

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Agrárias
Programa de Pós-graduação em Produção Animal

Valdo Soares Martins Júnior

**FUNGOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE OVINOS MELHORAM A
DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DA TORTA DE MACAÚBA**

Montes Claros

2023

Valdo Soares Martins Júnior

**FUNGOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE OVINOS MELHORAM A
DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DA TORTA DE MACAÚBA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Eduardo Robson Duarte

Montes Claros

2023

Martins Júnior, Valdo Soares .

M379f Fungos do trato digestório de ovinos melhoram a digestibilidade in vitro da torta de
2024 macaúba [manuscrito] / Valdo Soares Martins Júnior. Montes Claros, 2023.
58 f.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Produção Animal. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Eduardo Robson Duarte.

Banca examinadora: Vera Lúcia dos Santos, Júnio Cota Silva, Thiago Gomes dos Santos Braz.

Inclui referências: f. 20-26; 51-58.

1. Nutrição animal. 2. Ruminante - Alimentação e rações. 3. Carneiro. I. Duarte, Eduardo Robson. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 636.084.4



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Agrárias
Colegiado de Pós-Graduação em Produção Animal

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 3 dias do mês de julho de 2023 às 14:00 horas, sob a Presidência do Professor Eduardo Robson Duarte, D. Sc. (Orientador – UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Thiago Gomes dos Santos Braz, D. Sc. (Coorientador – UFMG/ICA), Junio Cota Silva, D. Sc. (UFMG/ICA) e Vera Lúcia dos Santos, D. Sc. (UFMG/ICB), reuniu-se, por videoconferência, a Banca de defesa de dissertação de Valdo Soares Martins Júnior, aluno do Curso de Mestrado em Produção Animal. O resultado da defesa de dissertação intitulada “ Fungos do trato digestório de ovinos melhoram a digestibilidade *in vitro* da torta de macaúba”. sendo o aluno considerado aprovado. E, para constar, eu, Professor Eduardo Robson Duarte, Presidente da Banca, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: O aluno somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 53 do regulamento e da resolução 05/2016 do Curso de Mestrado em Produção Animal.

Montes Claros, 3 de julho de 2023.

Eduardo Robson Duarte
Orientador

Thiago Gomes dos Santos Braz
Coorientador

Junio Cota Membro Silva
Membro

Vera Lúcia dos Santos
Membro

Dedico, a minha mãe, Arlete Fernandes Lopes Martins,
pelo amor incondicional e por todo apoio para que nunca
desistisse dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela graça concedida e por me fazer acreditar que tudo é possível quando é feito com amor.

À toda minha família, pelo apoio fornecido durante esse período, em especial a minha mãe (Arliete), ao meu pai (Valdo Soares) *in memoriam*, e meu avô (Arivaldo) *in memoriam* por todas as demonstrações de carinho e os ensinamentos passados.

Ao professor Dr. Eduardo Robson Duarte, pela orientação, amizade, companheirismo e paciência. Serei eternamente grato a tudo que me possibilitou e permitiu alcançar.

A Lavínia Francine, pelo apoio, paciência, dedicação, companheirismo e incentivo durante esses anos ao meu lado.

Aos meus amigos e integrantes do Grupo de Estudo e Pesquisa em Microbiologia e Parasitologia (GEMP) que contribuíram diretamente ou indiretamente para a elaboração desta pesquisa.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), à coordenação do Mestrado em Produção Animal e aos professores do programa.

A Fundação de Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) (projeto APQ-03221-21), pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

E a todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. A vocês meus sinceros agradecimentos.

“Ninguém educa ninguém, ninguém se educa sozinho, nos educamos mutuamente”.

(Paulo Freire)

RESUMO

Com a constante volatilidade nos preços dos ingredientes comumente utilizados na formulação de dietas para ruminantes, o uso de coprodutos industriais torna-se atrativo, uma vez que fornecem os nutrientes necessários a um custo reduzido. Os fungos presentes no trato digestório de ruminantes têm a capacidade de hidrolisar materiais lignocelulolíticos, promovendo assim um melhor aproveitamento dos nutrientes em dietas que contêm coprodutos. Os objetivos deste estudo foram analisar a ação dos fungos presentes no trato digestório de ovinos na utilização da torta de Macaúba (TM) e avaliar a digestibilidade in vitro desse coproduto inoculado com isolados de fungos celulolíticos selecionados. Inicialmente, foram avaliados quais fungos apresentavam as melhores taxas de degradabilidade da TM durante o processo de fermentação submersa. As fermentações foram conduzidas em tubos contendo água destilada e TM como fonte de nutrientes. Foram analisados o pH final, a biomassa fúngica e a degradabilidade do substrato. Nesta etapa, os fungos que apresentaram maiores valores de degradabilidade e produção de biomassa durante o processo fermentativo foram o *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp., com taxas de degradabilidade de 6,55%, 5,58% e 4,80%, respectivamente. Quanto à variável produção de biomassa, os resultados obtidos foram 4,921 g/L, 3,880 g/L e 3,512 g/L, respectivamente. O isolado de *Aspergillus fumigatus* não foi selecionado para o ensaio de digestibilidade devido ao seu potencial de patogenicidade, o que inviabilizaria sua utilização como aditivo microbiano. Posteriormente, foram analisados os coeficientes de digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) da TM inoculada com isolados de *Trichoderma longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp., ou com a mistura de ambos. O grupo inoculado com a mistura dos fungos apresentou um aumento na DIVMS e DIVFDN de, respectivamente, 19,75% e 38,51%, quando comparado ao grupo controle. Dessa forma, a adição da mistura desses microrganismos indica um potencial promissor para o desenvolvimento de aditivos microbianos a serem utilizados na suplementação de ovinos alimentados com coprodutos com elevados teores de fibras.

Palavras – chave: alimentação animal; coprodutos; ruminantes; *Acrocomia aculeata*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Paecilomyces* sp.

ABSTRACT

With the constant fluctuation in the prices of commonly used ingredients in formulating ruminant diets, the use of industrial by-products becomes appealing as they provide the necessary nutrients at a reduced cost. Ruminant digestive tract fungi can hydrolyze lignocellulosic materials, promoting better nutrient utilization in diets containing by-products. In this study, the objectives were to analyze the action of fungi from the digestive tract of sheep in the utilization of Macaúba cake (MC) and to evaluate the in vitro digestibility of this by-product inoculated with selected cellulolytic fungi isolates. Initially, the study assessed which fungi exhibited better degradability rates of TM during the submerged fermentation process. Fermentations were conducted in tubes containing distilled water and TM as a nutrient source. The final pH, fungal biomass, and substrate degradability were evaluated. Fungi that demonstrated higher degradability values and biomass production during the fermentation process were *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma longibrachiatum*, and *Paecilomyces* sp., with degradability rates of 6.55%, 5.58%, and 4.80%, respectively. Biomass production results were 4.921 g/L, 3.880 g/L, and 3.512 g/L, respectively. The *Aspergillus fumigatus* isolate was not selected for the digestibility test due to its pathogenic potential, which would make its use as a microbial additive unfeasible. Subsequently, the in vitro coefficients of dry matter digestibility (IVDMS) and neutral detergent fiber (IVNDFD) of TM inoculated with isolates of *Trichoderma longibrachiatum* and *Paecilomyces* sp., or their mixture, were analyzed. The group inoculated with the fungal mixture showed an increase in IVDMS and IVNDFD of 19.75% and 38.51%, respectively, compared to the control group. Thus, the addition of this microbial mixture indicates promising potential for developing microbial additives for supplementation in sheep fed with by-products with high fiber content.

Keywords: animal feeding; fungal isolates; co-products, ruminants; *Acrocomia aculeata*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Paecilomyces* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplar de *Acrocmia aculeata* com aproximadamente 4 metros de altura (imagem A), fruto da palmeira macaúba (imagem B) e torta de macaúba obtida após a extração do óleo (imagem C). 19

Figura 2: Comportamento do pH final das fermentações da torta de macaúba inoculada por *Trichoderma longibrachiatum* ou *Paecilomyces* sp. ao longo dos quatro períodos de incubações 45

Figura 3: Valores médios das degradações da torta de macaúba inoculada com isolados *Trichoderma longibrachiatum* ou *Paecilomyces* sp. ao longo de quatro dias de fermentação. 46

Figura 4: Biomassa fúngica (g/L) produzida pelo *Trichoderma longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp. inoculados em meio contendo torta de macaúba ao longo de quatro dias de fermentação. 47

Figura 5: Características macroscópicas e microscópicas dos isolados de *Paecilomyces* sp. (A1 e A2), *Trichoderma longibrachiatum* (B1 e B2), *Aspergillus niger* (C1 e C2), *Aspergillus terreus* (D1 e D2), *Rhodotorula mucilaginosa* (e1 e e2) crescidos em placas contendo ágar sabouraud dextrose (Kasvi®, Terámo, Itália) acrescidos de clorafenicol (150 mg/L), e visualizadas em microscópio óptico em aumento de 400x. 57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Identificação molecular de fungos micelianos isolados do trato digestório de ovinos criados em pastagens tropicais 37
- Tabela 2:** Composição bromatológica (g/kg de MS) da torta de macaúba utilizada, proveniente cooperativa de agricultores familiares e agroextrativista ambiental do vale do Riachão LTDA 39
- Tabela 3:** Valores médios de pH, biomassa fúngica e degradabilidade do substrato, coletadas após 96 horas de fermentação submersa da TM sob agitação a 120 rpm a 39°C inoculada com diferentes fungos autóctones isolados do ambiente ruminal de ovinos 44
- Tabela 4:** Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) da TM inoculada com fungos micelianos provenientes do trato digestório de ovinos 48
- Tabela 5:** Valores médios de pH durante o período de fermentação da torta de macaúba inoculada com os fungos autóctones isolados do ambiente ruminal de ovinos 55
- Tabela 6:** Valores médios da degradabilidade do substrato (%) durante o período de fermentação da torta de macaúba inoculada com os fungos autóctones isolados do ambiente ruminal de ovinos 55
- Tabela 7:** Valores médios de biomassa fúngica (g/L) durante o período de fermentação da torta de macaúba inoculada com os fungos autóctones isolados do ambiente ruminal de ovinos 56
- Tabela 8:** Unidades formadoras de colônias (nº/ml) de fungos micelianos durante a digestão *in vitro* da torta de macaúba inoculada ou não com cepas de fungos provenientes do trato digestório de ovinos 56

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1. USO DE COPRODUTOS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES	16
3.2. MACAÚBA (<i>ACROCOMIA ACULEATA</i> (JACQ.) LODD. EX MART.)	17
3.4. FUNGOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE RUMINANTES	20
3.5. SUPLEMENTAÇÃO COM ADITIVOS FÚNGICOS EM DIETAS DE RUMINANTES	23
4. REFERÊNCIAS	26
5. ARTIGO	33
5.1. FUNGOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE OVINOS MELHORAM A DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DA TORTA DE MACAÚBA	33
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1. ISOLADOS FÚNGICOS AVALIADOS	36
2.2. COPRODUTO UTILIZADO	38
2.3. EXPERIMENTO 1 - SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS DO AMBIENTE RUMINAL PARA A DEGRADAÇÃO DA TORTA DE MACAÚBA DURANTE FERMENTAÇÃO SUBMERSA	39
2.3.1. Determinação da massa fúngica, degradação do substrato e pH final	40
2.4. EXPERIMENTO 1.2 – CINÉTICA FERMENTATIVA DOS ISOLADOS FÚNGICOS SELECIONADOS DURANTE FERMENTAÇÃO SUBMERSA	41
2.5. EXPERIMENTO 2 - DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE TORTA DE MACAÚBA (<i>ACROCOMIA ACULEATA</i>) INOCULADA COM FUNGOS MICELIANOS ISOLADOS DO TRATO GASTROINTESTINAL DE OVINOS	41
2.5.1. Coleta de fluido ruminal	41
2.5.2. Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca e da fibra em detergente neutro da torta de Macaúba	42
2.5.3. Coleta e quantificação de fungos micelianos	43
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
3. RESULTADOS	44
3.1. EXPERIMENTO 1.1. - SELEÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS DO AMBIENTE RUMINAL PARA A DEGRADAÇÃO DA TORTA DE MACAÚBA DURANTE FERMENTAÇÃO SUBMERSA	44

3.2. EXPERIMENTO 1.2 - CINÉTICA FERMENTATIVA DOS ISOLADOS FÚNGICOS SELECIONADOS DURANTE FERMENTAÇÃO SUBMERSA	45
3.3. EXPERIMENTO 2 - DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE TORTA DE MACAÚBA (<i>ACROCOMIA ACULEATA</i>) INOCULADA COM FUNGOS MICELIANOS ISOLADOS DO TRATO GASTROINTESTINAL DE OVINOS	47
3.3.1. Quantificação de fungos micelianos	48
4. DISCUSSÃO	49
5. CONCLUSÃO	53
MATERIAL SUPLEMENTAR	55
REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

A utilização de ingredientes alternativos na alimentação animal é vista como uma opção econômica de grande importância considerando a constante oscilação nos preços dos insumos que compõem a dieta concentrada de ruminantes (AZEVEDO et al., 2012; SILVA et al., 2015).

A substituição de ingredientes tradicionais, como o milho e farelo de soja, por outros de menor custo deve ser considerada, caso haja benefícios em termos econômicos e nutricionais. Os resíduos da agroindústria oriundo a produção de biodiesel pode conter níveis satisfatórios de energia, proteína e fibra, que atendam às exigências nutricionais dos ruminantes, podendo ser empregados como substitutos de forma total ou parcial dos ingredientes comumente utilizados, como o milho e farelo de soja (NICORY et al., 2015; SILVA et al., 2015).

A torta de macaúba, um resíduo advindo da extração do óleo da casca (epicarpo) e polpa do fruto (mesocarpo) da macaúba, A palmeira (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.) possui grande disseminação em território brasileiro, sendo amplamente espalhada em regiões semiáridas. Análises químicas preliminares demonstram que esse coproduto pode ser aproveitado na alimentação de ruminantes devido as suas proporções de extrato etéreo e fibras, entretanto um dos obstáculos para sua utilização se dá ao seu elevado teor de lignina que pode chegar a valores superiores a 20% da matéria seca (AZEVEDO et al., 2012; RIGUEIRA et al., 2017).

Os fungos que colonizam o rúmen possuem papel substancial na digestão de materiais fibrosos, degradando os polissacarídeos mais complexos⁶. A degradação dos componentes lignocelulolíticos da dieta dos ruminantes se dá pela atividade enzimática e mecânica desempenhada pelos fungos do ambiente ruminal, estudos comprovam que dietas contendo altas proporções de fibras estimulam o desenvolvimento de populações fúngicas nesse ecossistema (WEI et al., 2016; ABRÃO et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Objetivou-se avaliar a ação de fungos provenientes do ambiente ruminal de ovinos durante o processo de fermentação e digestibilidade *in vitro* da torta de Macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.).

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o potencial de utilização da torta de Macaúba como fonte de nutrientes pelos isolados fúngicos provenientes do trato gastrointestinal de ovinos em fermentação submersa;

Analisar a cinética fermentativa dos fungos *Paecilomyces* sp., *Trichoderma longibrachiatum* durante o processo de fermentação submersa da torta de Macaúba;

Determinar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e fibra em detergente neutro (DIVFDN) da torta de Macaúba, inoculadas com os fungos selecionados em condições de fermentação ruminal.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Uso de coprodutos na nutrição de ruminantes

Em diferentes regiões produtoras de ruminantes, tem-se buscado utilizar coprodutos de agroindústrias, para reduzir o descarte de resíduos e melhorar a eficiência e desempenho dos animais, atendendo às exigências nutricionais. Adicionalmente, ocorre a otimização dos custos, uma vez que, diferentemente do milho e soja, os coprodutos de agroindústrias não são considerados *commodities* (FERRO *et al.*, 2020).

A parte aérea de mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) demonstrou potencial para uso em dietas de ruminantes, podendo ser fornecida *in natura* ou conservada, estando na forma de silagem ou feno (Pereira *et al.*, 2018). Características como o alto teor de energia, além das folhas apresentarem também elevado teor proteico (14%). Entretanto, deve-se considerar os tipos de cultivares e a idade da planta (TININI *et al.*, 2021).

Outro alimento alternativo que pode ser utilizado na dieta de ruminantes é a torta de dendê, pois possui disponibilidade durante todo o ano. Entretanto, análise da inclusão para ovinos, indicou que a torta de dendê, acima de 7,5% reduz o consumo de matéria seca e a digestibilidade dos nutrientes, o que promoveria menor desempenho dos animais (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

O uso de resíduos da agroindústria, produtoras de polpas de frutas, como abacaxi, acerola, cupuaçu e maracujá, representa alternativa na alimentação de ovinos para redução de custos (PAZDIORA *et al.*, 2019). Esses autores observaram que os resíduos do maracujá apresentam maiores consumo e ganho de peso em comparação a outras polpas e, observaram também que a utilização da dieta com resíduo de acerola promoveu maior tempo de ruminação e menor tempo de ócio.

Outras pesquisas avaliaram alimentos como torta de macaúba (AZEVEDO *et al.*, 2012) coprodutos da bananicultura (SILVA *et al.*, 2017) e indicaram diminuição dos custos e aproveitamento dos resíduos principalmente em regiões semiáridas.

3.2. Macaúba (*Acrocomia Aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.)

A *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.) é uma planta nativa das regiões central e sul da América do Sul, adaptada às regiões com solos arenosos e baixo índice pluviométrico, conhecida popularmente por bocaíuva, chiclete baiano, coco – catarro, macaúba, coco de espinho, coco baboso, mucaja e macaúba (GRAY, 2005; TEXEIRA, 1996). Entre as espécies de palmeiras encontradas no território brasileiro, a macaúba é a espécie de maior ocorrência, sendo encontrada em maior frequência nas regiões do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (MOTTA *et al.*, 2002).

A Macaúba pode atingir de 10 a 15 m de altura e 20 a 30 cm de diâmetro, apresenta região dos nós com coberta por espinhos com aproximadamente 10 cm de comprimento. As folhas são verdes, pinadas com 4 a 5 m de comprimento, sendo compostas por 130 folíolos de cada lado e espinhos em sua nervura central (LORENZI, 2006; MIRANDA *et al.*, 2001; LORENZI *et al.*, 1996, TEXEIRA, 1996). Dispõem de inflorescências amarelas fixadas em um eixo carnoso, flores unissexuadas e inconspícuas envolvidas por uma estrutura denominada espata com 2 metros de comprimento. Os frutos são de tom marrom-amarelado de formato esférico, seu mesocarpo é fibroso, rico em açúcares de tonalidade amarelada ou esbranquiçada, podendo ser comestível. O endocarpo é duro e escuro aderido fortemente a uma semente de aproximadamente 3 mm de espessura (Figura 1) (HENDERSON *et al.*, 1995; SILVA, 1994).

Os frutos dessa palmeira apresentam elevado teor de óleo, que depois de extraídos podem ser utilizados como matéria prima para a fabricação de sabão, lubrificante para máquinas, cosméticos e produção de biodiesel).

Estruturalmente esses frutos são formados por cerca de 20% de casca, 40% de polpa, 33% de endocarpo e 7% de amêndoa. A quantidade de óleo obtido pelo beneficiamento da polpa é superior, quando comparado aos extraídos da amêndoa; entretanto, por ser mais fino e de melhor qualidade, o óleo da amêndoa é utilizado para a produção de produtos nobres beneficiados pela indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (INSTITUTO

INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA AGRICULTURA – IICA, 2009). O processamento do coco macaúba para extração do óleo produz grande quantidade de resíduos, tendo a torta de macaúba (TM) como maior subproduto produzido, representando cerca de 50% do total dos frutos beneficiados (MOTTA et al., 2002).

A torta apresenta potencial para ser utilizada como ingrediente na formulação de dietas de ruminantes devido aos altos teores de FDN (60%) e extrato etéreo (8,1%), além disso, esse coproduto é alternativa viável para a alimentação dos rebanhos nas regiões semiáridas devido à disponibilidade da palmeira nessas regiões (RUFINO et al., 2011). Um entrave na utilização da TM para a alimentação animal é a falta de padronização do material, devido à forma artesanal para a obtenção desse resíduo, o que promove variação da composição bromatológica desse coproduto (BARRETO,2008).

A TM pode apresentar 8% de proteína bruta, que se assemelha ao milho. Em algumas regiões do país, como as regiões semiáridas, alimentos como a TM representam alternativa na alimentação de ruminantes, (RIGUEIRA *et al.*, 2017).

No estudo desenvolvido por Rufino *et al.*, (2011) avaliou-se a resposta da inclusão de quatro níveis de TM sobre as espécies de protozoários ruminais em caprinos criados na região semiárida. As concentrações de 10 e 15% estimularam o desenvolvimento de protozoários médios sem reduzir a contagem dos demais grupos. Os autores concluíram que dos dezessete gêneros encontrados, apenas os gêneros *Entodinium* e *Charonina* foram alterados com a inclusão da TM na dieta, demonstrando a estabilidade da microbiota ruminal.

Ao avaliar o efeito da introdução da TM na matéria seca da dieta sobre o desempenho econômico, produtivo e no consumo de nutrientes em ovinos mestiços, Azevedo *et al.*, (2012) observaram que a inclusão de 100 g/kg da TM aumentou em 5,4% e 12,4% a receita líquida por animal abatido, ao se comparar com os níveis de inclusão de 0 g/kg e 300 g/kg, respectivamente. Entretanto, não foram verificadas diferenças para as variáveis, consumo de matéria seca, ganho médio diário e ganho de peso vivo final.

Ao avaliar o comportamento ingestivo de ovinos, Azevedo *et al.*, (2013) constataram aumento linear na eficiência de alimentação, número de bolos

ruminados, número diário de mastigações, tempo de ruminação e tempo total de mastigação com a inclusão da TM. Contudo, não foram observadas diferenças no desempenho produtivo e consumo dos animais avaliados (AZEVEDO *et al.*, 2013).

Brandão (2013), ao comparar a digestibilidade aparente da TM com a da cana de açúcar picada como fonte de volumoso na dieta de ovinos, constatou que a inclusão da TM apresentou maior digestibilidade da fração do extrato etéreo (14,3%), o que demonstrou que esse coproduto pode ser uma opção viável para melhoria na qualidade da carcaça e desempenho produtivo de ovelhas em lactação e cordeiros em fase de terminação. O elevado teor de fibra em detergente ácido (FDA) da TM, quando comparado a cana de açúcar, pode ter afetado negativamente na digestibilidade da matéria seca, pois o FDA é a porção menos digerível da parede celular das forrageiras, por ser constituída basicamente de celulose e lignina, o que prejudica a ação dos microrganismos ruminais.

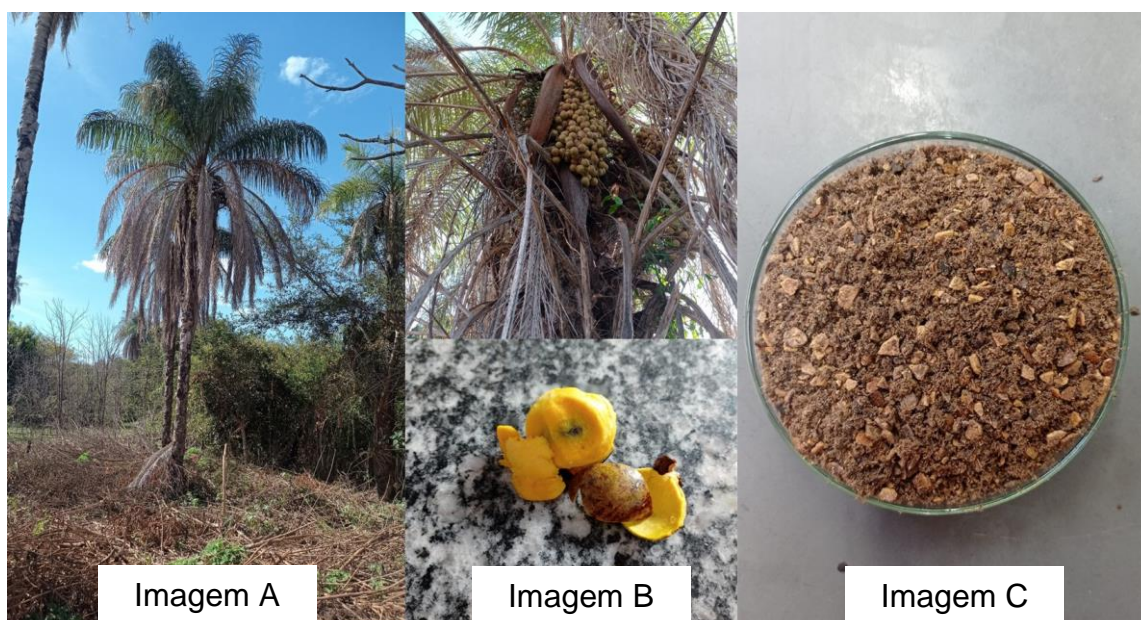


Figura 1: Exemplar de *Acrocmia aculeata* com aproximadamente 4 metros de altura (imagem A), fruto da palmeira macaúba (imagem B) e torta de macaúba obtida após a extração do óleo (imagem C).

Fonte: Arquivo Pessoal.

3.3. Ambiente ruminal

O ecossistema ruminal é complexo e atua na fermentação do alimento consumido pelo animal. Esse processo acontece por intervenção dos microrganismos que colonizam o rúmen, que transformam o alimento ingerido pelo animal em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), energia, proteínas (WEIMER et al., 2009).

Caracterizado por ser um ambiente anaeróbio estrito com temperaturas de 38 a 42°C, pH entre 6 e 7 e umidade na faixa de 80-90%. O rúmen atua como uma câmara fermentativa, favorecendo o crescimento de uma grande população de microrganismos (OLIVEIRA et al., 2007; LANA, 2005). É composto de partículas, agregados de alimentos e microrganismos anaeróbios que vivem de forma interativa (FONSECA; DIAS-DA-SILVA, 2001).

Dentro desse diversificado microbioma, existem bactérias ($10^{10}.\text{mL}^{-1}$), protozoários ciliados ($10^6.\text{mL}^{-1}$), fungos anaeróbicos estritos ($10^6.\text{mL}^{-1}$), fungos anaeróbios facultativos ($10^4.\text{mL}^{-1}$), enterobactérias ($10^6.\text{mL}^{-1}$), micoplasmas (interdeminado) e bacteriófagos ($10^8.\text{mL}^{-1}$). A comunidade de microrganismos ruminais, estabelece diversas interações para o equilíbrio ruminal, como a atividade fermentativa e inibição do crescimento de microrganismos contaminantes. As interações são responsáveis pela bioconversão dos alimentos em substâncias utilizadas pelo animal (OLIVEIRA et al., 2007; KOZLOSKI, 2011; ABRÃO et al., 2014), como o AGCC e as proteínas microbiana (HUNGATE, 1966; HENDERSON et al., 2015).

A composição do ecossistema microbiano ruminal é influenciada pela dieta e sua frequência de distribuição, idade, condições do animal hospedeiro e bem como as interações microbianas (WELKIE et al., 2010; JAMI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013).

3.4. Fungos do trato digestório de ruminantes

Os ruminantes apresentam um sistema digestório adaptado para o processo de fermentação, sendo capazes de digerir diferentes tipos de

forragens. O rúmen possui um ecossistema microbiano complexo e dinâmico, apresentando condições ideais para o crescimento de fungos, bactérias e protozoários (KOZLOSKI, 2011; TAPIO *et al.*, 2017).

Os microorganismos ruminais atuam sinergicamente para converter os nutrientes encontrados nas forrageiras, em compostos que serão utilizados pelo ruminante como fonte de energia para manutenção e para a produção de carne, leite e lã (KOZLOSKI, 2011; MALMUTHUGE; GUAN, 2017).

Os fungos anaeróbicos ruminais possuem a capacidade de colonizar os tecidos lignificados do material vegetal e com isso aprimorar o aproveitamento dos alimentos fibrosos (GRUNINGER *et al.*, 2014). Os fungos anaeróbicos apresentam um ciclo de vida que varia de zoósporo a micélio que recobrem as partículas alimentares e correspondem a uma biomassa aproximada de 6% a 8% do total da microbiota ruminal (KOZLOSKI, 2011).

Com o intuito de compreender a importância ecológica e o impacto dos fungos anaeróbicos no ambiente ruminal, estudos avaliando as características morfológicas e moleculares vem sendo realizados (EDWARDS *et al.*, 2017).

A ação mecânica da quebra das fibras vegetais realizada pelos fungos do gênero *Caecomyces* ocorre pela expansão dos bulbos rizoidais dentro da estrutura da célula vegetal. Esse rompimento ocorre, pois este gênero apresenta maior transcriptoma de enzimas livres, o que resulta em uma maior utilização das fibras vegetais mais complexas por este gênero fúngico (HENSKE *et al.*, 2017).

Os fungos do gênero *Neocallimastix* spp. são capazes de solubilizar pequenas porções de lignina presente na parede vegetal de plantas, além de produzir metabólitos secundários como etanol e lactato, que é utilizado como fonte de energia para o crescimento do próprio fungo (WEI *et al.*, 2016).

A ocorrência de fungos no trato digestório dos ruminantes está diretamente relacionada em função do tipo de dieta, hábito alimentar e filogenia do hospedeiro (GRUNINGER *et al.*, 2014). Em estudo avaliando, bovinos alimentados com dietas contendo 60% de palha de trigo, como fonte volumosa, observou maior predominância de fungos do gênero *Orpinomyces* (48%) e em

menor proporção os fungos dos gêneros *Cyllamyces* spp. (9%), *Piromyces* spp. (8%) e *Anaeromyces* spp. (6%) no fluido ruminal (SIROHI *et al.*, 2013).

Os caprinos, por possuírem um hábito alimentar seletivo, ingerem alimentos mais palatáveis e com alta digestibilidade, o que resulta em uma maior concentração de zoósporos na digesta, reflexo de uma maior taxa de passagem e menor tempo de aderência e ação dos fungos no alimento ingerido (LI; HOU, 2007). Fator este, que favorece a ocorrência de fungos monocêntricos e policêntricos em proporções iguais no seu fluido ruminal, diferente dos bovinos que possuem uma maior população de fungos monocêntricos (56,5%), que apresentam uma maior atividade celulolítica (EDWARDS *et al.*, 2008).

A elevada atividade hidrolítica de compostos complexos provenientes da parede celular dos vegetais realizada pelos fungos anaeróbicos que colonizam o rúmen, ocorre devido ao complexo celulosomo, que proporciona aos fungos ruminais produzirem enzimas diversificadas com variações inter e intraespecíficas (COUGER *et al.*, 2015), cuja atividade fibrolítica é superior à das bactérias (LJUNDAHL *et al.*, 2008).

A colonização do material vegetal pelos fungos está diretamente relacionada ao tempo em que os zoósporos levam para alcançar e se fixar no substrato (EDWARDS *et al.*, 2008), a degradação do substrato pode ser potencializada pela complexidade química da sua composição (SOLOMON *et al.*, 2016), as altas taxas de degradação dos componentes fibrosos resultam em um aumento da produção de AGCC e proteína microbiana, proporcionando condições favoráveis para o aumento da população microbiana e atividade enzimática no rúmen (PAUL *et al.*, 2012).

A degradação de materiais lignocelulolíticos é potencializado com a associação dos fungos com outros grupos de microrganismos ruminais, devido ao aumento da atividade enzimática (WEI *et al.*, 2015). A taxa de degradação pode variar de acordo com a cepa fúngica, o tipo de substrato e o a concentração de glicose dispersa no meio (WEI *et al.*, 2017, SOLOMON *et al.*, 2016).

3.5. Suplementação com aditivos fúngicos em dietas de ruminantes

A inclusão de fungos ou enzimas fúngicas na dieta de ruminantes pode apresentar benefícios como a melhoria no balanço positivo da microbiota, estabilização do pH ruminal e possuir ação física na degradação da parede celular das plantas (ALZAHAL et al., 2014; TRIPATHI et al., 2007). Além disso, a suplementação com esses eucariotos pode melhorar a fermentação dos alimentos ensilados (LEE et al., 2015). A utilização de aditivos fúngicos apresenta potencial promissor, pois permitiria a inclusão de maiores proporções de volumosos na dieta diminuindo os custos com a alimentação concentrada (NA; LI; LEE, 2017). USAR O TERMO ADITIVOS INVÊS DE SUPLEMENTOS.

Muitos estudos têm avaliado o efeito da inclusão de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* na alimentação de ruminantes. A utilização desse fungo pode melhorar a digestibilidade da fibra, aumentar a taxa de passagem dos alimentos e estimular o consumo de matéria seca (ELGHANDOUR et al., 2015; PUNIYA et al., 2015).

A suplementação das dietas de vacas em lactação com 3g/dia/animal de cepas de levedura aumentou a produção de total de leite (33,0 kg/dia x 32,3 kg/dia) além de elevar o teor do valor de proteína no leite dos animais, entretanto não foi observado diferenças no consumo de matéria seca (ROSSOW; RIORDAN, T.; RIORDAN, A., 2017). Em contrapartida, ao testar a inclusão de 1×10^{10} UFC/animal dia de *S. cerevisiae* SC47 na alimentação de vacas lactantes, não foram verificadas alterações na produção e qualidade do leite (DEVRIES; CHEVAUX, 2014).

A adição da cepa de *S. cerevisiae* SC47 na dieta de ovinos contendo 60% de cevada na matéria seca (MS) não resultou alterações no consumo de matéria seca e conversão alimentar (RAGHEBIAN et al., 2016). Entretanto, em outro estudo desenvolvido por Dabiri et al., (2016), verificou-se que a suplementação com essa levedura em ovelhas gestantes e lactantes, aumentou o desempenho produtivo (168 g/dia vs. 109 g/dia), e estimulou o sistema imunológico das crias.

A proliferação da população de leveduras do gênero *S. cerevisiae* no rúmen de vacas leiteiras contribui para o aumento das colônias de bactérias

fibrolíticas como *Fibrobacter succinogenes* e *Rumminococcus albus* (ALZAHAL et al., 2014). A melhoria da capacidade hidrolítica no ambiente ruminal quando é associado o uso desses inoculantes pode estar relacionado com a estabilização do pH ruminal, liberação de enzimas e a diminuição do potencial redox do líquido ruminal proporcionado pelo aumento das células leveduriformes (THRUNE et al., 2009; CHAUCHEYRAS-DURAND; FONTYM 2002). A redução do potencial redox no líquido ruminal favorece melhores condições para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbicos, principalmente aquelas sensíveis ao oxigênio, como as bactérias celulolíticas (CHAUCHEYRAS-DURAND; WALKER; BACH, 2008).

A suplementação com *Orpinomyces* sp., um fungo anaeróbio do rúmen, em dietas de bovinos não alterou o CMS dos animais (DEY et al., 2004). Contudo, foi observado maior ganho de peso diário dos búfalos alimentados com dietas compostas por 50% de palha de arroz adicionada de cepas de *Orpinomyces* sp. C -14 e *Piromyces* sp. WNG-12, além de melhorar a conversão alimentar (TRIPATHI et al., 2007).

Aspergillus oryzae é o fungo miceliano mais frequente avaliado quanto ao potencial de utilização na dieta de ruminantes (ELGHANDOUR et al., 2015; PUNIYA et al., 2015). Estudos apontam que esse fúngico estimulou o consumo de matéria seca de vacas leiteira alimentadas com silagem de milho, melhorando em 13% a produtividade desses animais durante os períodos avaliados (CHIOU; CHEN; YU, 2002).

Sun et al. (2017) verificou aumento da proteína microbiana (3,75 mg/ml x 3,38 mg/ml) e dos ácidos graxos totais no ambiente ruminal de vacas leiteiras alimentadas com dieta contendo 30% de volumoso associado a um suplemento de *A. oryzae*, o que melhorou desempenho produtivo e maior produção de energia.

Em outra pesquisa, Zicarelli et al. (2016) após avaliar a resposta de cabras suplementadas com *A.oryzae* criadas em pastagens nativas não foi observado diferença na produção de leite entre os grupos, entretanto foi verificado a redução no teor de gordura e proteína no leite dos animais que receberam o isolado fúngico.

Estudo realizado por Freitas (2018), após avaliar ensaios de digestibilidade *in vitro* de feno de *Urochloa decumbens* inoculados com cepas fungos isolados do trato digestório de ovinos, verificou que as cepas de *Trichoderma longibrachiatum*, promoveu incremento de 12,8% na digestibilidade do feno de baixa qualidade, apresentando potencial promissor para desenvolvimento de aditivo microbiano para dietas de ovinos criados em regiões tropicais.

Santos Magaço *et al.*, (2020), ao avaliar o efeito da inclusão de cepa de *Trichoderma longibrachiatum*, isolada do trato digestório de ovelhas alimentadas com pastagens tropicais, em dietas de cordeiros desmamados alimentados com dieta contendo 30% de feno de baixa qualidade. Os pesquisadores verificaram que a administração do inoculante fúngico promoveu maior ganho de peso total dos animais (1,86 kg), além de ter demonstrado melhor lucratividade com o uso da dieta associada ao aditivo microbiano.

4. REFERÊNCIAS

ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; FREITAS, C. E. *et al.* Characterization of Fungi from Ruminal Fluid of Beef Cattle with Different Ages and Raised in Tropical Lignified Pastures. **Current Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 649-59, 2014.

ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; ROSA, C. A.; FREITAS, C. E. S.; VIEIRA, E. A.; SILVA - HUGHES, A. F. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. **Current Microbiology** v. 69, p. 649-659., 2014.

ALZAHAL, O., DIONISSOPOULOS, L., LAARMAN, A. H., WALKER, N., & MCBRIDE, B. W. Active dry *Saccharomyces cerevisiae* can alleviate the effect of subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7751-7763, 2014.

LORENZI, G. M. A. C.; NEGRELLE, R. R. B. **Acrocomia aculeata (JACQ.) Lodd. ex Mart.: aspectos ecológicos.** Visão Acadêmica, 2006. Tese (doutorado), Universidade Federal do Paraná, Pós-Graduação em Produção Vegetal, 2006.

AZEVEDO, R. A. D., RUFINO, L. M. D. A., SANTOS, A. C. R. D., SILVA, L. P. D., BONFÁ, H. C., DUARTE, E. R., GERASEEV, L. C. Desempenho de cordeiros alimentados com inclusão de torta de macaúba na dieta. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.47, n.11, p. 1663-1668, 2012.

AZEVEDO, R.A.; BICALHO, F.L.; ARAÚJO, L.; RIBEIRO, JR.; SANTOS, A.C.R.; JAYME, D.G.; GERASEEV, L.C. Análise técnico-econômica de diferentes níveis da torta de macaúba em dietas para vacas leiteiras. **Archivos de Zootecnia**. v.62, n.237, p. 147-150, 2013.

AZEVEDO, R.A.; SANTOS, A.C.R.; RIBEIRO JUNIOR, C.S.; SANTOS, F.P.C.; ARAUJO, L.; BICALHO, F.L.; FONSECA, L.M.; GERASSEV, L.C. Desempenho de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo torta de macaúba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.66, n.1, p.211-218, 2014.

BARRETO, S. M. P. **Avaliação dos níveis de inclusão da torta de macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.] na alimentação de caprinos.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais- Instituto de Ciências Agrárias- Mestrado em Produção Animal, 2008.

BRANDÃO, E. G. Avaliação da torta de macaúba (*Acrocomia aculeata*) como volumosa para ovinos. **Monografia**. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília 2013.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F., & FONTY, G. Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and

fermentations in the rumen of newborn lambs. **Microbial ecology in health and disease**, v. 14, n. 1, p. 30-36, 2002.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F., WALKER, N. D., & BACH, A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, n.1, p. 5-26, 2008.

CHIOU, P. W. S., CHEN, C. R., & YU, B. Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on performance of lactating cows in the summer and winter in Taiwan. **Asian-australasian journal of animal sciences**, v. 15, n.3, p. 382-389, 2002.

COUGER, M. B. *et al.* Transcriptomic analysis of lignocellulosic biomass degradation by the anaerobic fungal isolate *Orpinomyces* sp. strain C1A, **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 208, p. 1-17, 2015.

DABIRI, N., YAZDI, A. B., HEMATI, B., BAHRANI, M., MAHDAVI, A., RAGHEBIAN, M., & HAJIMOHAMMADI, A. Effect of different levels of Biosaf probiotic in diet of late pregnant and lactating Iranian Zandi Ewes, on growth performance and immune system of their lambs. **J Fisheries Livest Prod**, v. 4, p.7 p.207, 2016.

DEVRIES, T. J., & CHEVAUX, E. Modification of the feeding behavior of dairy cows through live yeast supplementation. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n.10, p. 6499-6510. 2014.

EDWARDS, J. E.; KINGSTON-SMITH, A. H.; JIMENEZ, A. H. *et al.* Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 3, p. 537-545, 2008.

ELGHANDOUR, M. M., SALEM, A. Z., CASTAÑEDA, J. S. M., CAMACHO, L. M., KHOLIF, A. E., & CHAGOYÁN, J. C. V. Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 3, p. 526-533, 2015.

FARIAS, T.M. Reflexões sobre a cadeia produtiva da macaúba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, 5., 2008, **Dissertação Mestrado**, Lavras. Anais... Lavras: UFLA, 2008.

FERRO, M.M.; MOURA, D.C.; COSTA, F.G.; OLIVEIRA, E.B.; FERRO, R.M.; CABRAL, L.S. Parâmetros de degradação ruminal e digestibilidade in vitro de dietas para ruminantes utilizando diferentes níveis de coprodutos industriais. **Nativa**, Sinop, v. 8, n. 4, p. 533-537, 2020.

FONSECA, A. J. M; DIAS-DA-SILVA, A. A. Efeitos da eliminação dos protozoários do rúmen no desempenho produtivo de ruminantes - Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96, n. 538, p. 60-64. 2001.

FREITAS, CLAUDIO EDUARDO SILVA. Potencial de fungos do trato digestório de ovinos para utilização como probiótico. **Tese**. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 79f. 2018.

GRAY, M. **Palm and Cycad Societies of Australia**. 2005. Disponível em: <<http://www.pacsoa.org.au/palms/Acrocomia/aculeata.html>>.

GRUNINGER, R. J.; PUNIYA, A. K.; CALLAGHAN, T. M. *et al.* Anaerobic fungi (phylum *Neocallimastigomycota*): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, p. 1-17, 2014.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field Guide to the Palms of the Americas**. New Jersey: Princeton University, 1995. v. 5388, p.166-167.

HENDERSON, G.; COX, F.; GANESH, S. *et al.* Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p.1-15, 2015.

HENSKE, J. K.; GILMORE, S. P.; KNOP, D. *et al.* Transcriptomic characterization of *Caecomyces churrovis*: a novel, non-rhizoid-forming lignocellulolytic anaerobic fungus. **Biotechnol Biofuels**, v. 305, n. 10, p. 1-12, 2017.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. 1 ed. New York: Academic Press, 1966, 533 p.

INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA A AGRICULTURA – IICA. Biocombustível em foco. Boletim Informativo, v. 1, n. 11, 2009, 527 p.

JAMI, E.; ISRAEL, A.; KOTSER, A. *et al.* Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. **The ISME Journal**, v. 6, p. 1069–1079, 2013.

KOZLOSKI, V. G. **Bioquímica dos ruminantes**. 2. ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2011, 212 p.

LANA, R. P. **Nutrição e alimentação animal**. 1. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2005, 343p.

LEE, S. M., GUAN, L. L., EUN, J. S., KIM, C. H., LEE, S. J., KIM, E. T., & LEE, S. S. The effect of anaerobic fungal inoculation on the fermentation characteristics of rice straw silages. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n.3, p. 565-573, 2015.

LI, D. B.; HOU, X. Z. Effect of Fungal Elimination on Bacteria and Protozoa Populations and Degradation of Straw Dry Matter in the Rumen of Sheep and Goats. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v. 20, v. 1, p. 70-74, 2007.

LJUNGDAHL, L.G. The cellulase/Hemicellulase system of the Anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and aspects of its applied use, **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1125, p. 308-321, 2008.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; MEDEIROS-COSTA, J. T.; CERQUEIRA, L. S. C.; BEHR, N. Palmeiras do Brasil: exóticas e nativas. Nova Odessa: **Editora Plantarum**, 1996. p. 1-20.

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

MIRANDA, I.P.A.; RABELO, A.; BUENO, C. R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M. N. S. **Frutos de Palmeiras da Amazônia**. Manaus: **MCT INPA**. p. 7-10, 2001.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Acrocomia aculeata**. Disponível em: <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>>.

MOTTA, P.E.; CURI, N.; FILHO, A.R.O.; GOMES, J.B.V. Ocorrência de Macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedagógicos e vegetacionais **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 1023 – 1031, 2002.

Na, Y., Li, D. H., & Lee, S. R. Effects of dietary forage-to-concentrate ratio on nutrient digestibility and enteric methane production in growing goats (*Capra hircus hircus*) and Sika deer (*Cervus nippon hortulorum*). **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.30, p.7, p.967. 2017.

NICORY, I. M. C., DE CARVALHO, G. G. P., RIBEIRO, O. L., SANTOS, S. A., DA SILVA, F. F., SILVA, R. R., DE FREITAS JR, J. E. Productive and metabolic parameters in lambs fed diets with castor seed meal. **Livest. Sci.**, v. 181, p. 171-178, 2015.

OLIVEIRA V. S.; SANTANA NETO, J. S.; VALENÇA, R. L. *et al.* Características químicas e fisiológicas da fermentação ruminal de bovinos em pastejo – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária [online]**, v. 11, p. 1-21, 2013.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINIE, A. M.; SANTOS, E. M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 8, n. 6, 2007.

OLIVEIRA, M.V.; FERREIRA, I.C.; MACEDO JUNIOR, G.L.; SOUZA, L.F.; SOUZA, J.T.L.; SANTOS, R.G. Consumo e Digestibilidade De Nutrientes Da Torta De Dendê Na Dieta De Ovinos. **Ciência Animal Brasileira**. v.16, n.2, p. 179-192, 2015.

PAUL, K.; NONOH, J. O.; MIKULSKI, L.; *et al.* “*Methanoplasmatales*”, thermoplasmatales-related *Archaea* in termite guts and other environments, are

the seventh order of methanogens. **Applied Environmental Microbiology**, v. 78, p. 8245–8253, 2012.

PAUL, S. S., DEB, S. M., PUNIA, B. S., DAS, K. S., SINGH, G., ASHAR, M. N., & KUMAR, R. Effect of feeding isolates of anaerobic fungus *Neocallimastix* sp. CF 17 on growth rate and fibre digestion in buffalo calves. **Archives of animal nutrition**, v. 65, n.3, p. 215-228, 2011.

PAZDIORA, R.D.; PAZDIORA, B.R.C.N.; FERREIRA, E.; MUNIZ, I.M.; ANDRADE, E.R.; SIQUEIRA, J.V.S; SCHERER, F.; VENTUROSOS, O.J.; SOUZA, P.J. Digestibilidade, comportamento ingestivo e desempenho de ovinos alimentados com resíduos de agroindústrias processadoras de frutas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 71, n. 06, p. 2093-2102. 2019.

PIMENTA, T.V; Metodologias de Obtenção e Caracterização dos Óleos do Fruto da Macaúba com Qualidade Alimentícia: da Coleta à Utilização. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

PUNIYA, A. K., SALEM, A. Z., KUMAR, S., DAGAR, S. S., GRIFFITH, G. W., PUNIYA, M., KUMAR, R. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity: A review. **Journal of Integrative Agriculture**, v.14, n. 3, p. 550-560. 2015.

RAGHEBIAN, M., BABAEI YAZDI, A., DABIRI, N., HAJIMOHAMMADI, A., HATAMI, P., RAGHEBIAN, A., BAHRANI, M. J. Effect of different levels of live yeast in a high concentrate diet on performance, blood constituents and immune system status of Zandi lambs. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 6, n. 4, p. 833-840. 2016.

RIGUEIRA, J.P.S.; MONÇÃO, F.P.; SALES, E.C.J.; REIS, S.T.; ALVES, D.D.; AGUIAR, A.C.R.; ROCHA JUNIOR, V.R.; CHAMONE, J.A. Chemical composition and in vitro digestibility of pies from different parts of macaúba. **Revista Unimontes Científica**. v. 19, n. 2, p. 62-72, 2017.

RUFINO, L. M. A.; BARRETO, S. M. P.; DUARTE, E. R.; GERASEEV, L. C.; SANTOS, A. C. R.; JARUCHE, Y. G. Efeitos da inclusão de torta de macaúba sobre a população de protozoários ruminais de caprinos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.40, n.4, p.899-903, 2011.

SANTOS MAGAÇO, F.D.; FREITAS, C.E.S.; DE MOURA FREITAS, A.A.; MARTINS JÚNIOR, V.S.; DOS SANTOS, A.F.F.; PEREIRA, M.L.A.; DUARTE, E.R. Productive performance and economic profitable of weaned lambs supplemented with a *Trichoderma longibrachiatum* strain isolated from sheep. **International Journal of Animal Science**. v.4, n. 6, p.1-6, 2020.

SILVA, J. de C. Macaúba: fonte de matéria-prima para os setores alimentício, energético e industrial. **Viçosa: CEDAF/DEF/UFV**, v. 41, 1994.

SILVA, M.L. Parâmetros sanguíneos de ovinos alimentados com coprodutos da Bananicultura. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Minas Gerais- Instituto de Ciências Agrárias- Mestrado em Produção Animal. F.52, 2017.

SILVA, T. M., MEDEIROS, A. N. D., OLIVEIRA, R. L., NETO, S. G., RIBEIRO, M. D., BAGALDO, A. R., E RIBEIRO, O. L. Peanut cake as a substitute for soybean meal in the diet of goats. **J. Anim. Sci.**, v. 93, p. 2998-3005., 2015.

SIROHI, *et al.*, Ribossomal ITS1 sequence-based diversity analysis of anaerobic rumen fungi in cattle fed on high fiber diet, **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 1571-1577, 2013.

SOLOMON, K. V. *et al.* Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes. **Science**, v. 351, n. 6278, p. 1192-1195, 2016.

SUN, H., WU, Y., WANG, Y., WANG, C., & LIU, J. Effects of addition of *Aspergillus oryzae* culture and 2-hydroxyl-4-(methylthio) butanoic acid on milk performance and rumen fermentation of dairy cows. **Animal Science Journal**, 0v. 88, n. 4, p. 602-609, 2017.

TAPIO, I. *et al.* The ruminal microbiome associated with methane emissions from ruminant livestock. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1-11, 2017.

TEIXEIRA, E. *Acrocomia aculeata* In: TASSARO, H. **Frutas no Brasil**. São Paulo: Empresa das Artes, p.15, 1996.

THRUNE, M., BACH, A., RUIZ-MORENO, M., STERN, M. D., & LINN, J. G. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows: Yeast supplementation on rumen fermentation. **Livestock Science**, v. 124, n.1, p. 261-265, 2009.

TININI, R.C.R.; ZAMBONI, M.A.; DESDEBELL, J.G.; ADAMANTE, D.; VENTURINI, T. Silagem Da Parte Aérea Da Mandioca Como Um Alimento Alternativo Na Dieta De Vacas Em Lactação – Revisão De Literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 24, n.1., p. 2405, 2021.

TRIPATHI, V. K., SEHGAL, J. P., PUNIYA, A. K., & SINGH, K. Effect of administration of anaerobic fungi isolated from cattle and wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*) on growth rate and fibre utilization in buffalo calves. **Archives of Animal Nutrition**, v. 61, n.5, p. 416-423, 2007

WEI, Y. Q. *et al.* Characterization of natural co-cultures of *Piromyces* with *Methanobrevibacter ruminantium* from yaks grazing on the Qinghai-Tibetan Plateau: a microbial consortium with high potential in plant biomass degradation. **AMB Express**, v. 7, n. 160, p. 1-12, 2017.

WEI, Y. Q. *et al.* Fiber degradation potential of natural co-cultures of *Neocallimastix frontalis* and *Methanobrevibacter ruminantium* isolated from yaks (*Bos grunniens*) grazing on the Qinghai Tibetan Plateau. **Anaerobe**, v. 39, p. 158-164, 2016.

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

WEI, Y. Q., YANG, H. J., LUAN, Y., LONG, R. J., WU, Y. J., E WANG, Z. Y. Isolation, identification and fibrolytic characteristics of rumen fungi grown with indigenous methanogen from yaks (*Bos grunniens*) grazing on the Qinghai-Tibetan Plateau. **J. Appl. Microbiol.**, v. 120, p. 571-587., 2016.

WEIMER, P. J.; RUSSEL, J. B; MUCK, R. E. Lessons from the cow: what the ruminant animal can teach us about consolidated bioprocessing of cellulosic biomass. **Bioresource Technol**, v. 100, n. 21, p. 5323-5331, 2009.

ZICARELLI, F., ADDI, L., TUDISCO, R., CALABRÒ, S., LOMBARDI, P., CUTRIGNELLI, M. I., & INFASCELLI, F. The influence of diet supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* or *Saccharomyces cerevisiae* plus *Aspergillus oryzae* on milk yield of Cilentana grazing dairy goats. **Small Ruminant Research**, v. 135, p. 90-94, 2016.

5. ARTIGO

5.1. Fungos do trato digestório de ovinos melhoram a digestibilidade *in vitro* da torta de macaúba

Esse artigo foi elaborado de acordo com as normas da Revista *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*

Fungos do trato digestório de ovinos melhoram a digestibilidade *in vitro* da Torta de Macaúba

Valdo Soares Martins Júnior ^a, Eduardo Robson Duarte ^a, Lavínia Francine Xavier Santos ^a, Luciana Castro Geraseev ^a

^a Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, Av. Universitária, 1000, Universitário, Montes Claros, Minas Gerais, 39.404-547, Brasil.

RESUMO

Fungos do trato digestório de ruminantes poderiam hidrolisar materiais lignocelulolíticos e promoverem melhor aproveitamento de nutrientes de dietas contendo coprodutos. No presente estudo os objetivos foram analisar a ação de fungos do trato digestório de ovinos na utilização da torta de Macaúba (TM) e avaliar a digestibilidade *in vitro* desse coproduto inoculado com isolados de fungos celulolíticos selecionados. Inicialmente selecionou-se dois isolados de fungos celulolíticos que apresentaram melhores taxas de degradabilidade da TM durante o processo de fermentação submersa. As fermentações foram realizadas em tubos contendo água destilada e TM como fonte de nutrientes. Foram avaliados pH final, biomassa fúngica e degradabilidade do substrato, sendo os isolados de *Aspergillus niger*, *Paecilomyces* sp., *Trichoderma longibrachiatum*, os que apresentaram maiores taxas de degradação do material. Posteriormente foram analisados os coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) da TM inoculada com isolados de *Trichoderma longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp. selecionados na etapa anterior ou com a mistura deles. O grupo inoculado com a mistura dos fungos apresentou um incremento na DIVMS e DIVFDN, de, respectivamente 19,75% e 38,51% quando comparados ao grupo controle. Dessa forma, a adição da mistura desses microrganismos indica potencial promissor para desenvolvimento de aditivos microbianos para serem utilizados na suplementação de ovinos alimentados com coprodutos com elevados teores de fibras.

Palavras – chave: alimentação animal; isolados fúngicos, coprodutos, ruminantes, *Acrocomia aculeata*

1. INTRODUÇÃO

Com o constante aumento dos preços dos ingredientes que compõem a formulação concentrada da dieta de ruminantes, a procura por ingredientes alternativos, que mantenham o desempenho dos animais associado à redução do custo, tem se intensificado (Azevedo et al., 2012; Pimentel et al., 2012; Silva et al., 2016). Coprodutos podem ser empregados como alternativa na substituição dos ingredientes nas dietas para animais de produção, por conter níveis satisfatórios de energia, proteína e fibra e, poderiam ser empregados como substitutos de forma total ou parcial dos ingredientes comumente utilizados (Azevedo et al., 2014, Nicory et al., 2015, Silva et al., 2015).

A torta de macaúba (TM), resíduo da extração do óleo da casca e polpa do fruto da palmeira (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart.), é um coproduto encontrado em regiões semiáridas do território brasileiro. Análises preliminares demonstram que esse coproduto pode ser utilizado na alimentação de ruminantes devido ao seu alto teor de fibra em detergente neutro e extrato etéreo; entretanto um dos entraves para a utilização está relacionado ao elevado teor de lignina, que pode chegar a valores superiores a 10% da matéria seca (Rufino et al., 2011; Azevedo et al., 2012; Rigueira et al., 2017).

Os microrganismos ruminais possuem uma relação de simbiose com hospedeiro. A microbiota ruminal atua convertendo substâncias de menor valor biológico como a celulose, hemicelulose e a amônia em compostos utilizáveis pelos ruminantes, como ácidos graxos voláteis, aminoácidos, vitaminas e outras substâncias necessárias ao crescimento e à produção de carne, leite e lã (Kamra, 2005; Oliveira et al., 2007).

Os fungos que colonizam o rúmen possuem papel substancial na digestão de materiais fibrosos, degradando os polissacarídeos mais complexos (Wei et al., 2016). Estudos comprovam que dietas contendo altas proporções de fibras estimulam o desenvolvimento de populações fúngicas no ambiente ruminal, uma vez que a degradação dos componentes lignocelulolíticos da dieta dos ruminantes se dá pela atividade mecânica e enzimática desempenhada pelos fungos desse ecossistema (Wei et al., 2016; Abrão et al., 2014).

Neste estudo, os objetivos foram selecionar e analisar a ação de fungos do trato digestório de ovinos na utilização da TM como única fonte de carbono em fermentações submersas e avaliar a digestibilidade *in vitro* desse coproduto inoculado com isolados de fungos celulolíticos selecionados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados fúngicos avaliados

Os fungos micelianos *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces* sp., *Trichoderma longibrachiatum* e o isolado leveduriforme *Rhodotorula mucilaginosa* avaliados neste experimento, foram provenientes do trato digestório de borregos e ovelhas Santa Inês alimentados em pastagens de *Panicum maximum* cv. Tanzânia (Freitas et al., 2012) ou feno de *Cynodon dactylon* cv. Vaqueiro no norte de Minas Gerais, Brasil, durante o período seco do ano (Freitas et al., 2017). Os isolados fúngicos foram previamente identificados através da técnica de microcultivo e avaliação das características micromorfológicas, de acordo com o método descrito por De Hoog (2000).

Conforme relatado em Abrão *et al.* (2014), para a identificação molecular dos isolados fúngicos, a região ITS do rDNA foi amplificada a partir do DNA extraído por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), de acordo com o método descrito por White *et al.* (1990). Utilizando um NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies), os produtos de PCR purificados foram ensaiados e as reações de sequenciamento foram realizadas em DYEnamic™ (Amersham Biosciences, EUA) associado ao sistema de sequenciamento automatizado MegaBACETM 1000.

As sequências obtidas foram aparadas para qualidade utilizando o software Bioedit Versão 7.2.5 e Asparagin (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) das regiões de baixa qualidade (Score Phred <20), e a montagem das contigs das sequências nucleotídicas obtidas foi editada e comparada com sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando o programa Blast N (Altschul *et al.* 1997).

Com base nas características morfológicas, aspectos micromorfológicos e análise filogenética, os isolados com similaridade de 99% ou mais a uma sequência previamente depositada foram considerados pertencentes à mesma espécie. As sequências foram depositadas no GenBank, e os isolados foram identificados conforme detalhado na **Tabela 1** (Vieira, *et al.*, 2016; Freitas, 2018). Após a identificação, as culturas foram preservadas conforme metodologia descrita por Castellani (1967).

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

Identificação [n° Acc. Genbak]	Identificação dos isolados	Resultado BLAST [n° Acc. Genbak] e número de acesso
<i>Aspergillus niger</i>	O154	Sem número de acesso
<i>Aspergillus terreus</i>	O45M1	<i>A. terreus</i> Ef6 [KX 816799.1]
<i>Paecilomyces</i> sp.	OVS22	Sem número de acesso
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> *	O166	<i>R. mucilaginosa</i> SM6-1 [KU316790.1]
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	ICAUFMG LT 001	<i>T. longibrachiatum</i> SKF-3 [KX463453.1]

Nota: Identificação conduzida usando pesquisas BLASTN do D1/D2 do gene rRNA de levedura*; identificação conduzida usando pesquisas BLASTN do ITS e ITS1 do gene rRNA de fungos micelianos.

Fonte: Autoral, 2023.

2.2. Coproduto utilizado

A Torta de Macaúba - *Acrocomia aculeata* (TM) foi adquirida na Cooperativa de Agricultores Familiares e Agroextrativista Ambiental do Vale do Riachão LTDA, cooperativa que beneficia o fruto da macaúba para produção de biodiesel na região Norte de Minas Gerais. O clima da região é classificado como tropical úmido, com verão seco de acordo com a classificação de Köppen (Alvares et al., 2014), marcada por uma estação seca de abril a outubro e um período de chuvas compreendido entre novembro a março. O material foi seco, moído em moinho de facas Willy e peneirado até um tamanho de partícula de 1 a 3 mm. Posteriormente as amostras foram submetidas à análise de composição química.

As amostras foram analisadas de acordo com as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997) para MS (método 934.01), cinzas (método 942.05), proteína bruta (CP, método 954.01) e extrato etéreo (EE, método 920.39). As análises de fibra detergente neutro (FDN), (Van Soest *et al.*, 1991) e fibra detergente ácido (ADF) (AOAC, 1997, método 973.18) foram realizadas usando uma unidade ANKOM200 Fiber Analyzer (ANKOM Technology Corporation, Fairport, Nova York, EUA). O teor de lignina foi obtido por hidrólise ácida, conforme descrito anteriormente por Van Soest (1965). A composição do material com base na matéria seca encontra-se descrita na **Tabela 2**.

Tabela 2: Composição bromatológica (g/kg de MS) da torta de macaúba utilizada, proveniente cooperativa de agricultores familiares e agroextrativista ambiental do vale do Riachão LTDA

Constituintes	Torta de Macaúba
MS (g/kg de MN)	945,22
FDN (g/kg de MS)	550,54
FDA (g/kg de MS)	225,92
Lignina (g/kg de MS)	113,02
PB (g/kg de MS)	68,89
CNF (g/kg de MS)	79,53
Celulose (g/kg de MS)	112,90
Hemicelulose (g/kg de MS)	324,62
EE (g/kg de MS)	242,05
Minerais (g/kg de MS)	58,99
Matéria Orgânica (g/kg de MS)	941,00

Nota: MS: matéria seca; MN: matéria natural; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; CNF: Carboidratos não fibrosos.

Fonte: Autoral, 2023.

2.3. Experimento 1 - Seleção de isolados de fungos do ambiente ruminal para a degradação da torta de macaúba durante fermentação submersa

Inicialmente realizou-se fermentações submersas para selecionar os isolados fúngicos com melhor taxa de degradação da TM como única fonte de carbono e posteriormente avaliar a dinâmica fermentativa das duas melhores cepas selecionadas na etapa anterior.

Os fungos foram cultivados em meio ágar Sabouraud Dextrose (KASVI®, Terámo, Itália) acrescidos de clorafenicol (150 mg/L) por até sete dias a 37° C. A cultura esporulada dos fungos micelianos e as massas de células leveduriformes foram suspensas em solução salina a 0,85% acrescidas de Tween 80 a 0,1%, para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) em ágar Sabouraud Dextrose (KASVI®, Terámo, Itália), para padronização dos inóculos contendo 10⁷ UFC/mL.

As fermentações ocorreram em tubos de ensaio com capacidade para 150 mL, que foram pesados após serem secos em estufa a 105° C por 24 horas, em meio contendo 3 gramas da TM acondicionados em saquinhos de tecido não tecido (TNT) de 3 x 5 cm e gramatura de 100 µm, previamente secos em estufa a 105° C, devidamente pesados e vedados em máquina seladora. O material avaliado foi adicionado a 30 mL de água destilada sendo inserido nos tubos de ensaio e autoclavado a 120° C e 1 atm por 20 minutos (Duarte *et al.*, 2021).

Posteriormente, 3 mL da solução contendo os esporos fúngicos padronizados a 10⁷ UFC/mL foram inoculadas nos tubos segundo metodologia descrita por Rizzatti (2001). Os tubos de ensaio foram incubados a 39°C em incubadora Shaker de bancada (NT712, Novatecnica, São Paulo - Brasil) com agitação orbital a 120 rpm por 4 dias.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo nesta etapa testados cinco isolados fúngicos e o grupo controle, onde foram realizadas cinco repetições para cada tratamento. O grupo controle foi padronizado conforme descrito acima, porém, sem a adição da suspensão de fungo. Os tubos controles tiveram seus volumes completados com 3 mL de solução salina a 0,85%.

2.3.1. Determinação da massa fúngica, degradação do substrato e pH final

Para a determinação da degradabilidade da TM, os saquinhos de TNT contendo os substratos foram colocados em placas de Petri e desidratados em estufa de secagem a 45°C (TE – 394/3, TECNAL, São Paulo - Brasil) durante 4 dias. Para a quantificação da biomassa fúngica os tubos de ensaio contendo a água residual e a massa produzida pelos fungos foram colocados em estufa a 105° C, até a obtenção do peso constante. O pH das amostras foi mensurado antes e após as fermentações utilizado o potenciômetro digital (PG1800, Gehaka, São Paulo - Brasil).

O valor da biomassa fúngica foi mensurada de maneira direta em balança analítica pela diferença entre os pesos dos tubos de ensaios com as biomassas fúngicas e os pesos dos tubos vazios. Já o valor da degradação do material foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Degradação (\%)} = [((\chi.\text{TM. trat.}) - (\chi.\text{TM. cont.})) \times 100] / \chi.\text{TM inicial}$$

Onde:

χ .TM. trat.: média da TM após a degradação pelo isolado fúngico (g);

χ .TM. cont.: média da TM no controle (g);

χ .TM inicial: média do peso da TM acondicionada no saco de TNT.

2.4. Experimento 1.2 – Cinética fermentativa dos isolados fúngicos selecionados durante fermentação submersa

O experimento para avaliação da cinética fermentativa seguiu a mesma metodologia descrita anteriormente, entretanto foram avaliados os isolados *Paecilomyces* sp. e *T. longibrachiatum* que apresentaram melhor degradação da TM e maior produção de biomassa na etapa anterior. Este ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (3 x 5), sendo avaliado três tipos de inóculos, sendo um grupo controle e dois isolados fúngicos, e cinco períodos de fermentação. Utilizaram-se cinco repetições, considerando os tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. As variáveis observadas foram o potencial hidrogeniônico do meio, crescimento de massa fúngica (biomassa) e porcentagem de degradação do substrato.

2.5. Experimento 2 - Digestibilidade *in vitro* de torta de macaúba (*Acrocomia aculeata*) inoculada com fungos micelianos isolados do trato gastrointestinal de ovinos

Os fungos selecionados para serem utilizados nesta etapa foram da espécie *Paecilomyces* sp., *T. longibrachiatum* pois apresentaram melhores índices de degradação da torta de macaúba e elevada produção de biomassa fúngica na etapa de fermentação submersa, além de serem isolados que não produzem micotoxinas.

2.5.1. Coleta de fluido ruminal

Para o ensaio de digestibilidade *in vitro*, foram coletados o conteúdo ruminal de cinco carneiros $\frac{3}{4}$ Dorper x Santa Inês, com aproximadamente 5,5 meses de idade e 35 Kg de peso corporal. Esses animais eram alimentados com uma dieta formulada para atender o requerimento de nutrientes para animais jovens com um ganho médio diário de 350 gramas/dia, de acordo com National Research Council (2007), contendo 40% de volumoso e 60% de concentrado e mistura mineral.

Os animais foram abatidos no frigorífico com inspeção nacional seguindo todos os protocolos de bem-estar animal exigidos pela legislação vigente. Após a coleta e antes de iniciar o processo de digestibilidade *in vitro* foram realizadas análises físico-químicas do líquido ruminal (Dirksen, 1993), sendo obtidos como resultado tempo de redução de azul de metileno, média de 1 minuto, coloração castanho oliva, valor médio de pH correspondente a 6,2, odor aromático e viscosidade espessa resultando em um diagnóstico de um suco ruminal muito ativo.

2.5.2. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da fibra em detergente neutro da torta de Macaúba

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

Foram avaliados os coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) da torta de macaúba, segundo a metodologia relatada por, Tilley e Terry (1963) e as modificações descritas por Holden (1999), utilizando simulador ruminal (TE-150, TECNAL Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil).

Esse aparelho é composto por quatro câmaras de vidro (2,500 mL) para incubação a 39°C e rotação constante. Cada câmara recebeu um dos tratamentos, contendo dez saquinhos Ankon F-57 com 0,5 gramas da torta de macaúba moída e padronizada a 1mm de diâmetro (Nocek e Russell, 1988). Em cada câmara fermentativa foi inoculado 100 mL de caldo Sabouraud estéril (controle) ou contendo inóculos com a concentração de 10^7 UFC/mL do *Trichoderma longibrachiatum*, *Paecilomyces* sp. ou a mistura dos fungos (MIX) contendo 50 mL de cada um dos isolados.

As amostras foram incubadas com cada inóculo e o líquido ruminal acrescido de solução tampão de McDougall por 48 horas (proporção 1:3). Após esse período, foram adicionados pepsina e ácido clorídrico, para simulação da digestão química e incubou-se por mais 24 horas. Ao final desse processo os saquinhos foram lavados com água destilada, secos em estufa de circulação forçada a 55° C por 24 horas, posteriormente em estufa de 105° C por duas horas e pesados.

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

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

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

Para determinação da DIVFDN, os saquinhos lavados foram encaminhados ao digestor para fibras em sacos de extração (MA 444/CI, Marconi Equipamentos para Laboratório LTDA, São Paulo, Brasil) em solução de FDN durante uma hora a 90°C, seguida de duas lavagens com água destilada por 10 minutos e acetona por 15 minutos (AOAC, 1997, método 973.18). Posteriormente foram desidratados em estufa de circulação forçada de ar a 55°C por 24 horas e 2 horas em estufa a 105°C, para obter o peso seco. A fórmula utilizada para se obter a %DIVFDN foi a mesma para se determinar a %DIVMS, fazendo as substituições dos valores (Ankon, 2014).

2.5.3. Coleta e quantificação de fungos micelianos

Durante o ensaio de digestibilidade *in vitro* no simulador de rúmen (TE-150 - TECNAL®), foram realizadas coletas do fluido ruminal, no tempo zero, às 24 horas e às 72 horas para a realização de uma análise descritiva da população fúngica durante o procedimento de digestibilidade. Foram coletados 30 mL do fluido ruminal, de cada jarra fracionados em três seringas estéreis de 10 mL. Cada seringa foi lacrada, identificada, armazenada em caixa isotérmica com gelo e encaminhadas imediatamente para as análises.

O cultivo foi realizado para mensurar a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos micelianos por mL de fluido ruminal. Para a realização dessa quantificação foram realizadas diluições decimais seriadas do fluido ruminal. Após cada diluição os tubos foram homogeneizados durante três minutos e alíquotas de 100 microlitros foram inoculadas em placas estéreis contendo ágar Sabouraud Dextrose (KASVI®, Terámo, Itália). Os inóculos foram homogeneizados com alças de Drigalski estéreis e as placas foram incubadas em estufa BOD a 39°C e monitoradas para aferição do número de colônias fúngicas por até 21 dias (Kurtzman; Fell, 2011; da Silva Lacaz et al., 2002).

2.6. Análise estatística

Após teste de normalidade e homogeneidade, os dados obtidos na etapa de fermentação submersa foram avaliados e submetidos à análise de variância e as médias comparadas a 5% de significância pelo teste de Skott – Knott.

Os dados obtidos durante o ensaio de cinética fermentativa foram submetidos a análise de variância em esquema de fatorial considerando os três grupos avaliados, os cinco períodos e a interação entre os tratamentos e períodos. Os resultados de pH, produção de biomassa e degradação do substrato foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ pelo teste de Skott – Knott.

Além disso, quando foram detectadas variações significativas entre os períodos, também foram avaliados os modelos de regressão linear, quadrática, exponencial ou polinomial. Utilizou-se o pacote estatístico SAEG (Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007) para analisar os dados.

Para o ensaio de digestibilidade *in vitro*, após teste de normalidade e homogeneidade, os dados dos coeficientes de digestibilidades foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Skott – Knott. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o Sistema para Análises Estatísticas, SAEG, Versão 9.1.

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1.1. - Seleção de isolados de fungos do ambiente ruminal para a degradação da torta de macaúba durante fermentação submersa

Os isolados de *A. niger* e *Paecilomyces* sp. promoveram maior degradação TM quando comparado as demais cepas fúngicas avaliadas ($p < 0,05$) (**Tabela 2**). O isolado de *Paecilomyces* sp. proporcionou maior alcalinização do meio em relação aos demais inoculantes. Diferentemente os isolados de *A. terreus*, *A. niger* e *T. longibrachiatum* apresentaram os menores valores de pH (**Tabela 2**, $p < 0,05$).

Tabela 3: Valores médios de pH, biomassa fúngica e degradabilidade do substrato, coletadas após 96 horas de fermentação submersa da TM sob agitação a 120 rpm a 39°C inoculada com diferentes fungos autóctones isolados do ambiente ruminal de ovinos

Inóculos	pH	Biomassa Fúngica (g/L)	dp	Degradação da TM (%)	dp
Controle sem Fungos	5,55 c	0,00 c	-	0,00 c	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	5,85 b	2,086 b	0,02	3,49 b	0,04
<i>Aspergillus terreus</i>	5,65 c	1,167 b	0,02	4,38 b	0,03
<i>Aspergillus niger</i>	5,47 c	4,921 a	0,04	6,55 a	0,03
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	5,70 c	3,512 a	0,03	4,80 b	0,03
<i>Paecilomyces</i> sp.	6,18 a	3,880 a	0,04	5,58 a	0,03

Nota: Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste Skott – Knott ($p < 0,05$). dp= Desvio Padrão

Fonte: Autoral, 2023.

A produção de biomassa dos isolados de *A. niger*, *Paecilomyces* sp. e *T. longibrachiatum*, foi significativamente maior do que aquela observada para os isolados *A. terreus* e *R. mucilaginosa* (**Tabela 2**).

3.2. Experimento 1.2 - Cinética fermentativa dos isolados fúngicos selecionados durante fermentação submersa

Houve diferença do valor de pH em função do tempo para as fermentações utilizando os inóculos dos fungos avaliados ($p < 0,01$), apresentando um modelo regressão polinomial (**Figura 1**). Diferentemente, as fermentações sem o uso desses inoculantes apresentaram valor de pH constante em função dos períodos.

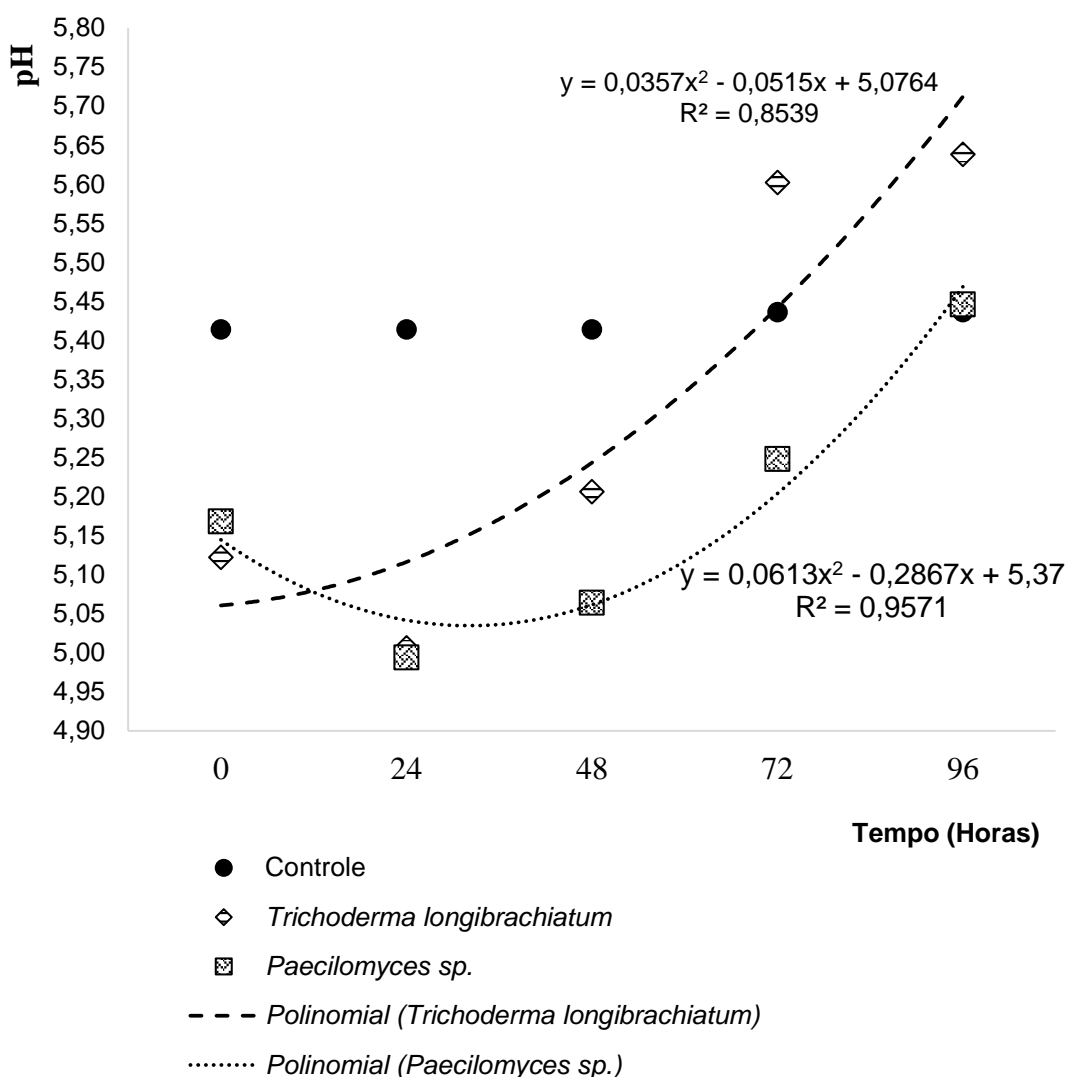


Figura 2: Comportamento do pH final das fermentações da torta de macaúba inoculada por *Trichoderma longibrachiatum* ou *Paecilomyces sp.* ao longo dos quatro períodos de incubações.

Fonte: Autoral, 2023.

Observou-se diferença na degradabilidade da TM em função do tempo durante o processo de fermentação utilizando os inóculos avaliados ($p < 0,01$), apresentando um modelo de regressão linear (**Figura 2**). Não houve degradação da TM no grupo controle.

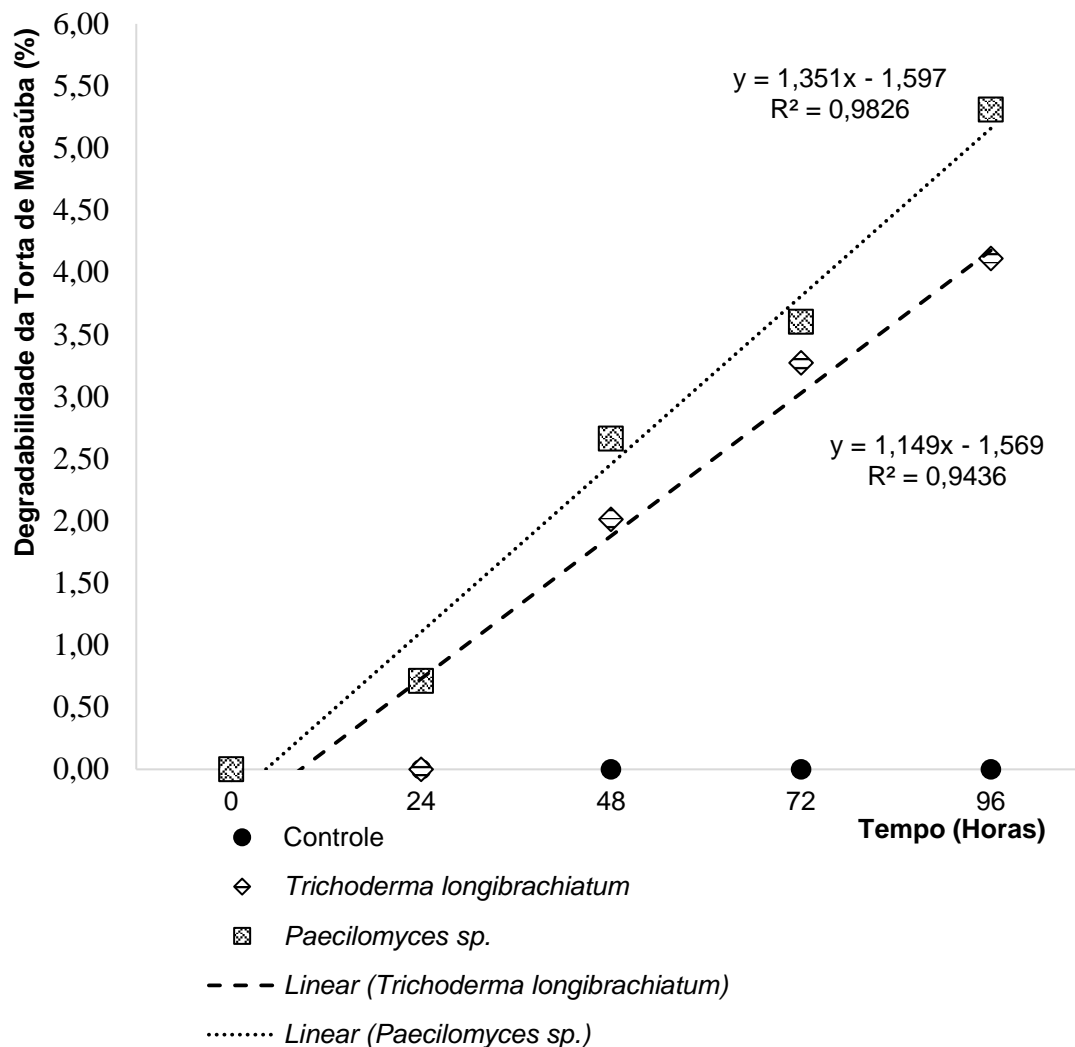


Figura 3: Valores médios das degradações da torta de macaúba inoculada com isolados *Trichoderma longibrachiatum* ou *Paecilomyces sp.* ao longo de quatro dias de fermentação.

O valor da biomassa fúngica foi influenciada pelo tipo de isolado fúngico avaliado e tempo de fermentação ($p < 0,01$), sendo o modelo de regressão linear que se ajustou melhor para expressar a produção de biomassa (**Figura 3**).

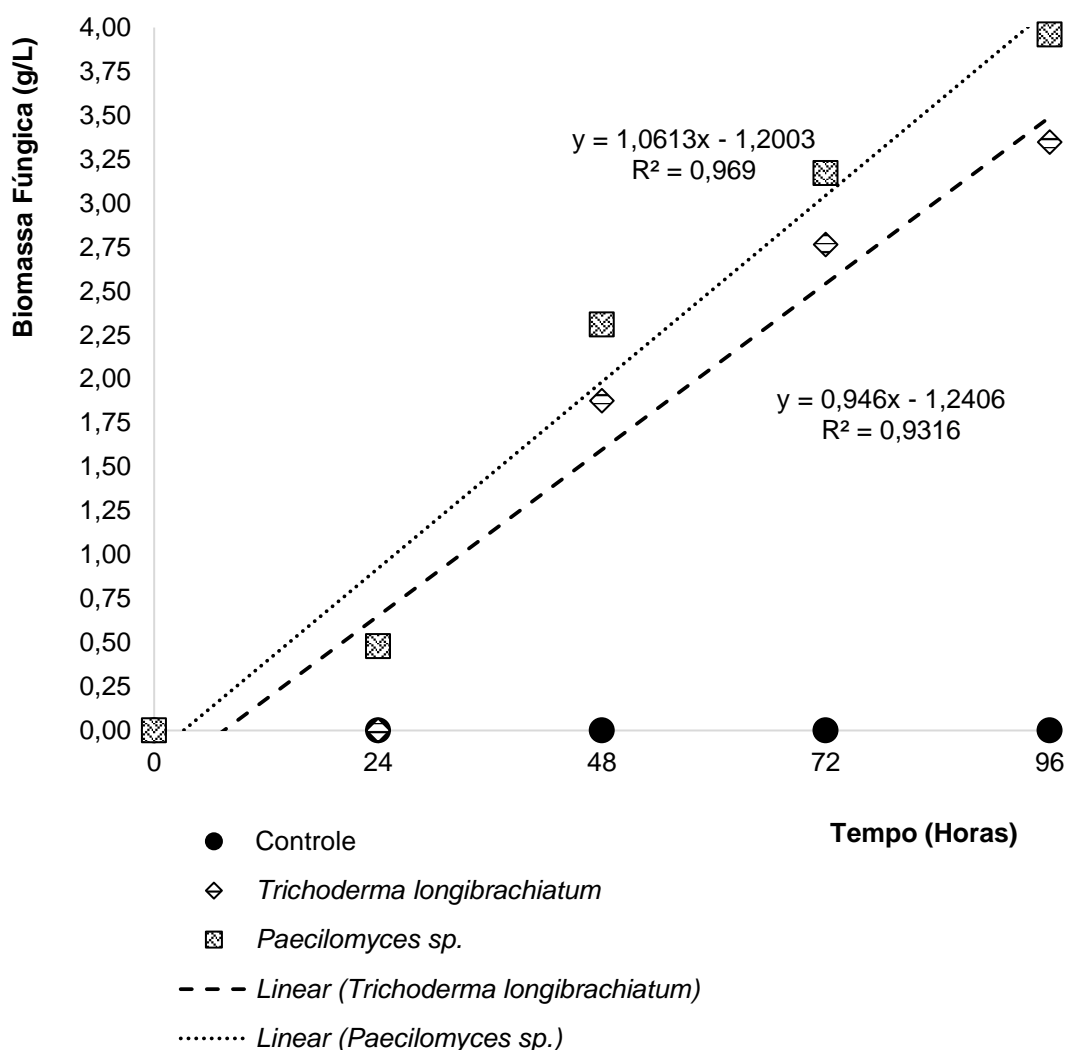


Figura 4: Biomassa fúngica (g/L) produzida pelo *Trichoderma longibrachiatum* e *Paecilomyces sp.* inoculados em meio contendo torta de macaúba ao longo de quatro dias de fermentação.

Fonte: Autoral, 2023.

3.3. Experimento 2 - Digestibilidade *in vitro* de torta de macaúba (*Acrocomia aculeata*) inoculada com fungos micelianos isolados do trato gastrointestinal de ovinos

A DIVMS da TM variou de 44,70 a 53,53%. Entretanto a inoculação do fluido ruminal com a mistura dos isolados de *T. longibrachiatum* e *Paecilomyces sp.* proporcionou maior DIVMS deste coproduto. A DIVFDN foi influenciada pela utilização dos inoculantes, que proporcionaram maiores médias quando comparado a fermentação sem o uso desses fungos (Tabela 3, $p < 0,01$).

Tabela 4: Digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da fibra em detergente neutro (DIVFDN) da TM inoculada com fungos micelianos provenientes do trato digestório de ovinos

Inóculos	DIVMS (%)	dp	DIVFDN (%)	dp
Controle sem Fungo	44,70 c	3,20	32,22 b	6,32
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	50,21 b	2,52	43,55 a	2,97
<i>Paecilomyces</i> sp.	49,67 b	3,10	41,26 a	2,37
MIX de fungos	53,53 a	2,64	44,63 a	2,02

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

Fonte: Autoral, 2023.

3.3.1. Quantificação de fungos micelianos

Constatou-se a presença de fungos nos cultivos realizados em ambos os períodos de coleta de fluido ruminal para amostras avaliadas no início da fermentação, 24 e 72 horas. Notou-se uma contagem acima de 10^4 UFC/mL de fungos micelianos no fluido ruminal sem inoculação das cepas selecionadas, indicando que a população fúngica estava naturalmente presente no fluido ruminal do ovino.

Observou-se a presença de populações fúngicas em ambos os tratamentos após 72 horas em que foi adicionado ácido clorídrico 6N para reduzir o pH, simulando as condições do abomaso. Entretanto, a maior contagem foi obtida no tratamento inoculado com o MIX fúngico, quando foi possível observar colônias compatíveis com *T. longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp.

4. DISCUSSÃO

Após 96 horas de fermentação, os valores de pH estiveram entre 5,47 e 6,18 para os isolados fúngicos avaliados, de acordo com Kubicek e Harman (1998) o crescimento ótimo para fungos lignocelulíticos ocorre no intervalo de pH entre 4 e 6,5. Para o gênero *Trichoderma* essa faixa está entre pH de 4 e 5 (Chahal et al., 1992), já para o gênero *Paecilomyces*, o pH que mais favorável à produção de biomassa estaria entre 5 e 6 (Sharma et al., 2014).

Durante a avaliação da cinética de crescimento dos isolados de *T. longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp. foi possível observar redução do pH logo após a inoculação e decorridas as primeiras 24 horas de fermentação. Essa queda do pH indicou a atividade fermentativa dos isolados testados, e está atribuída à produção de ácidos pelos fungos (Chahal et al., 1992).

Os isolados de *A. niger*, *Paecilomyces* sp. e *T. longibrachiatum* foram os mais eficientes na degradação da TM, e conseqüentemente maiores taxas de crescimento, sugerindo melhor adaptação para degradação desse substrato lignocelulolítico. Essa adaptação prévia pode estar relacionada ao fato desses microrganismos terem sido selecionados do trato gastrointestinal de ovinos criados em pastagens tropicais durante o período seco do ano (Freitas et al., 2017; Freitas et al., 2012).

A produção de biomassa fúngica e a taxa de degradabilidade da TM dos isolados de *Paecilomyces* sp. e *T. longibrachiatum* apresentaram aumento linear, demonstrando que a utilização do substrato pelos fungos aumentou com tempo de fermentação. O aumento gradativo da produção de biomassa em função do tempo de fermentação foi também relatado por Sharma et al., (2014), que ao avaliar o crescimento do *P. lilacinus* (isolado 6029) em torta de *Pongamia pinnata* durante dez dias, observaram produção máxima de biomassa (10,55 g/L) no final do período fermentativo.

Ao considerar a maior biomassa produzida por *Paecilomyces* sp. e *T. longibrachiatum*, neste presente estudo, é possível afirmar que esses isolados apresentam bom potencial de aproveitamento da TM, mesmo este coproduto contendo reduzidos teores de proteína e carboidratos não fibrosos. Resultados semelhantes foram relatados por Kumhar et al., (2014), que observaram valores de produção de biomassa de *Trichoderma viride* (KBN 24) de 148,04 g, 126,87g e 114,79g ao utilizar respectivamente os grãos de arroz, trigo e milho como substrato.

A escolha dos isolados de *T. longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp. para a elaboração dos inóculos utilizados no ensaio de digestibilidade *in vitro*, foi atribuída à maior degradabilidade da TM desses isolados quando comparado aos demais fungos avaliados no ensaio de fermentação submersa. O que corrobora com os resultados encontrados por Martins Júnior *et al.* (2023), que observaram que isolados de *Trichoderma* sp. e *Paecilomyces* sp. isolados do trato gastro intestinal de ovinos, apresentaram maior atividade celulolítica, quando avaliado a taxa de crescimento desses isolados em meio de cultura composto por celulose como única fonte de nutriente. Adicionalmente não existe registros de contaminação por micotoxinas produzidas por essas espécies de fungos para humanos e animais (Bokhari et al., 2009).

O isolado de *A. niger* também apresentou elevadas taxas de degradação da TM, entretanto não foi selecionado para etapa de digestibilidade *in vitro* uma vez que fungos dessa espécie apresentam elevado potencial de produção de ácido 3-nitropropiónico (Blumenthal, 2004), ocratoxina A (Frisvad et al., 2018) e fumonisina B2 (Gil-Serna et al., 2019) que podem ocasionar graves micotoxicoses aos animais quando ingeridos.

Contudo, este gênero fúngico pode ser empregado em diversos ramos da biotecnologia por secretar ácidos orgânicos, proteínas e metabólitos secundários que podem ser utilizados como biossulfarctantes, na produção de biocombustíveis derivados de material vegetal e produção de compostos químicos que podem ser utilizados na agricultura e indústria farmacêutica (Cairns et al., 2021; Cairns et al., 2018).

Estudos relatam os efeitos tóxicos que o alto teor de ácidos graxos insaturados pode causar sobre a população microbiana do rúmen, afetando diretamente o desenvolvimento das bactérias gram – positivas, especialmente aquelas que apresentam atividades celulolíticas (Nagaraja et al., 1997) e protozoários ruminais (Rufino et al., 2011), prejudicando assim a degradabilidade da fibra por esses microrganismos (Harvatine e Allen, 2006). Resultados obtidos pelo presente estudo demonstram que os isolados fúngicos avaliados podem não ser afetados pelos efeitos deletérios causados pelo excesso de ácido graxos insaturados encontrado na TM, resultando em uma maior taxa de DIVMS do material avaliado.

Fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Paecilomyces* têm apresentado expressivas produções de enzimas como: p-glucosidase (Li et al., 2016), xilanases (Toth et al., 2013), carboximetilcelulase, avicelase, β -Glucosidase, β -Xilosidase, α -Arabinofuranosidase, β -Galactosidase (Morgavi et al., 2000), hemicelulases, pectinases (Schuster et al., 2010; Patil et al., 2012), xiloglucanases (Tribak et al., 2002), lacases (Kluczek-Turpeinen et al., 2007), tanases (Battestin e Macaedo, 2007), celulases (Almeida et al. 2014), fitases e amilases (Herrera Bravo de Laguna et al., 2015). Essas enzimas que são importantes na degradação da parede celular vegetal e de estruturas complexas presentes nas plantas (Liu et al., 2017).

Nesta pesquisa, a maior taxa de DIVMS e DIVFDN observada com a inoculação dos isolados de *T. longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp. em relação àquela encontrada para o grupo que não recebeu os inoculantes (**Tabela 3**), corrobora com os estudos realizados por Schons et al., (2012) que ao inocular farelo de sorgo com *P. variotii* constatou produção 1,87 U/mL de tanase, o que pode proporcionar uma melhoria no valor nutritivo deste material, aumentando seu aproveitamento pelos animais. Nurudeen et al., (2015) avaliaram produção de carboximetilcelulase por *T. longibrachiatum* utilizando a biomassa de sorgo forrageiro, e verificaram produção de 1,82 U/mL dessa enzima. Desta forma, neste presente estudo, a maior produção dessas enzimas poderia ter contribuído para a melhor degradação da TM.

O incremento na digestibilidade da torta de macaúba em 19,75% com a inclusão do MIX dos fungos *T. longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp. estaria atribuído à melhor degradação da fração

fibrosa e proteína bruta desse coproduto pela ação de hidrólise das enzimas dos dois fungos, disponibilizando para os microrganismos do fluido ruminal os nutrientes prontamente digestíveis presentes no coproduto.

Os resultados observados evidenciam o potencial da utilização desses isolados fúngicos como aditivo microbiano em dieta de ruminantes alimentados com coprodutos e corrobora com outros estudos que avaliaram a inclusão de extratos enzimáticos fúngicos na digestibilidade de ingredientes fibrosos. Morgavi et al., (2000) ao analisar as interações entre enzimas ruminais e os complexos enzimáticos sintetizados pelo *T. longibrachiatum* em dieta de bovinos, constataram sinergismo entre as enzimas, sendo possível observar aumento da hidrólise da celulose, xilana e da silagem de milho em 35, 100 e 40%, respectivamente.

A suplementação de enzimas fúngicas também tem favorecido a digestibilidade *in vivo* de dietas com alto teores de fibra na sua composição. A suplementação exógena de xilanase e glucanase produzidas por fungos do gênero *Trichoderma* spp. em dietas de caprinos promoveu o incremento de 10% da DIVMS de dietas formuladas com 30% de palha de arroz (Yuangklang et al., 2017). Resultados semelhantes foram reportados para búfalos alimentados com silagem *Avena sativa* e suplementados com celulasas e xilanases secretadas por *Trichoderma reesei*, constatando aumento de digestibilidade *in vivo* em 17,5% (Nawaz et al., 2016).

Estudos que avaliaram a utilização de fungos do gênero *Paecilomyces* como aditivo microbiano melhorador da digestibilidade de ingredientes que compõe a dieta de ruminantes não são encontrados na literatura. O uso desse fungo ou suas enzimas é comumente empregado para controle biológico de nematódeos (Yang et al., 2015; Hussain et al., 2012; Yang et al., 2011) e como componentes do processo de compostagem e degradação de componentes orgânicos (Nakasaki et al., 2015; Wang et al., 2010; Sampredo et al., 2009).

Observou-se o crescimento dos fungos micelianos aeróbios e anaeróbios facultativos mesmo no líquido ruminal sem a inoculação dos isolados avaliados, corroborando outros estudos que reportaram que o fluido ruminal é naturalmente colonizado por cepas fúngicas. Resultados similares foram descritos em estudos que observaram a presença de fungos no líquido ruminal de ovinos, caprinos (Abrão et al. 2011) e bovinos de corte criados em pastagens tropicais (Abrão et al. 2014; Almeida et al. 2012).

Após 72 horas de digestibilidade em que foi adicionado o ácido clorídrico para simular as condições de digestão ácida do abomaso, constatou-se a presença de colônias compatíveis com *T. longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp. nos grupos que receberam os inoculantes. Para a Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO), um dos parâmetros considerados para o enquadramento de um produto como probiótico, seria a sobrevivência do microrganismo a acidez gástrica comprovada por meio de ensaios laboratoriais.

Esse resultado pode sugerir potencial biotecnológico dos isolados de *T. longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp. no desenvolvimento de aditivos microbianos para auxiliarem no aproveitamento de dietas de ovinos com alto teor de fibra de baixa digestibilidade. Colocar todas as características do fungo para utilização como aditivos.

5. CONCLUSÃO

Os isolados de *A. niger*, *T. longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp. do trato digestório de ovinos apresentaram melhores índices de degradação da TM como fonte única de carbono em processo de fermentação submersa.

A adição do MIX de isolados de *T. longibrachiatum* e *Paecilomyces* sp. eleva a DIVMS da TM. Dessa forma, a inclusão desses fungos apresenta potencial para elaboração de probiótico ou aditivo microbiano para ovinos alimentados com ingredientes com alto teor de fibras e extrato etéreo.

Futuros estudos devem avaliar o desempenho de borregos alimentados com torta de Macaúba e suplementados com o MIX de fungos isolados do ambiente ruminal.

Financiamento

Este projeto foi apoiado por bolsas da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais do Brasil (FAPEMIG) (projeto APQ-03221-21).

Declaração de interesse

Os autores declaram que não têm interesses financeiros concorrentes conhecidos ou relacionamentos pessoais que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

Agradecimentos

Agradecemos à Pró Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais do Brasil (FAPEMIG) pelo apoio logístico, técnico financeiro e científico nas pesquisas.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 5: Valores médios de pH durante o período de fermentação da torta de macaúba inoculada com os fungos autóctones isolados do ambiente ruminal de ovinos

Inóculos	Tempo (horas)				
	0	24	48	72	96
Controle sem Fungo	5,41 Aa	5,41 Aa	5,41 Aa	5,44 Ab	5,44 Ab
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	5,12 Dc	5,01 Ec	5,21 Cb	5,60 Ba	5,64 Aa
<i>Paecilomyces</i> sp.	5,17 Cb	4,99 Eb	5,06 Dc	5,25 Bc	5,45 Ab

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, e médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste Skott – Knott ($p < 0,05$). (Coeficiente de Variação (CV) 1,05%).

Fonte: Autoral, 2023.

Tabela 6: Valores médios da degradabilidade do substrato (%) durante o período de fermentação da torta de macaúba inoculada com os fungos autóctones isolados do ambiente ruminal de ovinos

Inóculos	Tempo (horas)				
	0	24	48	72	96
Controle sem Fungo	0,00 Aa	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,00 Ca	0,00 Cb	2,01 Ba	3,27 Aa	4,11 Aa
<i>Paecilomyces</i> sp.	0,00 Da	0,70 Ca	2,66 Bb	3,60 Bb	5,31 Ab

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, e médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste Skott – Knott ($p < 0,05$). (CV 40,29%).

Fonte: Autoral, 2023.

Tabela 7: Valores médios de biomassa fúngica (g/L) durante o período de fermentação da torta de macaúba inoculada com os fungos autóctones isolados do ambiente ruminal de ovinos

Inóculos	Tempo (horas)				
	0	24	48	72	96
Controle sem Fungo	0,00 Aa	0,00 Ab	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Ac
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,00 Da	00,00 Db	1,875 Cb	2,764 Bb	3,348 Ab
<i>Paecilomyces</i> sp.	0,00 Da	0,478 Ca	2,309 Ba	3,171 Ba	3,960 Aa

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, e médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste Skott – Knott ($p < 0,05$). (CV 42,73%).

Tabela 8: Unidades formadoras de colônias (n°/ml) de fungos micelianos durante a digestão *in vitro* da torta de macaúba inoculada ou não com cepas de fungos provenientes do trato digestório de ovinos

Inóculos	Tempo (horas)		
	0	24	72
Controle sem Fungo	$3,33 \times 10^4$	$1,67 \times 10^1$	$1,33 \times 10^1$
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	$2,33 \times 10^5$	$1,33 \times 10^3$	$2,67 \times 10^1$
<i>Paecilomyces</i> sp.	$4,33 \times 10^5$	$2,67 \times 10^5$	$3,33 \times 10^3$
MIX de fungos	$4,00 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	$3,33 \times 10^4$

Fonte: Autoral, 2023.

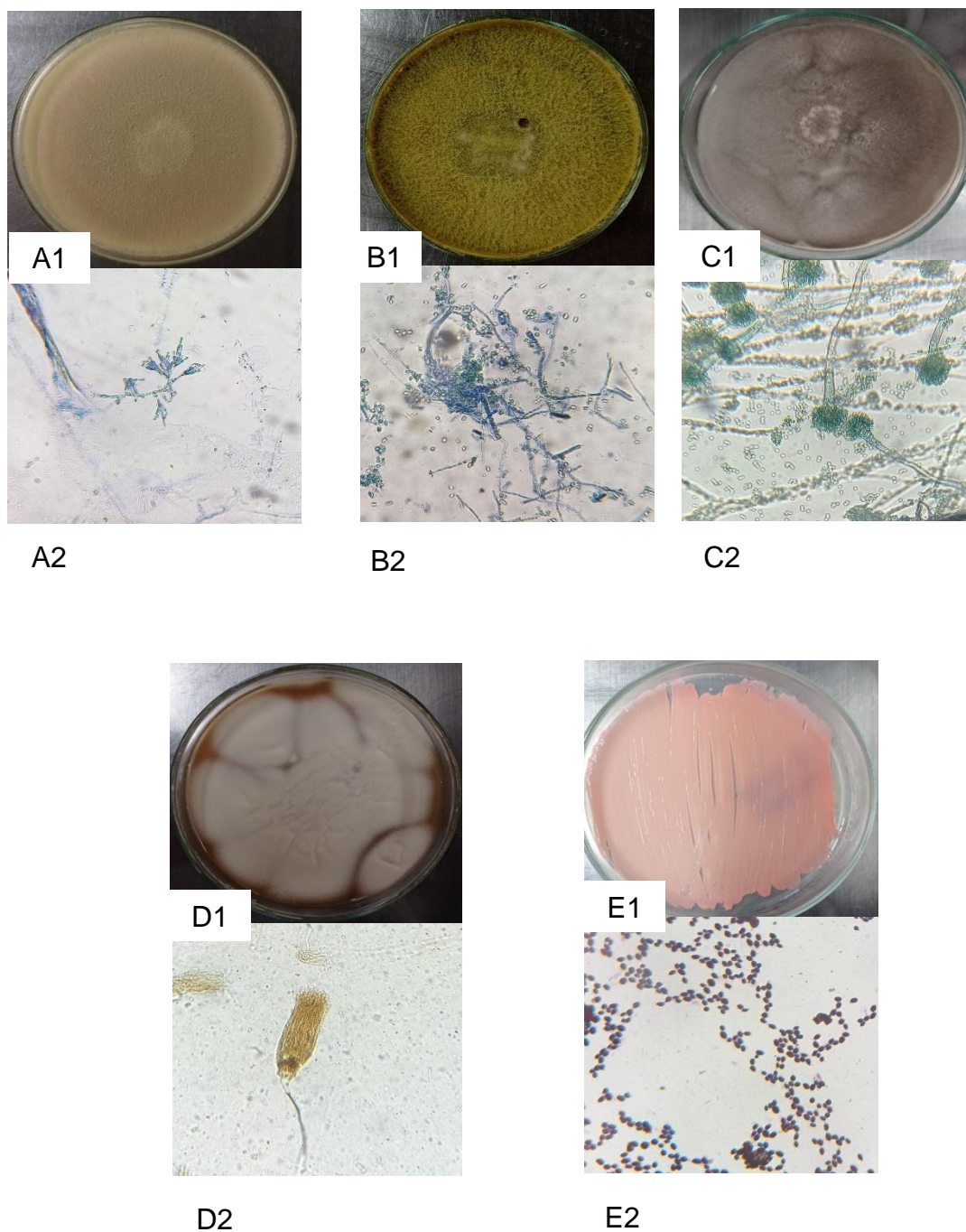


Figura 5: Características macroscópicas e microscópicas dos isolados de *Paecilomyces* sp. (A1 e A2), *Trichoderma longibrachiatum* (B1 e B2), *Aspergillus niger* (C1 e C2), *Aspergillus terreus* (D1 e D2), *Rhodotorula mucilaginosa* (e1 e e2) crescidos em placas contendo ágar sabouraud dextrose (Kasvi®, Terámo, Itália) acrescidos de clorafenicol (150 mg/L), e visualizadas em microscópio óptico em aumento de 400x.

Fonte: Autoral, 2023.

REFERÊNCIAS

- Abrão, F. O.; Duarte, E. R.; Rosa, C. A.; Freitas, C. E. S.; Vieira, E. A.; Silva - Hughes, A. F., et al., 2014. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. *Curr. Microbiol.* 69, 649-659. <https://doi/10.1007/s00284-014-0633-5>.
- Abrão, F. O.; Freitas, C. E. S.; Duarte, E. R.; Geraseev, L. C.; Barreto, S. M. P.; Medeiros, A. O.; Rosa, C. A., 2011. Leveduras no rúmen de caprinos e bovinos de corte criados em pastagem tropicais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63, 526-529. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000200039>.
- Almeida, P. N. M., Freitas, C. E. S., Abrão, F. O., Ribeiro, I. C. O., Vieira, E. A., Geraseev, L. C., e Duarte, E. R., 2014. Atividade celulolítica de fungos aeróbios isolados do rúmen de bovinos leiteiros alimentados com forragens tropicais. *Rev. Caat.* 27, 202-207.
- Alvares, C.A., Stape J.L., Sentelhas P.C., Gonçalves J.L.M., Sparovek G., 2014. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Z.* 22, 711-728.
- Almeida, P. N. M. D., Duarte, E. R., Abrão, F. O., Freitas, C. E. S., Geraseev, L. C., e Rosa, C. A., 2012. Aerobic fungi in the rumen fluid from dairy cattle fed different sources of forage. *R. Bras. Zootec.* 41, 2336-2342. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012001100006>.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., e Lipman, D. J., et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids Res.* 25, 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Ankom, Technology. Method 3: In vitro true digestibility using the DAISYII Incubator., 2014. http://www.ankom.com/media/documents/IVDMD_0805_D200.pdf.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemist, 1997. Official methods of analysis 16th edition AOAC, Gaithersburg, MP. AOAC, Gaithersburg, MP.
- Azevedo, R. A. D., Rufino, L. M. D. A., Santos, A. C. R. D., Silva, L. P. D., Bonfá, H. C., Duarte, E. R., e Geraseev, L. C., 2012. Desempenho de cordeiros alimentados com inclusão de torta de macaúba na dieta. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 47, 1663-1668. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012001100014>.
- Azevedo, R. A., Santos, A. C. R., Júnior, R., Santos, F. P. C., Araújo, L., Bicalho, F. L., Geraseev, L. C., et al., 2014. Desempenho de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo torta de macaúba. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 66, 211-218. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352014000100029>.
- Battestin, V., e Macedo, G. A., 2007. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresour. Technol.*, 98, 1832-1837. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.031>.

- Blumenthal, C. Z., 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. Regul. Toxicol. Pharmacol., 39, 214-228. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2003.09.002>.
- Bokhari, F., Gherbawy, Y., e Najjar, A., 2009. Detection of the patulin-producing potential of some *Paecilomyces variotii* strains isolated from the air samples of Jeddah City, Saudi Arabia, using the RAPD-PCR technique. Aerobiologia, 25, 49-54. <https://doi.org/10.1007/s10453-008-9108-0>.
- Cairns, T. C., Barthel, L., e Meyer, V., 2021. Something old, something new: challenges and developments in *Aspergillus niger* biotechnology. Essays Biochem., 65, 213-224. <https://doi.org/10.1042/EBC20200139>
- Cairns, T. C., Nai, C., e Meyer, V., 2018. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. Fungal Biol. Biotechnol., 5, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5>
- Castellani, A. A., 1967. Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. J. Trop. Med. Hyg., 70, 181-184.
- Chahal, P.D., Chahal, D.S., Andre, G., 1992. Cellulase production profile of *Trichoderma reesei* on different cellulosic substrates at various pH levels. J. Ferment. Bioeng. 74, 126–128. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)80015-B](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)80015-B).
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J., 2000. Atlas of clinical fungi. In: Centraal Bureau Voor Schimmel Cultures. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, The Netherland, 1126.
- Dirksen, G., 1993. Sistema digestivo. In: Dirksen, G., Gründer, H.D., Stöber, M. (Eds.), Rosenberger: Exame Clínico Dos Bovinos. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 167–169.
- Duarte, E. R., Maia, H. A. R., Freitas, C. E. S., da Silva Alves, J. M., Valério, H. M., e Cota, J., 2021. Hydrolysis of lignocellulosic forages by *Trichoderma longibrachiatum* isolate from bovine rumen. Biocatal. Agric. Biotechnol., 36, 102-135. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102135>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization., 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- Freitas C. E. S., 2018. Potencial de fungos do trato digestório de ovinos para utilização como probiótico. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-graduação em Zootecnia.
- Freitas, C. E. S., Abrão, F. O., Silva, K. D., Almeida, P. D., e Duarte, E. R., 2012. Fungos aeróbios no intestino grosso de borregos e de ovelhas criados em pastagens tropicais. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 64, 225-227. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000100033>.

- Freitas, C. E. S., Duarte, E. R., Alves, D. D., Martinele, I., D'Agosto, M., Cedrola, F., Beltran, M., et al., 2017. Sheep fed with banana leaf hay reduce ruminal protozoa population. *Trop. Anim. Health. Prod.*, 49, 807-812. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1265-0>.
- Frisvad, J. C., Møller, L. L., Larsen, T. O., Kumar, R., e Arnau, J., 2018. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102, 9481-9515. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9354-1>.
- Gil-Serna, J., García-Díaz, M., Vázquez, C., González-Jaén, M. T., e Patiño, B., 2019. Significance of *Aspergillus niger* aggregate species as contaminants of food products in Spain regarding their occurrence and their ability to produce mycotoxins. *Food Microbiol.*, 82, 240-248. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.013>.
- Goering, H. K.; Van Soest, P. J., 1970. Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications. *Agric. Res. Serv., US Department of Agriculture.*, 19. <https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT87209099/PDF>.
- Harvatine, K.J.; Allen, M.S., 2006. Effects of fatty acid supplements on ruminal and total tract nutrient digestion in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 89, 1092-1103. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72177-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72177-4).
- Herrera Bravo de Laguna, I., Toledo Marante, F. J., e Mioso, R., 2015. Enzymes and bioproducts produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. *J. Appl. Microbiol.*, 119, 1455-1466. <https://doi.org/10.1111/jam.12934>.
- Holden, L. A., 1999. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. *J. Dairy Sci.*, 82, 1791-1794. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75409-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75409-3).
- Hussain, A., Shrivastav, A., Jain, S. K., Baghel, R. K., Rani, S., e Agrawal, M. K., 2012. Cellulolytic Enzymatic Activity of Soft Rot Filamentous Fungi *Paecilomyces variotii*. *Adv. Biores.*, 3, 10-17. http://www.soeagra.com/abr/abrsept_2012/3.pdf.
- Kamra, D. N., 2005. Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.*, 89, 124-135.
- Kim, Y. I., Lee, Y. H., Kim, K. H., Oh, Y. K., Moon, Y. H., e Kwak, W. S., 2012. Effects of supplementing microbially-fermented spent mushroom substrates on growth performance and carcass characteristics of Hanwoo steers (a field study). *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 25, 1575 - 1581. <https://doi.org/10.5713%2Fajas.2012.12251>.
- Kluczek-Turpeinen, B., 2007. Lignocellulose degradation and humus modification by the fungus *Paecilomyces inflatus*. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology.
- Kubicek, C.P., Harman, G.E., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. CRC Press, Londres, p. 300. <https://doi.org/10.1201/9781482295320>.

Kumhar, K. C., Babu, A., Bordoloi, M., e Ali, A., 2014. Evaluation of culture media for biomass production of *Trichoderma viride* (KBN 24) and their production economics. Am. J. Agric. For., 2, 317-320. [10.11648/j.ajaf.20140206.24](https://doi.org/10.11648/j.ajaf.20140206.24).

Kurtzman, C. P., Fell, J. W., e Boekhout, T., 2011. (Eds.). The yeasts: a taxonomic study. Elsevier., 3 - 2071.

Da Silva Lacaz, C., Porto, E., Martins, J. E. C., Heins-Vaccari, E. M., e de Melo, N. T., 2002. Tratado de micologia médica Lacaz. Sarvier., 1104.

Li, C., Lin, F., Li, Y., Wei, W., Wang, H., Qin, L., Chen, Z., et al., 2016. A β -glucosidase hyper-production *Trichoderma reesei* mutant reveals a potential role of cel3D in cellulase production. Microb. Cell. Fact., 15, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0550-3>.

Liu, N. Y., Bao, Z. R., Li, J., Ao, X. Y., Zhu, J. Y., e Chen, Y. H., 2017. Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma atroviride* strain SS003 in the presence of cell wall of *Cronartium ribicola*. Genes Genom., 39, 473-484. <https://doi.org/10.1007/s13258-016-0512-5>.

Martins Júnior, V. S.; Duarte, E. R.; Silva, K. L. da; Freitas, C. E. S.; Pessoa, F. O. A.; Almeida, P. N. M. de. Seleção de Fungos Celulolíticos do Intestino Grosso de Borregos e Ovelhas Criados em Pastagens Tropicais. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 27, n. 2, p. 167–171, 2023. <https://ensaioseciencia.pgsscogna.com.br/ensaioseciencia/article/view/10436>.

Morgavi, D. P., Beauchemin, K. A., Nsereko, V. L., Rode, L. M., Iwaasa, A. D., Yang, W. Z., Wang, Y., et al., 2000. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. J. Dairy Sci., 83, 1310-1321. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74997-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74997-6).

Nagaraja, T.G., Newbold, C.J., van Nevel, C.J., e Demeyer, D.I., 1997. Manipulation of ruminal fermentation. In: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (eds) The Rumen Microbial Ecosystem. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_13.

Nakasaki, K., Mimoto, H., Tran, Q. N. M., e Oinuma, A., 2015. Composting of food waste subjected to hydrothermal pretreatment and inoculated with *Paecilomyces* sp. FA13. Bioresour. Technol., 180, 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.094>.

National Research Council. NRC. Nutrient requirements of small ruminants. Washington, D. C.: National Academy Press, 2007. 362.

Nawaz, H., Shahzad, N., Saif-ur-Rehman, M., e Ali, M., 2016. Effect of feeding xylanase and cellulase treated oat silage on nutrient digestibility, growth performance and blood metabolites of Nili Ravi buffalo calves. Pak. J. Agric. Sci., 53, 999-1004. <http://pakjas.com.pk/papers/2664.pdf>.

Nicory, I. M. C., de Carvalho, G. G. P., Ribeiro, O. L., Santos, S. A., da Silva, F. F., Silva, R. R., de Freitas Jr, J. E., et al., 2015. Productive and metabolic parameters in lambs fed diets with castor seed meal. Livest. Sci., 181, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.09.015>.

- Nocek, J. E., e Russell, J., 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. J. Dairy Sci., 71, 2070-2107. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79782-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79782-9).
- Nurudeen, O. O., Adetayo, O. M., Bolanle, A. S., e Olaltunde, O. A. L., 2015. Cellulase and Biomass Production from Sorghum (*Sorghum guineense*) Waste by *Trichoderma longibrachiatum* and *Aspergillus terreus*. J. Microbiol. Res., 5, 169-174. 10.5923/j.microbiology.20150506.01.
- Oliveira, J. S., de Moura Zanine, A., & Santos, E. M., 2007. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. Rev. Electron. de Vet., 8, 1-12.
- Patil, N. P., Patil, K. P., Chaudhari, B. L., e Chincholkar, S. B., 2012. Production, purification of exopolysaccharide from soil isolate *Paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and its application. Indian. J. Microbiol., 52, 240-246. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0162-x>.
- Pimentel, P. G., Reis, R. B., Leite, L. A., Campos, W. E., Neiva, J. N. M., Saturnino, H. M., e Coelho, S. G., 2012. Parâmetros da fermentação ruminal e concentração de derivados de purina de vacas em lactação alimentadas com castanha de caju. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 64, 959-966. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000400024>.
- Rigueira, J. P. S., Monção, F. P., de Sales, E. C. J., dos Reis, S. T., Alves, D. D., de Aguiar, A. C. R., Chamone, J. A., et al., 2017. Composição química e digestibilidade in vitro de tortas da macaúba. RUC., 19, 62-72. <https://www.periodicos.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/1180>.
- Rizzatti, A. C. S., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Rechia, C. G. V., e Polizeli, M. D. L. T. D. M., 2001. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. J. Ind. Microbiol. Biotech., 26, 156-160. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000107>.
- Rufino, L. M. A., Barreto, S. M. P., Duarte, E. R., Geraseev, L. C., Santos, A. C. R., e Jaruche, Y. G., 2011. Efeitos da inclusão de torta de macaúba sobre a população de protozoários ruminais de caprinos. Rev. Bras. Zootec., 40, 899-903. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000400026>.
- SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa, 2007.
- Sampedro, I., Cajthaml, T., Marinari, S., Petruccioli, M., Grego, S., e D'Annibale, A., 2009. Organic matter transformation and detoxification in dry olive mill residue by the saprophytic fungus *Paecilomyces farinosus*. Process Biochem., 44, 216-225. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.10.016>.
- Sarnklong, C., Cone, J. W., Pellikaan, W., e Hendriks, W. H., 2010. Utilization of rice straw and different treatments to improve its feed value for ruminants: a review. Asian-australas. J. Anim. Sci., 23, 680-692. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.80619>.

- Schons, P. F., Battestin, V., e Macedo, G. A., 2012. Fermentation and enzyme treatments for sorghum. *Braz. J. Microbiol.*, 43, 89-97. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100010>.
- Schuster, A., e Schmoll, M., 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 787-799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>.
- Sharma, A., Sharma, S., Mittal, A., e Naik, S. N., 2014. Statistical optimization of growth media for *Paecilomyces lilacinus* 6029 using non-edible oil cakes. *Annals of Microbiology*, 64, 515-520. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0683-0>.
- Silva, R. V. M. M., de Carvalho, G. G. P., Pires, A. J. V., Pereira, M. L. A., Pereira, L., Campos, F. S., De Carvalho, B. M. A., et al., 2016. Cottonseed cake in substitution of soybean meal in diets for finishing lambs. *Small Rumin. Res.*, 137, 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.03.014>.
- Silva, T. M., Medeiros, A. N. D., Oliveira, R. L., Neto, S. G., Ribeiro, M. D., Bagaldo, A. R., e Ribeiro, O. L., 2015. Peanut cake as a substitute for soybean meal in the diet of goats. *J. Anim. Sci.*, 93, 2998-3005. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8548>.
- Vieira, T. M., Vasconcelos, V. de O, Fonseca, L. D., Cândido, R. C. de S., e Duarte, E. R., 2016. Fungi extract in the inhibition of the egg hatching and larval development of the *Haemonchus contortus*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 10, 1044-1050. <http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/AE26A7B59473>.
- Tilley, J. M. A., e Terry, D. R., 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass Forage Sci*, 18, 104-111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>.
- Toth, K., Van Gool, M. P., Schols, H. A., Samuels, G. J., Gruppen, H., e Szakacs, G., 2013. Diversity in production of xylan-degrading enzymes among species belonging to the *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Bioenergy Res.*, 6, 631-643. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9282-3>.
- Tribak, M., Ocampo, J. A., e García-Romera, I., 2002. Production of xyloglucanolytic enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia*, 94, 404-410. <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833205>.
- Van Soest, P.J., 1965. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. *J. Anim. Sci.* 24, 834–843. <https://doi.org/10.2527/jas1965.243834x>.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).

- Wang, L., Li, Y., Yu, P., Xie, Z., Luo, Y., e Lin, Y., 2010. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel fungal strain *Paecilomyces variotii* JH6. *J. Hazard. Mater.*, 183, 366-371. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.033>.
- Wei, Y. Q., Yang, H. J., Luan, Y., Long, R. J., Wu, Y. J., e Wang, Z. Y., 2016. Isolation, identification and fibrolytic characteristics of rumen fungi grown with indigenous methanogen from yaks (*Bos grunniens*) grazing on the Qinghai-Tibetan Plateau. *J. Appl. Microbiol.*, 120, 571-587. <https://doi.org/10.1111/jam.13035>.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T. (Eds.), *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
- Yang, F., Abdelnabby, H., e Xiao, Y., 2015. The role of a phospholipase (PLD) in virulence of *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces lilacinum*). *Microb. Pathog.*, 85, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.05.008>.
- Yang, J., Zhao, X., Liang, L., Xia, Z., Lei, L., Niu, X., Zhang, K. Q., et al., 2011. Overexpression of a cuticle-degrading protease Ver112 increases the nematicidal activity of *Paecilomyces lilacinus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89, 1895-1903. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3012-6>.
- Yuangklang, C., Schonewille, J. T., Alhaidary, A., Vasupen, K., Bureenok, S., Seanmahayak, B., Beynen, A. C., et al., 2017. Growth performance and macronutrient digestion in goats fed a rice straw based ration supplemented with fibrolytic enzymes. *Small Rumin. Res.*, 154, 20-22. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.06.009>.