

Nota Técnica

População fúngica aeróbia ruminal de ovinos recebendo torta de macaúba

Antonio Carlos R. dos Santos¹, Paula M. Barbosa¹, Rafael A. de Azevedo¹,
Welder A. Baldassini¹, Eduardo R. Duarte¹, Luciana C. Geraseev*¹

¹Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. ²Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil. *Correio Eletrônico: lgeraseev@gmail.com

RESUMO

Fungos provenientes do ambiente ruminal podem representar potencial promissor para degradar componentes fibrosos vegetais. Nesta pesquisa, objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes níveis de inclusão da torta de macaúba (TM) na dieta de cordeiros, sobre a população de fungos aeróbicos do rúmen. Vinte e quatro cordeiros Santa Inés foram distribuídos em um delineamento de blocos casualizados, com quatro tratamentos e seis repetições. Os tratamentos foram 0, 100, 200 e 300 g/kg da TM. Alíquotas de 100 µL de líquido ruminal foram inoculadas em placas estéreis contendo o meio de cultura ágar Sabouraud. As placas foram incubadas e foi realizado o monitoramento do crescimento de colônias fúngicas por até sete dias. Realizou-se a identificação dos fungos micelianos por microcultivo de 45 isolados. O aumento dos níveis de inclusão da TM na dieta resultou em aumento linear na concentração de fungos micelianos ($P<0,01$) e diminuição linear na concentração de fungos leveduriformes ($P<0,01$). Verificou-se maior diversidade de gêneros de fungos micelianos em cordeiros alimentados com menores níveis de inclusão da TM na dieta. O gênero mais frequente nas dietas com inclusão de 200 e 300 g/kg da TM foi o *Aspergillus*, o qual poderia ter contribuído com a degradação das fibras presentes na TM.

Palavras-chave: *Acrocomia aculeata*, macauba, micobiota, ovinos, parâmetros ruminais.

Population of ruminal aerobic fungi in lambs fed with macaúba meal

ABSTRACT

Fungi from the ruminal environment could present promising potential to degrade plant fibrous components. The objective in this study was to evaluate the effects of the levels of macauba meal (MM) in the diet of lambs, on the population of aerobic rumen fungi. Twenty-four Santa Inés lambs were distributed in a randomized block design with four treatments and six replications. The treatments were 0, 100, 200 and 300 g/kg of TM. Aliquots of 100 µL of ruminal fluid were inoculated into the sterile plates containing agar Sabouraud medium. The growth colonies were monitored for seven days and the identification of mycelial fungi was performed by microculture of 45 isolates from rumen fluid. Increased levels of MM in the diet resulted in higher ($P<0.01$) concentration of mycelial fungi and reduction ($P<0.01$) of the yeast population. Higher genera diversity of mycelial fungi from lambs fed with lower levels of MM was observed. The most frequent genus for 200 and 300 g/kg inclusions was *Aspergillus* that could be contributing to fiber digestibility of the MM.

Key words: *Acrocomia aculeata*, macauba, mycobiota, ruminal parameters, sheep.

Población de hongos aeróbicos ruminales en corderos alimentados con torta de macaúba

RESUMEN

Los hongos del ambiente ruminal podrían presentar un potencial prometedor para degradar los componentes fibrosos de las plantas. El objetivo en este estudio fue evaluar los efectos de la inclusión de varios niveles de harina de macaúba (HM) en la dieta de corderos sobre la población de hongos ruminales aeróbicos. Veinticuatro corderos Santa Inês fueron distribuidos en un diseño de bloques al azar, a cuatro tratamientos y seis repeticiones. Los tratamientos fueron 0, 100, 200 y 300 g/kg de HM. Se inocularon alícuotas de 100 µl de fluido ruminal en placas estériles que contenían medio Sabouraud. El crecimiento de las colonias de hongos se monitoreó durante siete días y la identificación de hongos filamentosos se realizó mediante microcultivo de 45 aislados. Los niveles incrementales de HM en la dieta promovieron una concentración más alta ($P < 0,01$) de hongos miceliales y reducida población de levaduras ($P < 0,01$). Se observó una mayor diversidad de géneros de hongos miceliales en corderos alimentados con menores niveles de inclusión de HM. El género más frecuente en los niveles de 200 y 300 g/kg fue *Aspergillus* spp. que podría estar contribuyendo con la digestibilidad de la fibra de HM.

Palabras clave: *Acrocomia aculeata*, macaúba, microbiota, parámetros ruminales, ovejas,

INTRODUÇÃO

A microbiota ruminal é principalmente constituída por bactérias (10^{10} /mL), protozoários ciliados (10^6 /mL), fungos anaeróbios (10^6 /mL), os quais interagem entre si de diversas formas (Russel *et al.* 2001, Kamra 2005). Dentre esses microrganismos, os fungos autóctones do rúmen assumem papel relevante por serem pioneiros na colonização dos tecidos vegetais, propiciando com que outros microrganismos utilizem os carboidratos solúveis presentes internamente à parede celular (Wang *et al.* 2017). Pesquisas têm demonstrado a presença de fungos micelianos e leveduriformes no rúmen com potencial biotecnológico, sendo o crescimento desses microrganismos dependentes de fatores intrínsecos e extrínsecos aos animais, como a categoria animal e o alimento fornecido (Abrão *et al.* 2014).

A torta da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.), é um resíduo da extração do óleo da polpa do coco, que pode ser utilizado na alimentação de ruminantes (de Azevedo *et al.* 2012; de Azevedo *et al.* 2013b). Não obstante, este coproduto pode alterar a microbiota ruminal, devido aos teores elevados de carboidratos fibrosos na torta de macaúba, representado por 49,4 % de fibra em detergente ácido (FDA) e 72% de fibra em detergente neutro (FDN, além de lipídeos,

representado por 19,2 % de extrato etéreo (EE), de acordo com dados relatados por dos Santos *et al.* (2015, 2017). Com base no acima, objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito do fornecimento desse coproduto sobre a população de fungos micelianos e leveduriformes do rúmen de ovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais aprovou os procedimentos utilizados com os animais (Protocolo: 87/2008).

Utilizou-se 24 cordeiros Santa Inês, com idade média de cinco meses e peso corporal de $23,9 \pm 0,6$ kg, os quais foram distribuídos em um delineamento de blocos casualizados, com quatro tratamentos e seis repetições. Os tratamentos consistiram em dietas contendo 0, 100, 200 e 300 g/kg da TM na matéria seca. O período experimental foi de 70 dias, sendo os 10 dias iniciais para adaptação dos animais. No início do período de adaptação os animais foram alojados individualmente em baias de 1,0 x 1,0 m, identificados, tratados com antihelmíntico (Aldazol 10 CO® laboratório Vallée SA, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil), e imunizados para clostridiose

(POLI-R® laboratório Vallée SA, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil).

Durante o período experimental a alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, em horários preestabelecidos as sete e às 17 horas, ajustada de forma a manter as sobras em 20 % do oferecido. A tabela 1 mostra a composição das dietas experimentais; elas foram isonitrogenadas e formuladas de acordo com as recomendações do NRC (2007).

Ao final do período experimento, os borregos foram submetidos a jejum de sólidos por 12 horas e abatidos por sangria após concussão cerebral em frigorífico com inspeção municipal. Após o abate foram coletadas amostras de líquido ruminal de cada cordeiro, por incisão do saco ventral do rúmen.

Coletou-se aproximadamente 15 mL de fluido ruminal, com auxílio de pipetas estéreis. As amostras foram armazenadas em tubos de ensaio e transportadas em caixas isotérmicas, a 4°C para o laboratório. Foram conduzidas análises físico-químicas como cor, odor, viscosidade e tempo de redução do azul de metileno (PRAM) na

concentração 0,03 % (Dirksen 1993). Mensurou-se o pH do líquido ruminal com uso de potenciômetro digital, imediatamente após a coleta.

As variáveis avaliadas foram contagem de unidade formadora de colônias (UFC), no perfil da população fúngica miceliana e nas características do líquido ruminal. Para os cultivos micológicos, transferiu-se alíquotas de 1000 µL para tubos contendo 9,0 mL de solução salina estéril, para preparar diluições decimais seriadas até a diluição 10⁻⁸ (de Almeida *et al.* 2012). Inoculou-se alíquotas de 100 µL em placas estéreis contendo o meio de cultura ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (150 mg/L). Os regentes desse meio foram solubilizados em água destilada estéril e esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

A incubação foi realizada a 39°C e monitorou-se o crescimento de colônias fúngicas por até sete dias (Lacaz *et al.* 2002). Após esse período as colônias foram quantificadas em um contador de colônias e aquelas predominantes foram reisoladas em tubos contendo o mesmo meio de cultura. Realizou-se a técnica de microcultivo de

Tabela 1. Composição percentual e química bromatológica das dietas experimentais

Ingredientes	Níveis (g/kg) da TM na dieta			
	0	100	200	300
Silagem de Sorgo (g/kg de MS)	300,0	300,0	300,0	300,0
Farelo de Soja (g/kg de MS)	149,8	153,0	156,1	159,3
Milho (g/kg de MS)	486,5	384,0	281,4	178,9
Caroço de Algodão (g/kg de MS)	50,0	50,0	50,0	50,0
Torta de Macaúba (g/kg de MS)	0,00	100,0	200,0	300,0
Fosfato Bicálcico (g/kg de MS)	3,3	3,3	3,4	3,4
Calcário (g/kg de MS)	7,4	6,7	6,1	5,4
Sal Comum (g/kg de MS)	2,8	2,8	2,8	2,8
Premix Mineral (g/kg de MS)	0,2	0,2	0,2	0,2
Matéria seca (g/kg)	729,2	739,4	743,0	748,0
Proteína bruta (g/kg da MS)	150,1	158,8	158,1	157,4
Extrato etéreo (g/kg da MS)	39,0	49,5	62,0	67,9
Fibra em detergente neutro (g/kg da MS)	320,9	363,5	408,8	431,7
Fibra em detergente ácido (g/kg da MS)	167,5	203,3	249,6	272,3
Carboidratos totais (g/kg da MS)	768,1	744,9	728,0	716,1
Carboidratos não fibrosos (g/kg da MS)	447,2	381,4	319,2	284,4

45 isolados provenientes do fluido ruminal dos cordeiros para a identificação dos fungos micelianos e as características micromorfológicas foram evidenciadas a luz do microscópio óptico com objetivas de 10 e 40X (Lacaz *et al.* 2002). Os fungos foram identificados de acordo com as características descritas em de Hoog *et al.* (2000) e Lacaz *et al.* (2002).

Os dados foram analisados de acordo com o procedimento GLM do SAS (versão 9.1; SAS Institute Inc., Cary, Carolina do Norte, EUA). Os dados de contagem de UFC foram analisados após transformação logarítmica (\log_{10}) e, em seguida a análise de regressão foi utilizada para as variáveis de contagem de UFC e de características do líquido ruminal. Para a análise do perfil da população de fungos micelianos, os valores absolutos dos gêneros identificados foram comparados, utilizando-se o teste de Qui-quadrado com nível de significância de 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inclusão da TM nas dietas alterou as características físicas do fluido ruminal. A característica viscosidade foi a mais influenciada, os animais alimentados com TM apresentaram fluido ruminal

aquoso, enquanto a maioria dos cordeiros recebendo a dieta controle apresentou fluido ruminal espesso. Entretanto, não foram observadas alterações nos valores médios de potencial de redução do azul de metileno (PRAM) e de pH com a inclusão de TM (Tabela 2). Dessa forma, esse coproduto não estaria comprometendo atividade da microbiota ruminal ao considerar esses parâmetros.

Os valores de PRAM verificados nesta pesquisa foram semelhantes aos descritos por Dirksen (1993), que em caso de atividade ruminal muito ativa, o azul de metileno é reduzido em até três minutos. Os valores de pH estiveram sempre acima de 6,5 indicando que o ambiente ruminal permaneceu favorável ao desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela degradação de carboidratos fibrosos.

Os gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* foram isolados nos quatro tratamentos (Tabela 2). Sendo que o gênero *Rhizopus* predominou nos tratamentos sem inclusão de TM e com 100 g/kg desse coproduto na dieta, correspondendo a 33,3 % dos fungos micelianos identificados. Por outro lado, com a inclusão de 200 e 300 g/kg da TM na dieta, o gênero mais frequente passou a ser o *Aspergillus*, correspondendo a 50,0 % e 40,0 % dos fungos

Tabela 2. Efeito da inclusão da torta de macaúba (TM) na dieta sobre as características químicas, unidades formadoras de colônias (UFC x 10^6 mL⁻¹) e proporção (%) de gêneros de fungos micelianos no conteúdo ruminal de ovinos alimentados com diferentes níveis de torta de macaúba (TM).

	Níveis (g/kg) da TM na dieta				EPM	valor de p	
	0	100	200	300		Linear	Quad
pH	6,5	6,5	6,6	6,6	0,192	0,38	0,76
PRAM ¹ , minutos	2,2	1,9	0,4	1,5	0,049	0,17	0,31
UFC (x 10^6 mL ⁻¹)							
Fungos leveduriformes	19	25	6	4	0,118	<0,01	0,84
Fungos micelianos	5	9	11	23	0,105	<0,01	0,21
Gêneros de fungos micelianos (%)							
<i>Aspergillus</i>	11,1	22,2	50,0*	40,0*			
<i>Rhizopus</i>	33,3*	33,3*	33,3	26,7			
<i>Trichophyton</i>	22,2	22,2	-	13,3			
<i>Paecilomyces</i>	11,1	-	16,7	20,0			
<i>Scedosporium</i>	11,1	11,1	-	-			
<i>Scopulariopsis</i>	11,1	11,1	-	-			
Total identificado ²	9	9	12	15			

¹Potencial de redução do azul de metileno.

²Número total de fungos micelianos identificados por grupo de tratamento.

*Gêneros mais frequentes, teste do Qui-quadrado com $P < 0,05$.

micelianos encontrados, respectivamente. Esse último gênero poderia ter papel favorável na degradação das fibras presentes na TM, pois pesquisas tem demonstrado intensa atividade celulolítica para esse fungo (Oyelek e Okusanmi 2008, de Almeida *et al.* 2014).

Constatou-se a presença de leveduras e fungos micelianos para amostras de todos os animais avaliados. A concentração de leveduras decresceu linearmente ($P < 0,01$) com os níveis de inclusão da TM (Tabela 2). Os menores números de colônias leveduriformes com a inclusão do coproduto podem estar associados à menor ingestão de carboidratos não fibrosos (CNF) e ao maior consumo de extrato etéreo (EE) (de Azevedo *et al.* 2012), uma vez que a carência de carboidratos solúveis resulta em diminuição significativa na quantidade de leveduras e a suplementação lipídica em excesso poderia ocasionar efeitos deletérios sobre o crescimento da microbiota ruminal (de Almeida *et al.* 2012, Messana *et al.* 2012).

A concentração de fungos micelianos apresentou crescimento linear ($P < 0,01$) com o aumento dos níveis de inclusão da TM. Esse crescimento pode ser atribuído ao aumento do consumo de fibra em detergente neutro (de Azevedo *et al.* 2012), os fungos micelianos podem produzir enzimas que degradam celulose e hemicelulose (Oyeleke e Okusanmi 2008), podendo, portanto, utilizar carboidratos fibrosos como fonte de energia para o crescimento. Em pesquisas anteriores (de Azevedo *et al.* 2012, 2013a, 2013b; dos Santos *et al.* 2015, 2017), constatou-se que os teores de fibra em detergente neutro (hemicelulose, celulose e lignina) na torta de macaúba foram altos, variando de 62,08 a 72,03 %, o que provavelmente contribuiu para o aumento da concentração de fungos micelianos.

Foram identificados 45 isolados de fungos micelianos utilizando-se a técnica de microcultivo. Verificou-se maior diversidade de gêneros entre os isolados provenientes de cordeiros alimentados com menores níveis (0 e 100 g/kg) de inclusão da TM na dieta. (Tabela 2). Nesses níveis foram observadas estruturas fúngicas típicas dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichophyton*,

Paecilomyces, *Scedosporium* e *Scopulariopsis*. A redução na diversidade com inclusão da TM pode estar relacionada com o aumento na suplementação lipídica, uma vez que de acordo com dos Santos *et al.* (2017), a TM possui um perfil lipídico de ácidos graxos insaturados (1:3,4 saturados:insaturados), que pode ocasionar efeitos deletérios sobre o crescimento da microbiota.

CONCLUSÕES

As alterações na população de fungos micelianos e leveduriformes do rúmen de ovinos alimentados com torta de macaúba são reflexo principalmente da redução na disponibilidade ruminal de carboidratos não fibrosos e aumento dos carboidratos fibrosos e lipídeos. Assim, a inclusão da TM na dieta de cordeiros Santa Inês diminui a diversidade de gêneros de fungos micelianos e a concentração de fungos leveduriformes, mas proporciona aumento na concentração de fungos micelianos.

LITERATURA CITADA

- Abrão, FO; Duarte, ER; Freitas, CE; Vieira, EA; Geraseev, LC; da Dilva- Huhges, AF; Rosa, CA; Rodrigues, NM. 2014. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. *Current Microbiology* 69(5):649-659.
- de Almeida, PNM; Duarte, ER; Abrão, FO; Freitas, CES; Geraseev, LC; Rosa, CA. 2012. Aerobic fungi in the rumen fluid from dairy cattle fed with different sources of forage. *Revista Brasileira de Zootecnia* 41(11):2336-2342.
- de Almeida, PNM; Freitas, CES; Abrão, FO; Ribeiro, ICO; Vieira, EA; Geraseev, LC; Duarte, ER. 2014. Atividade celulolítica de fungos aeróbios isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. *Revista Caatinga* 27(4):202-207.
- de Azevedo, RA; Rufino, LMA; Santos, ACR; Ribeiro Júnior, CS; Rodriguez, NM; Geraseev, LC. 2013a. Comportamento ingestivo de cordeiros alimentados com torta de macaúba. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 65(2):490-496.

- de Azevedo, RA; Santos, ACR; Ribeiro Júnior, CS; Bicalho, FL; Bahiense, RN; Araújo, L; Geraseev, LC. 2013b. Comportamento ingestivo de vacas alimentadas com torta de macaúba. *Ciência Rural* 43(8):1485-1488.
- de Azevedo, RA; Rufino, LMA; Santos, ACR; Silva, LP; Bonfá, HC; Duarte, ER; Geraseev, LC. 2012. Desempenho de cordeiros alimentados com inclusão de torta de macaúba na dieta. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47(11):1663-1668.
- de Hoog, GS; Guarro, J; Figueras, MJ; Gené, J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. 2 ed. Utrecht, The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures. 1126 p.
- Dirksen, G. 1993. Sistema digestivo. In Dirksen, G; Gründer, HD; Stöber, M. (eds.). *Rosenberger: Exame clínico dos bovinos*. Brasil, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan. p.167-169.
- dos Santos, ACR; de Azevedo, RA; Virginio Júnior, GF; Rodriguez, NM; Duarte, ER; Geraseev, LC. 2017. Effects of macauba cake on profile of rumen protozoa of lambs. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(3):251-256.
- dos Santos, ACR; Magalhães, DQ; Azevedo, RA; Vieira, ILNL; França, DEG; Geraseev, LC; Duarte, ER. 2015. Efeito da inclusão da torta de macaúba na população de protozoários do rúmen de vacas leiteiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 67(6):1653-1659.
- Kamra, DN. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science* 89(1):124-135.
- Lacaz, CS; Porto, E; Martins, JEC; Heins-Vaccari, EM; Takahashi De Melo, N. 2002. *Tratado de micologia médica* 9 ed. Brasil, São Paulo, Sarvier. 1104 p.
- Messana, JD; Berchielli, TT; Arcuri, PB; Ribeiro, AF; Fiorentini, G; Canesin, RC. 2012. Effects of different lipid levels on protozoa population, microbial protein synthesis and rumen degradability in cattle. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 34(3):279-285.
- NRC (National Research Council). 2007. *Nutrient requirement of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids*. Washington DC, USA. The National Academy Press.
- Oyeleke, SB; Okusanmi, TA. 2008. Isolation and characterization of cellulose hydrolyzing microorganism from the rumen of ruminants. *African Journal of Biotechnology* 7(10):1530-1504.
- Russel, JB; Rychlik, JL. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292(5519):1119-1122.
- Wang, X; Liu, X; Groenewald, JZ. 2017. Phylogeny of anaerobic fungi (phylum *Neocallimastigomycota*), with contributions from yak in China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(1):87-103.