



VIVIANE CAMILA DE SOUZA

**ESTABILIDADE AERÓBIA DA SILAGEM DE CAPIM-
ELEFANTE CULTIVAR BRS CAPIAÇU EM DOIS
TEORES DE MATÉRIA SECA E INOCULADA COM
CEPAS DE *Lactobacillus* EM CULTURA PURA E MISTA**

**LAVRAS – MG
2021**

VIVIANE CAMILA DE SOUZA

**ESTABILIDADE AERÓBIA DA SILAGEM DE CAPIM-
ELEFANTE CULTIVAR BRS CAPIAÇU EM DOIS TEORES
DE MATÉRIA SECA E INOCULADA COM CEPAS DE
Lactobacillus EM CULTURA PURA E MISTA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila

Orientadora

Dra. Beatriz Ferreira Carvalho

Coorientadora

**LAVRAS – MG
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, Viviane Camila de.

Estabilidade aeróbia da silagem de capim-elefante cultivar BRS
Capiçu em dois teores de matéria seca e inoculada com cepas de
Lactobacillus em cultura pura e mista / Viviane Camila de Souza. -
2021.

44 p.

Orientador(a): Carla Luiza da Silva Ávila.

Coorientador(a): Beatriz Ferreira Carvalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Silagem. 2. Estabilidade aeróbia. 3. BRS Capiçu. I. Ávila,
Carla Luiza da Silva. II. Carvalho, Beatriz Ferreira. III. Título.

VIVIANE CAMILA DE SOUZA

**ESTABILIDADE AERÓBIA DA SILAGEM DE CAPIM-
ELEFANTE CULTIVAR BRS CAPIAÇU EM DOIS TEORES
DE MATÉRIA SECA E INOCULADA COM CEPAS DE
Lactobacillus EM CULTURA PURA E MISTA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 06 de agosto de 2021

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila

Dra. Beatriz Ferreira Carvalho

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

Dr. Aداuton Vilela de Rezende

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila

Orientadora

Dra. Beatriz Ferreira Carvalho

Coorientadora

LAVRAS – MG

2021

*Aos meus pais, Maria Cristina (in
memoriam) e Moacir (in memoriam) por
todo amor e carinho*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por minha saúde, por minha família, pela força para concluir meus estudos e por todas as bênçãos que me foram concedidas.

Aos meus pais, Maria Cristina Camilo (in memoriam) e Moacir de Souza (in memoriam), pelo amor infinito e por todo esforço para nunca me deixar faltar nada.

Aos meus irmãos, Amanda Aparecida de Souza e Tiago Moacir de Souza (in memoriam) pelo carinho, amizade e força que me deram para enfrentarmos as nossas dificuldades.

Ao meu cunhado por tudo apoio a nossa família.

Ao pequeno Enzo Henrique, meu sobrinho amado, por encher meu coração de alegria e me dar esperança de dias melhores.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e aos professores do DZO pelo apoio e oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao Léo Pereira proprietário das Fazendas Reunidas ACP e Filhos pela ajuda, disponibilidade e apoio.

Ao núcleo de estudos em forragicultura- NEFOR pelos ensinamentos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório de fermentações da Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Lavras pelo auxílio e suporte para a realização das análises desse trabalho.

Aos funcionários e colegas do laboratório da micro pelo apoio e momentos de descontração.

À Professora Dra. Carla Luiza da Silva Ávila, pela orientação, paciência, ensinamentos valiosos, sempre disposta a ajudar. Obrigada por tudo, professora!

À Dra. Beatriz Ferreira Carvalho pela ajuda, disponibilidade e pelas valiosas contribuições para esse experimento. Obrigada por tudo, Bia!

A todos do grupo de pesquisa da Prof. Carla pelo apoio, ensinamentos e compartilhamento de experiências. Agradeço de modo especial ao Rafael, pela parceria nesse experimento.

À minha amiga Isa pela amizade e companheirismo em todos esses anos, principalmente durante o mestrado... Com certeza a sua presença deixou meus dias de angústia mais leves e os momentos de alegria muito mais felizes!

A todos que colaboraram para a realização desse trabalho, muito obrigada!

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

Josué 1:9

Resumo

O capim-elefante cultivar BRS Capiapu, possui características desejáveis à produção de silagem. Entretanto quando colhido para essa finalidade, a planta apresenta alto teor de umidade e baixo teor de carboidratos solúveis em água (CSA), parâmetros que afetam a microbiota da silagem durante a fermentação e consequentemente a estabilidade aeróbia. Objetivou-se com esta pesquisa estudar a microbiota associada à deterioração aeróbia de silagens de capim-elefante cv. BRS Capiapu com dois teores de matéria seca (MS) e inoculadas com cepas de *Lentilactobacillus hilgardii* (CNCM I-4785 82), *Lactiplantibacillus plantarum* (CCMA 1394). O capim foi colhido com dois teores de MS: MS baixa 16,8% e MS alta 24,3% e picado com tamanho de partículas aproximado de 19 mm. Após o corte do capim, a forragem foi preparada com os seguintes tratamentos: controle, CCMA 1394 (*Lactiplantibacillus plantarum*) 8,62logUFC/g, CNCM I-4785 82 (*Lentilactobacillus hilgardii*) 8,86log UFC/g e a combinação de CCMA 1394 + CNCM I-4785 82. Silos experimentais (bombonas plásticas com capacidade de 30L) foram utilizados para a ensilagem e abertos após 104 dias de fermentação. Amostras de aproximadamente 2kg de silagem foram retiradas, colocadas em sacos plásticos e armazenadas em sala com temperatura controlada. No centro de um saco com 5kg de silagem, foi colocado um data logger para registrar a temperatura a cada 30 min. A estabilidade foi avaliada nos tempos 0, 1, 3 e 6 dias. As análises microbiológicas, ácidos orgânicos, álcoois e pH, foram feitas a partir de um extrato aquoso das amostras de cada tempo. A adição dos inoculantes afetou a população de leveduras ($P < 0,0001$), as silagens tratadas com *L. hilgardii*, apresentaram menor contagem de leveduras independente do teor de MS e dias de exposição aeróbia. No dia da abertura do silo (tempo 0), as silagens com MS baixa, tratadas com *L. plantarum*, *L. hilgardii* e a combinação *L. plantarum* + *L. hilgardii*, não apresentaram contagem para BAFE, diferente da silagem controle. Nas silagens com menor MS, os valores de pH aumentaram a partir de 3 dias de exposição, chegando a 7,33 com 6 dias de exposição aeróbia. As silagens com teor de MS de 24,3%, apresentaram a maior concentração de ácido acético comparadas com as silagens com teor de MS de 16,8%, em todos os tempos de exposição. Em relação a estabilidade aeróbia, os tratamentos não diferiram estatisticamente. O inoculante CNCM I-4785 82 se destacou por apresentar menor contagem de leveduras e menor temperatura após a exposição ao ar, dessa forma a silagem esteve melhor preservada ao longo dos dias de exposição aeróbia.

Palavras-chave: BRS Capiapu. Microrganismos. Estabilidade aeróbia. Matéria seca. Inoculantes.

Abstract

Elephant grass, cultivar BRS Capiçu, has desirable characteristics for silage production. However, when harvested for this purpose, the plant has a high moisture content and a low content of water-soluble carbohydrates (WSA), parameters that affect the silage microbiota during fermentation and, consequently, aerobic stability. The objective of this research was to study the microbiota associated with aerobic deterioration of elephant grass silages cv. BRS Capiçu with two levels of dry matter (DM) and inoculated with strains of *Lentilactobacillus hilgardii* (CNCM I-4785 82), *Lactiplantibacillus plantarum* (CCMA 1394). The grass was harvested with two DM contents: low DM 16.8% and high DM 24.3%, and chopped with an approximate particle size of 19 mm. After cutting the grass, the forage was prepared with the following treatments: control, CCMA 1394 (*Lactiplantibacillus plantarum*) 8.62log UFC/g, CNCM I-4785 82 (*Lentilactobacillus hilgardii*) 8.86logUFC/g and a combination of CCMA 1394 + CNCM I-4785 82. Experimental silos (30L capacity plastic pumps) were used for ensiling and opened after 104 days of fermentation. Samples of approximately 2kg of silage were removed, placed in plastic bags and stored in a room with controlled temperature. In the center of a bag with 5kg of silage, a data logger was placed to record the temperature every 30 min. Stability was evaluated at times 0, 1, 3 and 6 days. Microbiological analysis, organic acids, alcohols and pH were made from an aqueous extract of the samples at each time. The addition of inoculants affected the yeast population ($P < 0.0001$), the silages treated with *Le. hilgardii*, showed lower yeast count regardless of DM content and days of aerobic exposure. On the opening day of the silo (time 0), the silages with low DM, treated with *La. plantarum*, *Le. hilgardii* and the combination *La. plantarum* + *Le. hilgardii*, did not present aerobic spore-forming bacteria counts, unlike the control silage. In silages with lower DM, the pH values increased after 3 days of exposure, reaching 7.33 with 6 days of aerobic exposure. Silages with DM content of 24.3% had the highest concentration of acetic acid compared to silages with DM content of 16.8%, in all exposure times. Regarding aerobic stability, the treatments did not differ statistically. The CNCM I-4785 82 inoculant stood out for presenting a lower yeast count and lower temperature after exposure to air, thus the silage was better preserved throughout the days of aerobic exposure.

Keywords: BRS Capiçu. Microorganisms. Aerobic stability. Dry matter. Inoculants.

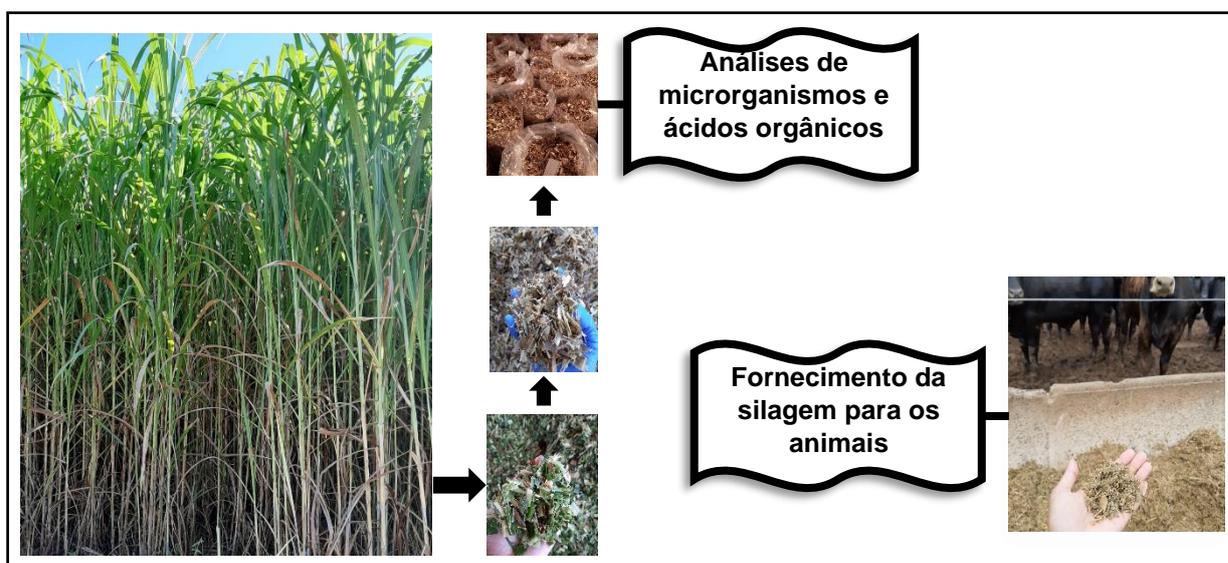
RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

Estabilidade aeróbia da silagem de capim-elefante cultivar BRS Capiaçú em dois teores de matéria seca e inoculada com cepas de *Lactobacillus* em cultura pura e mista

Elaborado por **Viviane Camila de Souza**, orientada por **Carla Luiza da Silva Ávila**

A estabilidade aeróbia (EA) das silagens é afetada por vários fatores, dentre esses, a concentração de matéria seca (MS) da forragem e ação de microrganismos inoculados. Dessa forma, objetivou-se com a pesquisa, avaliar a EA de silagens de capim-elefante cultivar BRS Capiaçú e estudar os microrganismos associados à deterioração após a exposição ao ar. A forragem utilizada foi colhida com duas concentrações de MS (16,8% e 24,3%) e inoculada com cepas de bactérias do ácido láctico (BAL) separadamente e em combinação (*Lentilactobacillus hilgardii* - CNCM I-4785 82 e *Lactiplantibacillus plantarum* - CCMA 1394). Os tratamentos avaliados foram: CON - controle (sem inoculante), LH - *Le. hilgardii* 8,86 log de unidades formadoras de colônia (UFC)/g de forragem, LP - *La. plantarum* 8,82 log UFC/g de forragem e LH+LP - combinação de *Le. hilgardii* e *La. plantarum*.

A adição dos inoculantes afetou a população de leveduras, sendo que as silagens tratadas com *Le. hilgardii*, apresentaram menor contagem de leveduras independente do teor de MS e dias de exposição aeróbia. Houve efeito do inoculante microbiano e do teor de MS para temperatura máxima e estabilidade aeróbia das silagens. Em relação ao tempo necessário para atingir a temperatura máxima, houve interação entre inoculante microbiano e teor de MS. A EA não diferiu estatisticamente entre os tratamentos com inoculantes com média de 124,8 horas. As silagens com concentração de MS alta, apresentaram os maiores tempos para alcançar a temperatura máxima, comparadas com as silagens de MS baixa. A silagem tratada com LH apresentou a menor temperatura máxima em relação ao tratamento CON (32,59 °C e 34,87 °C, respectivamente). A inoculação da silagem de capim-elefante cultivar BRS Capiaçú, não alterou a estabilidade aeróbia. A maior concentração de MS e a inoculação com LH se destacaram por apresentar menor temperatura máxima após a exposição ao ar, maiores tempos para alcançar a temperatura máxima, menor contagem de leveduras e silagens mais estáveis.



SUMÁRIO

1 Introdução	12
2 Referencial teórico	13
2.1 Capim-elefante cv. BRS Capiacu	13
2.2 Manejo do capim-elefante para produção de silagem.....	15
2.3 Fases da fermentação das silagens de capins tropicais	15
2.4 Microrganismos envolvidos na deterioração aeróbia de silagem	16
2.4.1 Leveduras	16
2.4.2 Fungos filamentosos.....	17
2.4.3 <i>Clostridium sp.</i>	18
2.4.4 <i>Bacillus sp.</i>	18
2.4.5 Enterobactérias	19
3 Material e métodos	20
3.1 Inoculantes utilizados para o preparo da silagem	20
3.2 Estudo da estabilidade aeróbia.....	21
3.3 Análises microbiológicas, ácidos orgânico, álcoois e pH.....	22
3.4 Teste de assimilação de ácido láctico e resistência ao ácido acético.....	23
4 Delineamento experimental e análise estatística	24
5 Resultados e discussão	25
5.1 Características das silagens após a abertura.....	25
5.2 Características dos microrganismos isolados da silagem	36
6 Conclusão	39
7 Referências	39

1 Introdução

A produção de forragem dos capins tropicais é influenciada pela temperatura, luminosidade e características da própria planta. É observado que a maior produtividade ocorre no período chuvoso e para melhor aproveitamento da planta nesse período, a ensilagem é aconselhável, para que o excedente de forragem no verão não seja desperdiçado. Também pela necessidade de ter forragem conservada durante todo o ano para alimentação de animais confinados (DANIEL et al., 2019), visto que no inverno ocorre um déficit na produção de forragem.

O capim-elefante é uma das forrageiras mais importantes e é cultivada em diversos países de clima tropical e subtropical (ROSA et al., 2019), devido à alta produtividade por área, facilidade de cultivo e boa aceitabilidade pelos animais. O cultivar BRS Capiáçu do capim-elefante, foi desenvolvido pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Gado de Leite e registrada em 2015 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Essa planta se destaca em relação as outras pela sua resistência ao tombamento, qualidade da forragem, facilidade de colheita mecânica e produtividade (PEREIRA et al., 2016).

O capim possui boa produtividade e adaptabilidade, porém no momento ideal de corte, quando apresenta características nutricionais desejáveis para a ensilagem, a planta apresenta alto teor de umidade (800g/kg) e baixo teor de carboidratos solúveis em água (CSA) (30g/kg) (FERREIRA et al., 2013). Esses fatores dificultam o crescimento das bactérias do ácido lático (BAL) e conseqüentemente a queda do pH, assim inibição de microrganismos indesejáveis não é eficiente. O crescimento de microrganismos indesejáveis gera produtos de fermentações indesejáveis principalmente ácido butírico, amônia e aminas produzidas por bactérias do gênero *Clostridium* (GEBRAHANNA et al., 2014). A alta umidade pode causar a produção de efluente que significa perdas tanto de matéria seca (MS) quanto de nutrientes da silagem.

O desenvolvimento de microrganismos indesejáveis pode ocorrer durante a fase de fermentação da silagem ou após a abertura do silo. Existem poucos trabalhos que analisaram a microbiota da silagem de capim, tanto durante a fermentação quanto após a abertura, assim ainda não se sabe se existe algum prejuízo para os animais alimentados com essas silagens.

A adição de alimentos absorventes ou o uso de inoculantes, são possíveis alternativas utilizadas para aumentar o teor de MS e/ou melhorar a fermentação das silagens de capim. A utilização de alimentos absorventes, nem sempre

é adequada, já que são alimentos com diferentes perfis de fermentação e essa interação pode não ser favorável. Além disso, pode não haver disponibilidade desses alimentos na região, alterando a logística da fazenda e gerando maiores custos operacionais. O uso de inoculantes contendo bactérias do ácido lático (BAL) tem sido indicado (DANIEL et al., 2019), principalmente pela facilidade de obtenção, aplicação e custo benefício.

Os inoculantes utilizados na silagem podem ser compostos por BAL homofermentativas, heterofermentativas ou uma combinação desses dois grupos (KUNG et al., 2009). Os microrganismos epífíticos tem potencial para serem selecionados e utilizados como inoculantes a fim de melhorar o processo fermentativo (Ávila et al., 2014).

A estabilidade aeróbia das silagens é influenciada pela ação dos microrganismos inoculados no momento da ensilagem, principalmente quando é usado inoculante contendo BAL heterofermentativas. Essas bactérias, além de produzir ácido lático, também produzem ácido acético que inibe o crescimento de leveduras, responsáveis por iniciarem a deterioração aeróbia. Em silagens de capim, geralmente a perda da estabilidade é mais demorada, devido à baixa concentração de CSA. Essa condição é um fator limitante ao crescimento de microrganismos que necessitam de substrato para se desenvolverem.

Durante as décadas de 80 e 90, muitos estudos foram realizados a partir da ensilagem de diferentes cultivares de capim-elefante, no entanto neste período, praticamente não foram estudadas características fermentativas como por exemplo, a microbiota presente ou os produtos de fermentação. Dessa forma ainda existe a necessidade de conhecer o perfil fermentativo da forrageira. Assim, objetivou-se com a pesquisa estudar a microbiota associada a deterioração aeróbia de silagens de capim-elefante cv. BRS Capiáçu com teores de MS alto e baixo e inoculadas com cepas de *Lentilactobacillus hilgardii* (CNCM I-4785 82) e *Lactiplantibacillus plantarum* (CCMA 1394).

2 Referencial teórico

2.1 Capim-elefante cv. BRS Capiáçu

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é uma gramínea pertencente à família Poaceae de origem africana (GONÇALEZ, 1985), descoberta pelo coronel Napier em 1905. No Brasil, a introdução da forrageira ocorreu por volta de 1920 e encontra-se difundida em todas as regiões brasileiras. É uma planta de clima tropical que apresenta ciclo de

desenvolvimento perene, crescimento cespitoso, forma touceiras densas, possui folhas largas e compridas e sua propagação é vegetativa (PEREIRA et al., 2010). O capim é exigente em termos de fertilidade do solo e apresenta tolerância a seca e a queimadas acidentais, porém é uma planta sensível a geadas e solos encharcados (REIS et al., 2014), pode ser usado como fonte de bioenergia (RENGSIRIKUL et al., 2011).

O cultivar BRS Capiacu foi obtido através de um programa de melhoramento genético do capim-elefante, realizado pela Embrapa Gado de Leite e registrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2015. Essa planta pode ser descrita como uma gramínea de porte alto, aproximadamente 5m de comprimento, que forma touceiras de formato ereto, com folhas largas, compridas de cor verde e nervura central branca com ausência de pelos, além de ter elevada densidade de perfilhos. Possui resistência ao tombamento e facilidade de colheita mecânica. Sua propagação ocorre por meio de colmos com idade de rebrota entre 100 e 120 dias, para que a maioria das gemas estejam maduras (PEREIRA et al., 2016).

A forrageira se destaca por apresentar elevado potencial produtivo de aproximadamente 50 t/ha/ano de MS (considerando três cortes ao ano) (MONÇÃO et al., 2019), além de ser uma alternativa à cultura do milho em regiões com ocorrência de veranicos e longos períodos chuvosos (ROSA et al., 2019; MONTEIRO et al., 2016). Pode ser utilizada como silagem e capineira para ser fornecida picada no cocho para os animais.

Uma alternativa para melhorar o perfil fermentativo do capim-elefante BRS Capiacu é utilizar inoculante microbiano no momento da ensilagem (HARRISON & BLAUWIEKEL, 1994) que vai favorecer a produção de ácidos orgânicos, como o ácido lático, para acelerar na queda do pH, na recuperação de MS e preservação das características nutritivas da silagem pela inibição de microrganismos indesejáveis (KUNG JR et al., 2003). Outra alternativa é fazer o corte da planta no momento em que haja equilíbrio entre produção e valor nutritivo, com adequado teor de MS. Dessa forma, alguns autores recomendam o corte do cultivar BRS Capiacu para produção de silagem na altura média de 3,5 a 4 metros, próximo aos 90 a 110 dias de rebrota (matéria seca 16,4% e 19,7% respectivamente) (ROSA et al., 2019). Se a forrageira ultrapassar os 120 dias de rebrota, seu uso como silagem não é recomendado devido ao baixo valor nutritivo (PEREIRA et al., 2016).

2.2 Manejo do capim-elefante para produção de silagem

As silagens produzidas a partir do capim-elefante são historicamente utilizadas principalmente para alimentação de animais menos produtivos, já que essa forrageira não atinge os requisitos energéticos de vacas leiteiras de alta produção ou de novilhos em crescimento (LIMA & EVANGELISTA, 2001). Além de ter processo de produção mais simples e de baixo custo, a gramínea apresenta elevado potencial produtivo, muitas variedades no mercado, aceitabilidade pelos animais e bom valor nutritivo quando colhida no estágio adequado (LIMA & EVANGELISTA, 2001).

À medida em que há o incremento de MS, ou seja, com o avanço da maturidade da planta, ocorre a redução no valor nutritivo. Sendo assim se faz necessário conhecer também o teor de matéria seca da forragem que será cortada a fim de proporcionar uma melhor fermentação da silagem.

O primeiro passo na ensilagem de capim é a colheita. No campo, a planta é picada e transportada até o local em que será ensilada. Ainda nesse processo, para se ter êxito, é preciso atentar para o ponto de colheita da forrageira, o processamento da forragem, altura de corte e tamanho de partícula, pois são aspectos determinantes ao processo fermentativo e conservação (NUSSIO; CAMPOS; DIAS, 2001).

A forragem ao ser depositada no silo, precisa passar por compactação a fim de retirar todo o oxigênio presente na massa ensilada, processo que é fundamental para o início da fermentação desejável. Um aspecto a ser considerado é o tipo de silo em que a forragem será depositada. Silos mais rasos tendem a produzir menos efluente do que silos profundos devido a menor pressão (AMOS; WOODMAN, 1922).

2.3 Fases da fermentação das silagens de capins tropicais

A fase inicial da fermentação chamada de fase aeróbia, ocorre após a vedação do silo. É uma fase geralmente de curta duração em que os microrganismos aeróbios e os anaeróbios facultativos consomem o oxigênio residual. Quanto maior a concentração de oxigênio, maior é a duração da fase e maior possibilidade de desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Após o consumo de todo oxigênio presente na massa ensilada, as bactérias lácticas iniciam a fermentação, tornando o meio ácido. As condições de anaerobiose e acidez impedem o crescimento de outros microrganismos, caracterizando a fase fermentativa. Entretanto, as plantas de capim-elefante, quando cortadas para a ensilagem, apresentam baixo teor de CSA.

Dessa forma, com pouco substrato, as BAL não têm capacidade de abaixar suficientemente o pH do meio, ocorrendo o crescimento de microrganismos indesejáveis.

Ao chegar à fase de estabilização, poucos ou nenhum evento microbiológico ou bioquímico ocorrerá, se não houver entrada de oxigênio na massa ensilada (ELFERINCK et al., 2000). Quando o processo fermentativo ocorre de maneira satisfatória, uma silagem de boa qualidade será produzida. Entretanto, após a abertura do silo, há um reingresso de oxigênio que em determinada situação pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos deterioradores como as leveduras, bactérias do gênero *Bacillus* e do gênero *Clostridium* (que podem sobreviver na forma de esporos) e posteriormente os fungos filamentosos (ELFERINK et al., 2000).

A estabilidade aeróbia é a resistência à deterioração quando o alimento é exposto ao ar. No caso das silagens, considera-se que uma silagem perdeu a estabilidade aeróbia quando a temperatura aumenta dois graus acima da temperatura do ambiente (MORAN, 1994). A alteração do pH, faz com que a silagem perca sua estabilidade devido a ação de microrganismos deterioradores, como as leveduras, fungos filamentosos, *Bacillus* e *Clostridium* (AMARAL et al., 2008).

Geralmente as silagens de capim-elefante demoram mais tempo para perder a estabilidade quando são expostas ao ar, pelo menor teor de nutrientes dessa silagem e também devido a maior produção de ácido acético e ácido propiônico durante o processo fermentativo. Os microrganismos indesejáveis podem estar presentes tanto na própria planta como também ser oriundos de contaminação, estando presentes na fase aeróbia ou anaeróbia, podendo causar danos também à saúde humana (DUNIÈRE et al., 2013). Dentre esses microrganismos, são citados principalmente: as leveduras, fungos filamentosos, *Clostridium sp.* e *Bacillus sp.* (DRIEHUIS e OUDE ELFERINK, 2000).

2.4 Microrganismos envolvidos na deterioração aeróbia de silagem

2.4.1 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, heterotróficas e anaeróbias facultativas e são responsáveis por iniciarem a deterioração aeróbia da silagem (PAHLOW et al., 2003). Esses microrganismos, por terem a capacidade de realizar atividade metabólica tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, causam perda de MS em todas as fases da fermentação (McDONALD; HANDERSON; HERON, 1991).

Na ausência de oxigênio, as leveduras fermentam os carboidratos disponíveis na forragem ensilada produzindo etanol, CO₂ e água (McDONALD; HANDERSON; HERON, 1991). Embora a fermentação de hexoses em etanol seja eficiente energeticamente, ela não produz nenhum ácido, dessa forma as leveduras desviam o substrato que é fundamental para produção de ácidos orgânicos. E na presença de oxigênio, algumas leveduras utilizam o ácido láctico contribuindo para a deterioração aeróbia (KUNG et al., 2018). A utilização do lactato aumenta o pH e a temperatura da silagem, formando um ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos aeróbios (ROOKE E HATFIELD, 2003).

Os dois principais grupos de leveduras envolvidos no processo de deterioração aeróbia são as que utilizam os ácidos orgânicos como exemplo, o ácido láctico (*Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula* e *Pichia*) e aquelas que utilizam açúcares, exemplo o gênero *Torulopsis* (JONSSON; PAHLOW, 1984).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* tem sido estudadas quanto a seus benefícios para a microbiota ruminal de bovinos e também na qualidade da silagem. Podem atuar como probiótico, por estimular bactérias celulolíticas, aumentando o potencial para digestão de fibra no rúmen e o equilíbrio do pH, pois favorecem bactérias que consomem ácido láctico (GUEDES et al., 2008).

A presença do ácido acético na silagem pode diminuir a população de leveduras já que esse ácido é considerado antifúngico (DANNER; 2003). Por ser um ácido fraco, o ácido acético consegue atravessar a membrana plasmática das leveduras em sua forma não dissociada, vindo a se dissociar no citoplasma da célula. Isso faz o pH intracelular diminuir comprometendo o metabolismo da levedura (LAMBERT & STRATFORD, 1999).

2.4.2 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são microrganismos eucarióticos, quimiorganotróficos, em sua maioria aeróbios. Causam deterioração em silagens e alguns são produtores de micotoxinas. As micotoxinas são compostos tóxicos de metabólitos secundários produzidos por fungos e causam prejuízos tanto aos animais quanto aos humanos que consomem produtos de origem animal contaminados. O crescimento de fungos filamentosos, ocorre principalmente durante a fase de desabastecimento do silo, onde há maior difusão de oxigênio na forragem ensilada (EL-SHANAWAN; MOSTAFA. BARAKAT, 2005).

A presença desses microrganismos na silagem, causa redução no valor nutritivo e na palatabilidade em função da degradação de nutrientes e também pode ter efeitos negativos na

saúde animal e humana (ARCURI; CARNEIRO; LOPES, 2003; MAY, 1993). Todos animais confinados estão susceptíveis à contaminação por micotoxinas, devido a alimentação diária com forragens, feno ou silagem (BERNARDES, 2006). Segundo Amaral (2008), a taxa de passagem da micotoxina do alimento para o leite era de 2%, contudo como a produtividade das vacas leiteiras está cada vez maior, essa taxa se torna mais elevada, com valores próximos a 4% (VELDMAN et al., 1992).

2.4.3 *Clostridium sp.*

Clostridium é um gênero de bactéria, gram-positiva, anaeróbia e formadora de esporos. O capim não possui esse microrganismo em sua microbiota epifítica, sua presença na silagem é devido à contaminação do solo ou esterco. São capazes de se desenvolver em silagens com baixo teor de CSA, quando a planta apresenta umidade acima de 70%, pH acima de 4,6 e temperatura de 30°C (QUEIROZ et al., 2018). Seu metabolismo é ativado a partir do momento em que as BAL cessam sua produção de ácido lático, uma vez que já consumiram todo o açúcar ali presente e o pH não é suficientemente baixo para inibir o crescimento desses microrganismos (ÁVILA, 2007; FLYTHE & RUSSEL, 2004; MUCK, 2010).

Esses microrganismos podem fermentar açúcares, ácido lático e aminoácidos e produzir ácido butírico e aminas biogênicas. Esse tipo de fermentação resulta em perdas significativas de MS e reduz a palatabilidade, além de diminuir a estabilidade da silagem (MAHANNA, 1994; MUCK, 2010; ROTZ; MUCK, 1994).

Devido ao aumento da sua atividade metabólica na silagem, pode haver a redução do consumo pelos animais, sendo que a causa dessa redução ainda é incerta, já que o ácido butírico é um ácido comum no rúmen. Apesar das aminas estarem associadas a queda de ingestão em pequenos ruminantes, em bovinos ainda não está claro. As vacas produtoras de leite em transição que consomem silagens contaminadas com metabólitos produzidos por clostrídeos, podem se tornar susceptíveis à cetose devido à alta quantidade de ácido butírico consumido. A fermentação do ácido lático e ácido butírico pode gerar uma perda de até 51% de MS e 18% de energia.

2.4.4 *Bacillus sp.*

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, são formadoras de esporos e consideradas indesejáveis no processo de conservação de alimento. (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002). A maioria desses microrganismos são aeróbios, gram-positivos em forma de bastonetes e dotados de motilidade (PAHLOW et al., 2003). Essas bactérias atuam no processo

de deterioração aeróbia quando a silagem apresenta pH superior à 4,5 e temperatura aproximada de 40°C (McDONALD, 1991; MUCK & PITT, 1994).

Os *Bacillus* além de produzirem compostos sem efeitos na conservação da silagem, ainda estão envolvidos na degradação inicial da mesma já que eles possuem a cadeia transportadora de elétrons completa, podendo metabolizar o ácido láctico (GIFFEL et al., 2002; ROOKE & HATFIELD, 2003). Em seu metabolismo, fermentam grande variedade de carboidratos da massa ensilada através de enzimas sacarolíticas e proteolíticas produzindo ácidos orgânicos, etanol, glicerol e 2,3-butanodiol (SANTOS, 2016). Algumas dessas substâncias produzidas, como exemplo o ácido acético, podem ser usadas para inibir o crescimento de fungos.

Os esporos dos *Bacillus* sobrevivem à passagem no trato digestivo de animais ruminantes, por isso se associa a contaminação do leite no momento da ordenha devido ao alto número de esporos nas fezes, colocando em risco a saúde humana pelo consumo de alimentos derivados do leite (PAHLOW et al., 2003).

As principais espécies de bacilos encontradas em silagens são: *B. cereus*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis* e *B. polymyx* (TE GIFFEL et al., 2002). A espécie *B. cereus* é um grupo de bactérias causadoras de intoxicação alimentar em produtos lácteos, presente principalmente em silagens de milho (ABEE et al., 2011).

2.4.5 Enterobactérias

As enterobactérias são microrganismos gram-negativos, anaeróbias facultativas que podem estar presentes em silagem deterioradas. Esse grupo de microrganismos compõe a microbiota do capim, em maior população que as BAL. Entretanto, no início do processo de fermentação da silagem, as bactérias do ácido láctico se desenvolvem rapidamente e abaixam o pH do meio, inibindo o crescimento das enterobactérias (HERON et al., 1993).

Em silagens de alfafa inoculadas com *Lactiplantibacillus plantarum* ou *Lentilactobacillus buchneri* comparadas com silagem controle, a inoculação resultou em rápido declínio do pH, inibindo o desenvolvimento de *Escherichia coli* adicionada na forragem (OGUNADE et al., 2016). Ogunade et al., 2017, em outro estudo semelhante, porém utilizando silagens de milho, reinocularam subamostras dos tratamentos com *E. coli* imediatamente após a abertura dos silos e após 168h de exposição aeróbia. Esses autores observaram depois de 6 e 24h, que as silagens com *L. plantarum* e controle tiveram maiores contagens de *E. coli* (5,39 e

5,30log UFC/g respectivamente) comparadas com aquelas tratadas com *L. buchneri* (1,32 log UFC/g).

As enterobactérias ainda competem com as BAL por substrato e podem produzir os ácidos lático, acético, succínico, etanol, 2,3-butanodiol, CO₂ e água. Esses compostos produzidos, não são prejudiciais para a silagem, porém são produzidos em baixas quantidades sendo insuficientes para a conservação (ROOKE e HATFIELD, 2003).

Os gêneros mais encontrados na planta antes da ensilagem são *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Rahnella*, *Hafnia*, *Serratia*. Apesar de serem não patogênicas, algumas dessas espécies são consideradas indesejáveis devido ao seu metabolismo de degradação de proteínas, produzindo amônia e aminas biogênicas (ROOKE e HATFIELD, 2003). A redução do nitrato (NO₃) para nitrito (NO₂), que por sua vez, são reduzidos a óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N₂O), feita por microrganismos pertencentes a esse grupo, é prejudicial para a silagem. Segundo Rooke e Hatfield (2003) os gases tóxicos produzidos podem se dissolver na massa ensilada, formando áreas marrons.

3 Material e métodos

A planta de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) cv. BRS Capiapu, foi colhida e ensilada nas Fazendas Reunidas ACP e Filhos, localizada na rodovia entre Carmo do Rio Claro e Itaci no km 9, Minas Gerais- Brasil.

As forrageiras utilizadas para a ensilagem foram cortadas com tamanho de partículas aproximado de 19 mm, obtido por meio da regulagem da máquina automotriz. No momento do corte, as plantas apresentavam dois teores médios de matéria seca: MS baixa 16,8% da matéria fresca (MF), (90 dias de rebrota, altura de 3,20 m) e MS alta 24,3% da MF (110 dias de rebrota, altura de 3,60 m). A colheita foi feita com altura de resíduo de 30 cm para MS1 e 50 cm para MS2, com uma máquina automotriz (CLAAS América Latina- Jaguar 860).

3.1 Inoculantes utilizados para o preparo da silagem

As cepas utilizadas como inoculantes estão depositadas na Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola (CCMA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As cepas são CCMA 0170 (*Lentilactobacillus hilgardii*), agora nomeada CNCM I-4785 82 (Lallemand SAS, France), isolada da silagem de cana de açúcar (ÁVILA et al., 2014) e CCMA 1394 (*Lactiplantibacillus plantarum*) isolada da silagem de capim-elefante cv. Napier (AMARAL et

al., 2020). Ambas foram previamente selecionadas e avaliadas em silagens de capim-elefante cv. BRS Capiçu. Ao todo foram utilizados três inoculantes: inoculante 1 (CNCM I-4785 82), inoculante 2 (CCMA 1394), inoculante 3 (mistura com as cepas CNCM I-4785 82 e CCMA 1394). As cepas foram cultivadas em laboratório conforme Ávila et al. (2009). A princípio, os microrganismos foram cultivados em 10 ml caldo MRS por 24h, em seguida foram transferidos para 90 ml de caldo MRS e cultivados por mais 24h. O conteúdo de 100 ml foi despejado em 900 ml de caldo MRS e cultivado por 24h em temperatura de 37°C. Após o período de crescimento (observação de biomassa), foi obtida uma cultura final, então o número de células foi contado, apresentando uma população de 8,86 log UFC/g (CNCM I-4785 82) e 8,62log UFC/g (CCMA 1394). Para cada tratamento, 150 ml do cultivo foram misturados com 50 ml de água destilada estéril, borrifados e homogeneizados em 15kg de forragem. A viabilidade das células foi verificada em plaqueamento de superfície. A silagem controle foi misturada com 200ml de água destilada.

A forragem picada e misturada com os inoculantes foi ensilada em silos experimentais (bombonas plásticas) com capacidade de 30 L. A forragem foi compactada manualmente até alcançar uma densidade de 633,33 kg/m³ para MS baixa e 500 kg/m³ para MS alta.

Após o período de estocagem de 104 dias, os silos foram abertos e amostras das silagens foram retiradas. As amostras foram homogeneizadas e fracionadas em quatro partes para as seguintes análises: 1) estabilidade aeróbia (duas partes); 2) análises microbiológicas e de pH (momento da abertura do silo); 3) análises dos ácidos orgânicos, álcoois e outras análises químicas (amostra congelada).

3.2 Estudo da estabilidade aeróbia

Para a avaliação da estabilidade aeróbia, uma amostra de cinco quilos de cada silagem foi colocada em um saco plástico no qual foi inserido um data logger (Impac, modelo MI-IN-D-2L) a 10 cm de profundidade, que registrou a temperatura a cada 30 minutos durante 14 dias. Em outros três sacos plásticos foram colocados dois quilos de silagem de cada tratamento e mantidos ao lado do saco plástico maior. Os sacos plásticos com as silagens foram armazenados em uma sala com temperatura monitorada. Amostras das silagens no momento da abertura do silo e de cada uma das frações de dois quilos de silagem após 1, 3 e 6 dias de estabilidade aeróbia foram coletadas. A perda de estabilidade foi considerada quando a silagem exposta ao ar excedeu 2° C em relação a temperatura do ambiente (MORAN, 1994).

3.3 Análises microbiológicas, ácidos orgânicos, álcoois e pH

Amostras da forragem fresca e das silagens após a abertura e exposição ao ar, foram levadas para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da UFLA, para avaliação microbiológica, ácidos orgânicos, álcoois e valores de pH. Um extrato aquoso com 25 g de silagem diluídos em 225 ml de água peptonada estéril (0,1%) foi preparado. O extrato aquoso foi homogeneizado por 20 minutos a 120 rpm em agitador orbital (Shaker). A partir do extrato obtido, foram feitas contagens da população de microrganismos.

A quantificação dos microrganismos foi feita a partir de diluições decimais seriadas do extrato de 10^{-1} a 10^{-6} . Frações de 0,1mL foram espalhadas em duplicata em meio de cultura DRBC (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol – KASVI) para quantificação de leveduras e fungos filamentosos; Ágar Nutriente (KASVI) para quantificação de bactérias aeróbias formadoras de esporos (BAFE) e Ágar EMB (Eosin Methylene Blue – Himedia) para quantificação de enterobactérias. A quantificação de BAL foi realizada apenas nas amostras da forragem e amostras do tempo zero (silagem no momento da abertura do silo). As placas foram incubadas em 37°C por 24 horas e 28°C por 48h, para bactérias e leveduras e fungos filamentosos respectivamente. Para a quantificação de BAFE, as amostras foram pasteurizadas a 80°C por 10 minutos para causar a morte das células vegetativas e manter apenas os endósporos, posteriormente as placas foram incubadas em BOD a 37°C por 24 horas. Os fungos filamentosos foram contados na mesma placa que as leveduras e diferenciados pela característica da colônia e visualização microscópica.

A quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC), foi realizada na placa que continha entre 30 e 300 UFC. Nas placas com os meios DRBC, ágar nutriente e EMB, após a quantificação, foi feita a caracterização dos morfotipos e a raiz quadrada do número total de colônias de cada morfotipo foi purificada para estudos de características e identificação. Para obter colônias puras, os isolados selecionados foram repicados em estrias compostas e posteriormente foram submetidos ao método da coloração de Gram para os isolados do ágar nutriente, lâmina á fresco para os isolados do DRBC e foram observados em microscópio.

A análise dos ácidos orgânicos e álcoois foi feita inicialmente acidificando o extrato aquoso com ácido sulfúrico 50% (v/v) que posteriormente foi congelado para a análise cromatográfica (HPLC) dos seguintes ácidos: lático, acético, propiônico e butírico e dos álcoois: etanol, propanol e 1,2-propanodiol de acordo com Santos et al. (2014). O aparelho utilizado foi o cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corporation – Tokio, Japão) equipado com um sistema de detecção duplo, composto por um detector de radiação

ultravioleta (UV – Vis/SPD – 10Ai) e um detector de índice de refração (RID 10A). O pH foi determinado por meio de um potenciômetro digital (Digimed Analítica, modelo DM20®) segundo a metodologia de Cherney e Cherney (2003).

3.4 Teste de assimilação de ácido lático e resistência ao ácido acético

Os microrganismos utilizados para o teste foram aqueles isolados do meio DRBC (leveduras) e do ágar nutriente (BAFE). Posterior a quantificação das colônias na placa, os morfotipos foram caracterizados de acordo com sua forma, tamanho, cor, purificados e observados em lâminas no microscópio. Em seguida, os isolados foram congelados em criotubos contendo 0,8 ml do meio específico para cada grupo e 0,8 ml de glicerol 40%. Para os testes, os isolados de leveduras e BAFE foram descongelados e reativados por microgota para obter biomassa suficiente para a inoculação no teste.

O teste de assimilação de ácido lático, foi feito utilizando o meio de cultura YNB Yeast Nitrogen Base, Difco). Após o meio ser autoclavado, foram acrescentados 9,4 ml de ácido lático 85%, para obter a concentração de 4% do ácido (considerando 200 ml). O meio de cultura pronto, foi colocado em placas de petri e a placa foi dividida em 24 quadrinhos. Em cada quadrinho foi inoculado 0,06 µl de cada isolado (leveduras e BAFE) e incubados em BOD a 28°C para leveduras e 37°C para BAFE por 48 horas. O resultado do teste foi considerado positivo pela observação do crescimento de biomassa dos isolados e negativo quando não houve crescimento. O mesmo meio contendo 5 ml de glicose 0,025M, foi utilizado como padrão positivo.

Para o teste de resistência ao ácido acético com os isolados de leveduras, foi utilizado um meio composto por glicose (100g/L), triptona (10g/L), extrato de levedura (10g/L) e ágar (20g/L), sendo testadas duas concentrações de ácido acético 0,5% e 1%. Após ser autoclavado, foram acrescentados a 200ml de meio, 1 ml do ácido acético glacial (98,9% de pureza), para a concentração final de 0,5% e 2 ml para a concentração final de 1%. Esse meio também foi colocado em placas de petri divididas em quadrinhos e cada um recebeu 6 µl de inóculo e armazenados em BOD por 48 horas. O teste feito para os isolados de BAFE, utilizou as mesmas concentrações de ácido acético e o meio de cultura utilizado foi o ágar nutriente. O resultado do teste foi considerado positivo pela observação do crescimento de biomassa dos isolados e negativo quando não houve crescimento.

4 Delineamento experimental e análise estatística

Nesta pesquisa, as variáveis MS, quantificação de BAFE, quantificação de leveduras, pH, ácido succínico, ácido lático, ácido acético, ácido propiônico e etanol foram analisadas em DIC em esquema fatorial ($4 \times 2 \times 4$), com quatro aditivos (controle, *Lactiplantibacillus plantarum*, *L. hilgardii* e a combinação de *L. plantarum* + *L. hilgardii*), dois teores de MS (16,8% e 24,3%) e quatro dias de exposição ao ar (0, 1, 3 e 6 dias). As variáveis estabilidade (h), tempo para alcançar a temperatura máxima (h) e temperatura máxima ($^{\circ}$ C) foram analisadas em DIC em esquema fatorial (4×2), com os quatro aditivos e os dois teores de MS. As variáveis foram analisadas com a função *lm* do pacote *stats* do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2021). Quando os tratamentos foram significativos pelo teste F da análise de variância, utilizou-se teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As hipóteses da análise de variância foram avaliadas nos resíduos do delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial ($4 \times 2 \times 4$) e no esquema fatorial (4×2), apenas a variável quantificação de leveduras não apresentou distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk ($P < 0,05$) as demais variáveis foram normais ($P > 0,05$), a homogeneidade de variâncias não foi violada sendo os resíduos homogêneos ($P > 0,05$) pela função *ncvTest* e no teste de independência de Durbin-Watson os resíduos não são correlacionados e houve independência ($P > 0,05$), a análise foi com a função *dwtest* do pacote *lmtest* do programa estatístico R.

Utilizou-se a estatística Modelos Lineares Generalizados (Generalized Linear Model - GLM) para a variável: quantificação de leveduras, na qual a melhor distribuição de probabilidade que se ajustou a essa variável foi a distribuição Poisson. Foi realizada a análise de *deviance* das variáveis no ensaio fatorial ($4 \times 2 \times 4$).

No presente estudo a análise de *deviance* foi realizada utilizando a função *anova* do pacote *MASS* do programa estatístico R. Para ajuste dos coeficientes do modelo utilizou-se a função *glm* para as variáveis foi a Poisson (*poisson*). Na análise de resíduos utilizou a função *hnp* do pacote *hnp* para verificação se o ajuste do modelo foi adequado.

A seguir tem o modelo para a quantificação de leveduras:

$$Y_i \sim \text{Poisson}(\mu_i),$$

Y_i : variável resposta;

μ_i segue uma distribuição de Poisson.

5 Resultados e discussão

5.1 Características das silagens após a abertura

A composição química e microbiológica do capim-elefante cv. BRS Capiáçu antes da ensilagem está apresentada na Tabela 1. A forrageira colhida com 90 dias de rebrota, apresentou 16,77% de MS e a forrageira colhida com 110 dias de rebrota, apresentou MS mais alta 24,26%. O teor de MS das silagens foi afetado apenas pelo teor de MS do capim fresco ($P < 0,0001$) e houve efeito do tempo de exposição aeróbia ($P = 0,067$) (Tabela 2). O efeito do teor de MS é devido a diferença no teor de MS da planta no momento do corte (16,77 e 24,26%). As forragens de capim-elefante cv. BRS Capiáçu utilizadas para o experimento, foram colhidas com duas maturidades. O aumento na concentração de FDN é explicado pelo aumento da idade de rebrotação da planta, porém os valores de FDN entre as duas MS tiveram pouca variação. De maneira geral os valores descritos para as variáveis da forragem antes de ensilar, estão dentro dos valores observados para esta forrageira (Tabela 1). Os valores dos ácidos orgânicos na forragem fresca, podem ser justificados pelo metabolismo de microrganismos epíficos, como também, pela presença de ácidos orgânicos nos tecidos da planta. Gutierrez e Faria 1978, encontraram predominantemente na parte aérea da planta de capim-elefante, os ácidos orgânicos cítrico e málico.

O teor de MS é um dos fatores que influenciam na qualidade final das silagens, bem como quando são expostas ao ar. Em silagens produzidas com teor de umidade acima de 80%, existe o risco de produzir produtos indesejáveis para a conservação da silagem, produção de efluentes e desenvolvimento de microrganismos deterioradores, como leveduras, enterobactérias e clostrídeos (JOBIM et al., 2007). Nessa pesquisa, as silagens com MS alta, apresentaram maiores concentrações de ácidos e menor quantificação de leveduras indicando que essas silagens tiveram um processo fermentativo mais adequado, refletindo na estabilidade aeróbia.

A população de enterobactérias e fungos filamentosos esteve abaixo do limite de detecção ($< 2,0$ log) em todas as silagens. A população de enterobactérias inicial, epífica da forragem fresca, não se desenvolveu durante o processo fermentativo das silagens. Segundo McDonald et al., 1991, o abaixamento do pH e a produção de ácidos orgânicos, principalmente os ácidos láctico e acético, provavelmente são responsáveis pela inibição desses microrganismos que estavam abaixo do limite de detecção nas silagens durante todos os tempos de exposição aeróbia. Os fungos filamentosos possuem crescimento lento na silagem quando exposta ao ar e só começam seu desenvolvimento após as leveduras iniciarem o processo de deterioração

(MUCK 2010). Nas silagens avaliadas nesse estudo, os fungos filamentosos também estavam abaixo do limite detectável.

A adição dos inoculantes afetou a população de leveduras ($P < 0,0001$), as silagens tratadas com *L. hilgardii*, apresentaram menor contagem de leveduras independente do teor de MS e dias de exposição aeróbia (média 1,54 log UFC). Houve efeito da interação entre dias de exposição aeróbia e o teor de MS sobre a quantificação de leveduras ($P < 0,0001$) (Tabela 2). Nos dois teores de MS, houve aumento na quantificação de leveduras. Entretanto na MS 1 (baixa) esse aumento iniciou com 1 dia de exposição ao ar, enquanto na MS 2 (alta) começou a aumentar a partir de 3 dias de exposição. A menor quantificação de leveduras foi observada na abertura do silo (tempo 0) e não diferiu entre os dois teores de MS nesse tempo. A maior quantificação de leveduras (em média 3,43log UFC/g) foi observada nas silagens com 3 e 6 dias de exposição aeróbia na MS 2, nos outros dias não houve diferença (Tabela 3).

Geralmente, a contagem elevada de leveduras na silagem é associada a maiores concentrações de etanol e menor estabilidade aeróbia. Entretanto é necessário conhecer a diversidade da levedura presente na silagem, já que algumas espécies podem ser utilizadoras de ácido lático e outras não (KUNG et al., 2018). Estudos mostraram que adicionar *L. buchneri*, uma cepa heterofermentativa, assim como *L. hilgardii*, aumenta a estabilidade aeróbia de várias silagens por inibir o crescimento de leveduras, que são responsáveis por iniciarem a deterioração aeróbia (DRIEHUIS et al., 2001). A combinação de inoculantes homofermentativo e heterofermentativo, atinge as leveduras de duas formas. A primeira é reduzindo a sua população no início da fermentação pela rápida acidificação do meio e a segunda é inibindo seu crescimento após a exposição da silagem ao ar (DRIEHUIS et al., 1999).

Houve interação entre inoculante microbiano, teor de MS e dias de exposição aeróbia sobre a população de BAFE ($P < 0,0001$) (Tabela 2). Ocorreu variação na quantificação de BAFE ao longo dos dias de exposição ao ar em todas as silagens, no entanto, não foi possível estabelecer um padrão de variação, sendo este dependente do tipo de inoculante e do teor de MS das silagens (Figura 1). Nas silagens controle, nos dois teores de MS, a quantificação de BAFE foi maior na abertura (tempo 0) reduzindo aos 3 ou 6 dias e aumentando novamente aos 6 dias.

No dia da abertura do silo (tempo 0), as silagens com MS baixa, tratadas com *L. plantarum*, *L. hilgardii* e a combinação *L. plantarum* + *L. hilgardii*, não apresentaram contagem para BAFE, diferente da silagem controle. Entretanto, nas silagens com MS alta, a contagem

de BAFE no tempo 0, foi mais alta ou semelhante aos outros tempos de exposição. Todas as silagens inoculadas e com MS baixa, no terceiro dia de exposição aeróbia, apresentaram maiores contagens de BAFE comparadas com a silagem controle (Figura 1). A silagem inoculada com *L. plantarum* apresentou diferenças entre os dois teores de MS, nos dias 0 e 1 de exposição aeróbia para a contagem de bactérias esporulantes. Nos dias 3 e 6, a contagem de BAFE não diferiu estatisticamente.

A comparação entre os teores de MS dentro de cada tempo e tratamento, mostrou que nas silagens controle (tempo 0 e 3 dias); *L. plantarum* (tempo 0 e 1 dia); *L. hilgardii* (tempo 0 e 1 dia) e a combinação *L. plantarum* + *L. hilgardii* (tempo 0, 1 e 6 dias), quanto maior o teor de MS, maior a quantificação de BAFE. As bactérias aeróbias formadoras de esporos, são um dos primeiros microrganismos a se desenvolverem após o início do processo de deterioração aeróbia (KUNG et al., 2018).

Houve interação entre os dias de exposição aeróbia e o teor de MS da silagem para os valores de pH ($P < 0,0001$) (Tabela 2). O valor de pH aumentou durante os dias de exposição aeróbia da silagem, mas esse aumento ocorreu de forma diferente de acordo com o teor de MS. Nas silagens com menor MS, os valores de pH aumentaram a partir de 3 dias de exposição, chegando a 7,33 com 6 dias de exposição aeróbia (Tabela 3). Já nas silagens com maior teor de MS, esse aumento ocorreu apenas aos 6 dias em relação a 1 e 3 dias. No tempo 0 a silagem com maior teor de MS apresentou maior pH, no entanto, nos tempos 3 e 6 dias, essas silagens apresentaram menor pH que as silagens com menor teor de MS (Tabela 3). As silagens da MS 1 (baixa), tiveram aumento no pH a partir de 1 dia de exposição aeróbia o que pode ser explicado pelo aumento também na população de leveduras a partir do tempo 1 dia, evidenciando que as leveduras nestas silagens consumiram ácido lático e conseguiram alterar o pH.

Tabela 1- Composição química e microbiológica do capim-elefante cultivar BRS Capiacu antes da ensilagem

Variável	MS baixa	MS alta
pH	6,2	6,2
Matéria seca (g/kg MF)	167,7	242,6
Concentração (g/kg MS)		
FDN ^a	725,6	766,2
Ácido acético	55,93	25,36
Ácido láctico	11,21	10,24
Ácido succínico	12,4	15,19
Etanol	1,76	1,04
População (log UFC ^b /g forragem)		
BAL ^c	9,18	9,31
Enterobactérias	5,64	6,08
Leveduras	6,07	6,20
Fungos filamentosos	2,53	2,63
Bactérias mesófilas aeróbias ^d	8,06	8,96
BAFE ^e	2,42	2,51

^aFibra em detergente neutro, ^bUnidades formadoras de colônia, ^cBactéria do ácido láctico, ^dMicrorganismos isolados do extrato da silagem de capim-elefante cv. BRS Capiacu, ^eBactérias aeróbias formadoras de esporos.

Tabela 2- Probabilidade para os efeitos contidos no modelo para análise de matéria seca (MS), pH, quantificação de microrganismos e metabólitos das silagens de capim-elefante cv. BRS Capiacu

Variável	Valor de <i>P</i>						
	Inoculante (I)	Matéria seca (MS)	EA ^a (D)	I x MS	I x D	MS x D	I x MS x D
MS	0,2154	<0,0001	0,0621	0,7937	0,7544	0,5113	0,9976
pH	0,3253	<0,0001	<0,0001	0,2704	0,1548	<0,0001	0,1103
^b BAFE	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1130	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Leveduras	<0,0001	0,0812	<0,0001	0,0880	0,2739	<0,0001	0,7007
Ácido succínico	0,7105	0,1083	<0,0001	0,2698	0,0978	<0,0001	0,9257
Ácido láctico	0,1160	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0125	<0,0001	<0,0001
Ácido acético	0,9162	<0,0001	0,0078	0,0322	0,8265	<0,0001	0,6844
Ácido propiônico	0,2494	<0,0001	0,0389	0,1349	0,2258	<0,0001	0,2127
Etanol	0,0637	<0,0001	<0,0001	0,5070	<0,0001	<0,0001	0,0183

^aExposição aeróbia, ^bBactérias aeróbias formadoras de esporos

Houve interação entre os dias de exposição aeróbia e o teor de MS da silagem para a concentração de ácido succínico, acético e propiônico ($P < 0,0001$) (Tabela 2). A concentração de ácido succínico teve um aumento ao decorrer dos dias de exposição aeróbia na silagem com

a maior teor de MS, em que o maior valor observado, foi de 4,88. Nas silagens com menor teor de MS, houve redução aos 3 dias e depois aumento em relação aos tempos iniciais. As silagens com teor de MS de 24,3%, apresentaram a maior concentração de ácido succínico comparadas com as silagens com teor de MS de 16,8%, apenas nos tempos 3 e 6 dias. A concentração de ácido succínico pode estar relacionada com o metabolismo de leveduras e de grande parte das BAL encontradas na silagem (CARVALHO et al., 2014; ZEIKUS et al., 1999). É possível perceber neste estudo que nos últimos tempos de exposição aeróbia houve maior contagem de leveduras nas silagens com MS 2, o que pode explicar a maior concentração de ácido succínico também nesses tempos.

As silagens com teor de MS de 24,3%, apresentaram a maior concentração de ácido acético comparadas com as silagens com teor de MS de 16,8%, em todos os tempos de exposição. Nestas silagens, durante os dias em que a silagem foi exposta ao ar, houve um aumento na concentração desse ácido, chegando ao valor de 46,30 g/kg MS. Nas silagens com menor teor de MS houve redução nos teores de ácido acético ao longo da exposição aeróbia (Tabela 3). A concentração de ácido acético na silagem traz benefícios em relação a estabilidade aeróbia por inibir o desenvolvimento de leveduras, após a exposição aeróbia. A concentração desse ácido quando maior que 3-4% na silagem é associada com a inoculação de uma cepa heterofermentativa, que converte ácido láctico em ácido acético (KUNG et al., 2018).

Entre os dois teores de matéria seca, houve diferença para a concentração de ácido propiônico. A concentração desse ácido não foi diferente durante os dias de exposição aeróbia para a silagem com MS de 16,8%. Já a silagem com MS de 24,3%, teve um aumento na concentração de ácido propiônico aos 6 dias, cujo valor foi de 44,86 g/kg MS (Tabela 3). O ácido propiônico tem propriedades fungicidas e também possui potencial para melhorar a estabilidade aeróbia (GRANT & FERRARETTO).

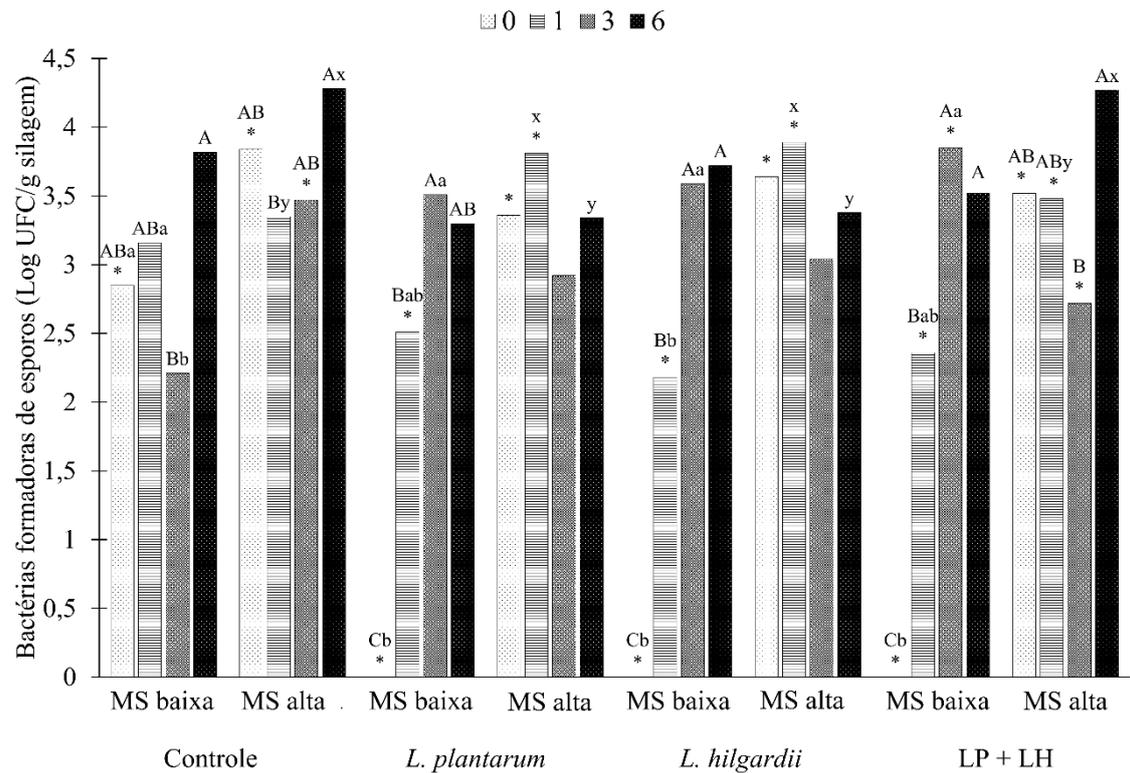


Figura 1 – Interação entre inoculante microbiano, teor de MS e dias de exposição aeróbia sobre a população de BAFE. Letras maiúsculas (A-C) comparam os dias de exposição aeróbia em cada inoculante na mesma MS. Letras minúsculas (a-b) comparam os inoculantes no mesmo dia de exposição aeróbia na MS baixa. Letras minúsculas (x-y) comparam os inoculantes no mesmo dia de exposição aeróbia na MS alta. * Indica diferença entre MS dentro do mesmo tratamento no mesmo dia de exposição aeróbia. As médias que não apresentam letras são estatisticamente iguais.

Tabela 3- Efeito da matéria seca no pH, contagem de leveduras e na concentração dos ácidos succínico, acético e propiônico da silagem de capim-elefante cv. BRS Capiapu, com 0, 1, 3 e 6 dias de estabilidade aeróbia

Exposição aeróbia (dias)	MS baixa	MS alta	EPM*
pH			
0	4,44 Cb	4,72 ABa	0,148
1	4,43 Ca	4,55 Ba	
3	6,85 Ba	4,59 Bb	
6	7,33 Aa	5,01 Ab	
Leveduras (log UFC/g)			
0	<2,00 Ba	<2,00 Ba	0,472
1	2,88 Aa	<2,00 Bb	
3	3,31 Aa	3,31 Aa	
6	3,47 Aa	3,55 Aa	
Ácido Succínico (g/kg MS)			
0	3,12 aA	2,16 aB	0,599
1	3,52 Aa	2,72 Ba	
3	1,65 Bb	3,36 Ba	
6	3,23 Ab	4,88 Aa	
Ácido Acético (g/kg MS)			
0	12,42 ABb	32,88 Ca	2,491
1	12,91 Ab	35,69 BCa	
3	4,37 Cb	39,63 Ba	
6	7,18 BCb	46,30 Aa	
Ácido Propiônico (g/kg MS)			
0	3,29 Ab	38,03 Ba	2,544
1	3,04 Ab	33,43 Ba	
3	2,04 Ab	36,93 Ba	
6	0,0 Ab	44,86 Aa	

As médias nas colunas com letras maiúsculas diferentes, diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$). E as médias nas linhas com letras minúsculas diferentes, diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$). *Erro padrão da média.

Houve interação entre inoculante microbiano, teor de MS e dias de exposição aeróbia sobre a concentração de ácido láctico ($P < 0,0001$). As silagens com MS alta apresentaram menores concentrações do ácido, comparadas com as silagens de MS baixa, quase todos os tratamentos, com exceção da silagem controle e inoculada com *L. hilgardii* no tempo 3, quando o teor de ácido láctico foi mais alto na silagem com MS maior. Nas silagens com MS baixa, nos dias 3 e 6 de exposição ao ar, tratadas com *L. hilgardii*, combinação de *L. plantarum* + *L. hilgardii* e controle, a concentração de ácido láctico estava abaixo do limite de detecção (Figura 2). Em silagens inoculadas com cepas homofermentativas a tendência é que a

concentração de ácido láctico seja maior nessas silagens, devido ao seu metabolismo (DRIEHUIS et al., 2018).

Houve interação entre inoculante microbiano, teor de MS e dias de exposição aeróbia sobre a concentração de etanol ($P < 0,0001$) (Tabela 2). Nas silagens controle com MS baixa após o tempo 0, não houve alteração nos teores de etanol ao longo dos dias de exposição aeróbia, enquanto que na MS alta o teor de etanol que era mais alto, reduziu. Nas silagens inoculadas com *L. plantarum* e *L. hilgardii*, na MS alta, houve redução no teor de etanol com a exposição aeróbia. Nas silagens inoculadas com *L. plantarum* + *L. hilgardii*, houve aumento e depois redução do teor de etanol na MS baixa, enquanto que na MS alta não houve diferença entre os dias de exposição nesse tratamento.

Na abertura (tempo 0), com teor de MS baixo, silagens controle e tratadas com *L. plantarum* e *L. hilgardii* apresentaram valores semelhantes e maiores concentrações de etanol (12,00; 11,64; 7,80 respectivamente). No terceiro e sexto dia de exposição aeróbia, as silagens com MS baixas nos tratamentos controle, *L. plantarum*, *L. hilgardii* e a combinação de *L. plantarum* + *L. hilgardii*, apresentaram as menores concentrações de etanol e não diferiram entre si.

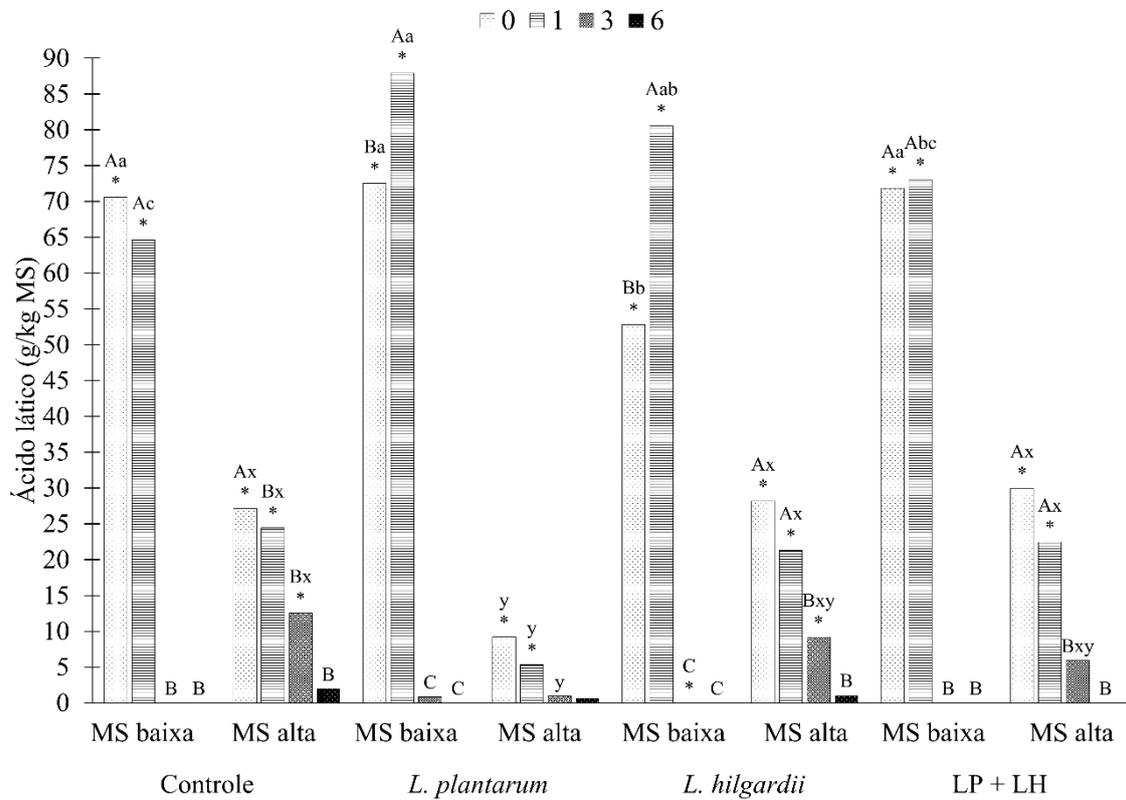


Figura 2- Interação entre inoculante microbiano, teor de MS e dias de exposição aeróbia sobre a concentração de ácido láctico. Letras maiúsculas (A-C) comparam os dias de exposição aeróbia em cada inoculante na mesma MS. Letras minúsculas (a-b) comparam os inoculantes no mesmo dia de exposição aeróbia na MS baixa. Letras minúsculas (x-y) comparam os inoculantes no mesmo dia de exposição aeróbia na MS alta. * Indica diferença entre MS dentro do mesmo tratamento no mesmo dia de exposição aeróbia. As médias que não apresentam letras são estatisticamente iguais.

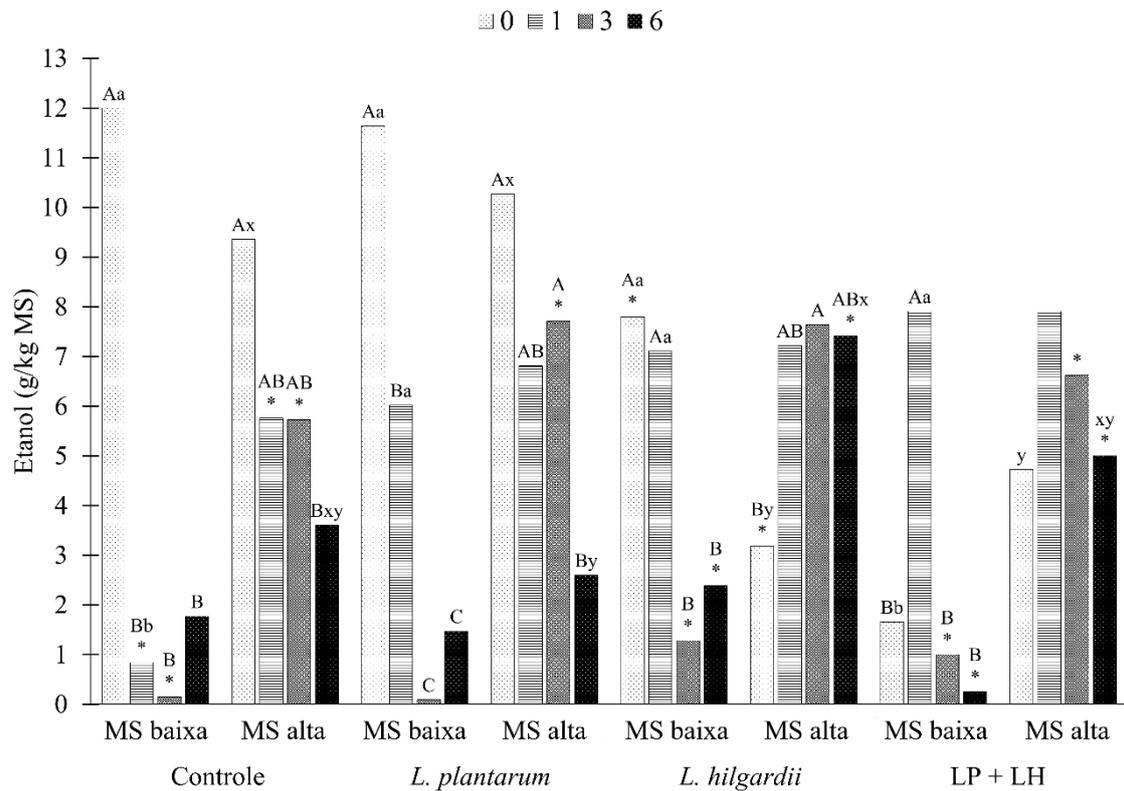


Figura 3- Interação entre inoculante microbiano, de MS e dias de exposição aeróbia sobre a concentração de etanol. Letras maiúsculas (A-C) comparam os dias de exposição aeróbia em cada inoculante na mesma MS. Letras minúsculas (a-b) comparam os inoculantes no mesmo dia de exposição aeróbia na MS baixa. Letras minúsculas (x-y) comparam os inoculantes no mesmo dia de exposição aeróbia na MS alta. * Indica diferença entre MS dentro do mesmo tratamento no mesmo dia de exposição aeróbia. As médias que não apresentam letras são estatisticamente iguais.

Houve efeito do inoculante microbiano ($P = 0,0416$) e efeito do teor de MS para temperatura máxima e estabilidade aeróbia das silagens ($P < 0,0001$). Em relação ao tempo necessário para atingir a temperatura máxima, houve interação entre inoculante microbiano e teor de MS ($P = 0,001$).

As silagens tratadas com *L. plantarum*, *L. hilgardii*, combinação de *L. plantarum* + *L. hilgardii* e a silagem controle, com MS alta, apresentaram os melhores resultados, comparadas com as silagens de MS baixa (Tabela 4). A inoculação com *L. plantarum* e *L. hilgardii* separadamente, resultou em silagens que demoraram mais tempo para atingir a temperatura máxima (média de 47,3 h), considerando silagens de MS baixa. A silagem tratada com *L. hilgardii* apresentou a menor temperatura máxima em relação ao tratamento controle (32,59 °C) (Tabela 4). A estabilidade aeróbia não diferiu estatisticamente entre os tratamentos com média de 124,8 horas.

Em relação às outras silagens, a silagem controle com MS baixa apresentou temperatura mais elevada após 24h, chegando à temperatura média de 38,5°C. Essa silagem foi a primeira a alcançar a temperatura máxima, com 35h em aerobiose. As silagens dos tratamentos com MS alta, tiveram o aumento na temperatura próximo nos primeiros dias de exposição aeróbia, vindo a diferenciar após 3 dias de exposição ao ar (Figura 1). Nos resultados de temperatura ao longo dos dias de exposição aeróbia, a silagem controle com MS1 teve maior aumento de temperatura em relação aos outros tratamentos. Isso mostra que os inoculantes adicionados e o teor de MS da silagem, influenciam sobre os parâmetros de estabilidade aeróbia, como a temperatura. As silagens com maior teor de MS e tratadas com a cepa heterofermentativa, podem promover maior estabilidade das silagens e menor temperatura máxima devido a produção de ácido acético e menor população de microrganismos deterioradores, como as leveduras.

Tabela 4- Temperatura máxima (°C), estabilidade aeróbia (h) e tempo para alcançar a temperatura máxima (h)

Tratamento	Temperatura máxima (°C)	Estabilidade aeróbia (h)	MS baixa	MS alta
			Tempo para alcançar a temperatura máxima (h)	Tempo para alcançar a temperatura máxima (h)
Controle	34,87 A	116,6A	35,0 Cb	226,8 Aa
<i>L. plantarum</i>	33,51 AB	121,4A	49,4 Ab	225,7 Aa
<i>L. hilgardii</i>	32,59 B	143,1A	45,1 Ab	223,8 Aa
LP+LH	33,53 AB	118,2A	41,7 BCb	224,2 Aa

As médias nas colunas com letras maiúsculas diferentes, diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$). Médias nas linhas seguidas por letras minúsculas diferentes, comparando MS, diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

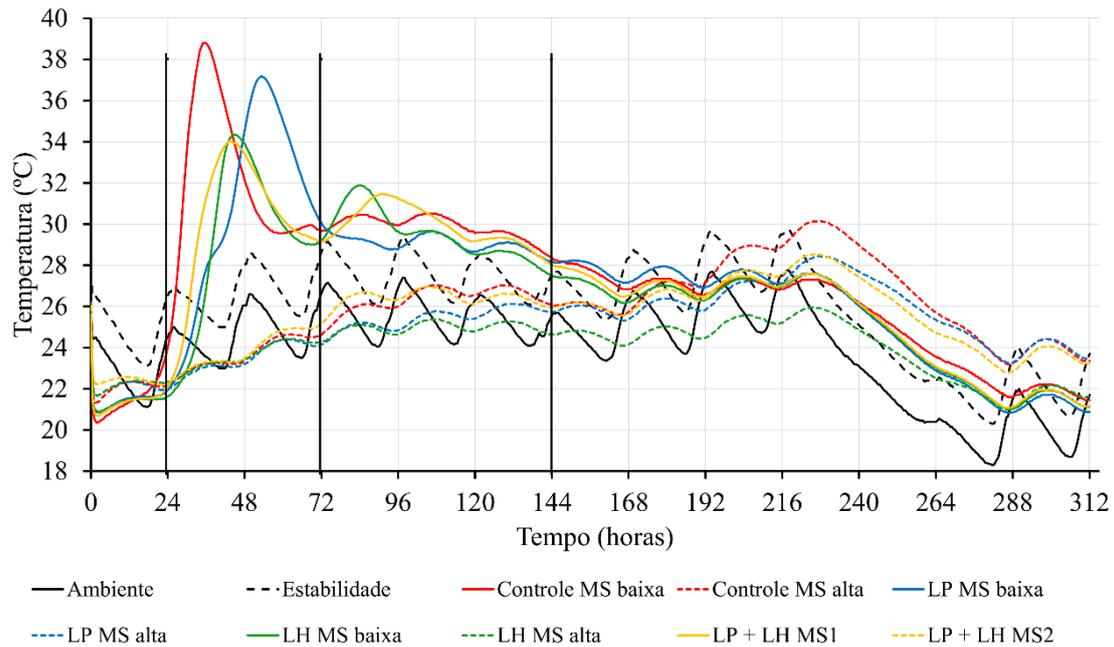


Figura 4- Temperatura das silagens em todos tratamentos ao longo dos dias de exposição aeróbia.

5.2 Características dos microrganismos isolados da silagem

As leveduras foram isoladas das silagens sob os diferentes tratamentos em todos os tempos de exposição aeróbia, entretanto nas silagens controle e com *Le. hilgardii* no tempo zero, não houve crescimento de leveduras (Tabela 5). Em geral se observa um aumento no número de morfotipos com o aumento do tempo de exposição ao ar, o que pode indicar aumento da diversidade. Nas silagens controle e no tempo zero, 62% dos isolados do meio DRBC, são capazes de utilizar ácido lático como única fonte de carbono, enquanto que após um dia de exposição, essa porcentagem foi de 48%. Nas silagens inoculadas pelo menos 50% dos isolados utilizam ácido lático como única fonte de carbono, sendo que essa porcentagem aumenta com o tempo de exposição (Tabela 5). A tolerância a 0,5% de ácido acético em geral foi alta, acima de 80% dos isolados, na maioria das silagens. O ácido acético na concentração de 1% foi mais eficiente em impedir o crescimento da maior parte das leveduras nessas silagens. As leveduras isoladas das silagens tratadas com a combinação *La. plantarum* + *Le. hilgardii* são as que mais utilizaram ácido lático e as mais tolerantes ao ácido acético, em relação aos outros tratamentos.

Tabela 5- Características das leveduras isoladas das diferentes silagens em meio DRBC em relação a assimilação de ácido láctico e tolerância ao crescimento em meio contendo 0,5 e 1,0% de ácido acético.

Exp. aeróbia	Número total de isolados		Ác. láctico		Ác. Acético 0,5%		Ác. Acético 1,0%	
	MS baixa	MS alta	MS baixa	MS alta	MS baixa	MS alta	MS baixa	MS alta
Controle								
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	14	2	8	2	14	2	1	0
3	25	9	13	0	22	9	2	1
6	34	11	13	9	25	10	8	7
Total	73	22	34	11	61	21	11	8
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>								
0	-	14	-	-	-	7	-	-
1	21	-	-	-	17	-	-	-
3	25	11	18	5	21	11	8	2
6	19	18	14	18	19	18	7	10
Total	65	43	32	23	57	36	15	12
<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>								
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	6	-	4	-	6	-	-	-
3	12	11	7	10	12	11	1	1
6	23	2	16	1	20	2	7	0
Total	41	13	27	11	38	13	8	1
<i>La. plantarum + Le. hilgardii</i>								
0	-	17	-	12	-	15	-	3
1	8	2	5	-	8	-	-	-
3	17	14	16	14	16	14	13	4
6	20	17	15	16	20	17	4	5
Total	45	50	36	42	44	46	17	12

Meio acrescido com glicose foi utilizado como padrão positivo.

As bactérias aeróbias formadoras de esporos foram isoladas do meio ágar nutriente. O número de morfotipos em cada tratamento e durante os tempos de exposição aeróbia, variou de 3 (silagem inoculada com *La. plantarum* tempo 0) a 7 (silagens com *Le.hilgardii*, tempos 0 e 1 e inoculadas com *La. plantarum + Le.hilgardii* tempo 6). A porcentagem de isolados de bactérias capazes de utilizar ácido láctico como fonte de carbono e tolerantes à presença de ácido acético, foi baixa (menos que 23%). Nas silagens controle a partir do dia 1 de exposição aeróbia, *La. plantarum* a partir do dia 3, *Le.hilgardii* e *La. plantarum + Le.hilgardii* a partir do dia 6 de exposição aeróbia, foi possível encontrar microrganismos que utilizam ácido láctico como fonte de carbono. Nas silagens inoculadas com *La. plantarum* todos os isolados foram capazes de utilizar glicose com exceção dos isolados no tempo 3 de exposição aeróbia. A assimilação de ácido láctico é uma habilidade que algumas espécies de

leveduras e BAFE possuem de crescer aerobiamente, utilizando esse ácido como única fonte de carbono. Esses microrganismos utilizadores de ácido láctico, são responsáveis por iniciar a deterioração aeróbia das silagens. Os microrganismos que são resistentes ao ácido acético, não são controlados pela produção desse ácido pelas BAL heterofermentativas. A identificação de microrganismos leva em consideração testes como esses para confirmação dos resultados (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Tabela 6- Características das bactérias isoladas das diferentes silagens em meio AN em relação a assimilação de ácido láctico, e tolerância ao crescimento em meio contendo 0,5 e 1,0% de ácido acético.

Exp. aeróbia	Número total de isolados		Glicose		Ác. láctico		Ác. Acético 0,5%		Ác. Acético 1,0%	
	MS baixa	MS alta	MS baixa	MS alta	MS baixa	MS alta	MS baixa	MS alta	MS baixa	MS alta
Controle										
0	7	16	7	14	-	-	-	1	-	-
1	-	9	-	5	-	1	-	-	-	-
3	19	13	1	11	6	1	5	1	-	-
6	27	9	3	1	6	1	8	-	8	-
Total	53	47	11	31	12	3	13	2	8	0
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>										
0	5	7	5	7	-	-	-	-	-	-
1	1	15	1	6	-	-	-	-	-	-
3	11	-	-	-	-	-	1	-	1	-
6	13	10	0	4	-	2	-	2	-	2
Total	30	32	6	17	0	2	1	2	1	2
<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>										
0	1	16	1	15	-	-	-	1	-	-
1	1	14	1	9	-	-	-	-	-	-
3	9	9	3	8	-	2	2	3	2	-
6	14	4	3	1	1	-	-	-	-	-
Total	25	43	8	33	1	2	2	4	2	0
<i>La. plantarum + Le. hilgardii</i>										
0	2	11	2	10	-	-	-	-	-	-
1	0	7	-	7	-	-	-	-	-	-
3	12	5	8	4	-	-	2	-	2	-
6	14	15	2	1	-	2	1	2	-	1
Total	28	38	12	22	0	2	3	2	2	1

Meio ágar nutriente foi utilizado como padrão positivo.

6 Conclusão

Os tratamentos avaliados modificaram a população e a diversidade metabólica de leveduras e de bactérias formadoras de esporos. Leveduras isoladas das silagens com MS baixa, foram mais eficientes em utilizar ácido láctico como fonte de carbono e foram mais resistentes à presença de ácido acético. As silagens com teor de matéria seca alto (24,3%) apresentaram maior concentração de ácido acético e maior tempo para alcançar a temperatura máxima. A inoculação com CNCM I-4785 82 (*Lentilactobacillus hilgardii*) e CCMA 1394 (*Lactiplantibacillus plantarum*) na forragem com maior teor de matéria seca resultou em silagens com maior estabilidade aeróbia. A inoculação com CNCM I-4785 82 se destacou por apresentar menor contagem de leveduras e menor temperatura após a exposição ao ar, dessa forma a silagem esteve melhor preservada ao longo dos dias de exposição aeróbia.

7 Referências

AMARAL, R.C.; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A. Estabilidade aeróbia de silagens do capim-marandu submetidas a diferentes intensidades de compactação na ensilagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 6, p. 977-983, 2008.

ARCURI, P. B.; CARNEIRO, J. C.; LOPES, F. C. F. Microrganismos indesejáveis em forragens conservadas: efeito sobre o metabolismo de ruminantes. In: REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. (Org.). **Volumosos na produção de ruminantes: valor alimentício de forragens**. Jaboticabal: EMBRAPA, p. 51-69, 2003.

ÁVILA, C. L. S. et al. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 2, p. 940-951, 2014.

ÁVILA, C.L.S. **Isolamento e uso de *Lactobacillus buchneri* na ensilagem de capim-mombaça e cana-de-açúcar**. 2007. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BERNARDES, T.F. **Controle da deterioração aeróbia de silagens**. 2006. Tese (Doutorado em Zootecnia) — Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

CARVALHO, B. F. et al. Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v. 195, p. 1-13, 2014.

DANIEL, J. L. P. et al. Production and utilization of silages in tropical areas with focus on Brazil. **Grass and Forage Science**, v. 74, n. 2, p. 188-200, 2019.

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, p. 562-567, 2003.

DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, S. J. W. H., & VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v. 56, p. 330-343, 2001.

DRIEHUIS, F., WILKINSON, J. M., JIANG, Y., OGUNADE, I. and ADESOGAN, A. T. Silage review: Animal and human health risks from silage. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 4093-4110, 2018.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 22, p. 212-216, 2000.

DUNIÈRE, L. et al., D.; Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. **Animal Feed Science and Technology**, v. 182, p. 1-15, 2013.

ELFERINK, S. O., DRIEHUIS, F. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: A review. **The veterinary quarterly**, v. 22, n. 4, p. 212-2016 2000.

EL-SHANAWANY, A. A.; MOSTAFA, M. E.; BARAKAT, A. Fungal populations and Mycotoxins in silage in Assuit and Sohag governorates in Egypt, with special reference to characteristic Aspergilli toxins. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 159, n. 2, p. 281-289, 2005.

FERREIRA, D.J., LANA, R.P., ZANINE, A.M., SANTOS, E.M., VELOSO, C.M., RIBEIRO, G.A. Silage fermentation and chemical composition of elephant grass inoculated with rumen strains of *Streptococcus bovis*. **Anim. Feed Sci. Technol**, v. 183, p. 22-28, 2013.

FLYTHE, M.D.; RUSSELL, J. B. The effect of pH and a bacteriocin (bovici HC5 on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade amino acids in ensiled plant materials. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47. p. 215-222, 2004.

GEBREHANNA, M. M. et al. Silage effluent management: a review. **Journal of environmental management**, v. 143, p. 113-122, 2014.

GIFFEL, M. C. T. et al. Bacterial spores in silage and raw milk. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 81, n. 1/4, p. 625-630, 2002.

GONÇALEZ, D. A. Capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) cv. Roxo de Botucatu. **B. Indústr. anim.**, Nova Odessa, p. 141-142, 1985.

GRANT, R. J. and FERRARETTO, L. F. Silage review: Silage feeding management: Silage characteristics and dairy cow feeding behavior. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 4111-4121, 2018.

GUTIERREZ, L.E. & FARIA, V.P. Influência da intensidade do murchamento sobre o poder tampão, proteínas e ácidos orgânicos do capim-Elefante (*Pennisetum purpureum*). **O Solo**, Piracicaba, v. 70(2), p. 48-52, 1978.

HARRISON, J. H.; BLAUWIEKEL, R.; STOKES, M. R. Fermentation and utilization of grass silage. **Journal of dairy science**, v. 77, n. 10, p. 3209-3235, 1994.

JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G.; REIS, R. A.; SCHMIDT, P. Methodological advances in evaluation of preserved forage quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 101-109, 2007.

JONSSON, A. & PAHLOW, G. Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures. **Animal research and development**, v. 20, p. 7-22, 1984.

KUNG JR, L. et al. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 4020-4033, 2018.

KUNG JR. L. Effects of microbial additives in silages: facts and perspectives. In: ZOPOLLATTO M., MURARO G.B., NUSSIO L.G. (eds) International Symposium on Forage Quality and Conservation. Piracicaba, Sao Paulo, Brazil: FEALQ. p. 7-22, 2009.

KUNG JR., L., SHAVER, R. D., GRANT, R. J., and SCHMIDT, R. J. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 4020-4033, 2018.

KUNG JR., L.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Eds.) **Silage science and technology**. Wisconsin: ASA; CSSA; SSSA, p. 305-360, 2003.

LAMBERT, R. J., and STRATFORD, M. Weak acid preservatives: Modeling microbial inhibition and response. **J. Appl. Microbiol.** v. 86, p. 157-164, 1999.

LIMA, J. A.; EVANGELISTA, A. R. **Silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum)**. LAVRAS: UFLA, 2001.

LINDGREN, S.; OLDENBURG, E.; PAHLOW, G. Influence of microbes and their metabolites on feed and food quality. In: general meeting of the european grassland federation, La Rochelle. **Proceedings...** La Rochelle, p. 503-511, 2002.

LOURES, D. R. S. **Características do efluente e composição químico-bromatológica da silagem sob níveis de compactação e de umidade do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum), cv. Cameroon**. 2000. Tese (Mestrado em Zootecnia) Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MAHANNA, B. Proper management assures high-quality silage, grains. **Feedstuffs**, Minnetonka, v. 10, p. 12-56, 1994.

MAY, J. J. Respiratory problems associated with work in silos. In: NATIONAL SILAGE PRODUCTION CONFERENCE, Syracuse. **Proceedings...** Syracuse. p. 283-290, 1993.

MCDONALD, P.J., HENDERSON, A.R. and HERON, S.J.E. The biochemistry of silage. 2^a ed. **Mallow Chalcombe Publications**. p. 340, 1991.

MONÇÃO, F. P. et al. Yield and nutritional value of BRS Capiacu grass at different regrowth ages. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, p. 2045-2056, 2019

MONTEIRO, I. J. G., ABREU, J. G., CABRAL, L. D. S., RIBEIRO, M. D., REIS, R. H. P. Silagem de capim-elefante aditivada com produtos alternativos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 33, n. 4, p. 347-352, 2016.

MORAN, J. P.; WEINBERG, G.; ASHBELL, Y. H.; OWEN, T. R. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: **international silage conference**. Proceedings. Aberystwyth: University of Wales Aberystwyth, p. 162-163, 1996.

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 183–191, 2010.

MUCK, R.E.; PITT, R.E. Aerobic deterioration in corn silage relative to the silo face. **Transactions of the ASAE**, v.37, n.3, p.735-743, 1994.

MUCK, R.E.; PITT, R.E. Aerobic losses at the silo face. **American Society of Agriculture and Engineer**, n.92, p.1003.1992.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; DIAS, F. N. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. In: Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas, 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, p. 127-145, 2001.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, p. 31-94, 2003.

PEREIRA, A. V.; AUAD, A. M.; LÉDO, F. J. S.; BARBOSA, S. *Pennisetum purpureum*. In: FONSECA, D. M.; MARTUSCELLO, J. A. (Ed) **Plantas Forrageiras**. Viçosa: UFV, cap. 6, p. 197-219, 2010.

PEREIRA, A. V.; LEDO, F. J. S.; MORENZ, M. J. F.; LEITE, J. L. B.; SANTOS, A. M. B.; MARTINS, C. E.; MACHADO, J. C. BRS Capiaçú: cultivar de capim-elefante de alto rendimento para produção de silagem. **Comunicado técnico**. Juiz de Fora, n. 79, 2016.

QUEIROZ, O. C. M. et al. Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4132-4142, 2018.

REIS, R.A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. **Forragicultura: Ciência, Tecnologia e Gestão dos Recursos Forrageiros**. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, v. 2000. p.714, 2014.

RENGSIRIKUL, K. et al. Effects of inter-cutting interval on biomass yield, growth components and chemical composition of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach) cultivars as bioenergy crops in Thailand. **Grassland Science**, v. 57, n. 3, p. 135–141, 1 set.2011.

ROSA, P. P.; SILVA, P. M.; CHESINI, R. G.; OLIVEIRA, A. P. T.; SEDREZ, P. A.; FARIA, M. R.; LOPES, A. A.; ROLL, V. F. B.; FERREIRA O. G. L. Características do Capim Elefante *Pennisetum purpureum* (Schumach) e suas novas cultivares BRS Kurumi e BRS Capiaçú. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 25, ns. 1/2, p. 70-84, 2019.

ROTZ, C. A.; MUCK, R. E. Changes in forages quality during harvest and storage. In: National conference on forage quality, evaluation, and utilization held at the university of nebraska, 1994, Lincoln. **Proceedings...** Lincoln, p. 828-868, 1994.

SANTOS, A.O. **Caracterização de silagens de milho produzidas em minas gerais e caracterização metabólica e genotípica de bactérias do ácido láctico isoladas dessas silagens**. 2016. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) — Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVEIRA, F.A. **Seleção de leveduras fermentadoras de xilose e análise do exometaboloma de *Meyerozyma guilliermondii* ufv-1**. 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) — Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

TOSI, P.; MATTOS, W.R.S.; TOSI, H. et al. Avaliação do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) Cultivar Taiwan A-148, ensilado com diferentes técnicas de redução de umidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 5, p. 947-954, 1999.

VELDMAN, A., MEIJS, J.A.C., BORGGREVE, G.J., HEERES-VAN DER TOL, J.J. **Anim. Prod**, v. 55, p. 163-168, 1992.

WOOLFORD, M. K. The detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, n. 2, p. 101-116, 1990.

ZEIKUS J.G., JAIN M.K. and ELANKOVAN P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 545–552, 1999.