



**Cultivo de fungos anaeróbios do rúmen de vacas Holandês x Zebu, sob condição de pastejo em *Brachiaria* spp., utilizando meio de cultura GSM**

Juliana Alves Resende<sup>1</sup>, Sara Barbosa de Paiva<sup>1</sup>, Thaís Barros Rispoli<sup>2</sup>, Marlice Teixeira Ribeiro<sup>3</sup>, Jailton da Costa Carneiro<sup>3</sup>, Pedro Braga Arcuri<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduanda do curso de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF. Estagiária da Embrapa Gado de Leite. e-mail: [juresende2003@yahoo.com.br](mailto:juresende2003@yahoo.com.br); [sarabp\\_farmufff@yahoo.com.br](mailto:sarabp_farmufff@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Graduanda do curso de Ciências Biológicas, Centro de Ensino Superior – CES/JF. Estagiária da Embrapa Gado de Leite. e-mail: [tbrispoli@yahoo.com.br](mailto:tbrispoli@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, MG. e-mail: [marlice@cnppl.embrapa.br](mailto:marlice@cnppl.embrapa.br); [jailton@cnppl.embrapa.br](mailto:jailton@cnppl.embrapa.br); [pba1@cnppl.embrapa.br](mailto:pba1@cnppl.embrapa.br)

**Resumo:** O papel dos fungos ruminais anaeróbios *in vivo* e sua importância para a degradação da parede celular das plantas ainda é questão discutível. O estudo da microbiota ruminal é importante, pois conhecimentos adquiridos nesta área contribuirão para incremento da degradação da parede celular, influenciando diretamente na nutrição dos ruminantes. Este artigo descreve o crescimento de fungos anaeróbios do rúmen de vacas Holandês x Zebu sob condição de pastejo em *Brachiaria* spp., num meio de cultura adequado ao crescimento de bactérias anaeróbicas (*Growth Study Medium*, GSM). O meio de cultura foi preparado, incluindo-se solução de Penicilina e Sulfato de Estreptomicina para impedir o crescimento bacteriano. Observou-se crescimento de estruturas filamentosas macroscopicamente, esporângios e sistemas de rizóides no microscópio óptico. Este meio constitui alternativa de cultivo desses tipos de microrganismos, uma vez que, na literatura não foi encontrada referência descrevendo seu uso para este fim.

**Palavras-chave:** atividade celulolítica, cultivo, fungos ruminais, nutrição de ruminantes

**Anaerobic Fungi of rumen of Holstein x Zebu cows under grazing in *Brachiaria* spp., in GSM culture medium**

**Abstract:** The role of ruminal anaerobic fungi *in vivo* and its importance for the plant cell walls degradation, still is a debatable question. The study of ruminal microbiota is very important, because of knowledge developed in this area will contribute for the increment of the degradation of the cell wall, directly influencing in the nutrition of the ruminants. This article describes on the growth of anaerobic fungi of rumen of Holstein x Zebu cows under grazing in *Brachiaria* spp., in an adequate culture medium (*Growth Study Medium*, GSM) to the growth of anaerobic bacteria. Culture medium was prepared including solution of Penicillin and Streptomycin sulfate to prevent the bacteria's growth. The growth of filament structures was observed macroscopically. The sporangia and systems of rhizoids in the microscope of light were observed. The modified GSM medium consists a new alternative of culture of these types of microorganisms, once in literature was not found any reference describing its use.

**Keywords:** cellulolytic activity, culture, ruminal fungi, ruminant nutrition

### Introdução

O rúmen abriga uma complexa mistura de partículas alimentares e microrganismos estritamente anaeróbios: protozoários, fungos e bactérias, os quais desenvolveram entre si diversos tipos de interações. Os fungos não eram descritos no ecossistema ruminal, porém foram encontrados no trato digestivo de ruminantes selvagens e domesticados (Orpin & Joblin, 1997). Estes constituem grupo de microrganismos, cuja taxonomia necessita ser consolidada. Apresentam ciclo de vida bifásico, relativamente simples. Uma característica comum dos fungos do rúmen relacionada com a nutrição animal é a habilidade de colonizar extensamente a parede celular das plantas, e produzir elevadas quantidades de enzimas (Akin & Windham, 1984). Devido à capacidade de degradação de fibras, os fungos vivem em maior abundância nos animais que se alimentam de forragens maduras (ricas em fibras) em comparação com animais que se alimentam de forragens novas ou grãos de cereais. A degradação da parede celular pelos fungos se deve à associação deste com a fibra da planta (Obispo, 1992). Assim, o tipo de dieta que o animal hospedeiro

ingere exerce influência significativa na população ruminal de fungos. O papel dos fungos anaeróbios *in vivo* e sua importância para a degradação da parede celular das plantas é importante, pois influi diretamente na nutrição dos ruminantes, resultando em maior produtividade animal.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de fungos anaeróbios do rúmen de vacas Holandês x Zebu sob condição de pastejo em *Brachiaria* spp., no meio de cultura GSM, adequado ao crescimento de bactérias anaeróbicas, com adição de antibióticos.

### Material e Métodos

O conteúdo ruminal foi obtido de uma vaca Holandês x Zebu, não-gestante, canulada no rúmen e mantida em pastagem de *Brachiaria* spp., no Campo Experimental de Coronel Pacheco (Coronel Pacheco, MG) de propriedade da Embrapa Gado de Leite. A amostra foi coletada manualmente de modo a se obter uma amostra representativa do conteúdo ruminal total, e em seguida transferida para um recipiente (garrafa térmica), devidamente identificado, desinfetado e pré-aquecido a 39°C. Após a coleta, a garrafa térmica foi armazenada em caixa de isopor e imediatamente encaminhada ao Laboratório de Microbiologia do Rúmen da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG) para análises microbiológicas. Em liquidificador previamente sanitizado, recebendo fluxo constante de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 180 mL de solução de diluição anaeróbica (3,75 mL de Solução Mineral 1; 3,75 mL de Solução Mineral 2; e 91,5 mL de água destilada). Uma alíquota de 20 g do conteúdo ruminal foi transferida para o liquidificador e, sob atmosfera de CO<sub>2</sub>, homogeneizada em velocidade máxima por três minutos. O meio de cultura GSM (*Growth Study Medium*) foi preparado seguindo as recomendações de Odenyo et al. (1991), com adição de antibiótico (Tabela 1). Em cada tubo contendo 8 mL de GSM foi adicionado 0,2 mL de solução de cisteína HCl 1,25% e, após ser autoclavada, também foi acrescida a solução de antibiótico, para impedir o crescimento bacteriano. Essa solução de antibiótico incluiu 12,1 mg/mL de Penicilina G (Sigma Chemical Co.) e 2 mg/mL de Sulfato de Estreptomomicina (Vetec Química Fina LTDA), conforme recomendação de Joblin (1981). A preparação da solução de antibiótico ocorreu sob condições anaeróbicas e esta foi esterelizada pelo processo de filtração (filtro de membrana Millipore, 0,45 µm de poro).

Tabela 1 Constituintes do meio de cultivo GSM modificado, para 100 mL, com acréscimo de antibiótico

Ingredientes	Volume (mL)	Quantidade (g)
Glicose	-	0,3
Triptona	-	0,2
Extrato de carne	-	0,1
Solução mineral 1 <sup>a</sup>	5	-
Solução mineral 2 <sup>b</sup>	5	-
Ácidos graxos voláteis	1	-
Resazurina 0,1%	0,1	-
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	0,4
Água destilada	81,9	-
Solução de antibiótico <sup>c</sup>	1	-

<sup>a</sup>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6% (p/vol) em água destilada; <sup>b</sup>KHPO<sub>4</sub> 0,6%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 1,2%, NaCl 1,2%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,25%, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0,16% (p/vol) em água destilada; <sup>c</sup>Volume de antibiótico para cada 8 mL de GSM, acrescido após ser autoclavado. Concentração final no meio: 1,34 mg/mL de Penicilina G e 0,22mg/mL de Sulfato de Estreptomomicina.

Com auxílio de uma seringa de plástico estéril, o conteúdo foi transferido anaerobicamente (1 mL) para tubos de ensaio vedados com rolhas de borracha butil, impermeáveis a gases, e selados com lacres de alumínio. O procedimento foi repetido em triplicata, por duas vezes, em semanas diferentes. Logo após a inoculação os tubos foram incubados a 39°C. A verificação do crescimento foi feita visualmente, pela observação no microscópio óptico, de hifas e esporângios, a partir de 48 h até sete dias de cultivo, corando-se as lâminas com azul de lactofenol-algodão.

Foi também medida a variação do pH de acordo com tempo de crescimento, sendo utilizados tubos em duplicata, inoculados com 1 mL de amostra de conteúdo ruminal.

### Resultados e Discussão

O crescimento de fungos anaeróbios foi observado macroscopicamente pela presença de estruturas filamentosas em meio de cultivo anaeróbico (GSM modificado). Nos tubos havia aglomerados de bolores junto às fibras. A análise microscópica mostrou a presença de hifas e esporângios aderidos aos fragmentos de fibras, confirmando experimentos *in vitro* que demonstraram abundante digestão dos

componentes fibrosos das plantas por parte dos fungos anaeróbios (Akin & Windham, 1984). A concentração de antibióticos foi aquela utilizada por Joblin (1981) e confirmada por Tripathi et al. (2007), porém não foi eficaz neste estudo, porque houve crescimento de bactérias no meio. Provavelmente existe resistência de algumas bactérias ruminais e novos estudos necessitam ser realizados com o objetivo de encontrar a concentração ideal de antibiótico. A Figura 1 representa fotomicrografias (Canon PowerShot A640), sendo observados esporângios e sistemas de rizóides. A Figura 2 mostra a redução do pH do meio, indicando atividade fermentativa dos fungos. O crescimento de fungos no meio GSM constitui nova alternativa de cultivo, uma vez que, na literatura não foi encontrada nenhuma referência descrevendo o uso deste meio de cultivo para o crescimento de fungos. Este meio possibilitou o crescimento dos fungos anaeróbios, devido à presença de substratos essenciais para o cultivo destes microrganismos.

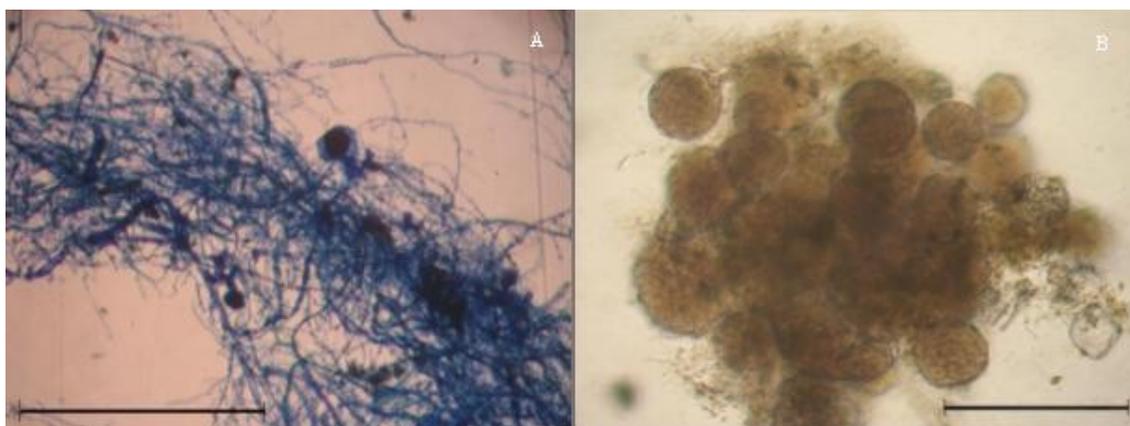


Figura 1 Fotomicrografias de fungos do conteúdo ruminal de vacas mestiças sob pastejo em *Brachiaria* spp. (A) Barra: 0,2 mm e zoom 5.1x. (B) Barra: 0,2 mm e zoom de 9.1x.

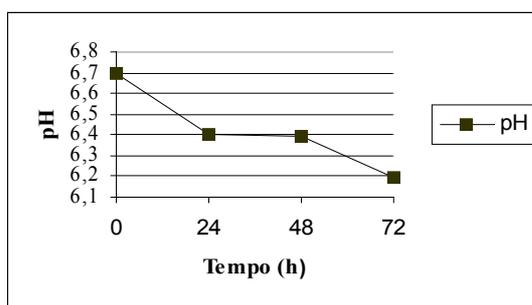


Figura 2 Variação do pH nos tubos contendo o meio de cultura GSM e inóculo, de acordo com o tempo.

### Conclusões

O meio de cultivo utilizado permitiu a observação de estruturas semelhantes a fungos ruminais anaeróbios em vacas mestiças sob pastejo em *Brachiaria* spp. A presença desses microrganismos mostrou que estes são capazes de crescer em meio contendo glicose como açúcar solúvel.

### Literatura citada

- AKIN, D.E.; WINDHAM, W.R. Rumen fungi and forage fiber degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.3, p.473-476, 1984.
- JOBLIN, K.N. Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, n.6, p.1119-1122, 1981.
- OBISPO, N. Los Hongos Anaeróbicos del Rumen. **Revista Zootecnia Tropical**, v.10, n.1, p.91-107, 1992.
- ODENYO, A.A.; MACKIE, R.I.; FAHER, G.Jr. et al. Degradation of wheat straw and alkaline hydrogen peroxide – treated wheat straw by *Ruminococcus albus* 8 and *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. **Journal of Animal Science**, v.69, p.819-826, 1991.
- ORPIN, C.G.; JOBLIN, K.N. The rumen anaerobic fungi. In: HOBSON P.N.; STEWART, C.S. (Ed.). **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2. ed. London: Blackie Academic, 1997. p.140-195.
- TRIPATHI, V.K.; SEHGAL, J.P.; PUNIYA, A.K. et al. Hydrolytic activities of anaerobic fungi from wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*). **Anaerobe**, v.13, p.36-39, 2007.