *Trichoderma* são produtores de celulases e hemicelulases. Estudos adicionais são necessários para explicar porque os cultivos com *Urochloa decumbens* podem apresentar habilidade em causar redução na produção de celulase por *Trichoderma*. Entretanto, estes fungos tem baixo nível de atividade da enzima β -glicosidase, esta deficiência restringe a conversão de celobiose em glicose, proporcionando inibição da atividade das celulases pelo acúmulo de celobiose (Singhania et al., 2010).

A menor produção ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$) das carboximetilcelulases e xilanases das leveduras *Pichia kudriavzevii* e *Rhodotorula mucilaginosa*, em comparação com fungos filamentosos, se justifica pelas diferentes características de atuação no substrato. Os fungos filamentosos apresentam vantagens em relação aos microrganismos unicelulares por possuírem hifas que permitem ação física de penetração no substrato e formar uma estrutura de aderência para hidrólise e utilização dos nutrientes disponíveis. Além disso, secretam enzimas hidrolíticas extracelulares, o que faz com que sua ação seja mais eficiente, permitindo adentrar no substrato aumentando a acessibilidade aos nutrientes disponíveis no conteúdo celular (Raimbault, 1998). A produção de CMCases e xilanases por microrganismos estende-se à utilização principalmente, de bactérias e fungos filamentosos, havendo poucos relatos acerca da utilização de leveduras (Haltrich et al.,

1996), que são citadas para produção de outras enzimas, como por exemplo, a invertase (Bofo et al., 2005).

Facchini *et al.* (2011a) avaliaram o pré-tratamento enzimático contendo extrato de enzimas fibrolíticas do fungo *Aspergillus japonicus* em quatro forrageiras tropicais, *Cynodon* spp. (Tifton-85), *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum* cv. Tanzânia (Tanzania). Foi constatado que o pré-tratamento com extrato de *Aspergillus japonicus* teve melhor atividade enzimática para *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*. O extrato desse fungo pode melhorar a disponibilidade de açúcares fermentescíveis, aumentando a fermentação ruminal com a hidrólise da parede celular de polissacarídeos.

A atividade de carboximetilcelulases e xilanases, ($\mu\text{mol mL}^{-1}$), produzidas por *Aspergillus terreus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Pichia kudriavzevii* e *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes do trato digestório de ovinos variou significativamente ($P < 0,0001$) entre os espécimes avaliados (Tabela 4), evidenciando diferenças interespecíficas e foi observado que houve interação (enzimas x fungos) ($P = 0,045$) e (tempo x fungos) ($P = 0,0001$).

O fungo *Aspergillus terreus* destacou-se quanto à atividade de carboximetilcelulase, apresentando maior produção de açúcares redutores dentro do mesmo período de incubação que a xilanase, estimado em 60 horas de crescimento do fungo. *Trichoderma longibrachiatum* produziu maiores quantidades de açúcares redutores com ação principal da xilanase. A taxa de formação de açúcares redutores foi $5,80 \mu\text{mol mL}^{-1}$ para cada unidade de hora de incubação. Este aumento linear pode estar relacionado com o aumento da atividade concomitante da CMCase, cuja exposição de hemicelulose da parede celular pode ser indutora da produção de xilanase. O efeito indutor do xilano na síntese da xilanase é citado por muitos autores e para diversos fungos, tais como: *Streptomyces. actuosus* (Wang et al., 2003), *Thermomyces. lanuginosus* (Hoq et al., 1994) e *Trichoderma harzianum* (Ahmed et al., 2003). As leveduras apresentaram as menores médias de atividade de CMCase e de xilanase, que não diferiram ($P > 0,05$) durante todo o período de incubação.

Tabela 4. Atividades de carboximetilcelulases e xilanases ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) produzidas por dois fungos micelianos e dois leveduriformes provenientes do trato digestório de ovinos

	Fungo								Valor de P		
	<i>Aspergillus</i>		<i>Trichoderma</i>		<i>Pichia</i>		<i>Rhodotorula</i>		Fungo	Enzima	Tempo
	Enzima										
	CMCase	Xilanase	CMCase	Xilanase	CMCase	Xilanase	CMCase	Xilanase			
Produção de açúcares redutores ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)									<0,0001	0,137	0,008
24 h de incubação	0,00	109,98	0,00	0,00	0,00	18,35	25,35	274,80			
48 h de incubação	774,01	586,75	35,40	264,81	128,16	20,65	40,83	39,30			
72 h de incubação	350,39	563,44	139,20	553,00	49,77	47,96	39,16	4,00			
96 h de incubação	570,76	217,44	82,83	714,64	18,01	29,53	0,00	18,50			
Interação	Valor de P		Média								
E x F	0,045	423,79a	369,40 ^a	64,36b	383,11a	48,99b	29,12b	26,34b	84,15b		
		Contraste Polinomial									
T x F	<0,0001	<0,0001 ¹	<0,0001 ²		n.s.		n.s.				

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas linhas diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

$$^1Y = 0,149 + 0,083 X - 0,00063 X^2$$

$$^2Y = -124,3 + 5,80 X$$

O potencial de fungos de mesmos gêneros estudados nesta pesquisa tem sido avaliados quanto à degradação de resíduos vegetais. Em uma pesquisa, foram avaliados os fungos *Paecilomyces variotti*, *Aspergillus fumigatus*, *Acremonium cellulolyticus*, *Penicillium verruculosum* e *Trichoderma* spp. provenientes de bagaço de cana-de-açúcar e de madeira em decomposição, e com as cepas *Trichoderma reesei* QM9414 e *T. reesei* RUT C30. Observou-se que os fungos isolados dos resíduos vegetais são bons produtores de enzimas celulolíticas (Basso *et al.*, 2010). Esses resultados ratificam os dados encontrados nesta pesquisa, pois o fungo do gênero *Aspergillus* foi capaz de converter o substrato em produto de forma mais rápida e eficiente.

Jun *et al.* (2013), avaliando a atividade de CMCase e xilanases do fungo *Trichoderma reesei* cultivado em diferentes fontes de carbono, encontraram valores de atividade de 6,58 e 4,91 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ respectivamente. Contrastando com estes resultados, o presente trabalho apresentou valores superiores para a produção de CMCase e xilanases produzidas por *Trichoderma longibrachiatum*.

Na avaliação da produtividade das enzimas, quando se considera a unidade de atividade (U) de celulase e xilanase, houve interação de (enzimas x fungos) ($P = 0,0002$). A CMCase produzida por *Aspergillus terreus* foi a mais ativa e a atividade de xilanase foi semelhante entre *Trichoderma longibrachiatum* e *Aspergillus terreus* sendo capazes de converter o substrato em produto de forma mais rápida e eficiente (Tabela 5).

Tabela 5. Unidades por mL (U/mL) de carboximetilcelulases e xilanases produzidas por dois fungos micelianos e dois leveduriformes provenientes do trato digestório de ovinos

	Fungo								Valor de P		
	<i>Aspergillus</i>		<i>Trichoderma</i>		<i>Pichia</i>		<i>Rhodotorula</i>		Fungo	Enzima	Tempo
	Enzima										
	CMCase	Xilanase	CMCase	Xilanase	CMCase	Xilanase	CMCase	Xilanase			
Atividade (U) ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$)									<0,0001	<0,0001	0,114
24 h de incubação	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,26			
48 h de incubação	0,29	0,80	0,01	0,36	0,03	0,02	0,01	0,03			
72 h de incubação	0,10	0,65	0,04	0,81	0,01	0,05	0,01	0,00			
96 h de incubação	0,13	0,20	0,03	0,88	0,01	0,03	0,00	0,02			
Interação	Valor de P	Média									
E x F	0,0002	0,127 ^a	0,449a	0,020b	0,513a	0,012b	0,030b	0,007b	0,079b		
		Contraste Polinomial									
T x F	0,069	0,025 ¹		0,002 ²		n.s.		n.s.			

Médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas linhas diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

$$^1Y = - 0,596 + 0,036 X - 0,0030 X^2$$

$$^2Y = - 0,135 + 0,067 X$$

A produtividade ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min.}^{-1}$) de carboximetilcelulases e xilanases diferiu entre os fungos filamentosos, essa produção pode ser devido ao fato de a maioria dos fungos filamentosos possuir amplo espectro de habilidade metabólica, principalmente, da eficiente degradação da celulose (Thongekkaew et al., 2008). *Aspergillus terreus* apresentou maior atividade com 60 horas de incubação como tempo maior de atividade das enzimas e *Trichoderma longibrachiatum* apresentou comportamento linear crescente até as 96 h de incubação.

A produção linear em função do tempo de incubação das enzimas fibrolíticas produzidas por *Trichoderma longibrachiatum*, pode ser importante na dieta de ruminantes que consomem fibras de baixa qualidade e elevado tempo de retenção da fibra no rúmen. A ação das enzimas do *Trichoderma longibrachiatum* poderá permanecer por mais tempo na fibra aumentando a extensão de degradação da fibra no rúmen. Esses resultados evidenciam o potencial de utilização desse fungo como aditivo microbiano em dieta de ruminantes alimentados com forragens tropicais e corrobora com outras pesquisas que avaliaram a inclusão de enzimas de fungos micelianos para melhorar a digestibilidade de forrageiras (Nurudeen et al., 2015).

A combinação de enzimas de microrganismos do rúmen e de extratos enzimáticos exógenos de *T. longibrachiatum* foi avaliada para bovinos (Morgavi et al., 2000). Os autores constataram sinergismo entre essas enzimas ao verificarem que a hidrólise da celulose, xilana e da silagem de milho foram aumentadas em 35, 100, e 40% respectivamente (Morgavi et al., 2000)

Para a produção de biomassa fúngica (g) houve interação (fungo x tempo) significativa (Tabela 6). A produção de massa miceliana por *Trichoderma longibrachiatum* e *Pichia kudriavzevii* variou de forma cúbica em função do tempo de incubação e o fungo *Aspergillus terreus* e *Rhodotorula* produziram massa micelial de forma constante durante todo período de incubação.

Urochloa decumbens foi um substrato que não alterou a produção de biomassa de *Aspergillus terreus* em função do tempo de incubação, apesar de ter havido aumento da atividade de ambas enzimas de acordo com o tempo de incubação. As quantidades adicionais de açúcares liberados pela ação de CMCase e xilanase após as 24 horas de incubação não contribuíram para o aumento de biomassa desta cepa.

O *Trichoderma longibrachiatum* apresentou atividade linear crescente das enzimas e o peso do micélio variou de forma cúbica conforme o tempo de incubação. O

peso máximo de biomassa produzida por *Trichoderma* foi estimado em 36 h de incubação, antes do pico de atividade específica das enzimas quando expressa em $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$, que foi de 62 horas.

A produção de xilanases atinge o máximo de forma relativamente gradativa e decai de forma brusca sendo que o período de cultivo necessário para que o fungo atinja o máximo de sua produção varia com o microrganismo avaliado. Segundo Kulkarni e Shendye (1999), as xilanases se expressam geralmente no fim da fase exponencial e este tempo é correlacionado com o meio de cultivo e segundo Haq et al. (2004), a queda brusca da atividade enzimática pode ser devido ao rápido consumo do substrato na fase exponencial que resulta em falta do mesmo para manutenção da síntese enzimática.

O peso mínimo da massa micelial de *Trichoderma longibrachiatum* foi estimada em 79 horas de incubação (Tabela 6). Haltrich et al. (1996), em cultivos de *T. reesei* observaram que a glicose foi efetiva na produção de biomassa, mas repressora na atividade da xilanase. Estes dados também são reportados por outros pesquisadores que avaliaram os efeitos da adição de glicose ao substrato na produção de xilanase por outros fungos (Gawande e Kamat, 2000; Haq et al., 2002; Ramesh e Manchanda, 1998; Peixoto et al., 2003; Margolles-Clark et al., 1997).

Tabela 6. Produção de biomassa fúngica (g) de provenientes do trato digestório de ovinos

	Fungo				Valor de P		
	<i>Aspergillus</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Pichia</i>	<i>Rhodotorula</i>	Fungo	Tempo	F x T
Peso do Micélio (g)							
24 h de incubação	0,332	0,356	0,321	0,338	<0,0001	0,0003	0,0052
48 h de incubação	0,331	0,372	0,329	0,328			
72 h de incubação	0,321	0,311	0,314	0,324			
96 h de incubação	0,326	0,363	0,337	0,334			
Contraste polinomial	n.s.	<0,0001 ¹	0,003 ²	n.s.			

$$^1Y = 0,073 + 0,020 X - 0,00040 X^2 + 0,0000023 X^3$$

$$^2Y = 0,226 + 0,07 X - 0,00013 X^2 + 0,0000008 X^3$$

O pH inicial apresentou média para todos os tratamentos de 5,38 (Tabela 7) e não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$). O pH final a cada tempo de incubação dos espécimes avaliados no presente trabalho promoveram médias diferentes ($P < 0,0001$), houve interação fungo x tempo significativa ($P = 0,088$) (Tabela 7). Observou-se que o pH final do meio incubado com o fungo *Aspergillus terreus* variou de forma linear decrescente em função do período de incubação, indicando atividade fermentativa deste espécime. Segundo Bajpai (1997), pH levemente ácidos (5 a 6,5) favorecem a produção de xilanases por fungos. O pH ao final dos períodos de 72 h e 96 h de fermentação por *A. terreus* esteve abaixo desta faixa, o que pode ter contribuído para reduzir a produção de xilanase por este fungo. No rúmen, devido ao efeito de tamponamento da saliva, dificilmente o pH estará abaixo de 5,0.

Facchini *et al.* (2011b) avaliaram a produção de xilanases e celulases de *Aspergillus japonicus* usando resíduos agroindustriais e observaram que ambas as enzimas exibiram ampla estabilidade de pH. O extrato bruto do fungo utilizado apresentou boa estabilidade ruminal quando comparado com preparações. Sohail *et al.* (2016) atribuíram a essa diminuição de pH à produção de enzimas pelo fungo.

Para as leveduras houve elevação do pH em função do tempo de incubação (Tabelas 7). Em relação ao pH, sabe-se que as fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores, sendo adequada a faixa entre 4 e 6, dependendo da temperatura, da presença de oxigênio e da espécie da levedura (Narendranath e Power, 2005). Toivari *et al.* (2013) observaram que *P. kudriavzevii* VTT-C-75010 não utilizou d-xylonato como fonte de carbono a pH 5, com ou sem presença de d-glucose, mesmo após 138 h de incubação. Estudos adicionais são necessários para explicar o porquê os cultivos com *Urochloa decumbens* em estufa de CO₂ a 39°C podem apresentar aumento no pH das leveduras *Pichia kudriavzevii* e *Rhodotorula mucilaginosa*.

Esse e outros estudos, envolvendo a produção de enzimas por fungos do rúmen corroboram o potencial para utilização dos fungos avaliados neste estudo. Esses isolados fúngicos da microbiota autóctone poderiam apresentar melhor adaptabilidade e melhor resposta quando comparados aos fungos exógenos, o que deve ser verificado em futuras pesquisas.

Tabela 7. Médias do pH final e variação de pH, no decorrer do processo fermentativo, com pH inicial médio de 5,38 por fungos do trato digestório de ovinos com *Urochloa decumbens*

	Fungo				Valor de P		
	<i>Aspergillus</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Pichia</i>	<i>Rhodotorula</i>	Fungo	Tempo	F x T
pH Final							
24 h de incubação	5,24	5,16	5,50	5,37	<0,0001	0,627	0,088
48 h de incubação	5,13	5,14	5,62	5,65			
72 h de incubação	4,88	5,14	5,69	5,48			
96 h de incubação	4,78	5,08	5,76	5,57			
Contraste polinomial	0,002 ¹	n.s.	n.s.	n.s.			
Variação de pH	-0,28	-0,37	0,32	0,12	<0,0001	0,648	0,385

¹Y = 5,42 – 0,007 X

Conclusões

A produção de xilanase por *Trichoderma longibrachiatum* e de CMCase e xilanase de *Aspergillus terreus* e suas aplicações na hidrólise de material lignocelulósico são promissoras para elaboração de probiótico ou aditivo microbiano.

Trichoderma longibrachiatum apresenta aumento de atividade de CMCase e xilanase em função do tempo de incubação de 96 que pode ser uma característica importante para atuar na extensão da degradação de fibra de baixa qualidade no rúmen.

Referências bibliográficas

- ABDELRAHMAN, M.; SAMI, A.; SULIMAN, G.; ABUDABOS, A. Growth Performance and Economic Efficiency of Fattening Naimi Lambs on Unconventional Ration Enhanced With Enzyme Cocktail. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 53, p. 467-471, 2016.
- ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; FREITAS, C. E. S.; VIEIRA, E. A.; GERASEEV, L. C.; SILVA-HUGHES, A. F.; ROSA, C. A.; RODRIGUES, N. M. Characterization of Fungi from Ruminal Fluid of Beef Cattle with Different Ages and Raised in Tropical Lignified Pastures. **Current Microbiology**, v. 69, p. 649-59, 2014.
- ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; NIGRI, A. C. A.; SILVA, M. L. F.; RIBEIRO, I. C. O.; SILVA, K. L.; ROSA, C. A.; RODRIGUEZ, N. M. Caracterização físico-química e microbiológica e população de fungos no conteúdo ruminal de novilhos de corte hígidos ou com acidose ruminal. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, p. 7-14, 2015.
- ABRÃO, F. O.; DUARTE, E.R., PESSOA, M.S. DOS SANTOS, V.L., FREITAS JÚNIOR, L.F., BARROS, K.O., HUGHES A.F.S., SILVA, T.D., RODRIGUEZ, N.M. 2017. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. **Plos ONE**, 12, 1-13
- AHMED, S.; AIN, Q.; A. N.; NAEEM, S. A.; RAHMAN, S.; JAMIL, A. Induction of Xylanase and Cellulase Genes from *Trichoderma harzianum* with Different Carbon Sources. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 912-1916, 2003.
- ALMEIDA, P. N. M.; FREITAS, C. E. S.; ABRÃO, F. O.; RIBEIRO, I. C. O.; VIEIRA, E. A.; GERSEEV, L. C.; DUARTE, E. R. Atividade celulolítica de fungos aeróbios isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. **Revista Caatinga**, v. 27, p. 202-207, 2014.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHENG ZHANG, J. Z.; MILLER, W.; LIPMAN D. J. Gapped BLAST nad PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Met Zet**, v. 22, p. 711-728, 2014.
- AOAC** - Association of Official Analytical Chemistry. Official methods of analysis. 19th ed. Gaithersburg, 2010. 3000p.
- BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and application. **Adv. Applied. Microbiology**, 43, p.141-94, 1997.

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, p. 1282-1289, 2010.

BOFO, D.C. S.; CASTRO, H. F. de; MEDEIROS, M. B. Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e S.112 *cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 121-124, 2005.

BRADFORD, M. M. A dyebindingassay for protein. **Anal Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Sequencial solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270-274, 2012.

DÍAZ, A. et al. Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: effects on chemical composition and in vitro rumen fermentation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, p. 345-355, 2014.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 65, p.497-522, 2001.

FACCHINI, F. D. A . et al. Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 347-355, 2011.

FACCHINI, F. D. A. et al. Optimization of Fibrolytic Enzyme Production by *Aspergillus Japonicus* C03 With Potential Application in Ruminant Feed and Their Effects on Tropical Forages Hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 1027-1038, 2011b.

FADEL, M. Production Physiology of cellulases and β -glycosidase enzymes of *Aspergillus niger* grown under solid-state fermentation conditions. **J. Biol. Sci.**, 1(5), p.401-411, 2000.

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

FREITAS, C. E. S. et al., Sheep fed with banana leaf hay reduce ruminal protozoa population. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, p. 807-812, 2017

GAWANDE, P. V.; KAMAT, M. Y. Production of xylanases by immobilized *Aspergillus* sp using lignocellulosic waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p.111-112, 2000.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **International union of pure and applied chemistry**, v. 59 , p. 257-268, 1987.

GOMATHI, D., MUTHULAKSHMI, C., KUMAR, D.G., RAVIKUMAR, G., KALAISELVI, M. UMA, C. Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulose. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, S67-S73, 2012.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p.137-161, 1996.

HAQ, I.; KHAN, A.; BUTT, W. A.; ALI, S.; QADEER, M. A. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Xylanase Production by Mutant Strain of *Aspergillus Niger* GCBMX-45. **Online Journal of Biological Sciences**, v. 2, p.143-144, 2002

HAQ, I.; TASNEEM, M.; RAANA, K.; KHAN, A.; MUKHTAR, H.; JAVED, M. Optimization of Cultural Conditions for the Production of Xylanase by Chemically Mutated Strain of *Aspergillus niger* GCBCX-20. Intern. **Journal of Agricultural, Biological and Environmental**, v. 6, p.1115-1118, 2004.

HOFFMAN, C. S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. **Gene** v. 57, p. 267–272, 1987.

HOQ, M. M.; HEMPEL, C.; DECKWER, W. D. Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9: Effect of agitation, aeration, and medium components on production. **Journal Biotechnology**, v. 37, p. 49-58, 1994.

JUN, H.; GUANGYE, H.; DAIWEN, C. Insights into enzyme secretion by filamentous fungi: Comparative proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown on different carbon sources. **Journal of Proteomics**, v. 89, p.191–201, 2013.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology**, v. 23, p. 411- 456, 1999.

LI, C.; LIN, F.; LI, Y.; WEI, W.; WANG, H.; QIN, L.; ZHOU, Z.; LI, B.; WU, F.; CHEN, Z. A β -glucosidase hyper production *Trichoderma reesei* mutant reveals a potential role of cel3D in cellulase production. **Microbial Cell Factories**. v. 15, p. 1-13, 2016.

LÓPEZ-AGUIRRE, D.; HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ, J., ROJO, R.; SÁNCHEZ-DÁVILA, F.; LÓPEZ-VILLALOBOS, N.; SALEM, A.Z.M.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.C.; VÁZQUEZ-ARMIJO, J.F.; RUÍZ, S. Effects of exogenous enzymes and application method on nutrient intake, digestibility and growth performance of Pelibuey lambs. **SpringerPlus**. 1399, 1-6, 2016.

MARGOLLES-CLARK, E.; IHNEN, M.; PENTTILÄ, M. Expression patterns of tem hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon source. **Journal Biotechnololy**, v. 57, p.167-179, 1997.

MARRERO Y, CASTILLO Y. BURROLA-BARRAZA M. E. et al. Morphological, biochemical, and molecular identification of the yeast *Levica 25*: A potential ruminal microbial additive. **Glo. Vet**, v. 1, p. 60-65, 2011.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHAMED, D. E. D. A.; BORHAMI, B. E.; EL-SHAZLY, K. A.; SALLAM, S. M. A. Effect of Dietary Supplementation with Fibrolytic Enzymes on the Productive Performance of Early Lactating Dairy Cows. **Journal of Agricultural Science**. v. 5, p. 146-155, 2013.

MORGAVI, D. P.; BEAUCHEMIN, K. A.; NSEREKO, V. L.; RODE, L. M.; IWAASA, A. D.; YANG, W. Z.; MCALLISTER, T. A.; WANG, Y. Synergy Between Ruminant Fibrolytic Enzymes and Enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. **Journal Dairy Science**, v. 83, p. 1310-1321, 2000.

NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Relação entre pH e sólidos dissolvidos médios em termos de crescimento e metabolismo de *Lactobacilli* e *Saccharomyces cerevisiae* durante a produção de etanol. **Microbiologia aplicada e ambiental** . v. 71, p. 2239-2243, 2005.

NURUDEEN, O, O. *et al.*. Cellulase and Biomass Production from Sorghum (*Sorghum guineense*) Waste by *Trichoderma longibrachiatum* and *Aspergillus terreus*. **Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 169-174, 2015.

PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology**, v. 6, p.269-273, 2003.

RAMESH, K. D. C.; MANCHANDA, M. Optimization of xylanase production by a hyperxylanolytic mutant strain of *Fusarium oxysporum*. **Process Biochem**, v. 33, p. 641-647, 1998.

ROSA, L. H.; VAZ, A. B. M.; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). **Polar Biology**, v. 32, p. 161-167, 2009.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.

SINGHANIA R. R. *et al.* Advancement and comparative profiles in the production technologie using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and MicrobialTechnology**. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.03.010. 2010.

STACKEBRANDT E, GOEBEL B.M. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 44, p. 846-849, 1994.

THONGEKKAEW, J., *et al.* An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 60, p. 140-146, 2008.

TOIVARI, M.; VEHKOMÄKI, M-L.; NYGÅRD, Y.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L.; WIEBE, M, G. Low pH d-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 555-562, 2013.

VALLEJO, L. H.; SALEM, A. Z. M.; CAMACHO, L. M.; KHOLIF, A. M.; MARIEZCURRENA, M. D.; CIPRIANO, M.; ALONSO, M. U.; OLIVARES, J.; LOPEZ, S. Effects of xylanase supplementation on feed intake, digestibility and ruminal fermentation in Rambouillet sheep. **Journal of Agricultural Science**, v. 154, p. 1110-1117, 2016.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds) **PCR protocols, a guide to methods and applications**. Academic Press San Diego. 1990;pp 315-322.

WANG, S.; YEN, Y.; SHIH, I.; CHANG, A. C.; CHANG, W.; WU, W.; CHAI, Y. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A -151. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 917-925, 2003.

IV – CAPÍTULO II

Digestibilidade *in vitro* de *Urochloa decumbens* inoculada com fungos isolados do trato gastrointestinal de ovinos

Resumo – Os alimentos fibrosos são à base da alimentação de ruminantes. Entretanto, a digestibilidade das pastagens é substancialmente reduzida na estação seca. Nesta pesquisa avaliou-se a digestibilidade *in vitro* de *Urochloa decumbens* inoculada com fungos provenientes do trato gastrointestinal de ovinos criados em pastagens tropicais. Foi utilizado um ovino com fístula ruminal, como doador de fluido ruminal para determinação dos coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro de *U. decumbens*. Durante o ensaio de digestibilidade *in vitro*, foram realizadas três coletas do fluido ruminal das câmaras de fermentação, no tempo zero, às 24 horas e às 72 horas quando foi adicionado o ácido clorídrico 6 N. A DIVFDN não foi influenciada pela inclusão dos inóculos contendo os fungos. Entretanto, a DIVMS foi maior ($P < 0,05$) quando utilizou-se a cepa ICA/UFMG LT 001 (47,31%) em comparação ao controle (41,94%) indicando potencial promissor para elaboração de probiótico ou aditivo microbiano para ovinos alimentos em pastagem tropical. Em relação DIVMS constatou-se média inferior para levedura ICA/UFMG LR 016 ($P < 0,05$), tanto no saco (F57-Ankon) quanto no TNT. Constatou-se a presença de fungos micelianos e leveduriformes nos cultivos realizados em ambos os períodos de coleta de fluido ruminal para amostras avaliadas no início da fermentação, 24 e 72h a população de ICA/UFMG LT 001 e ICA/UFMG LR 016 foi significativamente maior após a digestão ácida ($P < 0,05$). Esses resultados pode sugerir o potencial biotecnológico que estes fungos apresentam para produção de probiótico. Analisando-se conjuntamente os dados referentes à composição química do feno de *U. decumbens* avaliado no presente experimento, pode-se verificar que é alto o teor dos constituintes da parede celular e baixos são os teores da DIVMS e a DIVFDN, evidenciando a baixa qualidade de gramíneas tropicais colhidas após o florescimento. O incremento na digestibilidade do feno lignificado de *U. decumbens* em 5,37% com a inclusão de ICA/UFMG LT 001 estaria relacionado a degradação da fração fibrosa dessa forragem ocasionada pela ação hidrolítica das celulases produzidas por esse fungo. A adição da cepa ICA/UFMG LT 001, promove incremento significativo da DIVMS para o feno lignificado de *Urochloa decumbens*.

Palavras-chave: Forragem, nutrição de ruminantes, ovinocultura, probióticos, rúmen.

V - CHAPTER II

Digestibility of *Urochloa decumbens* inoculated with fungal isolates of the gastrointestinal tract ovine

Abstract – Fibrous foods are the basis of ruminant feed. However, pasture digestibility is substantially reduced in the dry season. In this research the *in vitro* digestibility of *Urochloa decumbens* inoculated with fungi from the gastrointestinal tract of sheep raised on tropical pastures was evaluated. A sheep with ruminal fistula was used as a donor of ruminal fluid to determine the *in vitro* dry matter digestibility coefficients (IVDDM) and the neutral detergent fiber of *U. decumbens*. During the *in vitro* digestibility assay, three collections of ruminal fluid from fermentation chambers were performed at time zero at 24 hours and at 72 hours when 6N hydrochloric acid was added. DIVFDN was not influenced by the inclusion of inoculums containing the fungi. However, the IVDDM was higher ($P<0.05$) when the ICA/UFMG LT 001 fungus (47.31%) was used in comparison with the control (41.94%) indicating a promising potential for the elaboration of a probiotic or microbial additive for sheep tropical pasture. In relation to DIVMS, lower mean values were found for ICA/UFMG LR 016 ($P<0.05$), both in the bag (F57-Ankon) and TNT. It was observed the presence of mycelial and yeasturiform fungi in the cultures realized in both periods of ruminal fluid collection for samples evaluated at the beginning of the fermentation, 24 and 72h the population of ICA/UFMG LT 001 and ICA/UFMG LT 016 was significantly higher after the acid digestion ($P<0.05$). These results may suggest the biotechnological potential that these fungi present for probiotic production. Analyzing data on the chemical composition of *U. decumbens* hay evaluated in the present experiment, it can be verified that the content of the constituents of the cell wall is high and the contents of IVDDM and IVDNDF are low, evidencing the low quality of tropical grasses harvested after flowering. The increase in the digestibility of *U. decumbens* lignified hay in 5.37% with the inclusion of ICA/UFMG LT 001 would be related to the degradation of the fibrous fraction of this forage caused by the hydrolytic action of the cellulases produced by this fungus. The addition of ICA/UFMG LT 001 promotes a significant increase in IVDDM for *Urochloa decumbens* lignified hay.

Keywords: forage, production of sheep, ruminant nutrition, probiotics, rumen.

Expeirmento 1

Digestibilidade *in vitro* de *Urochloa decumbens* inoculada com fungos micelianos isolados do trato gastrointestinal de ovinos

Resumo – Os alimentos fibrosos são à base da alimentação de ruminantes. Entretanto, a digestibilidade das pastagens é substancialmente reduzida na estação seca. Nesta pesquisa avaliou-se a digestibilidade *in vitro* de *Urochloa decumbens* inoculada com fungos micelianos provenientes do trato gastrointestinal de ovinos. Foi utilizado um ovino com fístula ruminal, como doador de fluido ruminal para determinação dos coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro de *U. decumbens*. Durante o ensaio de digestibilidade *in vitro*, foram realizadas três coletas do fluido ruminal das câmaras de fermentação, no tempo zero, às 24 horas e às 72 horas quando foi adicionado o ácido clorídrico 6 N. A análise das sequências das regiões ITS do DNAr identificou ICA/UFMG LT 005, e ICA/UFMG LT 001 com 100% de similaridade. A DIVMS foi maior ($P < 0,05$) quando inoculou-se a cepa ICA/UFMG LT 001 (47,31%) em comparação ao controle (41,94%). Entretanto, a DIVFDN não foi influenciada pela inclusão das cepas de fungos avaliadas. A degradação da fração fibrosa desse feno por celulases desse fungo revelam potencial promissor para elaboração de probiótico ou aditivo microbiano para ovinos alimentos em pastagem tropical. Consatatou-se que adição da cepa ICA/UFMG LT 001, promove incremento significativo da DIVMS para o feno lignificado de *Urochloa decumbens*.

Palavras-chave: forragem tropical, nutrição de ruminantes, ovinocultura, probióticos, rúmen.

Introdução

Em regiões tropicais ocorre escassez de forrageiras de boa qualidade durante a estação seca, quando apresentam redução da digestibilidade ocasionada pelo processo fisiológico de lignificação da parede celular (Wang et al., 2016). As pastagens do gênero *Urochloa* tem sido amplamente difundidas nessas áreas por apresentarem tolerância à seca e a solos de média e baixa fertilidade, assim como boa produção de massa vegetal (Louw-Gaume et al., 2010; Pessoa-Filho et al., 2017). Otimizar a digestibilidade dessas forragens é fundamental para melhorar a produtividade de ruminantes criados em sistema de pastejo, uma vez que representam a principal fonte de alimento para esses animais.

Os fungos presentes no rúmen possuem papel substancial na digestão de forrageiras degradando os polissacarídeos mais complexos (Kamra, 2005; Wei et al., 2015). A atividade enzimática e mecânica dos fungos no ambiente ruminal são fundamentais para a degradação da lignocelulose e estudos comprovam que a alimentação contendo altas proporções de fibras estimula o desenvolvimento de populações de fungos nesse ecossistema (Wei et al., 2015; Abrão et al., 2014).

Em nosso estudo anterior verificou-se a presença dos gêneros *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Malbranchea* e *Onychocola* no intestino grosso de ovinos criados em capim *Panicum maximum* cv. Tanzânia (Freitas et al., 2012). Esses fungos poderiam ser relevantes na degradação de estruturas complexas do alimento pela produção expressiva de enzimas hidrolíticas como reportado para isolados de *Aspergillus* spp. proveniente de bovinos (Almeida et al., 2014; Abrão et al., 2017).

Nesta pesquisa avaliou-se a digestibilidade *in vitro* do feno de *U. decumbens* inoculados com fungos micelianos provenientes do trato digestório de ovinos alimentados com forragens tropicais.

Material e Métodos

Isolados fúngicos avaliados

Os fungos *Trichoderma* sp.(B13 M2) e *Aspergillus* sp. (O45 M1), avaliados neste experimento, foram provenientes do trato digestório de borregos alimentados, respectivamente com pastagens de *Panicum maximum* cv. Tanzânia (Freitas et al., 2012) ou feno de *Cynodon dactylon* cv. Vaqueiro no norte de Minas Gerais, Brasil, durante a estação seca (Freitas et al., 2017). Em estudos preliminares, esses isolados apresentaram produção superior de enzimas de degradação da parede celular vegetal e maiores halos de degradação da celulose cristalina.

Identificação molecular dos fungos

Os fungos foram crescidos por sete dias em ágar Sabouraud, e a extração de DNA foi conduzida de acordo com (Rosa et al., 2009). O material extraído foi submetido à reação em cadeia da polimerase, utilizando os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) para amplificar a região ITS do rDNA conforme descrito por (White et al., 1990). O produto foi quantificado em NanoDrop 1000ND (NanoDrop Technologies) e ajustado para 100 ng ul⁻¹ para ser utilizado em reações de sequenciamento.

Utilizou-se kit DYEnamicTM (Amersham Biosciences, EUA) em um sequenciador automatizado MegaBACETM 1000. As sequências obtidas foram analisadas utilizando BLASTn v. 2.215 de BLAST 2.0 disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul et al., 1997). Para identificação específica, considerou-se similaridade de 99% ou mais e às sequências foram depositadas no GenBank.

FORAGEIRA AVALIADA

O feno de *Urochloa decumbens* enfardado após a queda das sementes foi adquirido comercialmente na região de Montes Claros – MG, durante o período de seca (março a outubro). Coletou-se subamostras dessa gramínea para avaliação bromatológica (AOAC, 2010) que indicaram a seguinte composição com base na matéria seca (g. 100 g⁻¹): Matéria Seca= 95,38; Proteína Bruta= 3,06; Proteína insolúvel em detergente neutro= 21,57; Proteína insolúvel em detergente ácido= 20,59; Fibra em

detergente neutro= 82,26; Fibra em detergente ácido= 53,04; Lignina= 7,50; Extrato etéreo= 1,02; Açúcares Totais= 3,02; Cinzas= 5,89; Cálcio= 0,14; Fósforo= 0,10; Potássio= 0,58; Magnésio= 0,20; Enxofre=0,06; Celulose= 45,54; Hemicelulose= 29,22; Carboidrato Não Fibroso= 8,43.

Coleta de fluido ruminal

Para o ensaio de digestibilidade *in vitro*, foi utilizado um carneiro Santa Inês adulto castrado com fístula ruminal com aproximadamente 65 Kg de peso corporal, como doador de conteúdo ruminal. O animal foi alojado em baia durante quinze dias, sendo quatorze dias para adaptação à dieta formulada para atender o requerimento de nutrientes para ovinos adultos, de acordo com (NRC, 2007), contendo 60% de *Urochloa decumbens* e 40% de concentrado e mistura mineral. No 15º dia o fluido ruminal foi coletado, homogeneizado, filtrado e transportado em garrafas térmicas vedadas. Foram realizadas três coletas do fluido ruminal em intervalos de 15 dias para permitir a recomposição da microbiota ruminal (Carro et al., 1992). Todos os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais sob registro CEUA 128/2013.

Digestibilidade in vitro da matéria seca e da fibra em detergente neutro do feno de Urochloa decumbens

Para preparação dos inóculos, os fungos foram cultivados em caldo Sabouraud a 39°C durante 48 h e padronizados na concentração aproximada de 10^7 unidades formadoras de colônias UFC/mL.

Foram avaliados os coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) do feno da forrageira, segundo a metodologia descrita por, (Tilley e Terry, 1963) e as modificações descritas por (Holden, 1999), utilizando simulador ruminal (TE-150, Tecnal Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil). Esse aparelho é composto por quatro câmaras de vidro (2,500 mL) para incubação a 39°C e rotação constante. Cada câmara recebeu um dos tratamentos contendo o feno acondicionado em saquinhos Ankon F-57 com 0,5 gramas do feno moído e padronizado a 1mm de diâmetro (Nocek e Russell, 1988). Foram utilizados oito saquinhos Ankon F-57 em cada câmara. Em cada câmara fermentativa foi inoculado 100 mL de caldo Sabouraud estéril (controle) ou contendo *Aspergillus* sp.

(O45 M1), *Trichoderma* sp. (B13 M2) ou a mistura contendo 50 mL de cada um dos inóculos desses fungos. O experimento foi repetido três vezes com o intervalo de 15 dias.

As amostras permaneceram em contato com cada inóculo e o líquido ruminal acrescido de solução tampão de McDougall por 48 horas (proporção 1:3). Posteriormente, foram adicionados pepsina e ácido clorídrico, para simulação da digestão química e incubou-se por mais 24 horas. Ao final desse processo os saquinhos foram lavados com água destilada, secos e pesados.

A determinação da DIVMS foi obtida pela fórmula (Ankon, 2014):

$$\% \text{DIVMS (base de MS)} = 100 - (W3 - (W1 \times C1)) / (W2 \times MS) \times 100.$$

Onde: W1 = Peso saco vazio; W2 = peso da amostra; W3 = peso saco + resíduo depois da incubação; W3 = peso saco + resíduo depois da incubação; C1 = correção da amostra branco (peso final seco em estufa / peso inicial) e MS= Matéria seca.

Para determinação da DIVFDN, os saquinhos lavados foram encaminhados ao determinador de fibra (TE-149 Tecnal®, Tecnal Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil) em solução de FDN (por uma hora a temperatura de 105°C, seguida de três lavagens com água destilada por 10 minutos e acetona por 15 minutos. Posteriormente foram desidratados em estufa de circulação forçada de ar a 55°C por 24 horas e 2 horas em estufa a 105°C, para obter o peso seco. A fórmula utilizada para se obter a %DIVFDN foi a mesma para se determinar a %DIVMS, fazendo as substituições dos valores (Ankon, 2014).

Coleta e Quantificação de fungos

Durante o ensaio de digestibilidade *in vitro* no simulador de rúmen (DaisyII Ankon®), foram realizadas três coletas do fluido ruminal, no tempo zero, às 24 horas e às 72 horas quando foi adicionado o ácido clorídrico 6N. Foram coletados 10 mL de fluido ruminal, com o auxílio de seringas estéreis. Cada seringa foi lacrada, identificada, armazenada em caixa isotérmica com gelo e encaminhadas imediatamente para as análises.

Foi realizado o cultivo para mensurar a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos micelianos e leveduriformes por mL de fluido ruminal. Foram realizadas diluições decimais seriadas do líquido ruminal, após cada diluição, os tubos foram homogêneos durante três minutos e alíquotas de 100 microlitros foram inoculadas em placas estéreis contendo o meio de cultura Ágar Sabouraud. Os inóculos

foram homogeneizados com alças de Drigalski estéreis e as placas foram incubadas em estufa BOD a 39°C e monitoradas para o crescimento de colônias fúngicas por até 21 dias (Kurtzman; Fell,1998; Lacaz et al., 2002).

Análise estatística

Após teste de normalidade e homogeneidade, os dados relativos das digestibilidades foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott utilizando o Sistema para Análises Estatísticas, SAEG, Versão 9.1 (Sistema para Análises Estatísticas). Para a contagem dos fungos procedeu-se à transformação para $\text{Log}_{10}(X+10)$ utilizando o teste de Ducan. Para comparar as populações desses fungos utilizou o mesmo programa estatístico.

Resultados e Discussão

Neste estudo, a análise das sequências da região ITS identificou *Aspergillus terreus*, e *Trichoderma longibrachiatum* com 100% de similaridade, respectivamente para os isolados O45M1 e B13M2 (Tabela 1). Essas espécies também têm sido detectadas no fluido ruminal de bovinos alimentados com forragens tropicais. Em um estudo com bovinos leiteiros alimentados com silagem de sorgo ou cana de açúcar foram identificados os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus* e *Scedosporium*. Entretanto, *Aspergillus* spp. foi o gênero mais frequentemente isolado, representando 55,10% dos fungos identificados (Almeida et al., 2012).

Ao avaliarem fungos micelianos de bovinos zebuínos criados em pastagem tropical em região semiárida (Abrão et al., 2014), identificaram *A. terreus* em amostras de bezerros, novilhos e vacas, enquanto que *T. longibrachiatum* foi isolado apenas em amostras do fluido ruminal dos novilhos.

Tabela 1. Identificação molecular de fungos micelianos isolados do trato digestório de ovinos criados em pastagens tropicais

Identificação [n° Acc. Genbank]	Identificação dos isolados	N° de pb analisados	Similaridade (%)	Abrangência (%)	Resultado BLAST [n° acc. GenBank]
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	B13M2	1136	100%	100%	<i>T. longibrachiatum</i> SKF-3 [KX463453.1]
<i>Aspergillus terreus</i>	O45M1	1062	100%	100%	<i>A. terreus</i> Ef6 [KX 816799.1]

* identificação conduzida usando pesquisas BLASTN do ITS e ITS1 do gene rRNA de fungos micelianos

A DIVMS do feno de *U. decumbens* avaliado no presente experimento variou de 41,94 a 47,31 % (Tabela 1). Essa forragem apresentava baixa qualidade nutricional, demonstrando elevados teores de FDN, FDA e lignina e baixos teores de proteína bruta, extrato etéreo e açúcares totais. Essa forragem foi coletada após o florescimento, no início da estação seca, justificando a baixa digestibilidade ocasionada pela pior composição nutricional. A digestibilidade das gramíneas tropicais varia de 50 a 65% decrescendo 0,1 a 0,2% por dia, conforme aumenta a idade fisiológica da forrageira (Geus, 1979).

A DIVMS do feno de *U. decumbens* foi significativamente maior quando inoculou-se *T. longibrachiatum* (Tabela 2). Entretanto a DIVFDN não foi influenciada pelos inoculantes avaliados ($P>0,05$).

Tabela 2. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de *Urochloa decumbens* inoculada com fungos micelianos provenientes do trato digestório de ovinos

Inóculos	DIVMS (%)	dp	DIVFDN (%)	dp
Controle sem fungos	41,94 b	0,79	40,98 a	1,81
B13 M2 - <i>Aspergillus terreus</i>	42,09 b	1,07	41,06 a	1,25
O45 M1 - <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	47,31 a	1,25	40,54 a	1,55
Mistura dos fungos	44,07 b	0,68	40,43 a	1,72

Médias seguidas por diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. dp= Desvio padrão

O incremento na digestibilidade do feno de baixa qualidade nutricional de *U. decumbens* em 10,2% com a inclusão de *T. longibrachiatum* estaria relacionado a degradação da fração fibrosa e proteína bruta dessa forragem ocasionada pela ação hidrolítica das celulasas produzidas por esse fungo, disponibilizando carboidratos prontamente digestíveis para os microrganismos do fluido ruminal. Fungos do gênero *Trichoderma* têm apresentado expressivas produções de p-glucosidase (Li et al., 2016), xilanasas (Toth et al., 2013), carboximetilcelulase, avicelase, β -Glucosidase, β -Xilosidase, α -Arabinofuranosidase, β -Galactosidase (Morgavi et al., 2000), hemicelulasas, pectinases (Schuster et al., 2010), enzimas importantes na degradação da parede celular vegetal e de estruturas complexas das plantas (Liu et al., 2017).

Nesta pesquisa, a maior taxa de DIVMS observada quando inculou-se *T. longibrachiatum* em relação àquela contatada para a inoculação com *A. terreus* (Tabela 2) corrobora o estudo de (Nurudeen et al., 2015) que comparou a produção de carboximetilcelulase para esses dois fungos. Utilizando a biomassa de sorgo forrageiro, os autores contataram que *T. longibrachiatum* e *A. terreus* secretaram respectivamente 1,82 U/mL e 0,95 U/mL dessas enzimas (Nurudeen et al., 2015). Dessa forma, neste presente estudo, a maior expressão dessa enzima por *T. longibrachiatum* contribuiria para a melhor degradação da parede celular de *U. decumbens* em comparação à cepa de *A. terreus*.

Esses resultados evidenciam o potencial de utilização desse fungo como aditivo microbiano em dieta de ruminantes alimentados com forragens tropicais e corrobora

com outras pesquisas que avaliaram a inclusão de enzimas de fungos micelianos para melhorar a digestibilidade de forrageiras. A combinação de enzimas de microrganismos do rúmen e de extratos enzimáticos exógenos de *T. longibrachiatum* foi avaliada para bovinos (Morgavi et al., 2000). Os autores constataram sinergismo entre essas enzimas ao verificarem que a hidrólise da celulose, xilana e da silagem de milho foram aumentadas em 35, 100, e 40% respectivamente (Morgavi et al., 2000).

Em outra pesquisa avaliaram-se os efeitos da adição de celulases de *Aspergillus niger*, *T. longibrachiatum* e a mistura das celulases desses fungos sobre a digestibilidade *in vitro* de uma dieta contendo 70% de feno de gramínea e 30% de concentrado. A adição dessas celulases exógenas promoveram maior DIVMS e DIVFDN após 24 horas de incubação, entretanto a 48 horas esses efeitos não foram observados, indicando que a adição das celulases exógenas estimularam somente fase inicial de degradação (Giraldo et al., 2007). Diferentemente, nesta pesquisa nos inoculamos o próprio fungo que promoveu elevação dessa digestibilidade mesmo após 48hs de incubação, indicando a produção de celulases por *T. longibrachiatum* durante a fermentação *in vitro* em suco ruminal.

Em outro estudo, diferentes gramíneas utilizadas em pastagens foram avaliadas como substrato para enzimas fibrolíticas de *Aspergillus japonicus* CO3 em fermentações submersas. O gênero *Urochloa* foi que apresentou melhores taxas de degradações com a inclusão do extrato enzimático. Segundo os autores, apesar das forragens tropicais terem baixo valor nutricional, o uso de extratos enzimáticos como pré-tratamento desses alimentos poderia contribuir para melhor degradação das fibras, favorecendo a microbiota ruminal (Facchini et al., 2011).

A adição de enzimas desses fungos em experimentos *in vivo* também tem favorecido a digestibilidade de dietas contendo altas proporções de forragens. A suplementação com xilanase e glucanase produzidas por *Aspergillus* spp. e *Trichoderma* spp. em caprinos promoveu aumento de 10% da digestibilidade aparente da matéria seca de dietas contendo 30% de palha de arroz (Yuangklang et al., 2017). Resultados similares foram reportados para búfalos alimentados com silagem de *Avena sativa* e suplementados com xilanase e celulase de *Trichoderma reesei*, constando-se elevação da digestibilidade *in vivo* em 17,5% (Nawaz et al., 2016).

Quantificação de fungos

Constatou-se a presença de fungos nos cultivos realizados em ambos os períodos de coleta de fluido ruminal para amostras avaliadas no início da fermentação, 24 e 72h (Tabela 3) a população de *Trichoderma longibrachiatum* foi significativamente maior após a digestão ácida ($P < 0,05$).

Tabela 3. Unidades formadoras de colônias (nº/ml) de fungos micelianos durante a digestão *in vitro* do feno de *Urochloa decumbens* inoculado ou não com cepas de fungos provenientes do trato digestório de ovinos

Fungos	Tempo (h)					
	0	dp	24	dp	72	dp
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1,2x10 ⁵ a	17	7,0x10 ³ a	98	3,3x10 ³ a	55
<i>Aspergillus terreus</i>	7,0x10 ³ a	10	3,0x10 ³ a	94	2,0x10 ¹ b	0
Mix	2,3x10 ³ a	23	6,0x10 ³ a	30	1,0x10 ¹ b	11
Controle	2,3x10 ³ a	26	3,0x10 ³ a	50	1,0x10 ¹ b	0

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem pelo teste não paramétrico de Ducan com ($P < 0,05$)

dp= Desvio padrão

Constatou-se contagem de fungos micelianos mesmo no fluido ruminal sem inoculação das cepas selecionadas, indicando que esses grupos de fungos estava presentes naturalmente no fluido ruminal do ovino. Resultados similares foram observados em bovinos criados em pastagem tropical em região semiárida (Almeida et al., 2012; Abrão et al., 2014).

Constatou-se maior população de colônias compatíveis com *T. longibrachiatum* em comparação aos demais tratamentos ($p < 0,05$), após 72 horas em que foi adicionado ácido clorídrico 6N para reduzir o pH, simulando as condições do abomaso. Fungos do gênero *Trichoderma* apresentam crescimento no intervalo de pH 4 e 5, sendo que apenas algumas espécies suportam valores de pH abaixo de 3 (Chahal, 1992). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2008) determina como um dos parâmetros para o enquadramento de um produto como probiótico, seria a sobrevivência a acidez gástrica da cultura comprovada por testes laboratoriais. Esse resultado pode sugerir o potencial biotecnológico da cepa de *Trichoderma longibrachiatum* avaliada, que

poderia atuar também nos ecossistemas do intestino delgado e grosso, o que deve ser avaliado em futuras pesquisas.

Conclusão

A adição da cepa B13 M2 (*T. longibrachiatumi*), proveniente do trato digestório de ovino, promove incremento significativo da DIVMS para o feno de baixa qualidade de *Urochloa decumbens*. Dessa forma, a inclusão desse fungo apresenta potencial promissor para elaboração de probiótico ou aditivo microbiano para dietas de ovinos criados em pastagens tropicais.

Referências Bibliográficas

- ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; ROSA, C. A.; FREITAS, C. E. S.; VIEIRA, E. A.; HUHGES, A. F. S. Characterization of Fungi from Ruminal Fluid of Beef Cattle with Different Ages and Raised in Tropical Lignified Pastures. **Current Microbiology**, v. 69, p. 1-13, 2014.
- ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; PESSOA, M. S.; DOS SANTOS, V. L.; FREITAS JÚNIOR, L. F.; BARROS, K. O.; HUGHES A. F. S.; SILVA, T. D.; RODRIGUEZ, N.M. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. **Plos ONE**, v. 12, p. 1-13, 2017.
- ALMEIDA, P. N. M.; DUARTE, E. R.; ABRÃO, F. O, *et al.* Aerobic fungi in the rumen fluid from dairy cattle fed different sources of forage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 2336-2342, 2012.
- ALMEIDA, P. N. M.; FREITAS, C. E. S.; ABRÃO, F.O.; RIBEIRO, I. C. O.; VIEIRA, E. A.; GERASEEV, L. C.; DUARTE, E. R. Atividade celulolítica de fungos isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. **Revista Caatinga**, v. 27, p. 202-207, 2014.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHENG ZHANG, J. Z.; MILLER, W. LIPMAN, D. J. Gapped BLAST nad PSI-BLAST, a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANKOM, Technology. **Method 3: In vitro true digestibility using the DAISYII Incubator**. Disponível em: http://www.ankom.com/media/documents/IVDMD_0805_D200.pdf. Acesso em 05 de novembro de 2014.
- ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, 2008.
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemistry**. Official methods of analysis. 19th ed. Gaithersburg, 2010. 3000p.
- CARRO, M. D.; P. LEBZIEN.; K. ROHR. Influence of yeast culture on the in vitro fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v.37, p.209–220, 1992.
- CHAHAL, P.D.; CHAHAL, D.S.; ANDRE, G. Cellulase production profile of *Trichoderma reesei* on different cellulosic substrates at various pH levels. **J. Ferment. Bioeng.** V. 74, p. 126-128, 1992.
- FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; BENASSI, V. M.; FREITAS, L. A. P.; REIS, R. A.; JORGE, J. A.; TERENCEZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Optimization of fibrolytic enzyme production by *Aspergillus japonicus* c03 with potential application in ruminant

feed and their effects on tropical forages hydrolysis. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 34, p. 1027–1038, 2011.

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

FREITAS, C. E. S. *et al.* Sheep fed with banana leaf hay reduce ruminal protozoa population. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, p. 807-812, 2017

GEUS, J. G. de. Possibilidades de producción de pastos en los trópicos y subtrópicos. **Zurich**, 1979, 60 p.

GIRALDO, L. A.; TEJIDO, M. L.; RANILLA, J. M.; CARRO, M. D. Effects of exogenous cellulase supplementation on microbial growth and ruminal fermentation of a high-forage diet in rusitec fermenters. **Journal Animal Science**, v. 85, p. 1962-1970, 2007.

HOLDEN, L. A. Comparison of methods in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal Dairy Science**. ed. 82, p.1791-1794. 1999.

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

KURTZMAN, C. P; FELL, J. W. (1998) The yeasts: a taxonomic study. 4. ed. Amsterdam: **Elsevier**,. 1055 p.

LACAZ, C. S. *et al.* **Tratado de micología médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.

LI, C.; LIN, F.; LI, Y.; WEI, W.; WANG, H.; QIN, L.; ZHOU, Z.; LI, B.; WU, F.; CHEN, Z. A β -glucosidase hyper production *Trichoderma reesei* mutant reveals a potential role of cel3D in cellulase production. **Microbial Cell Factories**, v.15, p. 1-13, 2016.

LIU, *et al.* Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma atroviride* strain SS003 in the presence of cell wall of *Cronartium ribicola*. **Genes & Genomics**, v. 39, p.473–484, 2017.

LOUW-GAUME, *et al.* A comparative study on plant growth and root plasticity responses of two *Brachiaria* forage grasses grown in nutrient solution at low and high phosphorus supply. **Plant Soil**, v. 164, p. 155–164, 2010.

MORGAVI, D. P.; BEAUCHEMIN, K. A.; NSEREKO, V. L.; RODE, L. M. IWAASA, A. D.; YANG, W. Z.; MCALLISTER, T. A.; WANG, Y. Synergy Between Ruminant Fibrolytic Enzymes and Enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. **Jounal Dairy Science**, v. 83, p. 1310-1321, 2000.

NAWAZ, H.; SHAHZAD, N.; SAIF-UR-REHMAN, M.; ALI, M. Effect of feeding xylanase and cellulose treated oat silage on nutrient digestibility, growth performance and blood metabolites of Nili Ravi buffalo calves. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 53, p. 999-1004, 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NRC. **Nutrient requirements of small ruminants**. Washington, D. C.: National Academy Press, 2007. 362 p.

NOCEK, J. E.; RUSSELL, J. B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.71, p. 2070-2107, 1988.

NURUDEEN et al., 2015. Cellulase and Biomass Production from Sorghum (*Sorghum guineense*) Waste by *Trichoderma longibrachiatum* and *Aspergillus terreus*. **Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 169-174.

PESSOA-FILHO, *et al.* Molecular dating of phylogenetic divergence between *Urochloa* species based on complete chloroplast genomes. **BMC Genomics**. v. 18, p. 516-520, 2017.

ROSA, L. H.; VAZ, A. B. M.; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv (Poaceae). **Polar Biology**, v. 32, p. 161-167, 2009.

SAEG. **Sistema para análises estatísticas**: versão 9.1.: Fundação Arthur Bernardes. Viçosa: UFV, 2007.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 787-799, 2010.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v. 18, p. 104-111, 1963.

TOTH, K.; VAN GOOL, M. P.; SCHOLS, H. A.; SAMUELS, G. J.; GRUPPEN, H. SZAKAES, G. diversity in production of xylan degrading enzymes among species belonging to the *Trichoderma section longibrachiatum*. **BioEnergy Research**, v. 6, p. 631-643, 2013.

WANG, H.; LI, K.; HU, XIAOJIAO.; LIU, Z.; WU, Y.; HUANG, C. Genome-wide association analysis of forage quality in maize mature stalk. **BMC Plant Biology**, p.16-227, 2016.

WEI, *et al.* Isolation, identification and fibrolytic characteristics of rumen fungi grown with indigenous methanogen from yaks (*Bos grunniens*) grazing on the Qinghai-Tibetan Plateau. **Journal of Applied Microbiology**, v.120, p.571-587, 2015.

WHITE, T. J, BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds) **PCR protocols, a guide to methods and applications**. Academic Press San Diego. 1990;pp 315-322.

YUANGKLANG, C.; SCHONEWILLE, J. TH.; ALHAIDARY, A.; VASUPEN, K.; BUREENOK, S.; SEANMAHAYAK, B.; WONGSUTHAVAS, S.; BEYNEN, A. C. Growth performance and macronutrient digestion in goats fed a rice straw based ration supplemented with fibrolytic enzymes. 2017. **Small Ruminant**, v. 154, p. 20-22, 2017

Experimento II

Digestibilidade *in vitro* de *Urochloa decumbens* inoculada com leveduras isolados do trato gastrointestinal de ovinos

Resumo – Em regiões tropicais, as pastagens representam o recurso mais importante na produção de ruminantes, fornecendo substratos energéticos de baixo custo, principalmente carboidratos fibrosos. Nesta pesquisa avaliou-se coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de feno de *Urochloa decumbens* com adição de cepas de leveduras provenientes do fluido ruminal de ovinos. Foi utilizado um ovino com fístula ruminal, como doador de fluido ruminal para determinação dos coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro de *U. decumbens*. Durante o ensaio de digestibilidade *in vitro*, foram realizadas três coletas do fluido ruminal das câmaras de fermentação, no tempo zero, às 24 horas e às 72 horas quando foi adicionado o ácido clorídrico 6 N. A DIVFDN não foi influenciada pela inclusão dos inóculos contendo as leveduras. Em relação DIVMS constatou-se média inferior para ICA/UFMG LR 016 ($P < 0,05$) para os dois tipos de saquinhos. Para a DIVFDN observou-se média inferior para o Mix (ICA/UFMG LP 030 e ICA/UFMG LR 016) em ambos os sacos de fermentação avaliados neste experimento ($p < 0,05$). A população de ICA/UFMG LR 016 foi significativamente maior após a digestão ácida em comparação aos demais tratamentos ($P < 0,05$). Esses resultados pode sugerir o potencial biotecnológico que ICA/UFMG LR 016 apresenta para produção de probiótico.

Palavras-chave: Forragem, nutrição de ruminantes, ovinocultura, probióticos, rúmen.

Introdução

Em regiões tropicais, as pastagens representam o recurso mais importante na produção de ruminantes, fornecendo substratos energéticos de baixo custo, principalmente carboidratos fibrosos (Comastri Filho et al., 2008). Contudo, a sazonalidade de produção no período seco do ano resulta em baixa disponibilidade e menor qualidade dessas forragens representando o principal desafio dos sistemas de produção em pastagens (Paulino et al., 2008).

O gênero *Urochloa* (*Brachiaria*) tem sido amplamente utilizado como forrageira em regiões de clima tropical, por possuírem características como tolerância à seca e a solos de pouca fertilidade, bem como boa produção de massa vegetal. Assim, otimizar a degradação dessa forragem principalmente durante o período de escassez hídrica, é essencial, uma vez que ela é uma das principais fontes de alimento para ruminantes criados em pastagens no Brasil. (Lima et al., 2015).

Os ruminantes possuem um sistema de pré-estômago com ampla variedade microbiana que contribui de forma simbiótica para degradação das fibras vegetais ingeridas (Kamra, 2005). A adição de aditivos microbianos contendo cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tem promovido equilíbrio nesse ecossistema com redução do teor de oxigênio ruminal, incremento da população bacteriana ruminal e elevando teores de proteína microbiana (França e Rigo, 2011). Esses eucaritos tem reduzido os teores de ácido láctico, controlando o pH ruminal e favorecendo a digestão da celulose, com o aumento do número de bactérias celulolíticas. Outros estudos têm demonstrado ainda redução de casos de acidoses e diarreias e apontam a redução da excreção fecal de bactérias patogênicas (Krisova et al., 2011; Marrero et al., 2015).

Apesar de serem pouco estudadas no ecossistema ruminal, pesquisas indicam a ocorrência natural de leveduras em populações significativas no fluido ruminal de animais alimentados com forragens tropicais (Lund, 1974; Almeida et al., 2012; Abrão et al., 2014; Marrero et al., 2011).

Em outro estudo, Abrão et al. (2011) relatam concentrações significativas da levedura *Pichia membranifaciens* no rúmen de caprinos de corte criados em pastagens tropicais. Almeida et al. (2012), ao analisarem a população de leveduras no trato gastrointestinal de bovinos leiteiros sugeriram que as leveduras são capazes de degradar carboidratos simples, o que poderia favorecer o desenvolvimento da microbiota ruminal e contribuir para a regulação do pH ruminal.

Cepas de leveduras provenientes de ruminantes criados em condições semiáridas e mais adaptadas às condições tropicais poderiam apresentar melhor capacidade de produção de enzimas e metabólitos favorecendo o ambiente ruminal e consequentemente a produção desses animais.

Neste trabalho avaliou-se os coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de feno de *U. decumbens* com adição de cepas de leveduras provenientes do fluido ruminal de ovinos utilizando sacos Ankon-F57 e TNT.

Material e Métodos

Isolados de leveduras avaliadas

Neste estudo foram avaliados dois isolados leveduriformes provenientes do rúmen de ovinos alimentados com feno de *Cynodon dactylon* cv. Vaqueiro no norte de Minas Gerais, Brasil, durante a estação seca (Freitas et al., 2017). Essas leveduras foram cultivadas em caldo Sabouraud e armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

Para identificação dos isolados procedeu-se a análise das sequências dos domínios D1 e D2 do gene 26S do RNA ribossomal, amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração do DNA total foi realizada de acordo com Hoffman e Winston (1987) e os iniciadores NL1 (5'-GCA TAT CAA AAG GAA GAG TAA GCC-3') e NL4 (5'-GGT AAG CTT CGC TGT CCG G-3') foram usados para a amplificação da região do DNAr como descrito por Burgaud et al. (2013), com modificações. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada numa solução contendo 2,0 µL de DNA (aproximadamente 100 ng); 2,0 µL de cada iniciador, NL1 e NL4 a 10 µmol-1; 5,0 µL tampão PCR 5X; 2,0 µL de MgCl₂, 25 mM; 1,5 µL de dNTP, 10 mM; e 0,3 µL de polimerase Taq DNA; com água ultrapura esterilizada para um volume final de 50 µL. O protocolo consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 54°C, e 2 minutos de extensão a 72°C e uma extensão final de 2 min a 72°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg ml⁻¹), em tampão TBE 1X, sob voltagem de 70V por aproximadamente 1 hora.

Os géis foram visualizados sob luz UV e fotografados pelo equipamento ProteinSimple, Alphamager HP system. Os *amplicons* produzidos foram purificados com utilização de EDTA e etanol absoluto quantificados em NanodropTM 1000 a 260 e 280 nm. As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas e comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa Blast N (Altschul et al. 1997). Para ser considerado pertencente a uma determinada espécie, o isolado teria que apresentar similaridade de 97% a outra já depositada no GenBank (Stackebrandt e Goebel, 1994).

Experimentação

Avaliou-se a digestibilidade *in vitro* de *Urochloa decumbens* inoculada com as duas cepas de leveduras. As fermentações ocorreram no simulador de rúmen (DaisyII Ankon®) o material lignocelulósico foi acondicionado em saco Ankon F-57 e sacos TNT.

O experimento foi conduzido com delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2x2), sendo dois fungos, dois tipos de saquinhos avaliados. Foram realizadas três repetições para cada tratamento e seus respectivos controles. As variáveis observadas foram a digestibilidade *in vitro* da matéria seca, e do FDN e a quantificação de fungos durante três períodos durante o processo de digestão.

FORAGEIRA AVALIADA

O feno de *Urochloa decumbens* relatado no experimento I de digestibilidade.

Coleta de fluido ruminal

Como relatada no experimento de digestibilidade.

Digestibilidade in vitro da matéria seca e da fibra em detergente neutro do feno de Urochloa decumbens

Para preparação dos inóculos, as leveduras foram cultivados em caldo Sabouraud a 39°C durante 48 h e padronizados na concentração aproximada de 10⁷ unidades formadoras de colônias UFC/mL. Foram avaliados os coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) do feno da forrageira, segundo a metodologia descrita por, (Tilley e Terry, 1963) e reportada anteriormente.

Em cada câmara de fermentação foram utilizados oito saquinhos Ankon F-57 e oito de TNT (Tecido não Tecido) os saquinhos foram confeccionados com as mesmas dimensões dos saquinhos Ankon (5 x 7 cm). Em cada câmara fermentativa foi inoculado 100 mL de caldo Sabouraud estéril (controle) ou contendo *Pichia* sp.(O151), *Rhodotorula* sp. (O166) ou a mistura contendo 50 mL de cada uma dessas cepas desses fungos. O experimento foi repetido três vezes com o intervalo de 15 dias.

Coleta e Quantificação de fungos

Como descrito anteriormente

Análise estatística

Após teste de normalidade e homogeneidade no experimento 1, os dados relativos das digestibilidades foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

Avaliou-se a normalidade e homocedasticidade. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott. Para a contagem dos fungos procedeu-se à transformação para $\text{Log}_{10}(X+10)$ utilizando o teste de Ducan. Os dados foram processados no Software estatístico SAEG-Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (2007), e as médias comparadas ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Nesta pesquisa foram identificadas as leveduras *Pichia kudriavzevii* e *Rhodotorula mucilaginosa* (Tabela 4). Essas duas espécies já foram relatadas em outras pesquisas que avaliaram a microbiota ruminal de ruminantes criados em pastagens lignificadas. Em um estudo realizado na região norte de Minas Gerais com novilhas e vacas Holandesas alimentadas com forragem tropical, 84% dos isolados corresponderam a espécie *P. kudriavzevii* (Almeida et al. 2012). Em outra pesquisa também realizada nessa região com bovinos de corte zebuínos de diferentes idades e criados em pastagem tropical, 56% dos isolados de leveduras foram identificados como *P. kudriavzevii* (Abrão et al. 2014). Em estudo anterior, Lund (1974) também isolou *P. kudriavzevii* (*C. Krusei*) de amostras do fluido ruminal de vacas leiteiras híbridas, correspondendo à espécie mais frequentemente identificada, 50%.

O gênero *Rhodotorula* é comum no ambiente e pode ser encontrada em amostras de solo, água, leite, sucos de frutas e amostras de ar (Guamán-Burneo e Carvajal-Barriga, 2009). A espécie *R. mucilaginosa* possui capacidade de assimilar glicose, sacarose e galactose (Jimoh et al. 2011).

A ocorrência dessas leveduras em ruminantes ainda é pouco respaldada na literatura científica (Abrão et al. 2011). Frequentemente os estudos da microbiota ruminal tem ignorado a presença de fungos leveduriformes no ecossistema ruminal. Apesar das duas espécies de leveduras identificadas neste estudo já terem sido também reportadas em outras pesquisas avaliando o líquido ruminal, o papel desses eucariotos devem ser melhor elucidados no ecossistema ruminal.

Em relação DIVMS constatou-se média inferior para levedura *Rhodotorula mucilaginosa* ($P < 0,05$) para os dois tipos de saquinhos (Tabela 5). Para a DIVFDN (Tabela 5) observou-se média inferior para o Mix de leveduras (*Pichia kudriavzevii* e *Rhodotorula mucilaginosa*) em ambos os sacos de fermentação avaliados neste experimento ($p < 0,05$).

Tabela 4. Identificação molecular de fungos leveduriformes isolados do trato digestório de ovinos criados em pastagens tropicais

Identificação [n° Acc. Genbank]	Identificação dos isolados	N° de pb analisados	Similaridade (%)	Abrangência (%)	Resultado BLAST [n° acc. GenBank] e número de acesso
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	O166	587	99%	100%	<i>Rhodotorula mucilaginosa SM6-1</i> [KU316790.1]
<i>Pichia kudriavzevii</i>	O151	580	10%	100%	<i>Pichia kudriavzevii</i> JW2-1 [KU316741.1]

Identificação conduzida usando pesquisas BLASTN do D1/D2 do gene rRNA de levedura

Tabela 5. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) de *Urochloa decumbens* acondicionada em saquinhos (F57-Ankon) ou tecido não tecido (TNT) e inoculada com fungos leveduriformes provenientes do trato digestório (ou do rúmen) de ovinos

Inóculo	DIVMS (%)		DIVMS (%)		DIVFDN (%)		DIVFDN (%)	
	Saco Ankon	dp	Saco TNT	dp	Saco Ankon	dp	Saco TNT	dp
Controle sem leveduras	58,50 Ab	1,59	61,32 Aa	1,47	36,65 Aa	1,70	39,56 Ab	1,41
<i>Pichia kudriavzevii</i>	59,60 Ab	1,48	61,67 Aa	0,95	36,45 Aa	1,52	39,86 Ab	0,64
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	57,49 Ba	0,81	59,85 Bb	1,31	36,65 Aa	1,13	39,62 Ab	1,30
Mistura das leveduras	59,26 Aa	1,55	62,92 Ab	0,66	36,01 Ba	1,49	39,08 Bb	0,51

Diferentes letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas indicam médias distintas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. dp= desvio padrão

A utilização de aditivos microbianos na dieta dos ruminantes visa aprimorar a utilização dos alimentos e, por conseguinte melhorar o desempenho produtivo. Apesar de não se observar diferenças significativas da DIVMS do feno de *U. decumbens* com F57-Ankon e TNT, a adição da levedura *Pichia kudriavzevii* aumentou a atividade fibrolítica no rúmen, o que pode ter aprimorado a utilização dos nutrientes para na DIVMS, e consequentemente ocorreu aumento em 1,1% em relação ao controle. Além disso, *P. kudriavzevii* apresentam três genes que codificam fitases. Esta classe de enzimas tem importância significativa na melhoria da desfosforilação do fitato (Greiner, Konietzny et al., 2006), que pode melhorar a nutrição animal.

Um dos motivos que justifica as diferenças observadas na digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) do feno inoculado com as leveduras avaliadas poderiam ser elucidadas pelo tipo de material utilizado. O saco TNT possibilita perdas de partículas ocasionada pela estrutura de porosidade que o tecido apresenta (Casali et al., 2009). Com isso pode-se ressaltar que a composição e organização estrutural dos tecidos avaliados pode ter interferido na DIVMS e DIVFDN do feno de *U. decumbens*, fazendo com que a *Pichia kudriavzevii* e o Mix leveduras (*Pichia kudriavzevii* e *Rhodotorula mucilaginosa*) apresentasse menor média de digestibilidade quando utilizou o F57 Ankon e o TNT. Possivelmente as leveduras poderia ter ficadas aderidas em biofilmes nos materiais fibrosos dificultado a remoção.

Ao comparar as DIVMS e DIVFDN, constatou-se que ao utilizar TNT observou-se maiores coeficientes de digestibilidade (Tabela 5). Esses resultados corroboram com o estudo de Cichoski et al. (2009) que avaliaram DIVMS e DIVFDN de quatro forrageiras utilizando sacos de náilon e TNT, comparados aos sacos Ankon. Os autores constataram que os sacos de náilon e TNT superestimaram os valores obtidos em relação ao saco F-57 Ankon. Entretanto reportaram que seria possível utilizar os sacos de TNT e náilon, desde que sejam feitas correções por meio de equações para cada material utilizado.

Quantificação de leveduras

Durante os três períodos de coleta observou-se a presença de leveduras nos cultivos realizados em ambos os períodos de coleta de fluido ruminal para amostras avaliadas (Tabela 3) a população de *Rhodotorula mucilaginosa* foi significativamente maior após a digestão ácida em comparação aos demais tratamentos ($P < 0,05$).

Tabela 6. Unidades formadoras de colônias (n^o/ml) durante o processo de fermentação *in vitro* do feno de *Urochloa decumbens* inoculado ou não com leveduras do fluido ruminal de ovinos

Fungos	Tempo (h)					
	0	dp	24	dp	72	dp
<i>Pichia kudriavzevii</i>	2,6x10 ³ a	38	4,0x10 ³ a	35	1,0x10 ¹ b	0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	15x10 ³ a	38	11x10 ³ a	36	2,6x10 ² a	26
Mistura das leveduras	4,0x10 ³ a	20	7,0x10 ³ a	21	1,0x10 ¹ b	21
Controle	2,3x10 ³ a	40	3,0x10 ³ a	40	0,6x10 ¹ b	10

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não diferem pelo teste não paramétrico de Ducan com (P<0,05). dp= Desvio padrão

Constatou-se contagem de leveduras mesmo no fluido ruminal sem inoculação das cepas selecionadas, indicando que esses grupos de fungos estava presente naturalmente no fluido ruminal do ovino. Esse resultado corrobora os estudos anteriores que reportam a ocorrência natural de leveduras no fluido ruminal de bovinos alimentados com forrageiras tropicais (Lund, 1974; Almeida et al. 2012; Abrão et al. 2014; Marrero et al. 2011). Essas leveduras de animais mais adaptados às condições tropicais poderiam apresentar melhor capacidade de produção de enzimas e metabólitos favorecendo o ambiente ruminal e conseqüentemente a produção dos ovinos.

A levedura do gênero *Rhodotorulla* foi predominante após a digestão ácida, indicando a sobrevivência e permanência dessas leveduras na fermentação *in vitro* do fluido ruminal incubado juntamente com o feno de *U. decumbens*. Esta levedura poderia ser utilizada como probiótico, pois apresenta parâmetros para o enquadramento de um produto probiótico que sobreviveria ao pH do abomaso (Anvisa, 2008).

Conclusão

A adição da cepa O166 (*Rhodotorula mucilaginosa*), proveniente do trato digestório de ovino, apresenta potencial promissor para elaboração de probiótico ou aditivo microbiano para dietas de ovinos criados em pastagens tropicais.

Os sacos F57 Ankon e o TNT podem interferir na DIVMS e DIVFDN. O saco TNT devido a sua estrutura de porosidade que possibilita perdas de partículas.

Referências Bibliográficas

- ABRÃO, F. O.; FREITAS, C. E. S.; DUARTE, E. R., *et al.* Leveduras no rúmen de caprinos e bovinos de corte criados em pastagem tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 526-529, 2011.
- ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; ROSA, C. A.; FREITAS, C. E. S.; VIEIRA, E. A.; HUHGES, A. F. S. Characterization of Fungi from Ruminal Fluid of Beef Cattle with Different Ages and Raised in Tropical Lignified Pastures. **Current Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1-13, 2014.
- ALMEIDA, P. N. M.; DUARTE, E. R.; ABRÃO, F. O., *et al.* Aerobic fungi in the rumen fluid from dairy cattle fed different sources of forage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 2336-2342, 2012.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHENG ZHANG, J. Z.; MILLER, W. LIPMAN, D. J. Gapped BLAST nad PSI-BLAST, a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANKOM, Technology. **Method 3: In vitro true digestibility using the DAISYII Incubator**. Disponível em: http://www.ankom.com/media/documents/IVDMD_0805_D200.pdf. Acesso em 05 de novembro de 2014.
- ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, 2008.
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemistry**. Official methods of analysis. 19th ed. Gaithersburg, 2010. 3000p.
- BURGAUD, G.; WOEHLKE, S.; RÉDOU, V. *et al.* Deciphering the presence and activity of fungal communities in marine sediments using a model estuarine system. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 70, p. 45-62, 2013.
- CARRO, M. D.; P. LEBZIEN.; K. ROHR. Influence of yeast culture on the in vitro fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v.37, p.209–220, 1992.
- CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C., *et al.* Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.130-138, 2009.
- CHAN, G. F.; GAN, H. M.; LING, H. L.; RASHID, N. A. A. Genome Sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a Potential Producer of Bioethanol and Phytase. **Genome Announcement**. v. 11, p. 1300-1301, 2012.
- CICHOSKI, E.; SANTOS, G. T.; SILVA, D. C.; CECATO, U.; SANTOS, W. B. R.; MARTINS, E. N.; GASPARINO, E. Diferentes tipos de sacos para análise da digestibilidade *in vitro* de forrageiras. **Archivos Zootecnia**, Córdoba, v. 58, p.749-752, 2009.

COMASTRI FILHO, J. A.; POTT, A.; CRISPIM, S. M. A. Atualização Metodológica Complementar para Avaliação de Germoplasma de Forrageiras: **EMBRAPA**, Documentos, v. 97, p. 20, 2008.

FRANÇA, R. A.; RIGO, E. J. Utilização de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) na nutrição de ruminantes – uma revisão. **FAZU em Revista**. V.8, p.187-195, 2011.

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

FREITAS, C. E. S. *et al.*, Sheep fed with banana leaf hay reduce ruminal protozoa population. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, p. 807-812, 2017

GUAMÁN-BURNEO C.; CARVAJAL-BARRIGA J. Characterization and identification of isolates of carotenogenic yeast strains from several natural zones of Ecuador. **Universitas Scientiarum**, v. 14, p. 187-197, 2009.

GREINER R, KONIETZNY U. Phytase for food application. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 125–140, 2006.

HOFFMAN, C. S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. **Gene**, v. 57, p. 267–272, 1987.

HOLDEN, L. A. Comparison of methods in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal Dairy Science**. ed. 82, p.1791-1794. 1999.

JIMOH, S. O.; ADO, S. A.; AMEH, J. B.; WHONG, C. M. Z. Characteristics and diversity of yeast in locally fermented beverages sold in Nigeria. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 6, p. 389–392, 2011.

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

KŘÍŽOVÁ, L.; RICHTER, M.; TŘINÁCTÝ, J.; ŘÍHA, J.; KUMPRECHTOVÁ, D. The effect of feeding live yeast cultures on ruminal pH and redox potential in dry cows as continuously measured by a new wireless device. **Czech Journal of Animal Science**, v. 1, p 37–45, 2011.

KURTZMAN, C. P; FELL, J. W. (1998) The yeasts: a taxonomic study. 4. ed. Amsterdam: **Elsevier**, 1055 p.

LACAZ, C. S. *et al.* **Tratado de micologia médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.

LIMA, F. G.; LEE, S. T.; PFISTER, J. A.; MIYAGI, E. S.; COSTA, G. L.; SILVA, R. D.; FIORAVANTI, M. C. S. O efeito da ensilagem e fenação sobre as concentrações de saponina esteroide em duas espécies de gramíneas *brachiaria*. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p. 858-86

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

MARRERO, Y.; CASTILLO, Y.; BURROLA-BARRAZA, M. E. *et al.* Morphological, biochemical, and molecular identification of the yeast Levica 25: A potential ruminal microbial additive. *Glo. Vet.* v. 1, p. 60-65, 2011.

MARRERO, Y.; CASTILLO, Y.; RUIZ, O., *et al.* Feeding of yeast (*Candida* spp.) improves in vitro ruminal fermentation of fibrous substrates. *J Integr Agric*, v. 14, p. 514-519, 2015.

NOCEK, J. E.; RUSSELL, J. B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *Journal of Dairy Science*, v.71, p. 2070-2107, 1988.

PAULINO, M. F.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C. Bovinocultura funcional nos trópicos. In: VI Simpósio de produção de gado de corte e II Simpósio internacional de produção de gado de corte. *Anais...* v. 6, p. 275-305, 2008.

ROSA, L. H.; VAZ, A. B. M.; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C. A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv (Poaceae). *Polar Biology*, v. 32, p. 161-167, 2009.

SAEG. **Sistema para análises estatísticas**: versão 9.1.: Fundação Arthur Bernardes. Viçosa: UFV, 2007.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 44, p.846-849, 1994.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society*, v. 18, p. 104-111, 1963.

WHITE, T. J, BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds) **PCR protocols, a guide to methods and applications**. Academic Press San Diego. 1990; pp 315-322.