

INCLUSÃO DO SUBSTRATO DE SHIMEJI-PRETO NA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO *IN VITRO* DO FENO DE *Brachiaria brizantha*¹

RICARDO DA SILVA OLIVEIRA^{2*}, SERGIO LUCIO SALOMON CABRAL FILHO², JOSÉ FRANLIN ATHAYDE OLIVEIRA²,
ROBERTO GUIMARÃES JÚNIOR³

¹Recebido para publicação em 24/06/13. Aceito para publicação em 25/05/15.

²Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF.

³EMBRAPA Cerrado, Laboratório de Nutrição Animal, Planaltina, DF.

*Autor correspondente: rbioferio@gmail.com

RESUMO: O objetivo desse trabalho foi estudar a inclusão do substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus* na fermentação *in vitro* de dietas a base de feno de *Brachiaria brizantha*. O experimento foi realizado utilizando a técnica de produção de gases semi-automática, e o inóculo ruminal foi colhido de três bovinos fistulados mantidos em pasto de *Brachiaria brizantha*. Foi utilizado feno de *Brachiaria brizantha* e substrato exaurido da produção de *Pleurotus* para composição das dietas: SE (100% substrato exaurido), FB (100% feno de *Brachiaria brizantha*), SE5 (5% SE + 95% FB), SE20 (20% SE + 80%FB) e SE30 (30% SE + 70% FB). O experimento foi conduzido em fatorial 5x3 com cinco tratamentos e três inóculos ruminal. A cinética de degradação da matéria seca foi determinada após 96 horas de fermentação [D (96h)]. Não houve diferenças significativas para o volume acumulado de gases (A) para as dietas FB (262,6 mL/g MS), SE5 (284,3 mL/g MS), SE20 (256,6 mL/g MS) e SE30 (261,7 mL/g MS), indicando que a inclusão do substrato não afetou a fermentação do feno. A dieta SE apresentou menor volume de gás e menor degradabilidade com valores de 165,9 mL e 52%, respectivamente, indicando menor valor nutricional desse substrato em relação ao feno de *Brachiaria brizantha*, provavelmente pela ação de enzimas que degradam carboidratos estruturais presentes nos micélios do *Pleurotus*. A dieta SE apresentou menor tempo de colonização (L=2,6 h; P<0,05), o que pode ser atribuído a uma interação entre o micélio e o substrato, facilitando a sua colonização inicial. A inclusão do substrato exaurido não resultou em ganhos no crescimento e degradação microbiana em relação à dieta FB, entretanto parece ter favorecido a colonização inicial desse substrato. A utilização do SE não afeta negativamente a colonização, e a princípio pode ser utilizada como ingrediente em dietas de ruminantes.

Palavras-chave: cinética ruminal, coprodutos, degradabilidade, micélio, *Pleurotus ostreatus* produção de gás *in vitro*.

EFFECT OF INCLUSION OF OYSTER MUSHROOM SUBSTRATE ON THE *IN VITRO* FERMENTATION KINETICS OF *Brachiaria brizantha* HAY

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of inclusion of exhausted substrate of *Pleurotus ostreatus* on the *in vitro* fermentation of *Brachiaria brizantha* hay-based diets. The experiment was conducted using the semi-automated gas production technique. The ruminal inoculum was collected from three fistulated cattle kept on *Brachiaria brizantha* pasture. *Brachiaria brizantha* hay and exhausted substrate of *Pleurotus* production were used for composition of the diets: ES (100% exhausted substrate), BH (100% *Brachiaria brizantha* hay), ES5 (5% ES + 95% BH), ES20 (20% ES + 80% BH), and ES30 (30% ES + 70% BH). The experimental design was a 5x3 factorial scheme consisting of five treatments and three ruminal inocula. The degradation kinetics of dry matter (DM) was determined after 96 hours of fermentation [D (96h)]. No significant differences in the cumulative volume of gas (A) were observed between BH (262.6 mL/g DM), ES5 (284.3 mL/g MS), ES20 (256.6 mL/g MS) and ES30 (261.7 mL/g MS), indicating that inclusion of the substrate did not affect hay fermentation. A lower gas volume (165.9 mL) and lower degradability (52%) were observed for the ES diet, showing a lower nutritional value of this substrate compared to *Brachiaria*

brizantha hay, probably due to the action of enzymes that degrade structural carbohydrates found in the mycelia of *Pleurotus*. The ES diet exhibited a shorter colonization time ($L=2.6$ h; $P<0.05$), a finding that may be attributed to the interaction between the mycelium and substrate, facilitating initial colonization. The inclusion of exhausted substrate did not increase microbial growth or degradation compared to the BH diet, but seems to have favored initial colonization of this substrate. The use of ES does not negatively affect colonization and may be used as an ingredient of ruminant diets.

Keywords: ruminal kinetics, co-products, degradability, mycelium, *Pleurotus ostreatus*, *in vitro* gas production.

INTRODUÇÃO

A produção de cogumelos no Brasil ainda é muito pequena em relação a outros países, mas com potencial para a utilização do substrato exaurido (subproduto), pois para cada 800 kg de cogumelo *in natura* produzido são necessários 1000 kg de substrato.

A técnica mais nova de produção de cogumelos é a “Jun Cao”, que em português significa “capim no saco”, na qual o tempo de produção é reduzido para 60 a 90 dias (CHANG e MILES, 2004). A formulação do substrato é à base de 78% de capim braquiária, 20% de farelo de trigo e 2% de gesso, onde irá desenvolver a frutificação que é a parte comestível de interesse comercial do cogumelo.

A utilização do substrato exaurido da produção de cogumelos na alimentação de ruminantes pode ser uma opção interessante para propriedades produtoras de cogumelos que utilizam esse tipo de tecnologia (Jun Cao) e possuem rebanho de bovinos, ovinos ou caprinos. Entretanto, a utilização desse substrato tem sido questionada pelos produtores de cogumelo que não possuem conhecimentos sobre os efeitos desse substrato rico em micélios sobre os microrganismos do rúmen.

Outro ponto importante seria a capacidade dos basidiomicetos de degradar a matéria orgânica. Segundo PLATT *et al.* (1984), alguns *Pleurotus* possuem entre outras enzimas a celulase, celobiase, hemicelulase, ligninase e a lacase, podendo disponibilizar a matéria orgânica para colonização das bactérias ruminais.

A utilização de fungos como aditivos ainda não é um processo conhecido na alimentação de ruminantes. Alguns estudos no Brasil que utilizaram coprodutos da produção de ácido cítrico, ricos em micélio, em níveis de 5% da matéria seca, em dietas de bovinos confinados (GONÇALVES *et al.*, 2014), não encontraram diferenças de ganho de peso de animais que não receberam o fungo com ganhos dentro dos padrões esperados para novilhas em terminação. A inclusão de micélio de fungos comestíveis nas

dietas de ruminantes poderá vir a contribuir com algum benefício em termos de desenvolvimento dos microrganismos do rúmen.

A técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases (MAURICIO *et al.*, 1999) apresenta comprovado potencial em descrever a cinética da fermentação no rúmen, fornecer a taxa e a extensão da degradação das forrageiras (GETACHEW *et al.*, 1998), bem como medir produtos da fermentação de partes solúveis e insolúveis de substratos (PELL e SCHOFIELD, 1993).

O objetivo desse trabalho foi estudar a inclusão do substrato de *Pleurotus ostreatus* (shimeji-preto) no perfil fermentativo e cinética de degradação de dietas a base de feno de *Brachiaria brizantha*, por meio de técnica de produção de gases *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição animal da Fazenda Água Limpa, de propriedade da Universidade de Brasília (UnB), em junho de 2009. Utilizou-se a metodologia da técnica semi-automática de produção de gases (THEODOROU *et al.*, 1994).

Foram utilizados três bovinos adultos, machos castrados, mestiços, mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha*, suplementados com 10 kg de silagem de milho e dois quilos de concentrado comercial contendo 20% de proteína bruta, sal mineral e água à vontade. Foi testado um alimento padrão (feno de *Brachiaria brizantha*, FB) e um potencial alimento para ruminantes (substrato exaurido da produção de *Pleurotus ostreatus*, SE) em cinco diferentes teores, SE (100% do substrato exaurido), FB (100% feno de *Brachiaria*), SE5 (5% SE + 95% FB), SE20 (20% SE + 80% FB) e SE30 (30% SE + 70% FB).

As amostras de substrato exaurido foram doadas pela empresa Cultivis Cogumelos Comestíveis. Os substratos estudados, feno e substrato exaurido, foram secos em estufa 65°C por 72 h e moídos em moinho tipo “Willey” com peneira de 1 mm. Após

o preparo foi pesado um grama dos substratos e das dietas propostas em frascos de vidro de 160 mL. Os inóculos ruminal foram colhidos de três bovinos com cânulas no rúmen, pela manhã após jejum de 12h, e posteriormente filtrados com camada dupla de pano de algodão e encaminhados para o laboratório em garrafas térmicas. No laboratório os inóculos ruminal foram transferidos para três Erlenmeyers identificados para cada animal, mantidos em banho-maria a 39°C e saturação de CO₂. Foram incubados 18 frascos no total, sendo 15 frascos referente às diferentes dietas e inóculos ruminal (5 dietas e 3 inóculos ruminal) e 3 frascos utilizados como branco (1 frasco de cada inóculo ruminal sem substrato). Nos frascos foram adicionados 90 mL de solução nutritiva-tamponante (GUIMARÃES JR. *et al.*, 2008), e 10 mL de inóculo ruminal.

A pressão de gases foi medida nos tempos de 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 26, 42, 48, 72, 96 horas após a inoculação, por intermédio da inserção de uma agulha acoplada ao transdutor de pressão à tampa de silicone e posteriormente transformada em volume, segundo equação desenvolvida por GUIMARÃES JR. *et al.* (2008), para as condições do Distrito Federal:

$$V = 4,50213 \times P + 0,05164 \times P^2 (R^2 = 0,996)$$

onde, V = Volume (mL); P = pressão (psi).

Os dados de volume de gás produzido foram ajustados pelo modelo de FRANCE *et al.* (1993) que forneceu as informações sobre o potencial de produção de gás (A), a taxa de produção de gás (b), e o tempo de colonização (L).

Ao final do período de coleta de gases, a fermentação foi interrompida com a imersão dos frascos em uma bandeja plástica com água e gelo. O conteúdo dos frascos foi filtrado em cadinho poroso previamente tarados para a determinação da degradabilidade após 96 horas de fermentação [D (96h)]. Foram realizadas as seguintes análises bromatológicas nas dietas estudadas: matéria mineral (MM), matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente ácido (FDA), segundo a AOAC (1995), e fibra em detergente neutro (FDN), segundo VAN SOEST *et al.* (1991) (Tabela 1).

O delineamento experimental foi conduzido em fatorial 5x3 com cinco tratamentos e três inóculos ruminal. A análise de variância foi feita pelo PROC GLM (SAS, Inst. Inc., Cary, NC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 pode ser observado o gráfico do

Tabela 1. Composição bromatológica do substrato exaurido da produção de shimeji-preto e feno de *Brachiaria brizanta*

Composição ¹	Substrato de Shimeji-preto	Feno de <i>Brachiaria brizanta</i>
MS (%)	95,0	81,0
MM (% MS)	12,9	11,0
PB (% MS)	8,2	8,6
FDN (% MS)	66,3	56,2
FDA (% MS)	48,0	36,2
EE (% MS)	1,60	1,40

¹MS: matéria seca; MM: matéria mineral; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EE: extrato etéreo.

perfil fermentativo das diferentes dietas estudadas. Nota-se menor fase de colonização para o substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus* (SE), indicado pela maior inclinação da curva em curto espaço de tempo, apesar da produção total e o pico da produção ter sido menor que nas demais dietas (P<0,05).

Não houve diferença significativa (P>0,05) no parâmetro volume de gases acumulado (A) para as dietas FB (262,6 mL/g MS), SE5 (284,3 mL/g MS), SE20 (256,6 mL/g MS) e SE30 (261,7 mL/g MS), evidenciando que o substrato não incrementou nem inibiu a fermentação do feno (Tabela 2). A dieta SE apresentou baixo volume de gases acumulado e degradabilidade com valores de 165,9 mL e 52% (P<0,05), respectivamente, indicando menor valor nutricional quando comparado com o feno. A presença de enzimas que degradam os carboidratos, importante para o desenvolvimento da estrutura reprodutiva do fungo (parte comestível), diminuiu a disponibilidade de matéria orgânica fermentável no substrato exaurido, apesar da presença de outras fontes de carboidratos no substrato.

A dieta SE apresentou fase curta de colonização quando comparada ao feno e às demais dietas estudadas (L=2,6 h; P<0,05). A ação da estrutura vegetativa (micélio) facilitou a colonização inicial do substrato e pode ser utilizada como uma forma de auxiliar o início da colonização bacteriana pelos microrganismos do rúmen. SCHMIDT *et al.* (2003) relataram aumentos na digestibilidade e na fração FDN ao submeterem feno de braquiária ao tratamento biológico com *Pleurotus ostreatus*, demonstrando a ação do micélio na maior disponibilidade de nutrientes. A diferença entre a curva de produção de gases para a dieta exclusiva com substrato exaurido (SE) e a dieta SE5%, demonstrou que houve melhoria na fermentação do feno de *Brachiaria brizantha* com

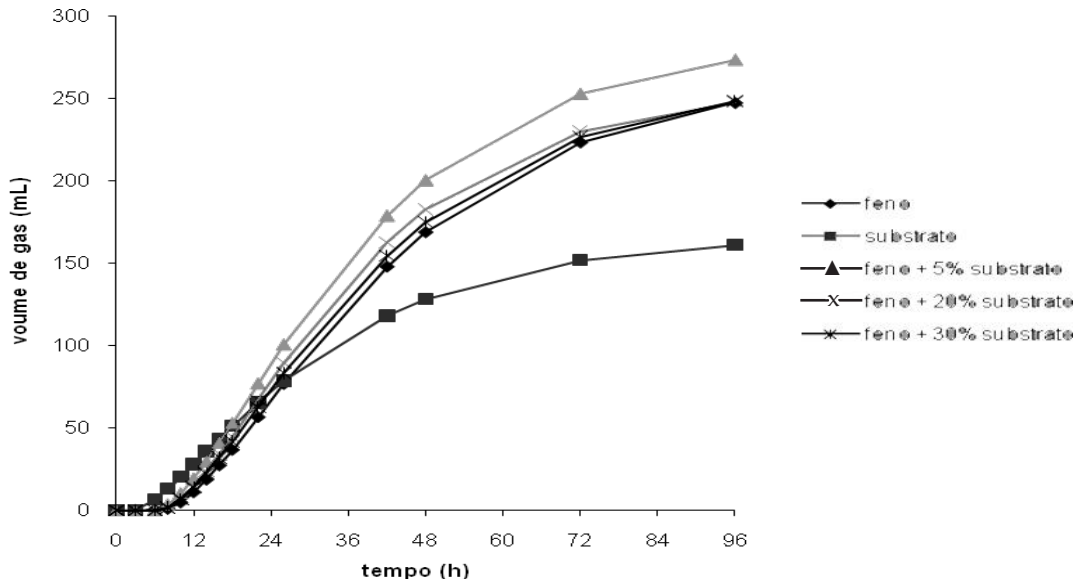


Figura 1. Cinética de produção de gás do substrato exaurido de *Pleurotus ostreatus* (shimeji-preto), feno de *Brachiaria brizanta* e inclusão de 5%, 20% e 30% do substrato de shimeji-preto no feno de *Brachiaria brizanta*.

Tabela 2. Produção de gases *in vitro* do feno de *Brachiaria brizanta* (FB) e das inclusões de 5% (SE5), 20% (SE20) e 30% (SE30) de substrato exaurido da produção de shimeji-preto

	Dietas					P ²	EPM ³
	FB	SE	SE5	SE20	SE30		
A (mL/g MS) ¹	262,6 a	165,9 b	284,3 a	256,6 a	261,7 a	<0,0001	21,02
b (%/h)	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,1806	0,01
C	-0,28 a	0,16 b	-0,28 a	-0,32 a	-0,27a	<0,0001	0,04
L (h)	7,16 a	2,59 b	5,86 a	6,86 a	6,61a	<0,0001	0,95
D (96 h)	60,1 a	52,1 b	58,4 a	58,3 a	5,807a	<0,0001	0,05

¹Volume acumulado de gás em 96h (A); Taxa de produção de gás (b); Ponto de interseção no eixo y (C); Tempo de colonização (L); Degradabilidade da matéria seca após 96h de fermentação [D (96h)]. ²Probabilidade. ³Erro padrão da média.

5% de substrato, provavelmente por proporcionar maior crescimento de microrganismos no início da fermentação.

Não foi verificada maior disponibilidade de carboidratos para a fermentação e nem maior degradabilidade no substrato exaurido, observado pela inclinação da curva de produção de gases, diferentemente dos resultados verificados por SCHMIDT *et al.* (2003). A diferença observada é porque no presente estudo não foi avaliada a ação do fungo como dieta biológica, e sim como subproduto da produção comercial de *Pleurotus ostreatus* após colonização pelo fungo. Neste caso, a composição bromatológica e a produção de gases mostraram

que após o desenvolvimento do fungo até o ponto de colheita existe diminuição de nutrientes no substrato (proteína bruta e energia), além da menor degradabilidade. Entretanto, a dieta com inclusão de 5% de substrato apresentou curva de produção de gases que sugere melhorias da fermentação microbiana.

As diferenças observadas entre as dietas podem ser devidas à forma como o fungo interage na parede celular, pois segundo SCHMIDT (2002) a maior degradação do fungo foi na hemicelulose, não interagindo totalmente com a celulose e a lignina. RAJARATHNAM e BANO (1989) afirmam que os basidiomicetos provocam degradação preferencial

da lignina, em contradição com SCHMIDT *et al.* (2003) que observaram aumento na concentração de lignina pela ação preferencial pela hemicelulose. ADAMOVIC *et al.* (1998) também relataram maior afinidade do fungo pela lignina em experimento realizado com palha de trigo inoculada com *Pleurotus ostreatus*, com diminuição de 4% de lignina, após 120 dias de incubação. MOYSON e VERACHTERT (1991) verificaram degradação de 59% da hemicelulose, 54% da lignina e 11% celulose, após 12 semanas com duas espécies do gênero *Pleurotus*.

CONCLUSÃO

O substrato exaurido apresentou perfil fermentativo que possibilita a utilização como ingrediente em dietas de ruminantes, com menor valor nutricional em relação ao feno de *Brachiaria brizantha*.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a equipe da Fazenda Água Limpa, ao CNPq e ao Laboratório de Análises Químicas da EMBRAPA Cerrado pela importante colaboração neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ADAMOVIC, M.; GRUBIC, G.; MILENKOVIC, I.; JOVANOVIC, R.; PROTIC, R.; SRETENOVIC, L.; STOICEVIC, L. The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. **Animal Feed Science and Technology**, v.71, p.357-362, 1998.
- AOAC - ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 16th ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.
- CHANG, S.T.; MILES, P.G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 451p.
- FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; THEODOROU, M.K.; LISTER, S.J.; DAVIES, D.R.; ISAC, D. A model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminant feeds. **Journal of Theoretical Biology**, v.163, p.99-111, 1993.
- GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. In vitro measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.72, p.261-281, 1998.
- GONÇALVES, M.F.; OLIVEIRA, M.V.; NOGUEIRA, H.C.R.; SANTOS, A.P.S.; FRANÇA, A.M.S.; HERMISDORFF, I.C.; SANTOS, R.M. Desempenho de novilhas alimentadas com co-produtos da indústria de milho ou do ácido cítrico. **Notícias Veterinárias**, v.20, p.28-36, 2014.
- GUIMARÃES JR., R.; CABRAL, S.L.S.F.; FERNANDES, F.D.; VILELA, L.; MARTHA, G.B.J. **Relação entre pressão e volume para implantação da técnica "in vitro" semiautomática de produção de gases na Embrapa cerrados**. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2008. 8p. (Comunicado Técnico, 144).
- MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminants feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, p.321-330, 1999.
- MOYSON, E.; VERACHTERT, H. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.421-424, 1991.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1063-1073, 1993.
- PLATT, M. J.; HADAR, Y.; CHET, I. Fungal activities involved in lignocellulose degradation by *Pleurotus*. **European Journal Applied Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.150-154, 1984.
- SCHMIDT, P. **Efeito da incubação com uréia ou inoculação com *Pleurotus ostreatus* no valor nutritivo do feno de braquiária**. 2002. 83f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2002.
- SCHMIDT, P.; WECHSLER, F.S.; NASCIMENTO, J.S. Tratamento do feno de braquiária pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1866-1871, 2003.
- THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; McALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.12, p.185-197, 1994.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.