

ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE FUNGOS AEROBIOS ISOLADOS DO RÚMEN DE BOVINOS LEITEIROS ALIMENTADOS COM FORRAGENS TROPICAIS¹

PATRÍCA NATALÍCIA MENDES ALMEIDA², CLÁUDIO EDUARDO SILVA FREITAS³, FLÁVIA OLIVEIRA ABRÃO⁴, IZABELLA CAROLINA OLIVEIRA RIBEIRO³, EDVALDO ALVES VIEIRA³, LUCIANA CASTRO GERASEEV³, EDUARDO ROBSON DUARTE^{3*}

RESUMO - Objetivou-se avaliar a atividade celulolítica de fungos aeróbios isolados do trato digestório de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. Os isolados dos fungos foram provenientes de 30 amostras de fluido ruminal de vacas alimentadas com silagem de sorgo, 32 de vacas alimentadas em pastagem de *Brachiaria brizantha* (braquiarião), 12 de bezerras recebendo silagem de sorgo e 11 de bezerras alimentadas com cana-de-açúcar. O isolamento foi realizado em meio C, contendo celulose. Foram avaliados 49 isolados, sendo 27 *Aspergillus* spp., quatro *Gliocladium* spp., seis *Paecilomyces* spp., nove *Rhizopus* spp. e três *Scedosporium*. Esses isolados foram incubados em meio C, contendo celulose microcristalina a 1% como única fonte de carbono, e incubados em estufa a 37°C em triplicata. Os índices de atividades celulolíticas foram verificados após 24, 48 e 72 horas, calculados pela razão entre o halo de degradação e o da colônia e comparados em testes não paramétricos. O gênero *Aspergillus* apresentou maior média de índice de atividade celulolítica quando comparado ao gênero *Rhizopus* ($p < 0,05$). Oito isolados de *Aspergillus* spp. e seis de *Paecilomyces* spp. apresentaram índice superior a um, indicando potencial para utilização na nutrição de ruminantes.

Palavras-chave: Bovinocultura. Celulases. Micobiota ruminal. Rúmen. Semiárido.

CELLULOLYTIC ACTIVITY OF AEROBIC FUNGI ISOLATED FROM DAIRY CATTLE FED WITH FORAGE TROPICAL

ABSTRACT - The objective was to evaluate the cellulolytic activity of aerobic mycelian fungi from dairy cattle fed tropical forages. Isolates of fungi were obtained from 30 samples of rumen fluid from cows fed sorghum silage, 32 cows fed on *Brachiaria brizantha*, 12 heifers receiving sorghum silage and 11 heifers fed cane sugar. The isolation was performed on C solid medium containing cellulose. Were evaluated 49 isolates, 27 *Aspergillus* spp., four *Gliocladium* spp., six *Paecilomyces* spp., nine *Rhizopus* spp. and three *Scedosporium*. These isolates were incubated in C medium with 1% microcrystalline cellulose as the sole carbon source, and incubated at 37°C in triplicate. Cellulolytic activity indices were verified after 24, 48 and 72 hours and calculated by the ratio between degradation halo and colony diameter for comparing in nonparametric tests. The genus *Aspergillus*, showed higher cellulolytic activity index mean compared to *Rhizopus* genus ($p < 0.05$). Eight isolates of *Aspergillus* spp. and six of *Paecilomyces* spp. showed this index higher than one, indicating potential for utilization in ruminant nutrition.

Keywords: Cattle. Cellulases. Mycobiota rumen. Rumen. Semiarid.

*Autor para correspondência.

¹Recebido para publicação em 26/05/2013; aceito em 26/09/2014.

²Faculdades Unidas do Norte de Minas Gerais, Associação Educativa do Brasil, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

³Instituto de Ciências Agrária da Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Universitária, 1000, Avenida Universitária, 1000, 39404-006, Montes Claros, MG, Brasil, duartevet@pq.cnpq.br.

⁴Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

INTRODUÇÃO

O ecossistema ruminal envolve complexa mistura de fragmentos alimentares, água e micro-organismos como bactérias, fungos e protozoários, que estabelecem entre si diversas interações positivas ou negativas (KAMRA, 2005; LOPES et al., 2002).

A taxa de crescimento e a maturidade das forragens são diretamente influenciadas pelos teores de água e nutrientes do solo, temperatura e luminosidade (VAN SOEST, 1994), influenciando diretamente na qualidade da dieta e nos níveis de ácidos graxos voláteis (AGV) e de nitrogênio amoniacal (NH₃) disponibilizados no rúmen. Em altas concentrações desses nutrientes, tem-se observado grandes populações de bactérias e fungos no conteúdo ruminal (DEHORITY, 1998). Consequentemente, a população autóctone do rúmen pode sofrer flutuações de acordo com as estações do ano (MARTILLOTTI et al., 1994). Dessa forma torna-se fundamental avaliar alternativas para favorecer a maximização da microbiota ruminal, mesmo quando os animais são alimentados com forragens tropicais, com elevado teor de fibras e frequentemente lignificadas.

A ocorrência de fungos aeróbios no rúmen tem sido pouco descrita na literatura científica. Em estudo preliminar, realizado na região norte do estado de Minas Gerais, Brasil, foram avaliados fluidos ruminais de vacas e de bezerras mestiças Nelore, criados em pastagem de *Brachiaria decumbens* (braquiariinha). A população desses fungos foi maior para as vacas e com maior ocorrência do gênero *Aspergillus* (40%). Foram também identificados os fungos *Schizophyllum* sp. e *Onychocola* sp. (ABRÃO et al., 2014). Pesquisas que verificaram a ocorrência de fungos celulolíticos no fluido ruminal de cinco vacas, cinco ovelhas e cinco cabras indicaram maior proporção desses micro-organismos nas amostras provenientes das vacas. Os gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor* foram de maior ocorrência e com atividade celulolítica comprovada nas espécies de ruminantes avaliadas (OYELEKE; OKUSANMI, 2008).

No último século, tem-se descrito o potencial biotecnológico de fungos para os mais diversos fins, como produção de enzimas (AMORE; FARACO, 2012; KUHAD et al., 2011), antibióticos, vitaminas, componentes farmacêuticos, fungicidas, reguladores do crescimento de plantas e hormônios (KAVANAGH, 2005; SOARES et al., 2010). Como exemplo na nutrição de ruminantes, a adição de extratos de *Aspergillus oryzae*, espécie utilizada na produção de molho de soja, pode triplicar a produção de zoósporos de fungo anaeróbio do rúmen de vacas leiteiras, indicando o potencial promissor da adição do extrato de *A. oryzae* no ambiente ruminal, com a maximização da degradação de fibras (SCHMIDT et al., 2004).

Para as forragens tropicais, que apresentam maiores teores de fibras frequentemente lignificadas,

a adição de aditivos microbianos para favorecer a degradação das paredes celulares vegetais poderia promover melhor aproveitamento desses volumosos, com redução dos custos de produção. Para a seleção de microrganismos com esse potencial, nesta pesquisa, objetivou-se avaliar a atividade celulolítica de fungos aeróbios isolados do fluido ruminal de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O experimento foi realizado no município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. As coordenadas geográficas dessa região correspondem a 16°50'52" de latitude sul, 43°55'29" de longitude oeste e encontra-se a 646 m de altitude. O clima, segundo classificação de Köppen-Geiger, é do tipo Aw, considerado tropical de savana, com longo período seco e curto período chuvoso no verão. As coletas ocorreram entre novembro de 2008 a agosto de 2009, com temperatura média de 22,9°C e pluviosidade de 960,0 mm, de acordo com o 5º Distrito do Instituto Nacional de Meteorologia, localizado em Montes Claros, MG, Brasil.

Animais

Os isolados de fungos avaliados neste estudo foram obtidos em estudo envolvendo a coleta de 30 amostras de fluido ruminal de vacas alimentadas com silagem de sorgo, 32 de vacas alimentadas em pastagem de *Brachiaria* (Syn. *Urochloa*) rizantha, 12 de bezerras recebendo silagem de sorgo e 11 de bezerras alimentadas com cana-de-açúcar. Ambos os animais eram da raça Holandesa e criados na região do Norte de Minas Gerais, apresentavam peso corporal homogêneo e dentro de cada categoria os animais eram contemporâneos.

Coleta das amostras

Os animais foram imobilizados em brete de contenção, no período da manhã, antes da primeira refeição. Para a coleta do fluido ruminal foram realizadas tricotomia e assepsia com solução de Iodo-PVPI (1%) em área de aproximadamente cinco cm², localizada na parte ventral do abdômen esquerdo, abaixo da fossa paralombar e cranialmente à articulação do joelho (DIRKSEN, 1993). Foram puncionados 15 mL de fluido ruminal, com o auxílio de cateter humano (Solidor®, 14,2, BioMed Health Care Products, Haryana - Índia) acoplado a seringas estéreis. Cada seringa foi lacrada, identificada, armazenada em caixa isotérmica com gelo e imediatamente encaminhadas para as análises microbianas.

Cultivo, isolamento e identificação das colônias fúngicas

As amostras foram cultivadas em meio sólido C, contendo celulose microcristalina a 1% (ALMEIDA et al., 2012). No cultivo foi avaliada a taxa de positividade de fungos micelianos para todos os animais avaliados. Utilizou-se swab estéril para inocular por esgotamento o fluido ruminal em duas placas de Petri contendo o meio sintético C, contendo 1% de celulose microcristalina, 0,5% de sulfato de amônio, 0,05% de sulfato de magnésio heptahidratado e 2% de ágar-ágar (TEATHER; WOOD, 1982). Após inoculação por estriação, as placas foram incubadas invertidas em estufa a 39° C e monitoradas para o crescimento de colônias fúngicas por até 21 dias (LACAZ et al., 2002). Para a identificação dos fungos micelianos obtidos, foi realizado microcultivo segundo técnica de Ridell utilizando o meio agar Sabouraud (LACAZ et al., 1998). As características micromorfológicas, evidenciadas ao microscópio óptico, foram associadas àquelas descritas para fungos de interesse biotecnológico e médico-veterinário (LACAZ et al., 2002).

Foram avaliadas as atividades celulolíticas de 49 isolados de fungos micelianos provenientes dos grupos de animais amostrados. Esses isolados corresponderam a 27 do gênero *Aspergillus*, quatro do gênero *Gliocladium*, seis do *Paecilomyces*, nove do *Rhizopus* e três isolados do gênero *Scedosporium*. Cada isolado foi reinoculado em meio C contendo a celulose microcristalina como única fonte de carbono.

Após incubação durante sete dias, fragmentos de aproximadamente 2mm de diâmetro foram inoculados no centro de placas de Petri 90 mm x 90 mm contendo 15 mL do meio C já solidificado. Os procedimentos foram realizados em triplicata. A incubação ocorreu em estufa BOD a 39° C e as leituras da atividade celulolítica (AC) foram realizadas às 24 h e 48 h, conforme adaptação à metodologia descrita por Teather e Wood (1982). Ao final de cada período, procedeu-se a incubação durante 15 minutos, após a adição de 15 mL de solução de corante vermelho congo (1mg mL⁻¹). Posteriormente, as placas foram lavadas com 15 mL de solução 1M de NaCl, por três vezes consecutivas, procedendo-se à mensuração dos diâmetros dos halos claros, que indicaram a degradação da celulose, e o diâmetro das colônias com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo®). Com esses dados, calculou-se o índice de atividade celulolítica (AC) de cada microrganismo, dividindo-se os valores das medidas do halo de hidrólise pelo diâmetro da colônia, para cada período de avaliação (SILVA et al., 2007).

Para comparar a AC dos grupos de fungos avaliados, foi realizada a análise de variância com emprego do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A comparação entre os tempos de incubação foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Ambos os testes foram realizados utilizando-se pacote estatístico SAEG -Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas (2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do cultivo em meio C, contendo celulose como única fonte de carbono, indicaram a presença de fungos para todas as bezerras, de ambos os grupos avaliados nesta pesquisa. Entretanto, verificou-se que a taxa de positividade no meio C para vacas alimentadas somente na pastagem de *Brachiaria brizanta* foi significativamente menor (86,7%, p<0,05) quando comparada à taxa observada para vacas alimentadas com a silagem de sorgo (100%). O grupo de vacas alimentadas na pastagem correspondia ao único lote que não recebia suplementação com concentrado e, possivelmente, o menor aporte de nutrientes como carboidratos solúveis e NH₃ no rúmen poderia ter reduzido a presença dos fungos avaliados nesta pesquisa, entretanto novos estudos devem elucidar essa hipótese.

Ao comparar a positividade para bezerras e vacas alimentadas com silagem de sorgo, não foi constada diferença significativa, sendo detectados fungos micelianos para amostras de todos esses bovinos. Diferentemente, estudos de fungos filamentosos em bovinos de cortes, criados em pastagens lignificadas do gênero *Brachiaria* (Syn. *Urochloa*), reportam que as diferenças na população desses fungos poderia também ser justificada pelas interações microbiológicas e fisiológicas existentes nos ecossistemas de animais de idades diferentes. Os autores reportam que a população desses micro-organismos foi significativamente maior para vacas Nelore quando comparada àquelas verificadas para novilhos e bezerros alimentados com a mesma forrageira (Abrão et al. 2014). Tem-se verificado maior estabilidade da microbiota ruminal em animais mais velhos (Kamra, 2005) o que poderia ter contribuído para maior ocorrência desses fungo no ambiente ruminal das vacas Nelore (Abrão et al. 2014).

A Tabela 1 descreve as médias dos índices de atividade celulolítica (IAC), após 24 e 48 horas, dos cinco gêneros de fungos avaliados. Para o tempo de 48 horas de incubação, pôde-se observar que o gênero *Aspergillus* apresentou média da IAC significativamente maior quando comparado ao gênero *Rhizopus* (p<0,05).

Tabela 1. Atividade celulolítica média de isolados de diferentes gêneros de fungos provenientes do rúmen de bovinos leiteiros, alimentados com forragens tropicais, após 24 e 48 horas de incubação.

Gêneros	IAC* 24 horas	IAC 48 horas
<i>Aspergillus</i> (n=27)	0,2855	0,7494
<i>Gliocladium</i> (n=4)	0,0250	0,5294
<i>Paecilomyces</i> (n=6)	0,0004	1,1149
<i>Rhizophus</i> (n=9)	0,0156	0,2116**
<i>Scedosporium</i> (n=3)	0,0001	0,5333

*IAC: índice de atividade celulolítica, que mede a relação do diâmetro do halo de degradação da celulose microcristalina (mm) pelo diâmetro da colônia do fungo (mm).

** Indica menor na média de IAC no contraste a média para os isolados de *Aspergillus* spp., utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

Os contrastes avaliados para os outros gêneros não foram reportados na análise estatística, uma vez que o número de isolados era inferior, prejudicando a acurácia do teste. A média do índice de atividade celulolítica (AC) para os isolados do gênero *Paecilomyces* foi superior a um, o que indica boa capacidade de degradação enzimática da celulase e aponta o potencial para as pesquisas desses isolados como aditivos ou probióticos, uma vez que não há relatos científicos de patologias associadas a esses fungos para animais e humanos (LACAZ et al., 2002). Em estudo da microbiota do trato digestório de tainhas (*Aldrichetta forsteri*), verificou-se a presença da espécie *Paecilomyces lilacinus* que demonstrou a capacidade de desenvolver-se tanto em meio aeróbio quanto em meio anaeróbio. Constatou-se que o isolado dessa espécie promoveu maior produção enzimática de celulase na presença de oxigênio (MOUNTFORT; RHODES, 1991).

A comparação dos índices de AC para os tempos de 24 e 48 horas, para o gênero *Aspergillus* foi descrita na Tabela 2. Observou-se que a média do índice de AC foi significativamente maior para o período de 48 horas de incubação ($p < 0,05$). Observou-se que os isolados apresentaram crescimento lento no meio de cultura, que era extremamente pobre em nutrientes e continha a celulose cristalina como única fonte de carbono. Embora se tenha avaliado AC para 96 horas de incubação, os dados obtidos não foram utilizados para a análise estatística. Nesse período, 55% das amostras apresentaram colônias que ocupavam toda a área de cultivo e, em 24,3 % delas, o halo de atividade enzimática foi semelhante ao diâmetro da placa. Essa particularidade impossibilitou as mensurações acuradas dos diâmetros dos halos e das colônias, entretanto revelou grande habilidade de degradação para maiores períodos de incubação, o que deve ser explorado em futuros estudos.

Foi possível observar variabilidade entre os índices de AC para os 21 isolados de *Aspergillus* spp. avaliados nos diferentes tempos avaliados (Tabela 2). Essa variação poderia ser justificada pelas diferenças genéticas entre as espécies e cepas desse gênero avaliadas neste estudo. Após 48 horas

de incubação foi verificado que oito isolados do gênero *Aspergillus* apresentaram índice de AC superior a um, sendo três provenientes de bezerras e cinco de vacas. O isolado V841, proveniente do rúmen de uma vaca alimentada na pastagem, correspondeu o fungo com maior índice (2,366), revelando elevado potencial para o desenvolvimento de probiótico ou prebióticos e para microbiologia industrial na produção de celulases (Tabela 2). Entretanto, futuras pesquisas devem identificar e caracterizar geneticamente esse isolado e outros isolados avaliados nesta pesquisa para favorecer a melhor aplicabilidade desses microrganismos, evitando-se também possíveis efeitos tóxicos ou patogênicos (CASADEVALL, 2007).

Pesquisas que avaliaram a atividade celulolítica de bactérias anaeróbias isoladas a partir de amostras de fluido ruminal indicaram efetiva capacidade desses microrganismos em degradar a celulose microcristalina. Foram utilizadas as cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Bacteroides succinogenes* e *Eubacterium cellulosolvens* (TEATHER; WOOD, 1982). Entretanto os halos de degradação de celulose desses microrganismos foram menores do que os dos fungos avaliados neste presente estudo. Enquanto os halos das bactérias foram aproximadamente de 1,5 mm às 16 h de incubação, com aumento semanal de um a dois milímetros, os fungos avaliados nesta pesquisa apresentaram diâmetro médio de 26,74 mm após 48 horas de incubação (Tabela 1).

Oyeleke e Okusanmi (2008) estudaram a ocorrência de fungos celulolíticos no fluido ruminal de cinco vacas, cinco ovelhas e cinco cabras. Esses autores observaram maior proporção desses microrganismos nas amostras provenientes das vacas. Os gêneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor* foram os mais prevalentes para as espécies de ruminantes avaliadas e ambos apresentaram atividade celulolítica comprovada. Para as amostras isoladas especificamente, a partir do suco ruminal das vacas, o gênero *Mucor* foi o mais prevalente, correspondendo a 42,9% dos isolados, seguido de *Aspergillus* sp., que foi identificado para 28,6% dos isolados.

Tabela 2. Atividade celulolítica de isolados de *Aspergillus* spp. provenientes do trato digestório de bovinos leiteiros, alimentados com forragens tropicais, após o cultivo em meio contendo celulose microcristalina a 1% e incubação a 24 e 48 horas.

Isolado	24 horas de crescimento			48 horas de crescimento		
	colônia(mm)	halo(mm)	IAC*	colônia(mm)	halo (mm)	IAC*
BS58	10,00	10,00	1,0000	25,50	19,00	0,7451
BS65	10,00	0,00	0,0000	29,00	9,50	0,3276
BS80	2,00	0,00	0,0001	6,00	4,00	0,6667
BS86	26,50	12,50	0,4717	27,50	10,00	0,3636
BS87	22,00	8,00	0,3636	61,00	12,00	0,1967
BS117	2,00	0,00	0,0000	20,00	9,00	0,4500
BS119	12,50	21,00	1,6800	26,00	9,00	0,3462
BS 17	19,00	0,00	0,0000	39,00	56,00	1,4359
B910	12,00	0,00	0,0000	59,00	0,00	0,0000
B912	9,00	0,00	0,0000	20,00	0,00	0,0000
B933	13,00	0,00	0,0000	34,00	0,00	0,0000
B934	14,00	0,00	0,0000	40,00	70,00	1,7500
BC42	20,00	0,00	0,0000	46,00	66,00	1,4348
V552	12,50	18,00	1,4400	32,00	16,00	0,5000
V685	10,00	0,00	0,0000	32,00	14,00	0,4375
V693	10,00	0,00	0,0000	20,00	0,00	0,0000
V705	11,00	0,00	0,0000	34,00	36,00	1,0588
V832	20,00	0,00	0,0000	33,00	59,00	1,7879
V835	18,00	0,00	0,0000	40,00	54,00	1,3500
V836	18,00	0,00	0,0000	34,00	47,00	1,3824
V841	12,00	0,00	0,0000	30,00	71,00	2,3667
Médias	13,50	3,31	0,2360 B	32,76	26,74	0,7905 A

*IAC corresponde ao índice de atividade celulolítica, que mede a relação do diâmetro do halo de degradação da celulose microcristalina pelo diâmetro da colônia.

Médias de IAC com letras distintas diferem estatisticamente pelo teste não paramétrico de Wilcoxon com $p < 0,05$.

Outros estudos avaliaram os efeitos da adição do extrato de *Aspergillus oryzae*, espécie utilizada na produção de molho de soja, sobre amostras do fungo anaeróbio *Neocallimastix frontalis*, proveniente do rúmen de vacas leiteiras. Verificou-se aumento de três vezes na produção de zoósporos móveis de *N. frontalis*, indicando o promissor potencial da adição do extrato de *A. oryzae* no ambiente ruminal, uma vez que esse fungo anaeróbio do rúmen está diretamente relacionado à degradação de fibras vegetais lignificadas (SCHMIDT et al., 2004). Culturas microbianas vivas dos fungos exógenos *Aspergillus oryzae* e *Sacchariomyces cerevisiae* e os seus respectivos extratos têm sido utilizados como suplementos alimentares na dieta dos animais, podendo melhorar a produtividade de ruminantes entre 7% a 8% (MARTIN; NISBET 1992; WALLACE, 1994). Esses e outros estudos, envolvendo a adição desses fungos no trato digestório dos ruminantes corroboram o potencial para utilização dos fungos avaliados neste estudo com isolados do próprio ambiente ruminal dos animais. 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.

CONCLUSÃO

Isolados do gênero *Aspergillus* apresentam maior atividade celulolítica quando comparados aos do gênero *Rhizopus* e demonstram maior capacidade de degradação da celulose com 48 horas de incubação. Oito isolados de *Aspergillus* spp. e seis de *Paecilomyces* spp. apresentam atividade celulolítica superior a um, o que indica boa capacidade para degradação da celulose e elevado potencial para o desenvolvimento de probióticos ou prebióticos na alimentação de ruminantes.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, F. O. et al. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. **Current Microbiology**, New York, v. 69, n. 5, p. 649-659, 2014.
- ALMEIDA, P. N. M. et al. Aerobic fungi in the rumen fluid from dairy cattle fed with different sources of forage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 11, p. 2336-2342, 2012.
- AMORE, A.; FARACO, V. Potential of fungi as category i consolidated bioprocessing organisms for cellulosic ethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 16, n. 5, p. 3286-3301, 2012.
- CASADEVALL, A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. **Fungal Biology Reviews**, Manchester, v. 21, n. 4, p. 130-132, 2007.
- DEHORITY, B. A. Microbial Interactions in the Rumen. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Luz, v. 15, p. 69-86, 1998.
- DIRKSEN, G. Sistema digestivo. In: Dirksen, G.; Gründer, H.D.; Stöber, M. (Ed.). **Rosenberger: exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p. 167-169, 1993.
- KAMRA, D. N. Rumen Microbial Ecosystem. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 1, p. 125-35, 2005.
- KAVANAGH, K. Fungi: **Biology and applications**. John Wiley and Sons Editors. 2005. 267 p.
- KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Research**, Magarpatta, v. 7, p. 10, 2011.
- LACAZ, C. S. **Tratado de micologia médica Lacaz**. 9. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.
- LACAZ, C. S. et al. **Guia Para Identificação de Fungos Actinomicetos e Algas de Interesse Médico**, 8. Ed. São Paulo: Sarvier, 1998.
- LOPES, F. C. F. et al. Efeitos da Defaunação em Ovinos Alimentados Com Cana-de-Açúcar (*Saccharum Officinarum*, L.) Adicionada de Uréia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n. 2, p.180-182, 2002.
- MARTILLOTTI, F. et al. Microbial and chemical characterization of rumen contents of grazing dairy cows, In: Prins R.A., Stewart C.S. (Ed.), **Microorganisms in Ruminant Nutrition**. Dalfsen: Nottingham University Press, p.43-48, 1994.
- MARTIN, A. S.; NISBET, D. J. Effect of direct-fed microbial on rumen microbial fermentation. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 6, p. 1736-1744, 1992.
- MOUNTFORT, D. O.; RHODES, L. L. Anaerobic growth and fermentation characteristics of *Paecilomyces lilacinus* isolated from mullet gut. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 1963-1968, 1991.
- OYELEKE, S. B.; OKUSANMI, T. A. Isolation and characterization of cellulose hydrolyzing microorganism from the rumen of ruminants. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 10, p. 1530-1504, 2008.
- PINTO, G. A. S. et al. Selection of Tannase-Producing *Aspergillus Niger* Strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 24-26, 2001.
- SAEG – **Sistema para Análises Estatísticas**. Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes. Viçosa, UFV, 2007.
- SCHMIDT, J. A. et al. Characterization of *Aspergillus oryzae* fermentation extract effects on the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*, EB 188. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 63, n. 4, p. 422-430, 2004.
- SILVA, J. O.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. Atividade enzimática, produção de slime e sensibilidade a antifúngicos de *Candida sp*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 3, p. 354-355, 2007.
- SOARES, I. A. et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.
- TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, n. 4, p.777-780, 1982.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2ªed. Ithaca: Cornell University Press, 476 p, 1994.
- WALLACE, R. J. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 11, p. 2992-3003, 1994.