

Avaliação *in vitro* de fungos ruminais como probiótico para ovinos em dieta de alto grão***In vitro* evaluation of ruminal fungi as probiotics for sheep on a high-grain diet**

DOI:10.34117/bjdv6n7-855

Recebimento dos originais: 27/06/2020

Aceitação para publicação: 31/07/2020

Ronaildo Fabino Neto

Doutorando em Zootecnia pela Universidade Federal de Goiás
Instituição: Instituto Federal Goiano - Campus Ceres
Endereço: Rodovia GO 154, Km 03, Zona Rural, CP 51, Ceres-GO, Brasil
E-mail: ronaildo.neto@ifgoiano.edu.br

Thiago Dias Silva

Bacharel em Zootecnia pela Instituto Federal Goiano - Campus Ceres
Instituição: Instituto Federal Goiano - Campus Ceres
Endereço: Rua Dona Mariquinha, Qd.12, Lote 19, Negrão de Lima, Goiânia-GO, Brasil
E-mail: Thiago.zootecnia@outlook.com

Flávia Oliveira Abrão

Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal de Minas Gerais
Instituição: Instituto Federal Goiano - Campus Ceres
Endereço: Rodovia GO 154, Km 03, Zona Rural, CP 51, Ceres-GO, Brasil
E-mail: flavia.abrao@ifgoiano.edu.br

Jakcelly Custodio Ferreira

Acadêmico Bacharel em Zootecnia pelo Instituto Federal Goiano – Campus Ceres
Instituição: Instituto Federal Goiano - Campus Ceres
Endereço: Rodovia GO 154, Km 03, Zona Rural, CP 51, Ceres-GO, Brasil
E-mail: jakcellycustodio@gmail.com

Luis Henrique Curcino Batista

Doutorando em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal
Instituição: Instituto Federal Goiano - Campus Ceres
Endereço: Department of Animal Science, Unesp, Jaboticabal-SP, Brasil
E-mail: luishenrique_94cb@hotmail.com

Bruno Carvalho da Silva

Acadêmico Bacharel em Zootecnia pelo Instituto Federal Goiano – Campus Ceres
Instituição: Instituto Federal Goiano - Campus Ceres
Endereço: Rodovia GO 154, Km 03, Zona Rural, CP 51, Ceres-GO, Brasil
E-mail: brunocarvalho4625@gmail.com

Rafael Ícaro Matos Vieira

Mestrado em Biologia Microbiana pela Universidade de Brasília
Instituição: Universidade de Brasília

Endereço: Rua 37, nº 336, Bairro Buritis, Goianésia, - GO, Brasil
E-mail: rafaelicarom@gmail.com

Eliane Sayuri Miyagi

Doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal de Goiás
Instituição: Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Goiás
Endereço: Rodovia Goiânia, Km 8 s/n Campus - Samambaia, Goiânia - GO, Brasil
E-mail: eliane_miyagi@ufg.br

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

A digestibilidade ruminal do amido do grão de milho é limitada pela matriz proteica que é uma estrutura amorfa com função estrutural do grão que encapsula os grânulos de amido (PAES, 2006). Essa matriz está presente principalmente no endosperma vítreo dos grãos (PAES, 2006) e a sua degradação pode melhorar a velocidade e a extensão da digestão do amido (HUMER; ZEBELI, 2017). Em função da matriz proteica, observa-se perdas significativas de amido nas fezes dos animais submetidos a sistemas de arração de alto grão (PAULINO et al., 2013). Os fungos do TGI penetram com seus rizoides na matriz proteica do milho, mas não tem ação nos grânulos de amido, enquanto que enzimas amilases extracelulares são liberadas para a degradação destes (PESSOA, 2016).

Apesar dos ganhos comprovados com animais em fase de terminação confinados alimentados com dieta de alto grão e pouca fibra (BERNARDES et al., 2015; PARENTE et al., 2016; VENTURINI et al., 2016), observa-se que, frequentemente, os mecanismos fisiológicos de homeostase são rompidos, ocorrendo redução do pH ruminal, causado pela alteração da ecologia microbiana do rúmen. Desse modo, o animal fica mais susceptível a doenças metabólicas e infecciosas (DONG et al., 2013; SEDDIK et al., 2019; ZHANG et al., 2019). Contudo, é válido respaldar que a notável capacidade de produção proteica nos ruminantes é dependente do sistema de pré-estômagos, o qual alberga complexo ecossistema microbiano (bactérias, protozoários, fungos e outros), responsáveis por sínteses das principais fontes energéticas (AGCC) além de serem uma das principais fontes proteica dos ruminantes (proteína microbiana) (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2011a).

Dessa forma, evidencia-se a relevância da utilização de aditivos microbianos na alimentação de ruminantes, principalmente daqueles confinados por um período mais longo, arraçados com alto teor de concentrado, tais como os probióticos de caráter fúngico, que são capazes de produzir e liberar enzimas extracelulares, tais como, a amilase, melhorando a digestibilidade e, conseqüentemente, o desempenho animal (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2011b; VIEIRA et al., 2015; ABRÃO et al., 2017; FABINO NETO et al., 2017).

De acordo com Soares et al. (2010) e Abrão et al. (2018a) fungos para serem usados com probiótico devem apresentar as seguintes características: capazes de sobreviverem as condições ruminais, não ser patogênicos ou tóxicos, capaz de produzir enzimas digestivas, capazes de se multiplicarem mantendo uma relação de simbiose com as demais populações microbianas ruminais e com o próprio hospedeiro e participara dos processos de digestão e fermentação ruminal melhorando assim a utilização dos alimentos.

Estudos têm sido realizados com objetivo de evidenciar a capacidade de alguns microrganismos de serem usados como potenciais probióticos. Pesquisa tem mostrado os potenciais dos fungos como produtores de enzimas capazes de degradar os grânulos de amido, sendo eles os principais microrganismo usados na produção de enzima, responsável por 64%, superior às bactérias, que respondem por apenas 24% das enzimas produzidas comercialmente (SOARES et al., 2010). Os fungos isolados do TGI de animais já são adaptados às condições ruminais, o que pode garantir maiores respostas como probióticos para ruminantes (ABRÃO et al., 2018a).

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DO ENSAIO DE VIABILIDADE DOS FUNGOS

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

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

2.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Os microrganismos que foram utilizados neste experimento foram isolados de ovinos confinados recebendo dieta de alto grão (sem volumoso), 85% milho, milheto e/ou sorgo e 15% de núcleo. Os isolados fúngicos foram obtidos em trabalhos prévios conduzidos por Fabino Neto et al. (2017) e Abrão et al. (2018b) e fazem parte de uma coleção de fungos estocada no laboratório de Microbiologia do Instituto Federal Goiano, Campus Ceres.

2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS OBTIDOS

Trinta isolados fúngicos provenientes do rúmen de ovinos foram agrupados por morfotipologia (cor, borda, superfície, fundo, aspecto, etc.) (CALUMBY et al., 2019) e posteriormente, um representante de cada morfotipo foi identificado até gênero por técnica de microcultivo, conforme metodologia descrita por Lacaz et al. (2002).

2.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE AMILASE

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

Os fungos foram cultivados no centro da placa com meio de cultura, em triplicata. Os cultivos foram incubados a 37°C, para medição do tamanho da colônia, tamanho do halo enzimático e verificação do índice de atividade enzimática, em cada um dos tempos de avaliação (24, 48 e 72 horas). Após a medição do tamanho da colônia, foi adicionado corante Vermelho Congo em cada um desses tempos, para medição da zona clara ao redor da colônia (correspondente ao halo de degradação enzimático pela ação da amilase). Todas as medições foram realizadas com o auxílio de paquímetro. O restante do meio (não degradado) permaneceu corado de vermelho (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

2.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS

Para avaliação da produção de micotoxinas, foi utilizado o método descrito por Saito e Machida (1999), que faz uso do vapor de amônia para identificação de cepas produtoras e não produtoras. Os fungos (em triplicata) foram cultivados em placa de Petri com ágar BDA, incubados a 37°C por 120 horas e depois foi adicionado dois mL de hidróxido de amônio nas tampas das placas. Em seguida, as placas com os fungos foram vedadas e incubadas novamente por mais 24 horas, e posteriormente foram feitas as leituras da coloração da base das colônias crescidas. De acordo com Baptista; Horii; Baptista, 2004) fungos produtores de micotoxina apresentam mudanças na coloração no verso da colônia após adição da amônia.

2.6 TOLERÂNCIA AOS ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA DO RÚMEN

Dez mL de uma mistura constituída por ácidos acético, propiônico e butírico foram adicionados a 990 mL de caldo composto por 3,5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona e 10 g/L de uma forma de glicose. A concentração final de AGCC no meio foi de 101,4; 31,4 e 23,4 mmol/L de ácidos acético, propiônico e butírico (proporção de 65:20:15), respectivamente. Um mL de cada isolado testado foi adicionado a 9 mL da mistura descrita anteriormente e, incubados a 39°C, em jarras de anaerobiose por 24 h, em triplicata (NOORAE et al., 2010). Também foi testada a proporção 50:40:10 dos respectivos ácidos; sendo esta comumente encontrada no rúmen de animais arraçados com alto concentrado. Após o período de incubação foi realizada a recuperação e identificação dos inóculos.

2.7 ENSAIO DE VIABILIDADE FÚNGICA NO FLUIDO RUMINAL

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

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

2.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Soluções padronizadas de esporos dos fungos viáveis foram adicionadas aos frascos de penicilina acrescidos de fluido ruminal autoclavado ou não com grãos de milho inteiro. A capacidade de colonização sobre o grão foi evidenciada por microscopia eletrônica conforme metodologia descrita por Lempp (1997). As imagens geradas foram registradas digitalmente com diferença de potencial variável de 2,5 a 5 Kv e distância focal de trabalho de 14-16 mm.

2.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram utilizados testes não-paramétricos, sendo Qui-Quadrado para taxas de detecção, Wilcoxon para análises de comparação de dois grupos, Friedman ou Kruscall-Wallis para dados de quantificação (ARNHOLD, 2013; R CORE TEAM, 2015). Foram realizadas análises descritivas das características sensoriais do fluido ruminal (cor, odor, viscosidade e PRAM).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ISOLADOS FÚNGICOS

Dos 30 isolados fúngicos selecionados e identificados, 21 foram do gênero *Aspergillus* spp., seis do gênero *Rhizopus* spp. e três *Rhizomucor* spp., os quais foram avaliados quanto ao seu potencial probiótico. Abrão et al. (2015) comparando as características físico-químicas e a população fúngica do conteúdo ruminal de novilhos em pastejo de capim *Brachiaria* spp. com novilhos confinados sob dieta de alto grão com milho e núcleo (85:15) observaram a predominância dos fungos do gênero *Aspergillus* spp. tanto para animais em pastejo quanto para confinados. Flipphi et al. (2009)

justificaram a predominância desse gênero por ser versátil e eficiente em catabolizar diferentes fontes de carboidratos solúveis, assim como, polímeros complexos.

Os fungos do gênero *Rhizopus* spp. são considerados pela FAOSTAT (2016) seguros para uso alimentar (MIYAOKA, 2012). De acordo com Miyaoka (2012), fungos do gênero *Rhizopus* spp. são capazes de se desenvolver em diferentes substratos. Esse gênero de fungo é largamente utilizado na Ásia para produzir produtos alimentícios e compostos fenólicos (RANDHIR; SHETTY, 2007).

Bernardes et al. (2014) avaliaram a capacidade do fungo da espécie *Rhizomucor miehei* em produzir α -amilase sobre diferentes tipos de substrato (quirera de arroz, quirera de milho e farelo de sorgo), e evidenciaram o potencial desse fungo para a produção de α -amilase a partir de subproduto agroindustrial em tempo de incubação de 48h, para pH entre 4,0 a 5,0 e temperatura de até 70°C.

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

3.2 PRODUÇÃO DE AMILASE

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

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

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

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

Contudo, para o índice de atividade enzimática (IAE), que mede a relação DMH/DMC, não houve diferença significativa entre os tempos testados. Não obstante, a sua ocorrência se dá desta maneira porque conforme o halo de degradação da amilase aumenta, o tamanho da colônia também

aumenta, fazendo com que o índice de atividade enzimática se mantenha equivalente nos três períodos de visualização. Soares et al. (2010), também verificaram que os índices enzimáticos para a amilase, medidos pela mesma relação, também não diferiram entre si com e sem refrigeração, ao se utilizar um meio completo e BDA, com e sem celulose.

Segundo Lealem e Gashe (1994), a habilidade do microrganismo em degradar o amido é estabelecida pelo índice de atividade enzimática, recomendando que o mesmo seja igual ou superior a dois para que a habilidade em degradar o amido seja considerada boa. Mesmo não havendo diferença significativamente estatística entre os IAE nos três períodos de incubação, é possível observar que após as primeiras 48 horas, o poder de degradação do amido dos inóculos diminuiu. No entanto isso não reflete uma menor habilidade na produção de amilase, e sim um crescimento proporcional de colônias e halos de degradação, o que leva a IAE's próximos a dois. Dessa forma podemos observar que a partir de 72h o IAE tende a diminuir.

3.3 PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS, VIABILIDADE FÚNGICA NO FLUIDO RUMINAL, TOLERÂNCIA AOS AGCC E HABILIDADE MECÂNICA SOBRE GRÃO DE MILHO (MEV)

Para os 30 inóculos estudados no experimento, 19 são produtores de micotoxina, representando um percentual de 63,33%. Estes, inicialmente, não são recomendados para compor um probiótico, pois as micotoxinas produzidas pelos mesmos podem causar efeitos indesejáveis ao metabolismo animal. Segundo Maziero e Bersot (2010), as micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, com baixo peso molecular, que apresentam efeito tóxico para os animais, plantas e outros microrganismos.

Abrão et al. (2018a) avaliando inocuidade micotoxicológica de algumas espécies do gênero *Aspergillus* ssp., sob as condições dos seus estudos, confirmaram que as espécies investigadas não produziram aflotoxinas, sendo estas um tipo de micotoxina comumente produzida pelo *A. flavus*. No entanto, estudos têm mostrado que outras espécies como o *Aspergillus niger*, além de outros gêneros, como *Fusarium solani*, *Penicillium fumiculosum* e *P. rubrum* podem ser capazes de realizar ações opostas impedido o crescimento do *A. flavus*, em meio de cultura combinado. Já Baptista; Horii; Baptista (2004) em seus achados observaram que os fungos *Rhizopus stolonifer*, *R. oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Brevibacterium linens* podem inibir o desenvolvimento do *A. flavus*. Sendo esse relato importante, pois um dos fungos investigados nesse estudo é o *Aspergillus terreus*, que pode auxiliar no controle de outros fungos indesejáveis produtores de micotoxinas. Farag et al. (2016) confirmaram que a enzima quitinase purificada produzida por *Aspergillus terreus* inibiu o crescimento de *A. niger*, *A. oryzae*, *Penicillium oxysporium*, *Rhizocotonia solani*, *Candida albicans* e *Fusarium solani*, não apresentando efeito inibitório para o crescimento do fungo *Rhizopus oryzae*.

Esses mesmos autores verificaram a ação antibacteriana contra bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*, porém não apresentou atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*.

Das oito cepas que não produziram micotoxinas, todas sobreviveram às condições do fluido ruminal diante da comunidade autóctone existente no rúmen de animais submetidos à dieta de alto grão, em todos os tempos de incubação. A capacidade do fungo sobreviver mantendo uma relação simbiótica com demais microrganismos ruminais contribui para a manutenção de sua comunidade dentro do ecossistema, estabelecendo assim, equilíbrio entre as populações microbianas. Segundo Zábanský et al. (2016) esse equilíbrio da comunidade autóctone do rúmen contribui para aumento na imunidade do hospedeiro melhorando o desempenho.

Abrão et al. (2018a) verificaram a capacidade do *Aspergillus terreus* e do *Aspergillus fumigatus* em resistir à pressão da comunidade microbiológica do rúmen de bovinos sob dieta com fonte de volumoso, concluindo que devido a essa característica, associada ao potencial celulolítico e a não produção de microtoxina, esses dois fungos apresentam potenciais para serem utilizados como probióticos na nutrição de bovinos alimentados com forragem.

Todos os isolados testados foram viáveis após incubação de 24 h no meio Sabouraud, com as diferentes concentrações dos principais ácidos graxos voláteis do rúmen (acético: propiônico: butírico, nas proporções de 65: 20: 15 e 50: 40: 10, respectivamente). Os resultados desse trabalho corroboram com de Abrão et al. (2018a) que avaliaram a viabilidade do fungo *Aspergillus* spp. em três diferentes proporções dos AGCC (65:20:15, 72:20:08 e 50:40:10), em três tempos de recuperação (0, 24 e 96 h), e verificaram que todos os isolados apresentaram viabilidade após o período de incubação nos diferentes tempos. A capacidade dos isolados de tolerar as concentrações dos AGCC é importante para confirmar a viabilidade dos fungos em manter a atividade constante na degradação do grão.

Um representante de cada um dos gêneros *Aspergillus* spp. e *Rhizomucor* spp. que se destacaram na produção de enzimas seguiram para a verificação da colonização do grão de milho sob microscopia eletrônica de varredura. Nas Figuras 01 e 02 é possível observar as hifas do micélio e estrutura reprodutiva formada por centenas de esporos fúngicos de duas cepas de interesse. Ainda na Figura 03, é possível identificar a capacidade de desenvolvimento dos fungos sobre o milho inteiro e a habilidade na ruptura da superfície dos grãos. Segundo Tortora; Funke; Case (2017), as hifas aéreas são as responsáveis por sustentar os esporos reprodutivos, os quais se encontram numa estrutura denominada micélio, formada por um conjunto de hifas. Segundo Paixão et al. (2004), as hifas de fungos do gênero *Aspergillus* spp. são septadas e se ramificam dicotomicamente em ângulos agudos.

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

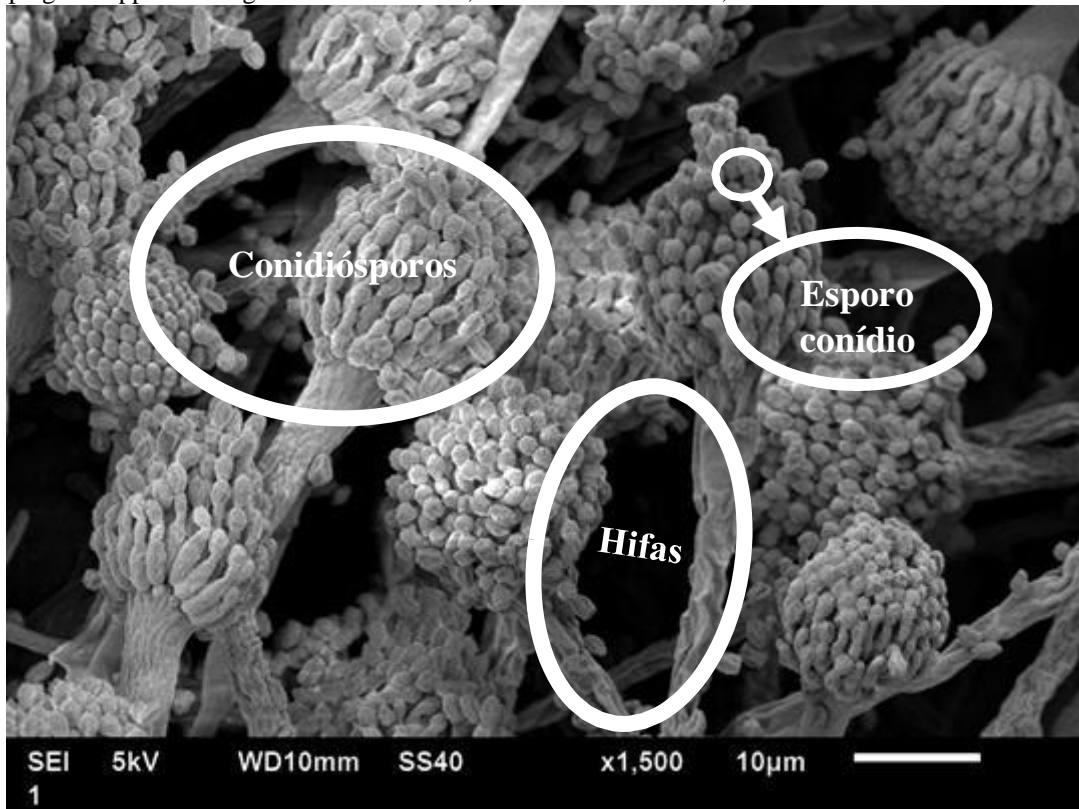


FIGURA 2 - Hifas e estrutura reprodutivas e esporos características do gênero *Rhizomucor* spp. sobre grãos de milho inteiros, sob aumento de 800x, e distância de 5kv.

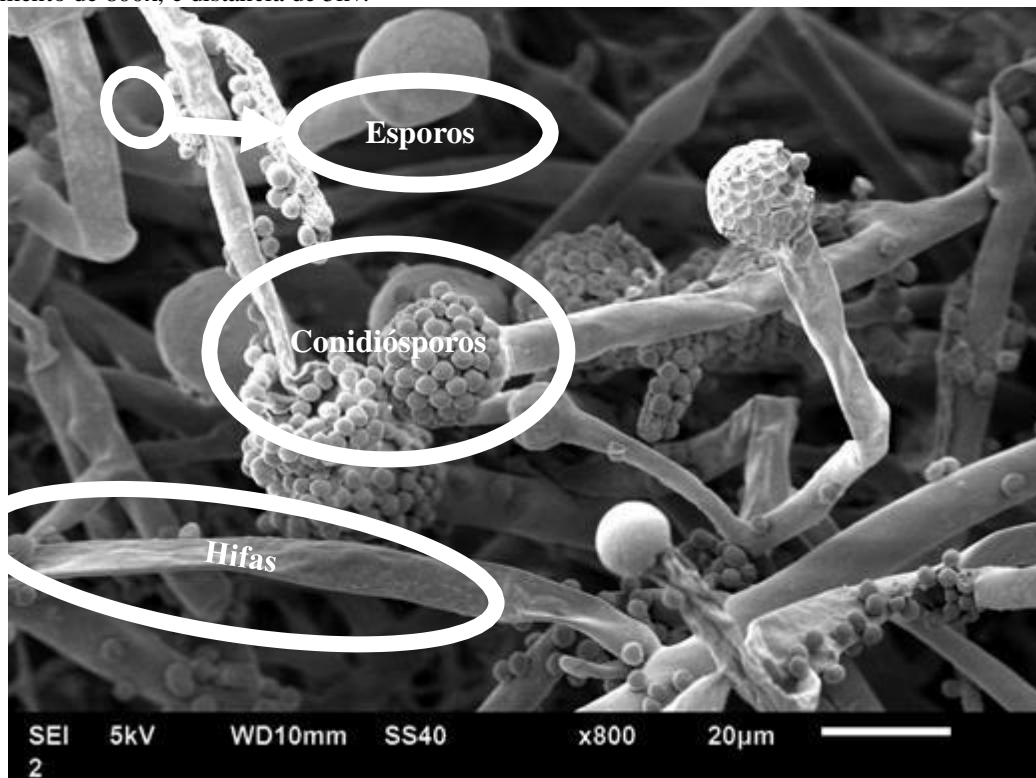
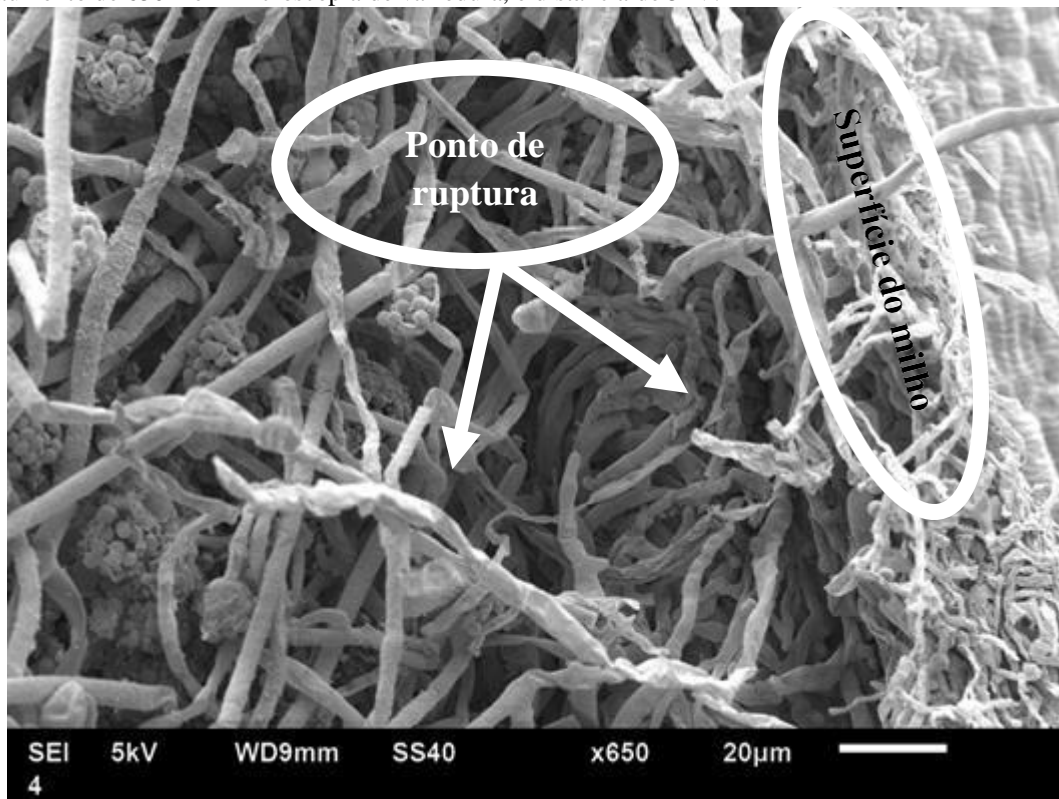


FIGURA 3 - Colonização fúngica sobre a superfície do milho, evidenciando um ponto de ruptura e aumento da superfície exposta, sob aumento de 650 x em microscopia de varredura, e distância de 5kV.



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

4 CONCLUSÃO

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; CAROLINA, A.; NIGRI, D. A.; LUIZA, M.; SILVA, F.; CAROLINA, I.; RIBEIRO, O.; LUIZ, K.; AUGUSTO, C.; MÁRIO, N.; O, A. A. F.; DUARTE, E. R.; NIGRI, A. C. A.; SILVA, M. L. F. 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, n. 1, p. 7–14, 2015. Disponível em: <<http://rbmv.org/index.php/BJVM/article/view/345>>.
- ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; PESSOA, M. S.; SANTOS, V. L. dos; FREITAS JÚNIOR, L. F. de; BARROS, K. de O.; HUGHES, A. F. da 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, n. 8, p. e0183628, 29 ago. 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0183628>>.
- ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; PESSOA, M. S.; SANTOS, V. L.; RODRIGUEZ, N. M. Inocuidade micotóxica e viabilidade de *Aspergillus* spp. com potencial probiótico provenientes do trato digestório bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 6, p. 1833–1839, dez. 2018a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352018000601833&lng=pt&tlng=pt>.
- ABRÃO, F. O.; SANTOS, E. O.; DIJKSTRA, D.; NETO, R. F.; BATISTA, L. H. C.; DUARTE, E. R. Efeito do processamento do grão sobre a população de protozoários ruminais de ovinos Santa Inês. **Archivos de Zootecnia**, v. 67, n. 260, p. 518–524, 2018b. Disponível em: <<https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/3882/2291>>.
- ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. da C. Microbiologia do rúmen. In: FANEP (Ed.). **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. [s.l: s.n.]p. 115–147.
- ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. da C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. DE (Ed.). **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. [s.l: s.n.]p. 115–160.
- ARNHOLD, E. No TitlePackage in the R environment for analysis of variance and complementary analyses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 6, p. 488–492, 2013. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-789914>>.
- BAPTISTA, A. S.; HORII, J.; BAPTISTA, A. S. FATORES FÍSICO-QUÍMICOS E BIOLÓGICOS LIGADOS À PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 1–14, 30 jun. 2004. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/1175>>.

- BERNARDES, A. V.; MARTINS, S.; FERREIRA, J.; EMERENCIANO, O. UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR *Rhizomucor miehei*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 2, p. 1439–1451, 2014. Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/rbta/article/view/1852>>.
- BERNARDES, G. M. C.; CARVALHO, S.; PIRES, C. C.; MOTTA, J. H.; TEIXEIRA, W. S.; BORGES, L. I.; FLEIG, M.; PILECCO, V. M.; FARINHA, E. T.; VENTURINI, R. S. Consumo, desempenho e análise econômica da alimentação de cordeiros terminados em confinamento com o uso de dietas de alto grão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 6, p. 1684–1692, dez. 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352015000601684&lng=pt&tln=pt>.
- CALUMBY, R. J. N.; SILVA, J. A.; SILVA, D. P.; MOREIRA, R. T. de F.; ARAÚJO, M. A. dos S.; ALMEIDA, L. M.; GRILLO, L. A. M.; ALVINO, V. Isolamento e identificação da microbiota fúngica anemófila em Unidade de Terapia Intensiva. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 19708–19722, 2019. Disponível em: <<http://www.brjd.com.br/index.php/BRJD/article/view/3839/3633>>.
- DONG, H.; WANG, S.; JIA, Y.; NI, Y.; ZHANG, Y.; ZHUANG, S.; SHEN, X.; ZHAO, R. Long-Term Effects of Subacute Ruminant Acidosis (SARA) on Milk Quality and Hepatic Gene Expression in Lactating Goats Fed a High-Concentrate Diet. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82850, 23 dez. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0082850>>.
- FABINO NETO, R.; OLIVEIRA, A. R. J. De; DIJKSTRA, D.; CURCINO, L. H. B.; GODOY, M. M. De; CASTRO, F. G. F.; DUARTE, E. R.; PESSOA, F. O. A. População fúngica ruminal em cordeiros com dietas de alto grão submetidas a diferentes processamentos. **Zootecnia Tropical**, v. 35, n. 1–2, p. 25–34, 2017. Disponível em: <http://www.sian.inia.gov.ve/revistas_ci/ZootecniaTropical/zt3512/pdf/Neto.pdf>.
- FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>.
- FARAG, A. M.; ABD-ELNABEY, H. M.; IBRAHIM, H. A. H.; EL-SHENAWY, M. Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 2, p. 185–192, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejar.2016.04.004>>.
- FLIPPPI, M.; SUN, J.; ROBILLET, X.; KARAFFA, L.; FEKETE, E.; ZENG, A.; KUBICEK, C. P. Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 1, p. S19–S44, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2008.07.018>>.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597, maio 1975. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/3758395?origin=crossref>>.
- HUMER, E.; ZEBELI, Q. Grains in ruminant feeding and potentials to enhance their nutritive and health value by chemical processing. **Animal Feed Science and Technology**, v. 226, p. 133–151, abr. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.02.005>>.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Tratado de Micologia médica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p. 297–298, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652002000500013&lng=en&nrm=iso&tln=fr>.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, p. 348–352, 1994.
- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. MICOTOXINAS EM ALIMENTOS PRODUZIDOS NO BRASIL. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89–99, 30 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.bibliotekevirtual.org/index.php/2013-02-07-03-02-35/2013-02-07-03-03-11/1417-rbpa/v12n01/15153-review-micotoxinas-em-alimentos-produzidos-no-brasil.html>>.

- MIYAOKA, M. F. **Avaliação do potencial dos fungos do gênero *Rhizopus* antioxidante utilizando diferentes substratos**. 2012. Universidade Federal do Paraná, 2012. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/29080/R - D - MITIYO FUKUDA MIYAOKA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.
- NOORAE, S. E.; ALIMON, A. R.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N. Characterization of *Kluyveromyces marxianus* as a potential feed additive for ruminants. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 578–584, 2010.
- PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**: Circular Técnico. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/489376/1/Circ75.pdf>>.
- PAIXÃO, T. A. da; NASCIMENTO, E. F. do; PARRA, P. N. S.; SANTOS, R. de L. Aspergilose em avestruz (*Struthio camelus*) no Brasil. **Ciência Rural**, v. 2004, n. 2, p. 573–576, 2004.
- PARENTE, H. N.; PARENTE, M. de O. M.; GOMES, R. M. da S.; SODRÉ, W. de J. dos S.; MOREIRA FILHO, M. A.; RODRIGUES, R. C.; SANTOS, V. L. F. dos; ARAÚJO, J. dos S. Increasing levels of concentrate digestibility, performance and ingestive behavior in lambs. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, n. 2, p. 186–194, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbspa/v17n2/1519-9940-rbspa-17-2-0186.pdf>>.
- PAULINO, P. V. R.; OLIVEIRA, T. S.; GIONBELI, M. P.; GALLO, S. B. Dietas Sem Forragem para Terminação de Animais Ruminantes. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 15, n. 2, p. 161–172, 31 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.bibliotekevvirtual.org/index.php/2013-02-07-03-02-35/2013-02-07-03-03-11/352-rcpa/v15n02/2877-v15n02a06.html>>.
- PESSOA, F. O. A. **Fungos do trato digestório de ruminantes como potencial probiótico para bovinos alimentados com forrageiras lignificadas**. 2016. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-200060>>.
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. [s.l: s.n.].v. 1
- RANDHIR, R.; SHETTY, K. Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 197–204, jun. 2007. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/29080/R - D - MITIYO FUKUDA MIYAOKA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.
- SAITO, M.; MACHIDA, S. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. **Mycoscience**, v. 40, n. 2, p. 205–208, 1999.
- SEDDIK, H.; XU, L.; WANG, Y.; MAO, S. Y. A rapid shift to high-grain diet results in dynamic changes in rumen epimural microbiome in sheep. **Animal**, v. 13, n. 8, p. 1614–1622, 18 ago. 2019. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731118003269/type/journal_article>.
- SOARES, I. A.; FLORES, A. C.; ZANETTIN, L.; PIN, H. K.; MENDONÇA, M. M.; BARCELOS, R. P.; TREVISOL, L. R.; CARVALHO, R. D.; SCHAUREN, D.; LUCIA, C.; SARTORI, D. M.; BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700–705, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000300021>.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. [s.l: s.n.]
- VENTURINI, R. S.; CARVALHO, S.; PIRES, C. C.; PACHECO, P. S.; PELLEGRIN, A. C. R. S.; MORO, A. B.; LOPES, J. F.; MARTINS, A. A.; BERNARDES, G. M. C.; SIMÕES, R. R.; MENEGON, A. L.; MOTTA, J. H. Consumo e desempenho de cordeiros e borregos alimentados com dietas de alto concentrado de milho ou sorgo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, p. 1638–1646, dez. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352016000601638&lng=pt&tlng=pt>.
- VIEIRA, E. A.; ABRÃO, F. O.; RIBEIRO, I. C. O.; NIGRI, A. C. de A.; SILVA, K. F. da; CARELI, R. T.; GERASEEV, L. C.; DUARTE, E. R. Bastonetes Gram-negativos aeróbios e anaeróbios facultativos no fluido ruminal de bovinos de corte alimentados em pastagem lignificada e em novilhos

com acidose ruminal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 9, p. 811–816, set. 2015. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2015000900811&lng=pt&tlng=pt>.

ZÁBRANSKÝ, L.; HADA, V.; ŠOCH, M.; BOHUSLAV, Č.; SMUTNÝ, L.; NOVOTNÁ, I.; SMOLÍK, P.; FREJLACH, T. Influence of Probiotic Feed Additives on Rumen Microflora of Cattle.

Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, v. 49, n. 2, p. 246–248, 2016. Disponível

em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/2baf/aa888be24ca355072edd9ad0c4a04566c1b2.pdf>>.

ZHANG, R. Y.; LIU, Y. J.; YIN, Y. Y.; JIN, W.; MAO, S. Y.; LIU, J. H. Response of rumen microbiota, and metabolic profiles of rumen fluid, liver and serum of goats to high-grain diets.

Animal, v. 13, n. 9, p. 1855–1864, 7 set. 2019. Disponível em:

<https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731118003671/type/journal_article>.