

ATIVIDADE FIBROLÍTICA E EFEITOS DE CEPAS FÚNGICAS AUTÓCTONES DO TRATO DIGESTÓRIO NA DIETA DE CORDEIROS DESMAMADOS



<https://doi.org/10.56238/arev7n2-007>

Data de submissão: 03/01/2025

Data de publicação: 03/02/2025

Joane Raquel F. A. Almeida

Programa de Pós-Graduação em Produção de Ruminantes
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia, Brasil
E-mail: jraquelalmeida@hotmail.com

Cláudio Eduardo S. Freitas

Programa de Pós-Graduação em Produção de Ruminantes
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia, Brasil
E-mail: eduardo-freitasmoc@hotmail.com

Mara Lúcia A. Pereira

Departamento de Ciências Exatas e Naturais
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia, Brasil
E-mail: mlpereira@uesb.edu.br

Leandro S. E Silva

Programa de Pós-Graduação em Produção de Ruminantes
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia, Brasil
E-mail: ses.leandro@gmail.com
ORCID: 0000-0002-0537-7451

Valdo S. Martins Junior

Instituto de Ciências Agrárias
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brasil
E-mail: valdo-soares1@hotmail.com

Fernando S. Magaço

Departamento de Produção Animal, Faculdade de Ciências Agrárias
Universidade Zambeze, Tete, Moçambique
E-mail: fernandomagaco@gmail.com

Herymá Giovane O. Silva

Departamento de Ciências Exatas e Naturais
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia, Brasil
E-mail: heryma@gmail.com

Eduardo R. Duarte

Instituto de Ciências Agrárias
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brasil
E-mail: duartevet@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da celulase e xilanase de fungos isolados do trato digestivo de ovinos e os efeitos da suplementação com dois fungos selecionados sobre o consumo, digestibilidade, síntese de proteína microbiana (PM) e balanço de nitrogênio em cordeiros. O primeiro experimento avaliou as atividades da carboximetilcelulase (CMCase) e da xilanase de dois fungos filamentosos e duas leveduras, que foram cultivados em meio de cultura contendo feno de *Urochloa decumbens*. O segundo experimento foi realizado com vinte e um cordeiros mestiços machos Santa Inês x Dorper, com peso corporal inicial de $18,80 \pm 0,55$ kg, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com duração de 78 dias. As dietas consistiram de 30% de feno de *U. decumbens* e 70% de concentrado, suplementado ou não com isolados do fungo *Trichoderma longibrachiatum* (TL B13M2; 30 ml) ou levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (RM O166; 30 ml). No primeiro experimento, a CMCase e a xilanase de *Aspergillus terreus* e *T. longibrachiatum* foram mais ativas e eficientes ($P < 0,05$) do que as leveduras. No segundo experimento, o consumo de nutrientes, a digestibilidade, a síntese de MP e a retenção de nitrogênio corporal não foram influenciados ($P > 0,05$) pela suplementação fúngica. A eficiência microbiana foi menor ($P < 0,05$) com o uso de RM O166. A inclusão de TL B13M2 mostrou aumento da atividade da CMCase e da xilanase.

Palavras-chave: Carboximetilcelulase. Aditivo microbiano. Eficiência microbiana. Probióticos. Xilanase.

1 INTRODUÇÃO

Diante das preocupações com a segurança alimentar e os riscos de resistência aos antibióticos devido à liberação desses resíduos químicos no meio ambiente e à persistência em produtos de origem animal, há uma infinidade de alternativas naturais aos antibióticos promotores de crescimento que produzem efeitos semelhantes no desempenho animal (Eicher et al., 2006; Collier et al., 2010; Martínez-Vaz et al., 2014; Yamamoto et al., 2014; McCann et al., 2017; Mani et al., 2021). Entre eles está a adição direta de microrganismos, também conhecidos como microbianos de alimentação direta, explorados como alternativas mais seguras aos antibióticos para melhorar o equilíbrio da microbiota gastrointestinal e melhorar a saúde e a produtividade dos ruminantes (Mani et al., 2021). Atualmente, *Saccharomyces cerevisiae* é o principal probiótico do mercado, e a maioria dos probióticos não é do rúmen (Han et al., 2021). No rúmen, os microrganismos ingeridos apresentam benefícios e modificações no ecossistema, melhorando as características de fermentação (Díaz et al., 2014; Elghandour et al., 2015; Uyeno et al., 2015; McCann et al., 2017; Han et al., 2021; Abrão et al., 2022). No entanto, essas estratégias podem variar considerando o ambiente, manejo, idade, características da ração e finalidade de produção (Elghandour et al., 2015; Liu et al., 2021).

A suplementação de fungos pode provocar um "efeito fibrolítico" no rúmen, colonizando e interrompendo fisicamente as frações vegetais para aumentar o acesso das superfícies das fibras para bactérias e suas enzimas degradadoras de fibras (Dagar et al., 2011; McCann et al., 2017; Liang et al., 2020). O desenvolvimento de pesquisas contemplando o uso dietético de fungos filamentosos autóctones ruminais e linhagens de leveduras, cujo efeito probiótico precisa ser testado, pode fornecer uma alternativa para enfrentar o desafio de produzir carne de qualidade e de forma sustentável (Han et al., 2021; Abrão et al., 2022; Wang et al., 2022). Nesse sentido, as cepas isoladas do trato digestório de ovinos, como *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus terreus*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Pichia kudriavzevii* apresentam-se como alternativa, destacando-se em testes anteriores dentro do grupo de pesquisa, quando foi avaliada a degradabilidade in vitro da matéria seca e da fibra em detergente neutro.

Nas regiões tropicais, a estação seca é um fator limitante para o fornecimento de forragem com qualidade nutricional aos animais. As gramíneas tropicais na estação seca reduzem o fornecimento de nutrientes solúveis no conteúdo celular e apresentam maior proporção de carboidratos fibrosos lignificados na parede celular.

A adição de fungos e suas enzimas às dietas de ruminantes pode estimular o consumo de matéria seca, promover o uso de dietas ricas em fibras e melhorar o desempenho desses animais (Mohamed et al., 2013; Abdelrahman et al., 2016; López-Aguirre et al., 2016; Vallejo et al., 2016; Liang et al., 2020).

Sabe-se também que, além da população de fungos anaeróbios estritos, fungos anaeróbios facultativos têm sido detectados no ambiente ruminal (Abrão et al., 2014; 2017). Esses fungos ruminais podem assumir importância fundamental na degradação de forrageiras tropicais, produzindo enzimas com atividade para degradar a celulose (Almeida et al., 2014; Abrão et al., 2017). Estudo prévio realizado por Freitas et al., (2012), apontou a ocorrência dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma*, isolados do trato digestivo de cordeiros criados em *Megathyrsus maximum*, que poderiam ser utilizados para o desenvolvimento de aditivos microbianos ou probióticos. A inclusão das cepas de *T. longibrachiatum* e *R. muscilaginosa* do trato digestório de ovinos mostrou aumento no consumo e no ganho de peso corporal de cordeiros desmamados alimentados com feno de baixa qualidade (Magaço et al., 2020; Martins Júnior et al., 2022).

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade celulolítica e xilanolítica de fungos anaeróbios facultativos isolados do trato digestório de ovinos e analisar os efeitos da suplementação com dois fungos selecionados sobre o consumo, digestibilidade aparente total, síntese de proteína microbiana e balanço de nitrogênio em cordeiros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos de cuidado e manejo dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o Protocolo nº 128/2013, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Campus Montes Claros, Minas Gerais, Brasil.

2.1 EXPERIÊNCIA 1

2.1.1 Isolados fúngicos locais avaliados e identificação molecular

O experimento 1 foi realizado no Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil (15° 15' 19,3" de latitude S e 40° 16' 21,2" de longitude W). Foram avaliados quatro fungos/leveduras, duas enzimas e quatro tempos de fermentação. O fungo *Trichoderma* sp. (TL B13M2) foi isolado das fezes, *Aspergillus* sp. (AT O45M1), *Pichia* sp. (PK O151) e *Rhodotorula* sp. (RM O166) foram isolados do rúmen de ovinos mestiços sadios Santa Inês × Dorper. Esses animais foram alimentados em pastagens de feno de *Megathyrsus maximum* ou *Cynodon dactylon* e isolados durante o período seco do ano.

Fungos e leveduras foram cultivados em ágar Sabouraud (Acumedia, Lansing, EUA) por sete e dois dias, respectivamente, e o DNA foi extraído usando glucanase (Glucanex, Ferment Ltd., CH) em uma extração de fenol seguida de duas extrações de fenol/clorofórmio de acordo com Neuhauser et al. (2009). Para fungos, a região espaçadora interna transcrita (ITS) do rDNA foi amplificada a partir

do DNA extraído por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) de acordo com White et al. (1990). Além disso, fragmentos do gene que codifica a proteína β -tubulina (β -tub) foram amplificados usando Bt2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTTTC) e Bt2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) (Glass e Donaldson, 1995), e fragmentos do gene do fator de alongamento (EF-1 α) foram amplificados usando os primers EF-728M (CATYGAGAAGTTCGAGAAGG) e EF2 (GGARGTACCAGTSATCATGTT) (Samson et al. 2014).

As reações de PCR, com um volume final de 50 μ L, continham 5 μ L de tampão 10 X, 5 μ L de 25 mM MgCl₂, 1 μ L de 10 mM dNTPs, 2 μ L de cada primer a 10 μ M, 2,5 μ L de 20% de DMSO, 2 μ L de 150 ng de DNA, 0,5 μ L de Taq DNA polimerase (Sinapse, BR), e 30 μ L de H₂O ultrapuro. As amplificações foram realizadas com uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, recozimento dos primers ITS a 58 °C por 1 min e 20 s, do primer β -tub a 55 °C por 1 min e do primer EF-1 α a 57 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min e 30 s, seguida por uma extensão final a 72 °C por 5 min. Para a purificação dos produtos da PCR, 11,25 μ L de EDTA (125 mmol/L) e 135 μ L de etanol absoluto foram adicionados aos tubos contendo a reação. A mistura foi incubada por 15 min a 28 °C e depois centrifugada a 20215 \times g por 25 min para precipitar os amplicons. O sobrenadante foi descartado e 120 μ L de etanol a 70% (v/v) foram adicionados aos tubos da microcentrífuga. Esses tubos foram homogeneizados por inversão, centrifugados a 20215 \times g por 10 min, e o sobrenadante descartado novamente. Após a evaporação completa do etanol residual, o produto foi ressuspensão em 10 μ L de água livre de nuclease. Os produtos amplificados foram quantificados com um NanoDrop (1000ND, ThermoFisher Scientific, EUA), e a concentração foi ajustada para 100 ng/ μ L para uso em reações de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada em placas de 96 poços usando um volume final de 10 μ L. 20 ng do produto de amplificação purificado foram adicionados à reação junto com 1,6 μ L de tampão de reação, 0,8 μ L de BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (AppliedBiosystems®), 1 μ L dos mesmos primers de amplificação a uma concentração de 5 μ mol/L e água. A amplificação foi realizada com desnaturação a 96 °C por 1 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 s, recozimento do primer a 50 °C por 15 s e extensão a 60 °C por 4 min. Para a precipitação da reação de sequenciamento, um volume de 2,5 μ L de EDTA (125 mmol/L) e 30 μ L de etanol (95%) foram adicionados a cada poço. Após 15 min, a centrifugação foi realizada a 2500 \times g por 45 min, o sobrenadante foi descartado e 30 μ L de etanol (70% v/v) foram adicionados a cada poço. Uma nova centrifugação foi realizada a 2500 \times g por 15 min, o sobrenadante foi descartado e a placa permaneceu

em temperatura ambiente até que o etanol estivesse completamente seco (White et al., 1990). O produto da purificação foi suspenso em formamida Hi-Di™ e sequenciado em um sequenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As sequências obtidas foram cortadas quanto à qualidade usando o software Bioedit versão 7.2.5 e Asparagin (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) para excluir regiões de baixa qualidade (Phred Score < 20). Para montar os contigs, as sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas e comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o programa Blast N (Altschul et al., 1997). Para ser considerado pertencente a uma determinada espécie, o isolado deveria apresentar 97% de similaridade com outro já depositado no GenBank (Stackebrandt et al., 1994).

Para leveduras, as sequências de domínio variável D1-D2 do gene 28S rRNA foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers NL1 (5'-GCATATCAAAAGGAAGAGTAAGCC-3') e NL4 (5'-GGTAAGCTTCCGCTGTCCGG-3'). A concentração de DNA foi ajustada para 100 ng/μL usando um NanoDrop (1000ND, ThermoFisher Scientific, EUA) para uso em reações de sequenciamento. ADYEnamic (Amersham Biosciences, EUA) foi usado para sequenciamento em um sistema de sequenciamento automatizado Mega-BACE 1000. As sequências de rDNA foram analisadas usando BLASTn (v.2.2.15) do BLAST2.0 no site do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Cepas coespecíficas diferiram em não mais do que três dentro dos 500-600 nucleotídeos dos domínios D1 / D2, e isolados com 99% de semelhança de sequência com as sequências depositadas foram considerados da mesma espécie (Kurtzman et al., 2011).

2.1.2 Forragem utilizada

O feno de Urochloa decumbens (UDH) foi adquirido durante a estação seca (março a outubro). Foram realizadas análises em duplicata para determinação de matéria seca (MS; método 934.01), cinzas (método 942.05), proteína bruta (CP; método 954.01), extrato etéreo (EE; método 920.39), fibra em detergente neutro (FDN; método 973.18), fibra em detergente ácido (FDA; método 973.18), lignina (método 973.18), cálcio (Ca; método 984.27), fósforo (P; 984.27), potássio (K; método 984.27), magnésio (Mg; método 984.27), enxofre (S; método 990.28), açúcares (carboidratos solúveis em etanol; 985.29), proteína insolúvel em detergente neutro (NDIP; método 973.18), proteína insolúvel em detergente ácido (ADIP; método 973.18), celulose (Cel; método 991.46) e hemicelulose (Hem; método 2002-04) de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (Tabela 1).

Os teores de carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados de acordo com o modelo proposto por Hall (2003):

$$\text{NFC} = (100 - \% \text{NDF} - \% \text{CP} - \% \text{EE} - \% \text{ash}).$$

Tabela 1. Composição química do feno de *U. decumbens* amostrado durante a estação seca

Componente	<i>U. decumbens</i> (g/kg)
Matéria seca (%)	95.38
Proteína bruta	30.63
PEQUENO DIA	215.68
ADIP	205.92
NDF	822.56
ADF	530.44
Lignina	75.01
Açúcares totais	30.18
Extrato etéreo	10.22
Freixo	58.88
Ca	1.45
P	1.04
K	5.77
Mg	2.02
S	0.64
Celulose	455.36
Hemicelulose	292.21
NFC	84.30

MS = matéria seca; NDIP = Proteína insolúvel em detergente neutro; ADIP = Proteína insolúvel em detergente ácido; FDN = Fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; Ca = Cálcio; P = Fósforo; K = Potássio; mg = magnésio; S = Enxofre; NFC = carboidratos não fibrosos.

2.1.3 Fermentação

Os fungos selecionados *Trichoderma* sp. (TL B13M2), *Aspergillus* sp. (AT O45M1), *Pichia* sp. (PK O151) e *Rhodotorula* sp. (RM O166) foram cultivados em ágar-batata-dextrose (Acumedia, Lansing, MI) com cloranfenicol (150 mg/L) durante sete dias a 37°C. As culturas esporuladas de fungos miceliais e células de levedura foram suspensas em solução tween 80 a 0,01%, onde o número de esporos ou células em suspensão foi contado por meio de câmara de Neubauer com auxílio de microscópio binocular. Após esse período, cada isolado foi reinoculado em meio C.

A fermentação ocorreu em Erlenmeyers com 50 mL de meio líquido (meio C) contendo 0,5% de sulfato de amônio, 0,1% de fosfato de potássio monobásico, 0,05% de sulfato de magnésio heptahidratado e 1% de fonte de carbono (UDH moído em moinho Wiley e padronizado em 1 mm) adicionado ao inóculo contendo aproximadamente 107 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

As fermentações submersas foram realizadas a 39 °C em uma incubadora de CO₂ (Forma Direct Heat 311, Thermo Fisher Scientific, EUA), às 24, 48, 72 e 96 h. O pH do meio foi medido antes e após a incubação com o auxílio de um potenciômetro digital (Q440BC, Quimis, BR). Após o

processo de fermentação, o extrato enzimático foi coletado e centrifugado a $11000 \times g$ (Himac CF 16RX II, Hitachi, JP) por 30 minutos a 4°C , e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzimas microbianas.

Determinou-se a biomassa fúngica com base na massa seca, que foi obtida após o processo de filtração no caldo (extrato enzimático) e lavagem em água corrente, seguida de secagem em estufa circulante (TE-394/3, Tecnal, BR) por quatro dias a 55°C até que tenham peso constante. Para a massa seca das leveduras, após a obtenção do extrato enzimático com centrifugação a $11000 \times g$, a fase líquida foi descartada, e as leveduras foram transferidas para cadinhos e seguidas de secagem em estufa de circulação (TE-394/3, Tecnal, BR) por quatro dias a 55°C até que tenham peso constante.

2.1.4 Determinação das actividades enzimáticas

A carboximetilcelulase (CMCase) foi determinada de acordo com a metodologia adaptada de Ghose (1987) modificada por Siqueira et al. (2020). Uma solução de carboximetilcelulose 1% (m/v) (Vetec, BR) foi utilizada como substrato na dosagem de CMCase. Para a reação, 0,5 mL de solução de substrato de carboximetilcelulose a 1% (m/v), 0,5 mL de extrato enzimático e 1 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L; pH 6,8). A reação foi incubada a 39°C por 60 min e a quantificação de açúcares redutores foi estimada de acordo com a metodologia de Miller (1959) modificada por Gonçalves et al. (2010).

Para medir a atividade da xilanase, foi preparada uma mistura contendo 1 mL de tampão fosfato (0,1 mol/L; pH 6,8), 0,5 mL de sobrenadante e 0,5 mL de xilana (D-Xylana, Vetec, BR) (0,25%). A reação foi incubada por 15 min, a 39°C e a quantificação dos açúcares redutores foi estimada de acordo com a metodologia adaptada de Miller (1959) modificada por Gonçalves et al. (2010).

Todas as amostras foram testadas em triplicata e 1 mL de misturas foram removidos para determinação de Açúcares Redutores Totais (ATR) e colocados em tubos de ensaio juntamente com 1 mL de DNS. Os tubos foram agitados e aquecidos em banho-maria a 96°C por cinco min. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo por cinco minutos, adicionando-se 16 mL de tartarato duplo de potássio e sódio. Os brancos de cada leitura foram realizados com os extratos enzimáticos avaliados sem a adição dos respectivos carboidratos a serem degradados. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro (UV-M51, Bel Engineering, IT) a 540 nm, as concentrações de glicose foram expressas em g/L. Uma unidade de atividade ou produtividade de celulase e xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um micromol (1 μmol) de glicose ou xilose mililitro por minuto (U / mL), nas condições descritas (Miller, 1959; Ghose, 1987). Os cálculos de produtividade foram realizados por meio da fórmula:

$$U = \text{Absmeans} \times (1/\epsilon) \times (1/t) \times (1/V_i) \times 103 \times V_f$$

Onde:

U = unidade de atividade;

Abs = absorvância;

ϵ = absortividade da glicose ou da xilose: $a \times W$ (a = coeficiente obtido a partir da linha-padrão glicose e xilose, W = massa molecular da glicose ou da xilose);

t = tempo de reação;

103 = transformação de mg em μg ;

V_i = tamanho do extracto enzimático;

V_f = dimensão final da reacção.

2.2 EXPERIMENTO 2

2.2.1 Dietas locais, animais e experimentais

O experimento 2 foi realizado no município de Montes Claros, norte de Minas Gerais (16° 44' 13" de latitude S e 43° 51' 53" de longitude oeste), clima tropical úmido com verão seco. O período experimental foi de 12 dias para adaptação às dietas e baias e 63 dias para coleta de dados.

Foram avaliados vinte e um ovinos machos Santa Inês x Dorper, com quatro meses de idade, com peso corporal inicial de $18,80 \pm 2,34$ kg. Foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado, com três dietas e sete repetições. As dietas experimentais consistiram em uma dieta padrão, suplementada com a cepa fungo/levedura ou sem aditivo probiótico (controle). No momento da alimentação, um grupo de animais foi suplementado com 30 mL do meio de cultura contendo 109 UFC/mL da cepa *R. mucilaginosa* (levedura; RM O166) ou 30 mL do meio de cultura contendo 107 UFC/mL da cepa *T. longibrachiatum* (fungo; TL B13M2). Estes foram misturados com 100 g do concentrado, o que permitiu a ingestão total do suplemento. Os cordeiros do grupo controle receberam o mesmo meio de cultura sem as cepas fúngicas. A água foi fornecida ad libitum aos animais em bebedouro individual. Os aditivos microbianos foram isolados do trato digestivo (fezes) e rúmen (líquido) de ovinos criados em pastagens de *feno de Megathyrsus maximum* ou *Cynodon dactylon*, conforme relatado por Freitas et al. (2012) e Martins Júnior et al. (2022).

Após identificação e pesagem, os cordeiros foram tratados com ivermectina a 1% e vacinados contra clostridiose. Os animais foram alojados em baias individuais medindo 1,20 m de largura, 2 m de comprimento e 1,30 m de altura, equipados com baldes para água e comedouros.

Para a formulação das dietas, os alimentos foram analisados pelos métodos descritos no experimento 1, de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC) e balanceados

para um ganho de 200 g/dia de acordo com o National Research Council (NRC, 2007). O UDH foi utilizado como volumoso (30% MS na dieta) e o concentrado (70% MS na dieta) consistiu de milho moído e farelo de soja, conforme detalhado na Tabela 2.

Tabela 2. Composição química dos ingredientes e da dieta experimental contendo feno de *U. decumbens*

Ingredientes	DM%	% de OM	EE%	% de NFC	% de CP	FDN%	TDN% ¹
Milho	89.0	98.8	7.9	63.2	9.0	16.5	83.2
Farelo de soja	88.8	93.6	1.8	30.0	46.0	15.5	80.7
Ureia + AS	100	-	-	-	277.0	-	-
Minerais	100	-	-	-	-	-	-
Feno de <i>U. decumbens</i>	95.4	94.1	1.0	8.4	3.1	82.3	30.9
% de inclusão, matéria seca							
Milho	59.1	58.4	4.7	37.3	5.3	9.8	49.2
Farelo de soja	8.3	7.8	0.1	2.5	3.8	1.3	6.7
Ureia + AS	0.5	-	-	-	1.4	-	-
Minerais	2.0	-	-	-	-	-	-
Feno de <i>U. decumbens</i>	30.0	28.2	9.3	2.5	3.1	24.7	0.9
Dieta total	100	94.4	14.1	42.4	11.4	35.8	65.2

AS = sulfato de amônio; MS = matéria seca; EE = Extrato etéreo; NDT = Nutrientes digestíveis totais; PB = Proteína bruta; FDN = Fibra em detergente neutro; ¹Estimado de acordo com as equações NRC (2007).

Os animais receberam alimentação *ad libitum*, sendo divididos em duas refeições diárias (07:00 h e 15:00 h), a fim de permitir sobras de 15% do fornecido. No momento da alimentação, um grupo de animais foi suplementado com 30 mL de meio de cultura contendo TL B13M2, outro grupo suplementado com 30 mL de meio de cultura contendo RM O166. O grupo controle recebeu o mesmo meio de cultura estéril sem fungos. Esses inóculos foram misturados a 100 g do concentrado, o que permitiu o consumo total da solução microbiana ou controle.

Os animais foram pesados após jejum sólido de 12 h no 1º dia e no 63º dia do período experimental para determinação do peso corporal médio (PC) e expressão da ingestão diária de energia (g/kg PC e em g/kg PC 0,75).

2.2.2 Consumo e digestibilidade

A ração fornecida e as sobras foram pesadas diariamente para avaliar o consumo de MS. O consumo diário de MS total foi obtido pela diferença entre a quantidade total de volumoso e concentrado fornecida e as sobras todos os dias durante todo o período de coleta. animal. No período de coleta, as amostras da ração fornecida (feno e concentrado) e das sobras foram acondicionadas em sacos plásticos rotulados e armazenadas em freezer a -20 °C. Após o descongelamento, as amostras foram pré-secas em estufa de ar forçado a 65 °C. Em seguida, estes foram moídos em um moinho de facas Wiley com uma peneira de 1 mm. Para a ração, foi feita uma amostra composta por período e

para as sobras, uma amostra composta foi formada por animal, e marcada para análises laboratoriais subsequentes.

Para as análises de digestibilidade, as fezes foram coletadas com o auxílio de sacos coletores acoplados aos animais por seis dias, três dias de adaptação e outros três dias para a coleta de fezes. O total de fezes excretadas por dia foi pesado e alíquotas de 10% de cada dia foram amostradas e misturadas para formar uma amostra composta para cada animal e armazenadas a -20 °C para posterior análise. Essas amostras foram pré-secadas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 h e moídas através de uma tela de 1 mm (moinho Wiley; A. H. Thomas, Filadélfia, PA).

2.2.3 Análise química

As concentrações médias dos componentes nutricionais dos ingredientes concentrados e da dieta experimental são apresentadas na Tabela 2 e da UDH, Tabela 1.

As amostras de fezes foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 h e moídas através de uma tela de 1 mm (moinho Wiley; A. H. Thomas, Filadélfia, PA). Os teores de matéria seca (MS, método INCT-CA G-003/1), matéria mineral (MM, método INCT-CA M-001/1), proteína bruta (CP, método INCT-CA N-001/1) e extrato etéreo (EE, método INCT-CA G-004/1) foram determinados de acordo com Detmann et al. (2012). Para as análises sequenciais da fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA), as amostras foram tratadas com alfa-amilase termoestável, sem sulfato de sódio, e corrigidas para cinzas residuais (Mertens, 2002). A correção da FDN para compostos nitrogenados e a estimativa dos compostos nitrogenados insolúveis em detergente neutro (NDIN) e ácido (ADIN) foram realizadas de acordo com Licitra et al. (1996). A lignina (método INCT-CA F-005/1) foi obtida com base na metodologia descrita por Detmann et al. (2012), com o resíduo de FDA tratado com ácido sulfúrico a 72%. O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) foi calculado de acordo com Hall (2003) com modificações, utilizando FDN corrigida para cinzas e proteínas.

Os níveis de carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados de acordo com o modelo proposto por Hall (2003), sendo: $CNF = 100 - ((\%CP - \%CPU + \%U) + \%FDN + \%EE + \%cinzas)$, onde, %CPU = teor de proteína bruta da uréia e %U = teor de uréia.

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados de acordo com Weiss (1999), utilizando-se a seguinte equação: $NDT = DCP + DNDF + DNFC + 2,25 \times DEE$. Onde: DCP = PB digestível; DNDF = FDN digestível; DNFC = NFC digerível; e DEE = EE digestível.

2.2.4 Balanço de nitrogênio, síntese de proteínas microbianas e excreção de uréia

No 20º dia de cada período experimental, aproximadamente 4 h após o fornecimento da ração matinal, foram realizadas coletas de amostras de urina isolada por meio da micção espontânea dos animais. As amostras foram filtradas através de quatro camadas de gaze e 10 mL de alíquota foram retiradas e diluídas em 40 mL de ácido sulfúrico (0,018 mol/L) e armazenadas a -20 °C. Posteriormente, foram utilizados para quantificar as concentrações de ureia, nitrogênio total, creatinina, alantoína, ácido úrico e xantina-hipoxantina.

Para a análise das concentrações de creatinina, ácido úrico e uréia nas amostras de urina, foram utilizados kits comerciais (Bioclin®) com os respectivos códigos: K016, K139 e K047. A conversão dos valores de ureia em nitrogênio ureico foi realizada multiplicando-se os valores obtidos pelo fator 0,4667.

As concentrações urinárias de alantoína e xantina-hipoxantina foram obtidas pelo método colorimétrico e enzimático, respectivamente, de acordo com as metodologias propostas por Chen e Gomes (1992), e o teor de nitrogênio total obtido pelo método de Kjeldahl (AOAC 2010).

A excreção diária de creatinina foi de 20,37 mg/kg PV, obtida no teste com cordeiros do mesmo grupo genético (Santos et al., 2021). Assim, o volume de urina foi estimado para cada animal nas diferentes dietas experimentais, dividindo-se a excreção diária de creatinina (mg/kg PB) pela concentração de creatinina (mg/L) na amostra de urina isolada, multiplicando-se o resultado pelo respectivo peso corporal do animal (kg). A excreção diária de metabólitos urinários foi obtida multiplicando-se o volume urinário estimado pela concentração de cada metabólito determinada na urina local. O balanço de nitrogênio (N retido, g/dia) foi calculado com a fórmula: $N \text{ retido} = N \text{ ingerido (g)} - N \text{ nas fezes (g)} - N \text{ na urina (g)}$.

A excreção de derivados totais de purina (PD) foi obtida pela adição das quantidades de alantoína, ácido úrico e xantina-hipoxantina, excretadas na urina. A quantidade de purinas microbianas absorvidas (mmol/dia) foi estimada a partir da excreção de derivados de purinas totais (mmol/dia), utilizando a equação proposta por Chen e Gomes (1992), para ovinos: $PD \text{ (mmol/dia)} = 0,84 \times AP + (0,150 \times BW^{0,75} \times e^{-0,25 \times AP})$, onde: PD = derivados de purinas totais (mmol/dia) e AP = purinas absorvidas (mmol dia⁻¹).

A síntese de proteína microbiana ruminal (g MP/dia) foi calculada em função das purinas absorvidas (X, mmol/dia), utilizando a equação descrita por Chen e Gomes (1992): $MP = 70 \times AP \times (0,83 \times 0,116 \times 1000)^{-1}$, onde: 70 é o teor de N das purinas (mg N/mmol); 0,83 a digestibilidade das purinas microbianas absorvidas e 0,116 é a razão entre o N da purina e o N total nas bactérias.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento 1 foi conduzido com delineamento fatorial inteiramente casualizado (4 x 2 x 4), com os seguintes fatores fixos: quatro fungos, duas enzimas e quatro tempos de fermentação com três repetições, em que cada tratamento foi constituído por uma linhagem fúngica. Os dados foram submetidos à análise de variância e as interações não significativas foram retiradas do modelo estatístico, adotando-se um nível de significância de $P < 0,05$. Utilizou-se o Procedimento Misto, tendo o período de análise como fator aleatório, no Software SAS, versão 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). A análise de regressão foi realizada utilizando-se o PROC GLM do SAS para as variáveis em função do tempo de incubação que mostrou efeito significativo para os componentes linear, quadrático ou cúbico dos contrastes polinomiais.

As médias dos fatores qualitativos foram comparadas por meio do teste de Tukey e o contraste polinomial foi utilizado para o tempo, adotando-se um nível de 5% de probabilidade para o erro Tipo I.

A análise estatística para o experimento 2 foi realizada usando o software PROC GLM do SAS, versão 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + Tri + \text{erro}$$

Onde: μ = constante geral; Tri = efeito relacionado ao tratamento ou dieta i ; ei = erro aleatório. Após a coleta de dados, estes foram agrupados e submetidos à análise de variância, em caso de diferenças significativas, foi aplicado o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 ATIVIDADES DA CARBOXIMETILCELULASE E XILANASE

As análises das enzimas produzidas por *A. terreus*, *T. longibrachiatum*, *P. kudriavzevii* e *R. mucilaginosa* mostraram interação entre o tipo de fungo e os tempos de incubação ($P < 0,001$) para a produção de açúcares específicos e redutores. Com a divisão dos resultados para os tempos de incubação, detectou-se aumento do efeito linear ($P < 0,001$) dessas variáveis para *A. terreus* e quadrático ($P < 0,001$) para *T. longibrachiatum* (Tabela 3).

A atividade das CMCase e xilanases dos quatro fungos avaliados variou significativamente ($P < 0,001$) para a redução da produção de açúcares ($\mu\text{mol/mL}$), apresentando diferenças interespecíficas. Uma interação enzimática \times tipo de fungo ($P = 0,045$) e tempo \times fungos ($P = 0,001$) também foi observada. *A. terreus* apresentou maior atividade da CMCase do que outras cepas de fungos (Tabela 3).

Na avaliação da atividade enzimática, foi detectada interação de enzimas \times isolado fúngico ($P < 0,001$), quando considerada a atividade enzimática ($\mu\text{mol/mL/min}$) da celulase e xilanase. A CMCase produzida por *A. terreus* foi a mais ativa e a atividade da xilanase foi semelhante entre os isolados de *T. longibrachiatum* e *A. terreus*. O isolado de *A. terreus* apresentou atividade enzimática máxima ($0,479 \mu\text{mol/mL/min}$) em 59,7 h de incubação, enquanto *T. longibrachiatum* apresentou um aumento na atividade enzimática em $6,7 \mu\text{mol/mL/min}$ para cada 1 h de incubação (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade enzimática específica ($\mu\text{mol/mg}$), produção de açúcares redutores ($\mu\text{mol/mL}$) e taxa de atividade enzimática ($\mu\text{mol/mL/min}$) para carboximetilcelulase e xilanase produzidas por fungos miceliais e leveduras do trato digestivo de ovinos até 96 h de fermentação in vitro com feno de *U. decumbens* como substrato

	Parede celular								SEM	Valor de p		
	<i>A. terreus</i>		<i>T. longibrachiatu</i>		<i>P. kudriavzevii</i>		<i>R. mucilaginosa</i>			Pared celular	Enzim	Hora
	CMCas	Xilanas	CMCas	Xilanas	CMCas	Xilanas	CMCas	Xilanas				
	Atividade enzimática específica (μmol/mg)											
Tempo de fermentação (h)												
24	0.00	2.11	0.00	0.00	0.00	0.21	0.34	3.83	0.50	< 0,00	0.155	0.004
48	17.20	12.03	0.73	5.39	1.80	0.28	0.53	0.52	2.27			
72	6.06	9.76	2.46	12.19	0.81	0.82	0.70	0.07	1.66			
96	7.82	3.01	1.54	13.20	0.36	0.51	0.00	0.31	1.68			
Interação	Significa								SEM	Valor de p		
E × F	7.77a	6.73a	1,18 bilhões	7.69a	0,74 bilhões	0,46 bilhões	0,39 bilhões	1,19 bilhões	1.22	0.050		
	Contraste											
T vs F	< 0.0012		< 0.0013		n.s.		n.s.		0.00	< 0,001		
	Produção de açúcares redutores (μmol/mL)								SEM	Valor de p		
Tempo de incubação (h)										Pared celular	Enzim	Hora
24	0.00	109.98	0.00	0.00	0.00	18.35	25.35	274.80	34.24	< 0,00	0.137	0.008
48	774.01	586.75	35.40	264.81	128.16	20.65	40.83	39.30	102.50			
72	350.39	563.44	139.20	553.00	49.77	47.96	39.16	4.00	83.48			
96	570.76	217.44	82.83	714.64	18.01	29.53	0.00	18.50	99.21			
Interação	Significa								SEM	Valor de p		
E × F	423.79	369.40	64.36b	383.11	48.99b	29.12b	26.34b	84.15b	63.05	0.045		
	Contraste											
T vs F	< 0,0014		< 0,0015		n.s.		n.s.		0.00	< 0,001		
	Atividade enzimática (μmol/mL/min)								SEM	Valor de p		
Tempo de incubação (h)										Pared celular	Enzim	Hora
24	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.26	0.03	< 0,00	< 0,00	0.114
48	0.29	0.80	0.01	0.36	0.03	0.02	0.01	0.03	0.10			
72	0.10	0.65	0.04	0.81	0.01	0.05	0.01	0.00	0.12			
96	0.13	0.20	0.03	0.88	0.01	0.03	0.00	0.02	0.11			
Interação	Significa								SEM	Valor de p		
E × F	0.127a	0.449a	0,020b	0.513a	0,012b	0,030b	0,007b	0,079b	0.07	< 0,001		
	Contraste											

T vs F	0.0256	0.0027	n.s.	n.s.	0.01	0.069
--------	--------	--------	------	------	------	-------

As médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas linhas diferem pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade; 1Erro padrão da média; 2Y = - 2,15 + 0,110X; 3Y = - 14,41 + 0,862X - 0,007X²; 4Y = 0,149 + 0,083X - 0,00063X²; 5Y = - 124,3 + 5,80X; 6Y = - 0,589 + 0,036X - 0,0030X²; 7Y = - 0,133 + 0,007X.

3.2 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE

Não houve diferença para consumo (P = 0,664) e digestibilidade aparente total (P = 0,376) de MS e nutrientes por cordeiros alimentados com dietas suplementadas ou não com isolados de *T. longibrachiatum* e *R. mucilaginosa* (Tabela 4).

Tabela 4. Consumo e digestibilidade aparente de nutrientes em cordeiros desmamados alimentados com dieta suplementada ou não com *T. longibrachiatum* (fungo) e *R. mucilaginosa* (levedura) do trato digestivo de ovinos

Item	Dieta			SEM1	Valor de p
	Controle	Fungo	Levedura		
	Ingestão (g/dia)				
Matéria seca	921.34	972.69	978.34	27.17	0.664
Matéria orgânica	883.02	931.73	936.64	25.97	0.671
Proteína bruta	80.64	87.13	86.10	2.42	0.525
Extrato Etéreo	27.44	29.45	29.74	0.87	0.509
NDF2	398.37	407.68	426.74	12.58	0.666
NFC3	391.12	416.22	409.04	11.30	0.670
TDN4	760.45	800.53	805.95	19.02	0.704
ME					
MJ/dia	11.09	10.38	11.42	0.07	0.424
kJ/kg PC	0.46	0.38	0.46	0.005	0.243
kJ/kg BW0.75	1.05	0.88	1.00	0.009	0.258
	Digestibilidade aparente (g/kg)				
Matéria seca	724.80	684.22	731.74	18.90	0.376
Matéria orgânica	732.47	693.66	756.43	18.57	0.399
Proteína bruta	808.20	829.54	809.58	28.61	0.431
Extrato etéreo	929.33	930.32	946.37	8.10	0.650
NDF2	597.44	531.12	621.12	28.15	0.425
NFC3	921.58	918.51	931.52	8.93	0.749
TDN4	676.13	641.42	693.76	16.30	0.439

1Erro padrão da média; 2Fibra em detergente neutro; 3Hidratos de carbono não fibrosos; 4Nutrientes digestíveis totais.

3.3 SÍNTESE DE PROTEÍNAS MICROBIANAS E BALANÇO DE NITROGÊNIO

Não foram detectadas diferenças (P > 0,05) entre as dietas para consumo de nitrogênio, excreção de nitrogênio fecal, nitrogênio urinário, nitrogênio digerido e nitrogênio retido (Tabela 5).

A síntese de proteína microbiana não foi influenciada (P > 0,05) com o uso de fungos probióticos, e houve menor eficiência de síntese de MP (P < 0,05) com a inclusão da cepa de *R. mucilaginosa* na dieta (Tabela 5).

Tabela 5 Balanço de nitrogênio, síntese e eficiência microbiana em cordeiros desmamados alimentados com dieta suplementada ou não com *T. longibrachiatum* (fungo) e *R. mucilaginosa* (levedura) do trato digestivo de ovinos

Item	Dieta			SEM1	Valor de p
	Controle	Fungo	Levedura		

Nitrogênio (g ^{dia-1})					
Ingerido	12.71	13.92	13.33	0.42	0.528
Fecal	2.34	2.33	2.42	0.04	0.510
Urina	2.88	2.27	1.91	0.31	0.454
Urina (% de N ingerido)	22.74	16.57	14.37	2.38	0.350
Azoto digerido					
g ^{dia-1}	10.37	11.57	10.88	0.42	0.553
% ingerido N	81.47	82.93	80.95	0.70	0.516
Azoto retido					
g ^{dia-1}	7.49	9.29	8.97	0.52	0.339
% ingerido N	58.72	66.36	76.24	3.42	0.106
% de N digerido	72.05	79.95	82.12	2.92	0.355
Nitrogênio microbiano (g ^{dia-1})	10.56	8.95	10.31	0.56	0.289
Eficiência microbiana (g MP ^{kg-1} NDT)	100.98a	84.15ab	78.24b	3.50	0.012

As médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas linhas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ¹Erro padrão da média.

4 DISCUSSÃO

Foi possível observar grande variabilidade entre as médias de produção de CMCase e xilanase ($\mu\text{mol/mL/mg}$) determinada pela liberação de açúcares redutores pela ação específica das enzimas. O isolado de *T. longibrachiatum* apresentou apenas 16% de atividade da CMCase quando comparado a *A. terreus*, enquanto o da xilanase foi semelhante. O tempo de fermentação com maior atividade de enzimas fibrolíticas diferiu entre os fungos filamentosos. O isolado de *A. terreus* apresentou atividade crescente com o tempo de incubação e para a linhagem de *T. longibrachiatum* com aproximadamente 62 h. Essa variação pode ser justificada pelas diferenças genéticas entre as espécies e/ou linhagens desses gêneros analisados, uma vez que os fatores ambientais, como pH inicial, tempo de cultivo, temperatura de incubação, concentração de inóculo e, principalmente, substrato foram os mesmos. Portanto, os mecanismos de controle da síntese enzimática podem variar consideravelmente entre os diferentes microrganismos devido à sua natureza inespecífica.

Os fungos do gênero *Trichoderma* são produtores de celulasas e hemicelulasas. Estudos adicionais são necessários para explicar por que o UDH pode causar uma redução na produção de celulase por *Trichoderma* sob cultivo in vitro. No entanto, esses fungos apresentaram baixo nível de atividade da enzima β -glicosidase, e essa deficiência restringe a conversão da celobiose em glicose, proporcionando inibição da atividade das celulasas pelo acúmulo de celobiose (Tiwari et al., 2013).

A menor atividade específica ($\mu\text{mol/mL/mg}$) das CMCases e xilanases das leveduras *P. kudriavzevii* e *R. mucilaginosa*, em comparação com fungos filamentosos, é justificada pelas diferentes características de desempenho no substrato. Os fungos miceliais têm vantagens sobre os microrganismos unicelulares porque suas hifas permitem que a ação física penetre no substrato e forme o celulosomo multienzimático, que é composto por um grande número de glicosilhidrolases (β -glicosidase, exoglucanase, endoglucanase e xilanase) para degradação eficiente da lignocelulose

(Liang et al., 2020). Ou seja, os fungos miceliais tornam sua ação mais eficiente, permitindo que eles entrem no substrato, aumentando a acessibilidade aos nutrientes disponíveis no conteúdo celular (Aloulou-Abdelkefi et al., 2017). A produção de CMCase e xilanases por microrganismos se estende ao uso principalmente de bactérias e fungos filamentosos, com poucos relatos sobre o uso de leveduras (Gusmão et al., 2018; Intasit et al., 2021), que são citadas para a produção de outras enzimas, como invertase (Kulshrestha et al., 2013).

O isolado de *A. terreus* apresentou maior atividade de CMCase e xilanase, com maior produção de açúcares redutores dentro do mesmo período de incubação, estimado em 60 h de crescimento fúngico. Diferentemente, o isolado de *T. longibrachiatum* produziu maiores quantidades de açúcares redutores com a ação principal da xilanase. A taxa de formação de açúcares redutores foi de 5,80 $\mu\text{mol/mL}$ para cada unidade de hora de incubação. Esse aumento linear pode estar relacionado ao aumento concomitante da atividade da CMCase, cuja exposição à hemicelulose da parede celular pode induzir a produção de xilanase. O efeito indutor da xilana na síntese de xilanase é citado por vários autores para bactérias das várias espécies de *Streptomyces* (Sanjivkumar et al., 2017; Nascimento et al., 2020), e para fungos como *Thermomyces* e *Trichoderma* (Oliveira et al., 2014; Morgan et al., 2017). As leveduras apresentaram as menores médias de atividade de CMCase e xilanase, que não diferiram ao longo do período de incubação.

O potencial de fungos do mesmo gênero estudados nesta pesquisa foi avaliado para a degradação de resíduos vegetais. Sari et al. (2017) isolaram fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Thielaviopsis* encontrados na serapilheira de *Salacca zalacca* e observaram que fungos isolados de resíduos vegetais são bons produtores de enzimas celulolíticas, o que corrobora os resultados encontrados nesta pesquisa, como o fungo do gênero *Aspergillus* foi capaz de converter o substrato em um produto de forma mais rápida e eficiente.

Em estudo realizado por Jun et al. (2013), que avaliaram a atividade da CMCase e xilanases do fungo *T. reesei* cultivado em diferentes fontes de carbono, encontraram valores de atividade de 6,58 e 4,91 $\mu\text{mol/mL}$ respectivamente. Em contraste com esses resultados, o presente estudo mostrou maiores valores para a produção de CMCase e xilanases produzidas por *T. longibrachiatum*.

A produtividade ($\mu\text{mol/mL/min}$) de CMCases e xilanases diferiu entre os fungos filamentosos. Pode ser devido ao fato de que a maioria dos fungos filamentosos possui um amplo espectro de capacidade metabólica, principalmente, degradação eficiente da celulose (Arntzen et al., 2020). *A. terreus* apresentou maior atividade com 60 h de incubação e *T. longibrachiatum* apresentou aumento linear até 96 h de incubação.

O aumento linear da produtividade com o tempo de incubação das enzimas fibrolíticas produzidas por *T. longibrachiatum*, pode ser importante na dieta de ruminantes que consomem fibras de baixa qualidade e alto tempo de retenção de fibras no rúmen. A ação das enzimas de *T. longibrachiatum* pode permanecer na fibra por mais tempo, aumentando a extensão da degradação da fibra no rúmen. Esses resultados demonstraram o potencial do uso desse fungo como aditivo microbiano na dieta de ruminantes alimentados com forrageiras tropicais e corroboram com outras pesquisas que avaliaram a inclusão de enzimas miceliais de fungos para melhorar a digestibilidade das forrageiras (Nurudeen et al., 2015; Liang et al., 2020).

As dietas suplementadas com os fungos não alteraram o consumo de MS e a digestibilidade aparente total. Embora o feno tenha sido de baixa qualidade (alto teor de FDA e lignina na fibra), possivelmente foi incluído em uma proporção na dieta, o que não influenciou o consumo de MS e a taxa de passagem. A baixa proporção entre o feno e o concentrado utilizado pode ser o principal fator na manutenção do consumo, independentemente do probiótico.

Em outro estudo, Qureshi et al. (2020) também não observaram aumento na ingestão de MS ao adicionar o probiótico à dieta creep feeding de cordeiros lactentes. Da mesma forma, Yuangklang et al., (2017) também não identificaram influência no consumo de MS em pesquisas com caprinos alimentados com palha de arroz e suplementados com enzimas fibrolíticas produzidas por *Aspergillus* spp. e *Trichoderma* spp.

Os efeitos dos aditivos microbianos na ingestão são variáveis devido à diversidade de composição dos produtos microbianos, dietas e categoria de animais estudados. No entanto, diversos fatores podem influenciar o desempenho animal ao suplementar a dieta com fungos e leveduras, dentre eles, destacam-se os fatores causadores de estresse, tipo de forragem disponível, estratégia alimentar e proporção de volumoso e concentrado presentes na dieta (Magaço et al., 2020; Martins Júnior et al., 2022).

As enzimas celulolíticas extracelulares, quando atuam no ambiente ruminal durante a fermentação, podem melhorar a atividade microbiana do rúmen. Produtos de degradação de fibras, como açúcares livres, podem ser usados como fontes de energia durante o crescimento microbiano e como substratos de fermentação (Liang et al., 2020).

No entanto, a extensão da degradação da fibra depende do número de enzimas celulolíticas com atividades ligadas à composição da fibra e sincronizadas com o tempo de retenção no rúmen. Observou-se que a linhagem *T. longibrachiatum* apresentou menor atividade de CMCase em comparação com a xilanase no meio de cultura com UDH. Por outro lado, o UDH apresentou maior teor de celulose do que a hemicelulose.

Em relação à extensão da degradação da fibra, ela pode ser reduzida se a taxa de passagem pelo rúmen exceder sua taxa de degradação (Siqueira et al., 2017). No entanto, no presente estudo, as alterações no consumo e na digestibilidade não foram significativas com o uso de probióticos, possivelmente porque a alta proporção de concentrado e o menor teor de FDN do volumoso nas dietas promoveram um aumento na taxa de passagem (Stensig e Robinson, 1997), excedendo o tempo necessário para prolongar a degradação da fibra no rúmen.

A inclusão de amido na dieta e a taxa de passagem mais rápida com alta ingestão de MS podem diminuir a degradabilidade no rúmen (Firkins, 2021). Além disso, a fonte de amido ou fibra solúvel que é altamente degradável ainda pode induzir acidose em ovelhas (Lettat et al., 2010). O rúmen precisa processar a forragem para manter o enchimento ruminal suficiente para evitar a acidose ruminal subaguda. No entanto, o excesso de preenchimento ruminal limita a ingestão de DM. Para melhorar qualquer tipo de eficiência ruminal para a digestibilidade da FDN são necessárias mudanças dietéticas ou outras mudanças gerenciais. No entanto, houve um aumento numérico no consumo de MS com o uso de ambos os aditivos microbianos, mas os valores numéricos de digestibilidade da FDN e NDT foram maiores para a suplementação com a levedura do que para o fungo filamentoso. Isso pode ser explicado pelo fato de *R. mucilaginosa* exibir ação da CMCase dentro de 24 h após a incubação.

A depressão da NDT pelo aumento do nível de consumo é assumida principalmente quando a FDN digestível é descontada. Este efeito foi diminuído consideravelmente desde então, em grande parte pela diluição do amido com fibra de subproduto (mais digerível) (Firkins, 2021). No entanto, no presente estudo, esses pequenos aumentos observados com *R. mucilaginosa* podem resultar da atuação das enzimas fibrolíticas mais precocemente durante seu crescimento, além de possíveis contribuições benéficas na digestibilidade dos nutrientes, produção de ácidos graxos voláteis (AGV), estrutura da comunidade microbiana ruminal e pH ruminal (Liang et al., 2020). A regulação da levedura nos microrganismos ruminais se reflete no aumento das bactérias degradadoras de fibras e utilizadoras de lactato, o que melhora ainda mais a eficiência da fermentação ruminal e a subsequente capacidade de produção (Martins Júnior et al., 2022; Wang et al., 2022).

Além disso, a suplementação de fungos pode aumentar o crescimento bacteriano, a produção de proteína microbiana e a digestibilidade da matéria seca, resultando na produção de vários tipos de enzimas fibrolíticas para quebrar a estrutura das lignoceluloses e aumentar a digestibilidade dos nutrientes (Liang et al., 2020).

No entanto, a suplementação com *T. longibrachiatum* apresentou menor valor numérico para a digestibilidade da FDN, possivelmente devido à taxa de passagem mais rápida na dieta com 24,7% de

FDN da forragem (Azevêdo et al., 2024), possivelmente porque a atividade da CMCase de *T. longibrachiatum* só aparece após 24 h de incubação.

O nitrogênio urinário e retido não diferiu entre as dietas com o uso de *T. longibrachiatum* e *R. mucilaginosa*. A perda de nitrogênio na urina acaba não sendo viável em sistemas sustentáveis.

Ainda, Bueno et al. (2013), avaliando a adição de *S. cerevisiae* em dietas para cordeiros com proporções de volumoso e concentrado de 20:80 e 40:60, não relataram diferenças significativas na quantidade de nitrogênio retido. Embora as dietas não tenham influenciado a quantidade de nitrogênio retido na dieta, houve alterações na eficiência microbiana ruminal onde a dieta suplementada com *T. longibrachiatum* foi maior do que a dieta com *R. mucilaginosa*, que foi menor do que a dieta controle.

O aumento da degradação e, conseqüentemente, maior fermentação não resulta necessariamente em maior síntese e/ou eficiência microbiana no rúmen. As bactérias ruminais têm uma relação inversa entre as taxas de crescimento e fermentação (degradação do substrato) (Schären et al., 2018). O aumento da eficiência do crescimento direciona uma proporção maior de carbono anabólico da ração degradada para as células, em vez de VFA (Russell e Cook, 1995). Os processos catabólicos são em grande parte da fermentação de açúcares e aminoácidos em VFA (ou intermediários de ácidos orgânicos, especialmente lactato e succinato) para produzir trifosfato de adenosina (ATP) enquanto descarta equivalentes redutores. Além disso, Russell et al. (1992) afirmou que o aumento do amido aumentaria a proporção de ATP usado para manutenção e, portanto, diminuiria a eficiência da síntese de proteínas microbianas (EMPS). O ATP produzido durante a fermentação pode ser convertido de forma menos eficiente em matéria celular e, portanto, é mais provável que seja desperdiçado (Firkins, 2021). Os resultados da eficiência microbiana não são coerentes com os resultados da ingestão de MO digestível calculados a partir dos valores da Tabela 4. Houve muitos relatos publicados de um aumento da EMPS resultante da diminuição da degradabilidade da MO ruminal sem uma diminuição no fluxo de proteína microbiana do rúmen. A taxa de passagem mais rápida pode diminuir a degradabilidade no rúmen, mas a passagem de FDN não degradada para o duodeno pode ser um veículo importante para exportar o fluxo microbiano de N porque cerca de 75% das bactérias aderem às partículas (Sauvant e Nozière, 2016). Em contraste, os efeitos associativos negativos (ou seja, aumentar a inclusão de amido na dieta diminui a digestibilidade da FDN com alto consumo de matéria seca (CMS) dependem de variáveis dietéticas e também diferem entre os animais, pelo menos em parte, devido às suas estruturas únicas de comunidade microbiana (Firkins, 2021).

No entanto, o uso da levedura *R. mucilaginosa* reduziu a eficiência microbiana e o consumo de MO digestível calculado foi 8,6% maior do que as demais dietas. Dois aspectos que podem explicar esses resultados, primeiro, seriam a estabilidade do pH fornecida pela levedura, que pode ajudar a

aumentar a resiliência contra a acidose ruminal subaguda (Ishaq et al., 2017; McCann et al., 2017). Huws et al. (2018) observaram que animais eficientes tinham menos diversidade bacteriana ruminal. De forma negativa, a menor diversidade bacteriana pode estar associada à acidose ruminal. Em segundo lugar, seria o anabolismo e o catabolismo indefinidos que às vezes levam à perda de oportunidades de obter melhorias no EMPS. Por exemplo, aumentar o amido na dieta normalmente aumenta o fluxo de proteína microbiana para o duodeno, ao mesmo tempo em que aumenta a MO ruminal ou a degradabilidade de carboidratos (Firkins, 2021). Consistentemente, os resultados demonstraram o princípio de que, enquanto o fluxo de proteína microbiana aumenta, o EMPS diminui porque o ganho de EMPS foi menor do que poderia ter sido (Hespell, 1979; Russell, 2007).

De acordo com Firkins (2021), o NDT não deve ser usado para derivação, pois o aumento do CMS diminui a degradabilidade da FDN e do amido ao aumentar a taxa de passagem (ou seja, maior passagem de FDN e amido potencialmente degradáveis); em contraste, o aumento da degradabilidade ruminal da FDN pela alimentação de forragens ou coprodutos de maior qualidade permite maior CMS em uma base igual de FDN. O UDH que é mais degradável quando associado a probióticos pode ser menos resistente à redução do tamanho das partículas e pode reduzir a saciedade e a limitação da ingestão, melhorando assim o ganho de peso, como observado por Magaço et al. (2020) e Martins Júnior et al. (2022).

Assim, a dieta com o fungo *T. longibrachiatum*, mesmo favorecendo a degradação da fibra, não diferiu da dieta sem aditivo microbiano, possivelmente a quantidade de fungo utilizada não foi suficiente para provocar essa resposta. Além disso, o concentrado fornecido em maior proporção foi eficaz na manutenção da eficiência da síntese de proteínas microbianas no rúmen. A taxa de crescimento dos fungos é mais lenta quando comparada a outros microrganismos do rúmen, que utilizam carboidratos solúveis.

A eficiência do metabolismo do nitrogênio em ruminantes depende da complexa interação de vários nutrientes e energia. O nitrogênio só é usado de forma eficiente para a síntese microbiana quando a dieta fornece um equilíbrio entre a utilização de energia e proteína. Bactérias, fungos e protozoários são essenciais para estender a digestão das fibras, o que mantém o suprimento de substrato para o crescimento microbiano no rúmen (Castillo-González et al., 2014; Hackmann e Firkins, 2015). No entanto, estimular seu crescimento reduz a necessidade de usar o excesso de proteína porque a proporção de nitrogênio ligado à fibra e nitrogênio reciclado no rúmen pode ser aumentada (Jin et al., 2018).

5 CONCLUSÃO

A produção de CMCase e xilanase por *T. longibrachiatum*, *A. terreus*, *R. mucilaginosa* e suas aplicações na hidrólise de material lignocelulósico são promissoras para a elaboração de um probiótico ou microbianos de alimentação direta. *T. longibrachiatum* apresenta aumento da atividade da CMCase e da xilanase durante o tempo de incubação de 96 h, o que pode ser uma característica importante que atua na extensão da degradação da fibra de baixa qualidade no rúmen. Por outro lado, *R. mucilaginosa* apresenta atividade de CMCase e xilanase em 24 h de incubação, podendo ser utilizada para suplementar dietas com alta proporção de concentrado e fibra de baixa qualidade da forragem. Pesquisas futuras devem avaliar como esses aditivos parecem alimentar o comportamento com base em seu papel específico na estrutura da comunidade microbiana e EMPS. Além disso, recomendam-se ensaios utilizando dieta com maior quantidade de inóculo e proporção de forragem com alto teor de parede celular lignificada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, M.; SAMI, A.; SULIMAN, G.; ABUDABOS, A. Growth performance and economic efficiency of fattening Naimi lambs on unconventional ration enhanced with enzyme cocktail. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, [s. l.], v. 53, p. 467-471, 2016.
- ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; FREITAS, C. E. S.; VIEIRA, E. A.; GERASEEV, L. C.; SILVA-HUGHES, A. F.; ROSA, C. A. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. *Current Microbiology*, [s. l.], v. 69, p. 649-659, 2014.
- ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; PESSOA, M. S.; SANTOS, V. L.; FREITAS JÚNIOR, L. F.; BARROS, K. O.; HUGHES, A. F. S.; SILVA, T. D.; RODRIGUEZ, N. M. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. *PLOS ONE*, [s. l.], v. 12, e0183628, 2017.
- ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; PESSOA, M. S.; SANTOS, V. L.; GONÇALVES, D. B.; LIMA, S. S.; SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M. *Aspergillus* spp. isolated from the bovine gastrointestinal tract improve organic acid profiles in *Urochloa decumbens* fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, [s. l.], v. 42, 102360, 2022.
- ALMEIDA, P. N. M.; FREITAS, C. E. S.; ABRÃO, F. O.; RIBEIRO, I. C. O.; VIEIRA, E. A.; GERASEEV, L. C.; DUARTE, E. R. Cellulolytic activity of aerobic fungi isolated from dairy cattle fed with forage tropical. *Revista Caatinga*, [s. l.], v. 27, p. 202-207, 2014.
- ALOULOU-ABDELKEFI, M.; TRIGUI-LAHIANI, H.; GARGOURI, A. Autoclaved mycelium induces efficiently the production of hydrolytic enzymes for protoplast preparation of autologous fungus. *Applied Biochemistry and Microbiology*, [s. l.], v. 5, p. 230-236, 2017.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST, a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, [s. l.], v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AOAC. Official methods of analysis. 19. ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists, 2010.
- ARNTZEN, M. Ø.; BENTSSON, O.; VÁRNAI, A.; DELOGU, F.; MATHIESEN, G.; EIJSINK, V. G. H. Quantitative comparison of the biomass-degrading enzyme repertoires of five filamentous fungi. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 10, 20267, 2020.
- AZEVEDO, J. A. G.; PEREIRA, M. I. B.; SOUZA, L. L.; MENEZES, G. L.; CARVALHO, G. G. P.; PEREIRA, E. S.; TEIXEIRA, I. A. M. A.; SANTOS, S. A.; PEREIRA, M. L. A.; ARAÚJO, G. G. L.; CÂNDIDO, M. J. D.; BEZERRA, L. R.; PEREIRA FILHO, J. M.; LIMA JÚNIOR, D. M.; URBANO, S. A.; FERREIRA, M. A.; ALBA, H. D. R. Predição do consumo de matéria seca para caprinos e ovinos. In: PEREIRA, E. S.; TEIXEIRA, I. A. M. A.; AZEVEDO, J. A. G.; SANTOS, S. A. (Eds.). *Exigências nutricionais de caprinos e ovinos – BR-Caprinos & Ovinos*. São Carlos: Editora Scienza, 2024.

BUENO, M. S.; WATANABE, M. H. T.; ISSAKOWICZ, J.; SAMPAIO, A. C. K. Active yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation improves digestibility of lamb diet. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, [s. l.], v. 2, p. 21-26, 2013.

CASTILLO-GONZÁLEZ, A. R.; BURROLA-BARRAZA, M. E.; DOMÍNGUEZ-VIVEROS, J.; CHÁVEZ-MARTÍNEZ, A. Rumen microorganisms and fermentation. *Archivos de Medicina Veterinaria*, [s. l.], v. 46, p. 349-361, 2014.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An overview of technical details. In: *International Feed Research Unit*. Bucksburn: Rowett Research Institute, 1992. p. 1-21.

COLLIER, C. T.; CARROLL, J. A.; CALLAWAY, T. R.; ARTHINGTON, J. D. Oral administration of citrus pulp reduces gastrointestinal recovery of orally dosed *Escherichia coli* F18 in weaned pigs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, [s. l.], v. 9, p. 2140-2145, 2010.

DAGAR, S. S.; KUMAR, S.; MUDGIL, P.; SINGH, R.; PUNIYA, A. K. D1/D2 domain of large-subunit ribosomal DNA for differentiation of *Orpinomyces* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], v. 77, p. 6722-6725, 2011.

DETMANN, E.; SOUZA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C.; QUEIROZ, A. C.; BERCHIELLI, T. T.; SALIBA, E. O. S.; CABRAL, L. S.; PINA, D. S.; LADEIRA, M. M.; AZEVÊDO, J. A. G. Métodos para análises de alimentos. 1. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012.

DÍAZ, A.; RANILLA, M. J.; GIRALDO, L. A.; TEJIDO, M. L.; CARRO, M. D. Treatment of tropical forages with exogenous fibrolytic enzymes: Effects on chemical composition and in vitro rumen fermentation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, [s. l.], v. 99, p. 345-355, 2014.

EICHER, S. D.; MCKEE, C. A.; CARROLL, J. A.; PAJOR, E. A. Supplemental vitamin C and yeast cell wall β -glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning. *Journal of Animal Science*, [s. l.], v. 84, p. 2352-2360, 2006.

ELGHANDOUR, M. M. Y.; SALEM, A. Z. M.; 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*, [s. l.], v. 14, p. 526-533, 2015.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, [s. l.], v. 59, p. 257-268, 1987.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], v. 61, p. 1323-1330, 1995.

GONÇALVES, C.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, [s. l.], v. 2, p. 2046-2048, 2010.

GUSMÃO, R. O.; ASSIS, F. G. V.; CRUZ, A. R.; SOLIDADE, L. S.; FERREIRA, L. F. A. A.; LEAL, P. L. Filamentous fungi producing enzymes under fermentation in cassava liquid waste. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, [s. l.], v. 40, e41512, 2018.

HACKMANN, T. J.; FIRKINS, J. L. Maximizing efficiency of rumen microbial protein production. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 6, 465, 2015.

HALL, M. B. Challenges with non-fiber carbohydrate methods. *Journal of Animal Science*, [s. l.], v. 81, p. 3226-3232, 2003.

HAN, G.; GAO, X.; DUAN, J.; ZHANG, H.; ZHENG, Y.; HE, J.; HUO, N.; PEI, C.; LI, H.; GU, S. Effects of yeasts on rumen bacterial flora, abnormal metabolites, and blood gas in sheep with induced subacute ruminal acidosis. *Animal Feed Science and Technology*, [s. l.], v. 280, 115042, 2021.

HESPELL, R. B. Efficiency of growth by ruminal bacteria. *Federation Proceedings*, [s. l.], v. 38, p. 2707-2711, 1979.

HUWS, S. A.; CREEVEY, C. J.; OYAMA, L. B.; MIZRAHI, I.; DENMAN, S. E.; POPOVA, M.; MUÑOZ-TAMAYO, R.; FORANO, E. et al. Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: Past, present, and future. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 9, 2161, 2018.

INTASIT, R.; CHEIRSILP, B.; SUYOTHA, W.; BOONSAWANG, P. Synergistic production of highly active enzymatic cocktails from lignocellulosic palm wastes by sequential solid state-submerged fermentation and co-cultivation of different filamentous fungi. *Biochemical Engineering Journal*, [s. l.], v. 173, 108086, 2021.

ISHAQ, S. L.; ALZAHAL, O.; WALKER, N.; MCBRIDE, B. An investigation into rumen fungal and protozoal diversity in three rumen fractions, during high-fiber or grain-induced sub-acute ruminal acidosis conditions, with or without active dry yeast supplementation. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 8, 1943, 2017.

JIN, D.; ZHAO, S.; ZHENG, N.; BECKERS, Y.; WANG, J. Urea metabolism and regulation by rumen bacterial urease in ruminants – A review. *Annals of Animal Science*, [s. l.], v. 18, p. 303-318, 2018.

JUN, H.; GUANGYE, H.; DAIWEN, C. Insights into enzyme secretion by filamentous fungi: Comparative proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown on different carbon sources. *Journal of Proteomics*, [s. l.], v. 89, p. 191-201, 2013.

KULSHRESTHA, S.; TYAGI, P.; SINDHI, V.; YADAVILLI, K. S. Invertase and its applications – A brief review. *Journal of Pharmacy Research*, [s. l.], v. 7, p. 792-797, 2013.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds.). *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2011.

LETTAT, A.; NOZIÈRE, P.; SILBERBERG, M.; MORGAVI, D. P.; BERGER, C.; MARTIN, C. Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep. *Journal of Animal Science*, [s. l.], v. 88, p. 3041–3046, 2010.

LIANG, J.; NABI, M.; ZHANG, P.; ZHANG, G.; CAI, Y.; WANG, Q.; ZHOU, Z.; DING, Y. Promising biological conversion of lignocellulosic biomass to renewable energy with rumen microorganisms: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, [s. l.], v. 134, 110335, 2020.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology*, [s. l.], v. 57, p. 347-358, 1996.

LIU, K.; ZHANG, Y.; YU, Z.; XU, Q.; ZHENG, N.; ZHAO, S.; HUANG, G.; WANG, J. Ruminant microbiota-host interaction and its effect on nutrient metabolism. *Animal Nutrition*, [s. l.], v. 7, p. 49-55, 2021.

LÓPEZ-AGUIRRE, D.; HERNÁNDEZ-MELÉNDEZ, J.; ROJO, R.; SÁNCHEZ-DÁVILA, F.; LÓPEZ-VILLALOBOS, N.; SALEM, A. -F. Z. M.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J. C.; VÁZQUEZ-ARMIJO, J. F.; RUÍZ, S. Effects of exogenous enzymes and application method on nutrient intake, digestibility and growth performance of Pelibuey lambs. *SpringerPlus*, [s. l.], v. 5, 1399, 2016.

MAGaço, F. S.; FREITAS, C. E. S.; FREITAS, A. A. M.; MARTINS JÚNIOR, V. S.; SANTOS, A. F. F.; PEREIRA, M. L. A.; DUARTE, M. L. A.; DUARTE, E. R. Productive performance and economic profitability of weaned lambs supplemented with a *Trichoderma longibrachiatum* strain isolated from sheep. *International Journal of Animal Science*, [s. l.], v. 4, p. 1-6, 2020.

MANI, S.; AIYEGORO, O. A.; ADELEKE, M. A. Characterization of rumen microbiota of two sheep breeds supplemented with direct-fed lactic acid bacteria. *Frontiers in Veterinary Science*, [s. l.], v. 7, 570074, 2021.

MARTÍNEZ-VAZ, B. M.; FINK, R. C.; DIEZ-GONZALEZ, F.; SADOWSKY, M. J. Enteric pathogen-plant interactions: Molecular connections leading to colonization and growth and implications for food safety. *Microbes and Environments*, [s. l.], v. 29, p. 123-135, 2014.

MARTINS JÚNIOR, V. S.; FREITAS, C. E. S.; SANTOS, A. F. F.; SANTOS, L. F. X.; GERASEEV, L. C.; DUARTE, E. R.; SOARES, L.; MAGaço, F. S.; PEREIRA, M. L. A. Desempenho de cordeiros desmamados alimentados com dieta contendo levedura autóctone do ambiente ruminal. *Ensaio e Ciências*, [s. l.], v. 26, p. 274-278, 2022.

MCCANN, J. C.; ELOLIMY, A. A.; LOOR, J. J. Rumen microbiome, probiotics, and fermentation additives. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, [s. l.], v. 33, p. 539-553, 2017.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, [s. l.], v. 85, p. 1217-1224, 2002.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, [s. l.], v. 31, p. 426-428, 1959.

MOHAMED, D. E. D. A.; BORHAMI, B. E.; EL-SHAZLY, K. A.; SALLAM, S. M. A. Effect of dietary supplementation with fibrolytic enzymes on the productive performance of early lactating dairy cows. *Journal of Agricultural Science*, [s. l.], v. 5, p. 146-155, 2013.

MORGAN, N. K.; WALLACE, A.; BEDFORD, M. R.; CHOCT, M. Efficiency of xylanases from families 10 and 11 in production of xylo-oligosaccharides from wheat arabinoxylans. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], v. 167, p. 290-296, 2017.

NASCIMENTO, R. P.; REIS, A. D.; GÍRIO, F.; PEREIRA JÚNIOR, N.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. A thermotolerant xylan-degrading enzyme is produced by *Streptomyces malaysiensis* AMT-3 using by-products from the food industry. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, [s. l.], v. 63, e20190243, 2020.

NRC. Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and New World camelids. 7. ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 2007.

NEUHAUSER, S.; HUBER, L.; KIRCHMAIR, M. A. DNA-based method to detect the grapevine root-rotting fungus *Roesleria subterranea* in soil and root samples. *Phytopathologia Mediterranea*, [s. l.], v. 48, p. 59-72, 2009.

NURUDEEN, O. O.; ADETAYO, O. M.; BOLANLE, A. S.; OLALUNDE, O. A.-L. Cellulase and biomass production from sorghum (*Sorghum guineense*) waste by *Trichoderma longibrachiatum* and *Aspergillus terreus*. *Journal of Microbiology Research*, [s. l.], v. 5, p. 169-174, 2015.

OLIVEIRA, M. M. Q.; GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; FRANCO-CIRIGLIANO, M. N.; NASCIMENTO, R. P.; BON, E. P. S.; COELHO, R. R. R. *Trichoderma atroviride* 102C1 mutant: A high endoxylanase producer for assisting lignocellulosic material degradation. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, [s. l.], v. 6, p. 236-241, 2014.

QURESHI, S. T.; FIAZ, M.; KHAN, M. I.; ISHAQ, K.; AHMAD, T.; SHAKEEL, M.; YAQOOB, M.; ASLAM, M.; JO, I. H. Effect of probiotic supplementation and varying dietary protein levels in creep feed on growth performance of Salt Range lambs. *Pakistan Journal of Science*, [s. l.], v. 72, p. 198-202, 2020.

RUSSELL, J. B. The energy spilling reactions of bacteria and other organisms. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, [s. l.], v. 13, p. 1-11, 2007.

RUSSELL, J. B.; COOK, G. M. Energetics of bacterial growth: Balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiological Reviews*, [s. l.], v. 59, p. 48-62, 1995.

RUSSELL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; SNIFFEN, C. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*, [s. l.], v. 70, p. 3551-3561, 1992.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J. B.; VARGA, J.; KOCSUBÉ, S.; SZIGETI, G.; YAGUCHI, T.; FRISVAD, J. C. Phylogeny, identification, and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, [s. l.], v. 78, p. 141-173, 2014.

SANJIVKUMAR, M.; SILAMBARASAN, T.; PALAVESAM, A.; IMMANUEL, G. Biosynthesis, purification and characterization of β -1,4-xylanase from a novel mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3) and its applications. *Protein Expression and Purification*, [s. l.], v. 130, p. 1-12, 2017.

SANTOS, J. R. A.; PEREIRA, M. L. A.; PEREIRA, T. C. J.; SILVA, H. G. O.; SANTOS, O. O.; CARVALHO, G. G. P.; ALMEIDA, J. R. F. A.; SILVA, R. P.; RIBAS, K. P. O. Supplementation with mesquite alkaloids extract in diets for lambs fed Bermuda grass improves growth performance. *Small Ruminant Research*, [s. l.], v. 205, 106560, 2021.

SARI, S. L. A.; SETYANINGSIH, R.; WIBOWO, N. F. A. Isolation and screening of cellulolytic fungi from *Salacca zalacca* leaf litter. *Biodiversitas*, [s. l.], v. 18, p. 1282-1288, 2017.

SAUVANT, D.; NOZIÈRE, P. Quantification of the main digestive processes in ruminants: The equations involved in the renewed energy and protein feed evaluation systems. *Animal*, [s. l.], v. 10, p. 755-770, 2016.

SCHÄREN, M.; FRAHM, J.; KERSTEN, S.; MEYER, U.; HUMMEL, J.; BREVES, G.; DÄNICKE, S. Interrelations between the rumen microbiota and production, behavioral, rumen fermentation, metabolic, and immunological attributes of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, [s. l.], v. 101, p. 4615-4637, 2018.

SIQUEIRA, J. G. W.; TEIXEIRA, N. A.; VANDENBERGHE, L. P. S.; OLIVEIRA, P. Z.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUES, C. Update and revalidation of Ghose's cellulase assay methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, [s. l.], v. 191, p. 1271-1279, 2020.

SIQUEIRA, M. C. B.; FERREIRA, M. A.; MONNERAT, J. P. I. S.; SILVA, J. L.; COSTA, C. T. F.; CONCEIÇÃO, M. G.; ANDRADE, R. P. X.; BARROS, L. J. A.; MELO, T. T. B. Optimizing the use of spineless cactus in the diets of cattle: Total and partial digestibility, fiber dynamics and ruminal parameters. *Animal Feed Science and Technology*, [s. l.], v. 226, p. 56-64, 2017.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA re-association and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, [s. l.], v. 44, p. 846-849, 1994.

STENSIG, T.; ROBINSON, P. H. Digestion and passage kinetics of forage fiber in dairy cows as affected by fiber-free concentrate in the diet. *Journal of Dairy Science*, [s. l.], v. 80, p. 1339-1352, 1997.

TIWARI, P.; MISRA, B. N.; SANGWAN, N. S. β -Glucosidases from the fungus *Trichoderma*: An efficient cellulase machinery in biotechnological applications. *BioMed Research International*, [s. l.], 2013, 203735, 2013.

UYENO, Y.; SHIGEMORI, S.; SHIMOSATO, T. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes and Environments*, [s. l.], v. 30, p. 126-132, 2015.

VALLEJO, L. H.; SALEM, A. Z. M.; CAMACHO, L. M.; et al. Effects of xylanase supplementation on feed intake, digestibility and ruminal fermentation in Rambouillet sheep. *Journal of Agricultural Science*, [s. l.], v. 154, p. 1110-1117, 2016.

WANG, Y.; LI, Z.; JIN, W.; MAO, S. Isolation and characterization of ruminal yeast strain with probiotic potential and its effects on growth performance, nutrients digestibility, rumen fermentation and microbiota of Hu sheep. *Journal of Fungi*, [s. l.], v. 8, 1260, 2022.

WEISS, W. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Ithaca: Cornell University, 1999. p. 176-185.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: A guide to methods and applications. California: Academic Press Inc., 1990. p. 315-322.

YAMAMOTO, S.; NAKANO, M.; KITAGAWA, W.; TANAKA, M.; SONE, T.; HIRAI, K.; ASANO, K. Characterization of multi-antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from beef cattle in Japan. *Microbes and Environments*, [s. l.], v. 29, p. 136-144, 2014.

YUANGKHLANG, C.; SHONEWILLE, J. TH.; ALHAIDARY, A.; VASUPEN, K.; BUREENOK, S.; SEANMAHAYAK, B.; WONGSUTHAVAS, S.; BEYNEN, A. C. Growth performance and macronutrient digestion in goats fed a rice straw-based ration supplemented with fibrolytic enzymes. *Small Ruminant Research*, [s. l.], v. 154, p. 20-22, 2017.