



CARINA DOS SANTOS CELESTINO

**CEPA EPIFÍTICA DE *Lentilactobacillus farraginis* EM
CULTURA ÚNICA OU CO-CULTURA NA ENSILAGEM DE
PLANTA INTEIRA DE MILHO.**

LAVRAS-MG

2025

CARINA DOS SANTOS CELESTINO

CEPA EPIFÍTICA DE *Lentilactobacillus farraginis* EM CULTURA ÚNICA OU CO-CULTURA NA ENSILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE MILHO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr(a). Carla Luiza da Silva Ávila
Orientadora

Dr(a). Beatriz Carvalho
Co-orientadora

**LAVRAS-MG
2025**

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

Celestino, Carina dos Santos.

Cepa epitífica de *Lentilactobacillus farraginis* em cultura única ou co-cultura na
ensilagem de planta inteira de milho / Carina dos Santos Celestino. - 2025.
58 p. : il.

Orientadora: Carla Luiza da Silva Ávila

Coorientadora: Beatriz Ferreira Carvalho

Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade Federal de Lavras, 2025.

Bibliografia.

1. bactérias do ácido láctico. 2. pH. 3. heterofermentativo. 4. estabilidade
aeróbica. I. Ávila, Carla Luiza da Silva. II. Carvalho, Beatriz Ferreira. III. Universidade
Federal de Lavras. IV. Título.

CARINA DOS SANTOS CELESTINO

CEPA EPIFÍTICA DE *Lentilactobacillus farraginis* EM CULTURA ÚNICA OU CO-CULTURA NA ENSILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE MILHO

EPIPHYTIC STRAIN OF *Lentilactobacillus farraginis* IN SINGLE CULTURE OR CO-CULTURE IN WHOLE CORN PLANT SILAGE

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 31 de maio de 2025.

Dr(a) Carla Luiza da Silva Ávila UFLA

Dr(a) Beatriz Ferreira Carvalho UFLA

Dr(a) Cíntia Lacerda Ramos UFVJM

Prof. Dr(a). Carla Luiza da Silva Ávila
Orientadora

Dr(a). Beatriz Carvalho
Co-orientadora

**LAVRAS-MG
2025**

AGRADECIMENTOS

A Deus, toda honra e toda glória por ter me sustentado até aqui. Todo louvor a Ti, aquele que tudo em mim realizou.

Ao meu esposo Leandro, pelo incentivo, companheirismo, amor e paciência durante essa trajetória. Obrigada por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, o seu abraço restaura minhas forças e o seu olhar me coloca de pé.

Aos meus pais, Jaina Luiza e Antônio, por todas as palavras de aconchego e por todo amor incondicional, vocês são meu suporte. Obrigada por serem exemplo de honestidade, humildade e sabedoria, tenho orgulho da minha origem.

Ao meu irmão e padrinho, Alisson, pelos inúmeros conselhos, conversas e palavras encorajadoras. Obrigada por ser mais que um irmão, um companheiro para todas as horas, inclusive as horas noturnas, você é o meu apoio que sempre impulsiona a viver os meus sonhos.

A minha orientadora, Carla, e coorientadora, Beatriz, pelo carinho, compreensão e conhecimento compartilhado e por toda orientação durante esses dois anos. Obrigada pela paciência, ajuda, conselhos e confiança.

Ao Grupo de Pesquisa em Microbiologia de Silagem, todos os colegas que trabalharam comigo durante esse tempo. Obrigada pela ajuda e por todo conhecimento compartilhado. A doutoranda Viviane, pela ajuda, atenção e contribuição na condução do experimento.

À Universidade Federal de Lavras, e em especial ao Programa de Microbiologia Agrícola, a todos os professores, técnicos e funcionários, pela estrutura e todos os ensinamentos transmitidos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

A todos que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente e torceram para que eu chegasse até aqui.

MUITO OBRIGADA!

“Minha filha, que o teu coração se encha de alegria. Eu, o Senhor, estou contigo. Nada temas, estás em meu coração.” (Diário de Santa Faustina §1133)

RESUMO

A ensilagem da planta inteira de milho é uma estratégia para a conservação desse alimento. A aplicação de inoculantes na silagem pode promover melhorias significativas no processo fermentativo, acelerando a queda no pH e inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis. Objetivou-se avaliar o efeito de dois inoculantes comerciais e de uma cepa epifítica na silagem de planta inteira de milho após 14 e 60 dias de estocagem. Foram utilizados 40 silos experimentais sendo 4 repetições para cada tratamento: controle (CTR) sem inoculante, inoculante comercial 1 (IC1) 8 log UFC/g, inoculante comercial 2 (IC2) 8 log UFC/g, *Lentilactobacillus farraginis* (LF) 10 log UFC/g e; IC1+LF 9 log UFC/g. Após 14 e 60 dias de estocagem as silagens foram amostradas e analisadas de acordo com parâmetros microbiológicos, químicos e estabilidade aeróbia. Os resultados indicaram que o pH não diferiu significativamente entre os tratamentos (média de 3,78), mantendo-se dentro da faixa ideal para conservação. A perda de MS foi menor nos tratamentos LF e IC1+LF, enquanto a FDN reduziu ao longo do tempo, exceto em IC1+LF. A população de BAL foi maior em LF e IC1+LF, especialmente após 60 dias, enquanto a contagem de leveduras diminuiu significativamente nesses tratamentos. Aos 60 dias de estocagem, a produção de ácido acético e 1,2-propanodiol foi mais elevada em LF e IC1+LF, esses tratamentos também apresentaram maior estabilidade aeróbia (168 horas em IC1+LF). O tratamento IC1+LF também apresentou menor temperatura máxima durante a exposição ao ar, indicando menor atividade microbiana deteriorante. Conclui-se que a combinação do inoculante comercial com *L. farraginis* (IC1+LF) foi a mais eficaz na melhoria da qualidade fermentativa e estabilidade aeróbia da silagem, destacando-se pela produção de metabólitos inibidores de microrganismos indesejáveis e pela preservação dos nutrientes. Esses resultados reforçam o potencial de cepas heterofermentativas, como *L. farraginis*, no desenvolvimento de inoculantes para ensilagem.

Palavras-chave: bactérias do ácido lático; pH; heterofermentativo.

ABSTRACT

Whole-plant corn silage is a strategy for preserving this food. The application of inoculants to silage can significantly improve the fermentation process, accelerating the drop in pH and inhibiting the growth of undesirable microorganisms. This study aimed to evaluate the effect of two commercial inoculants and an epiphytic strain on whole-plant corn silage after 14 and 60 days of storage. Forty experimental silos were used, with four replicates for each treatment: control (CTR) without inoculant; commercial inoculant 1 (IC1) 8 log CFU/g; commercial inoculant 2 (IC2) 8 log CFU/g; *Lentilactobacillus farraginis* (LF) 10 log CFU/g; and IC1+LF 9 log CFU/g. After 14 and 60 days of storage, the silages were sampled and analyzed for microbiological, chemical, and aerobic stability parameters. The results indicated that the pH did not differ significantly between treatments (average of 3.78), remaining within the ideal range for storage. DM loss was lower in the LF and IC1+LF treatments, while NDF decreased over time, except in IC1+LF. The LAB population was higher in LF and IC1+LF, especially after 60 days, while the yeast count decreased significantly in these treatments. After 60 days of storage, acetic acid and 1,2-propanediol production were higher in LF and IC1+LF; these treatments also showed greater aerobic stability (168 hours in IC1+LF). The IC1+LF treatment also had a lower maximum temperature during air exposure, indicating less spoilage microbial activity. It is concluded that the combination of the commercial inoculant with *L. farraginis* (IC1+LF) was the most effective in improving the fermentation quality and aerobic stability of the silage, notably producing metabolites that inhibit undesirable microorganisms and preserving nutrients. These results reinforce the potential of heterofermentative strains, such as *L. farraginis*, in the development of silage inoculants.

Keywords: lactic acid bacteria; pH; heterofermentative

INDICADORES DE IMPACTO

Os resultados obtidos apresentam impactos de caráter social, tecnológico, econômico e ambiental que contribuem diretamente para a melhoria da qualidade da produção de silagem de planta inteira de milho, com reflexos na sustentabilidade da pecuária leiteira e de corte. Do ponto de vista tecnológico, o estudo proporciona avanços no conhecimento científico a utilização de inoculantes microbianos de última geração, viabilizando a recomendação de práticas que conferem maior estabilidade aeróbia e preservação de nutrientes durante o armazenamento, fatores estes capazes de gerar ganhos econômicos significativos aos produtores rurais. Além disso, a seleção de cepas epifíticas, como bactérias heterofermentativas capazes de produzir compostos antimicrobianos, estimula o desenvolvimento de inovações no setor agrícola e amplia as possibilidades de transferência tecnológica da universidade para o campo. Em termos sociais, os impactos manifestam-se na qualidade dos alimentos conservados e segurança alimentar, considerando que a pecuária constitui uma das principais fontes de renda de pequenos e médios agricultores familiares, de modo que a adoção de tecnologias que melhorem a conservação da forragem contribui para a manutenção da atividade no campo. Os impactos podem ser classificados, nas áreas de Tecnologia e Produção, pois envolvem o desenvolvimento de soluções biotecnológicas, e a disseminação de conhecimento técnico-científico. Dessa forma, os impactos identificados evidenciam relevância científica e aplicabilidade prática, demonstrando benefícios concretos e potenciais para a sociedade, a economia e o meio ambiente.

IMPACT INDICATORS

The results obtained demonstrate social, technological, economic, and environmental impacts that directly contribute to improving the quality of whole-plant corn silage production, with implications for the sustainability of dairy and beef cattle farming. From a technological perspective, the study advances scientific knowledge regarding the use of state-of-the-art microbial inoculants, enabling the recommendation of practices that provide greater aerobic stability and nutrient preservation during storage, factors capable of generating significant economic gains for rural producers. Furthermore, the selection of epiphytic strains, such as heterofermentative bacteria capable of producing antimicrobial compounds, stimulates the development of innovations in the agricultural sector and expands the possibilities for technology transfer from universities to the field. Socially, the impacts are reflected in the quality of preserved foods and food security, considering that livestock farming is one of the main sources of income for small and medium-sized family farmers. Therefore, the adoption of technologies that improve forage conservation contributes to the maintenance of agricultural activity. The impacts can be classified into the areas of Technology and Production, as they involve the development of biotechnological solutions and the dissemination of technical and scientific knowledge. Thus, the identified impacts demonstrate scientific relevance and practical applicability, demonstrating concrete and potential benefits for society, the economy, and the environment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Concentração de Fibra em Detergente Neutro - FDN em silagens de planta inteira de milho após 14 e 60 dias de estocagem com diferentes inoculantes.....	39
Figura 2	Concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) na silagem de milho de planta inteira após 14 e 60 dias de estocagem com diferentes inoculantes.....	39
Figura 3	Interação entre inoculantes e tempo de estocagem sobre a população de BAL na silagem de milho após 14 e 60 dias de Fermentação.....	40
Figura 4	Concentração de ácido láctico em silagens de planta inteira de milho após 14 e 60 dias de estocagem. com diferentes inoculantes.....	41
Figura 5	Concentração de ácido acético em silagens de planta inteira de milho após 14 e 60 dias de estocagem com diferentes inoculantes.....	42
Figura 6	Concentração de Ácido Succínico em silagens de planta inteira de milho após 14 e 60 dias de estocagem com diferentes inoculantes.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização da forragem antes do processo de ensilagem.....	36
Tabela 2	Parâmetros fermentativos e composição química e microbiológica da silagem de planta inteira de milho tratado com diferentes inoculantes...	38
Tabela 3	Avaliação da estabilidade aeróbia da silagem de planta inteira de milho tratado com diferentes inoculantes após 14 dias de estocagem.....	43
Tabela 4	Avaliação da estabilidade aeróbia da silagem de planta inteira de milho com diferentes inoculantes após 60 dias de estocagem.....	44

LISTA DE SIGLAS

BAL	Bactérias do ácido láctico
BAFE	Bactérias aeróbias formadoras de esporos
CHO	Carboidratos solúveis
CSA	Carboidrato solúvel em água
CTR	Controle
DAD	Detector de arranjo de diodos
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
EA	Estabilidade aeróbia
FDN	Fibra em detergente neutro
FF	Fungos filamentosos
IC1	Inoculante comercial 1
IC2	Inoculante comercial 2
LDH	Lactato desidrogenase
LF	<i>Lentilactobacillus farraginis</i>
MS	Matéria seca
N-NH ₃	Nitrogênio amoniacal
PB	Proteína bruta
PP	Pentoses fosfato
RPM	Rotações por minuto
RU5P	Ribulose 5 fosfato

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	14
1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	Bactérias utilizadas como inoculantes em silagens.....	17
2.2	Seleção de BAL para silagem.....	18
2.3	Metabolismo de BAL.....	20
2.4	Atuação das bactérias ácido-láticas durante a produção de silagem.....	21
2.5	Co-cultura de inoculantes para silagens.....	23
	REFERÊNCIAS.....	25
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	29
	ARTIGO – Cepa epitifíca de <i>Lentilactobacillus farraginis</i> em cultura única ou co-cultura na ensilagem de planta inteira de milho.....	30
	TERCEIRA PARTE.....	52
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A ensilagem é uma técnica que se consiste na fermentação natural ou inoculada de substratos (forragens, cereais e subprodutos da indústria) por bactérias do ácido láctico (BAL) em um ambiente anaeróbico, onde o principal objetivo é a conservação de alimentos além de evitar a perda de matéria seca (MS) através da inibição de microrganismos indesejáveis. A opção de conservação de forragens pelo método da ensilagem permite a intensificação e torna a produção pecuária menos dependente das condições climáticas, especialmente em situações de escassez de pastagens (Zopollatto, 2020).

A planta de milho é a principal forrageira utilizada na alimentação animal devido à tecnologia de cultivo, elevada produtividade e valor nutritivo. Apesar de geralmente bem preservadas, essas silagens apresentam problemas de deterioração após abertura. O desenvolvimento de inoculantes de nova geração pode oferecer benefícios adicionais, mesmo para silagens geralmente bem preservadas. Assim, a utilização de inoculantes microbiológicos tem se mostrado uma estratégia eficiente para melhorar a conservação da silagem, sendo o aumento da estabilidade aeróbia um dos principais benefícios observados em silagens de milho planta inteira.

As BAL constituem o grupo de microrganismos mais utilizados como aditivos biológicos em silagens, devido à sua capacidade de promover a fermentação láctica e inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis. Essas bactérias são classificadas de acordo com seu metabolismo fermentativo em homofermentativas, que produzem predominantemente ácido láctico, e heterofermentativas, que geram, além do ácido láctico, outros compostos como ácido acético, etanol e dióxido de carbono (Peng *et al.*, 2021). Dentre as BAL heterofermentativas, destaca-se as bactérias heterofermentativas obrigatórias do grupo do *Lentilactobacillus buchneri*, que tem mostrado efetividade em melhorar principalmente a estabilidade aeróbia de silagens. Uma cepa da espécie *Lentilactobacillus farraginis*, recentemente isolada de silagens de milho de fazendas em Minas Gerais, tem demonstrado capacidade de melhorar a estabilidade aeróbia da silagem de milho e de capim-elefante. Essa característica está associada à sua habilidade de reduzir populações de leveduras e diminuir a produção de ácido butírico, indicando potencial como inoculante em silagens de milho (Amaral *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2021).

A utilização de co-culturas, ou seja, a combinação de cepas homo e heterofermentativas, tem sido amplamente investigada visando unir os benefícios distintos de cada grupo. Cepas

homofermentativas como *Lactiplantibacillus plantarum* são responsáveis por uma rápida redução do pH no início da fermentação, enquanto as heterofermentativas, como *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus farraginis*, contribuem para a produção de compostos antimicrobianos, como o ácido acético e o 1,2-propanodiol, que inibem leveduras e prolongam a estabilidade da silagem após a abertura do silo (Huang *et al.*, 2021; Okoye *et al.*, 2023). A interação sinérgica entre essas cepas pode resultar em uma silagem mais estável, segura e nutritiva, mesmo sob condições de estresse ou variações ambientais.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de uma cepa de *Lentilactobacillus farraginis* sozinha ou em combinação com outros inoculantes mistos comerciais, compostos por diferentes espécies de BAL na ensilagem de milho planta inteira, sobre os parâmetros fermentativos e estabilidade aeróbia da silagem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bactérias utilizadas como inoculantes em silagens

Os inoculantes microbianos podem melhorar significativamente o processo de ensilagem, promovendo melhorias na fermentação, preservação e qualidade nutricional das silagens. Embora sejam especialmente benéficos para silagens mais desafiadoras como capins ou grãos de milho reidratados, eles também causam melhorias na qualidade de silagens com características fermentativas favoráveis, como a de planta inteira de milho, melhorando a estabilidade aeróbia.

No mercado, há aditivos químicos, como ácidos fórmico, sórbico, acético, propiônico, benzóico e seus sais, além de aditivos biológicos, como celulases e bactérias do ácido lático homo e heterofermentativas. Os aditivos biológicos são mais indicados para a inoculação de silagens por serem seguros, não corrosivos, ambientalmente sustentáveis e eficazes na recuperação de matéria seca, fermentação e desempenho animal (Ni *et al.*, 2015).

As bactérias do ácido lático (BAL) são os microrganismos mais utilizados como inoculantes em diferentes tipos de silagens devido à sua eficácia no estímulo de uma fermentação eficiente. A qualidade da silagem depende de diversos fatores biológicos e tecnológicos. Os fatores biológicos estão relacionados com a interação entre características da planta (teor de carboidratos, umidade, microbiota natural) e técnicas de manejo (compactação, vedação, uso de aditivos). Por exemplo, silagens de milho – embora de baixo risco fermentativo – podem apresentar perdas significativas se colhidas fora do estágio ideal ou mal compactadas. Portanto, a qualidade final depende tanto dos fatores biológicos inerentes à cultura quanto da aplicação correta de tecnologias de ensilagem. Durante a fermentação da biomassa vegetal, as BAL produzem ácidos orgânicos, como o ácido lático, que contribuem para a redução do pH a níveis que impedem o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes (Adesogan; Newman, 2014; Yitbarek; Tamir, 2014).

A produção de ácido lático, composto fundamental para a fermentação anaeróbica durante a ensilagem, está diretamente associada às BAL, que dominam o processo em condições ideais de pH e ausência de oxigênio. Seu metabolismo permite a conversão de carboidratos em ácido lático, promovendo a preservação eficiente da silagem (Zhao *et al.*, 2019). Em diversas aplicações biotecnológicas relacionadas à alimentação, as BAL apresentam relevância devido à sua segurança para a nutrição humana e animal, diversidade metabólica e

ampla adaptação ecológica, despertando interesse para novos usos, incluindo fermentação em escala industrial (Okoye *et al.*, 2022). As espécies de BAL utilizadas na produção de silagens pertencem aos gêneros *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Weissella*, destacando-se, entre os mais utilizados, os gêneros *Lactiplantibacillus* e *Lentilactobacillus* (Ellis *et al.*, 2016).

As bactérias do ácido lático representam o grupo mais utilizado, sendo classificadas conforme seu metabolismo fermentativo. As homofermentativas, como *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lacticaseibacillus paracasei*, são particularmente eficazes na rápida redução do pH, enquanto as heterofermentativas, incluindo *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus farraginis*, produzem ácido acético que melhora a estabilidade aeróbia (Liu *et al.*, 2014; Tyrolova *et al.*, 2017). Outras BAL como *Pediococcus pentosaceus* e *Enterococcus faecium* são frequentemente combinadas em inoculantes comerciais por sua capacidade de iniciar rapidamente a fermentação (Carrizo *et al.*, 2021; Ning *et al.*, 2017).

Além das BAL, outros microrganismos têm demonstrado potencial como inoculantes. Bactérias produtoras de enzimas como *Bacillus subtilis* podem melhorar a digestibilidade da fibra (SU *et al.*, 2024), enquanto *Propionibacterium freudenreichii* podem reduzir perdas proteicas em silagens de leguminosas (Saizen *et al.*, 2023). As bactérias fibrolíticas, principalmente do gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*), produzem um complexo enzimático que inclui celulasas, xilanases e β -glucanases (Su *et al.*, 2024). Estas enzimas quebram as fibras da parede celular vegetal, aumentando a digestibilidade da forragem. Quando combinadas com BAL, como *Lactobacillus plantarum*, podem melhorar tanto a fermentação quanto o valor nutricional da silagem (Su *et al.*, 2024).

As bactérias ácido lácticas têm um papel central na rápida acidificação do meio ensilado, resultando na produção de ácido lático e outros metabólitos que preservam a forragem e inibem microrganismos indesejáveis, como clostrídios, leveduras e fungos. Esse processo mantém a qualidade nutricional e reduz perdas durante o armazenamento e o uso da silagem.

2.2 Seleção de BAL para silagem

A seleção de BAL para a produção de silagem pode melhorar a eficiência do processo fermentativo e a qualidade do material conservado (Oliveira *et al.*, 2017). A seleção ocorre após o isolamento de cepas, seguido por triagem baseada na capacidade de produção de ácidos orgânicos, degradação de proteínas e taxa de crescimento em diferentes níveis de pH e temperaturas, além de testes de desempenho (Okoye *et al.*, 2023). Outros critérios para a

escolha dos inoculantes incluem o habitat natural da planta, o rápido crescimento em biomassa vegetal cortada ou picada, a resistência a bacteriófagos, a compatibilidade com coculturas, a estabilidade genética, a tolerância ao estresse e a inibição de fungos e leveduras (Carvalho *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021). O ambiente de ensilagem e a capacidade das BAL de se adaptar e metabolizar rapidamente os nutrientes disponíveis são fatores determinantes para a fermentação eficiente da biomassa vegetal (Amaral *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2021; Guan *et al.*, 2020).

As cepas utilizadas como inoculantes em silagens, são isoladas principalmente de silagens, gerando adaptação competitiva à microbiota local. O meio de cultivo mais usado para o isolamento é o Man Rogosa Sharpe (MRS), que pode ser adaptado de acordo com o gênero ou espécie de interesse (Carvalho *et al.*, 2020). Após o isolamento, as cepas são purificadas, caracterizadas e conservadas, geralmente a baixas temperaturas (-20 a -80°C) ou por meio do processo de liofilização (Carvalho *et al.*, 2020). Algumas espécies especialmente dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* podem ser patogênicas, sendo necessário a realização de testes bioquímicos que indicam o potencial de patogenicidade como: produção de enterotoxinas, atividade hemolítica, gelatinase e DNase, além da avaliação da resistência a antibióticos (Pereira *et al.*, 2018).

Durante a etapa de triagem, diversas propriedades são avaliadas para selecionar as cepas mais promissoras. Entre elas, destaca-se a capacidade de produzir metabólitos de interesse, cuja presença pode ser quantificada por técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, entre outras metodologias analíticas. Também são analisadas a velocidade de utilização dos açúcares disponíveis no substrato a ser ensilado e a rapidez na acidificação do meio. A habilidade de consumir rapidamente os carboidratos da forragem e de produzir compostos ácidos, como o ácido lático, é importante para reduzir perdas fermentativas. (Carvalho *et al.*, 2020). Outras características como atividade proteolítica, produção de enzimas ou a capacidade de modificar micotoxinas também podem ser consideradas para seleção especializada.

A capacidade das cepas de inibir micro-organismos indesejáveis, como leveduras, fungos filamentosos e bactérias deteriorantes, é avaliada por testes de antagonismo. A formação de halos de inibição e a redução do crescimento radial de fungos são indicadores de eficácia microbiana. Essa atividade pode ser atribuída à produção de diversos compostos pelas BAL, incluindo ácido lático, ácido acético, peróxido de hidrogênio, lactato peroxidase, lisozima, 1,2-propanodiol e bacteriocinas ou substâncias de efeito semelhante (Carvalho *et al.*, 2020).

Após a seleção laboratorial, as cepas são testadas em silos experimentais de pequeno porte (denominados silos experimentais), visando avaliar a perda de matéria seca, perfil de metabólitos (ácidos e álcoois), pH, população microbiana e estabilidade aeróbia. As cepas com melhor desempenho seguem para testes em silos de campo, que simulam condições reais de campo. A avaliação criteriosa nessas duas etapas é importante para validar a eficácia das culturas selecionadas como inoculantes para aplicação prática na produção de silagens.

2.3 Metabolismo de BAL

As bactérias ácido-láticas são microrganismos gram-positivos, não formadores de esporos, com papel essencial na fermentação de carboidratos. Esses microrganismos utilizam diferentes vias metabólicas, como glicólise (fermentação de açúcares), lipólise (degradação de lipídios) e proteólise (degradação de proteínas), para gerar metabólitos benéficos, incluindo ácidos orgânicos, bacteriocinas e exopolissacarídeos. Essas características conferem às BAL ampla aplicação na produção, melhoria e conservação de alimentos fermentados, incluindo silagens (Bintsis, 2018).

As BAL podem ser classificadas em homofermentativas e heterofermentativas, sendo ambas utilizadas na produção de silagem. A identificação e seleção dessas bactérias consideram, principalmente, sua função metabólica na conversão de carboidratos solúveis em ácidos orgânicos (Okoye *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2013). O ácido lático é o principal metabólito produzido por BAL homofermentativas, como *Pediococcus pentosaceus*, promovendo a rápida redução do pH e impedindo o crescimento de microrganismos indesejáveis. Já as BAL heterofermentativas, como *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus hilgardi*, produzem, além de ácido lático, compostos como ácido acético, etanol e dióxido de carbono, que melhoram a estabilidade aeróbica da silagem (Peng *et al.*, 2021). O ácido acético, em particular, possui propriedades antimicrobianas que inibem fungos e leveduras, prolongando a vida útil da silagem após a abertura do silo.

A capacidade de degradação de lipídeos e proteínas por BAL é restrita e variável entre espécies e cepas. A expressão das enzimas relacionadas a esses processos não ocorre em todas as condições, sendo modulada por fatores ambientais como pH, temperatura e disponibilidade de substratos. Quanto à produção de bacteriocinas, apenas determinadas BAL possuem essa capacidade e estão associadas a fatores genéticos específicos. As bacteriocinas desempenham um papel importante na melhoria da estabilidade microbiológica da silagem, atuando na

inibição de microrganismos deteriorantes e patogênicos, como *Listeria monocytogenes*, o que contribui para a segurança e qualidade do alimento ensilado (Bintsis, 2018).

Durante a fermentação anaeróbia, ocorrem a produção de diversos ácidos orgânicos, como ácido lático, acético, fórmico, succínico e cítrico (Wang *et al.*, 2021). No processo de ensilagem, as BAL metabolizam glicose como fonte de carboidratos, sintetizando piruvato por meio da glicólise. Esse composto é então convertido em ácido lático pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH), utilizando a via fosfoacetolase (Kim *et al.*, 2021). Além disso, a glicose-6-fosfato é transformada em dióxido de carbono (CO₂), ribulose-5-fosfato (Ru5P) e NADPH através da via das pentoses fosfato (PP). A LDH é uma enzima essencial na conversão do piruvato em ácido lático, sendo sua estereoespecificidade um fator determinante no metabolismo desse ácido (Wang *et al.*, 2021).

A produção de ácido lático pode ocorrer de duas formas: pelas BAL homofermentativas que geram com exclusividade esse composto, e as BAL heterofermentativas que produzem também etanol, acético e outros compostos. Além disso, as bactérias do ácido lático sintetizam acetato, formato e succinato por diferentes vias metabólicas do citrato. No primeiro mecanismo, as enzimas fumarase, fumarato redutase e malato desidrogenase convertem citrato em succinato pela redução do oxaloacetato. No segundo, o piruvato é transformado em lactato, acetato, formato e etanol (Nuryana *et al.*, 2019). Em algumas cepas com atividade reduzida da enzima acetaldeído desidrogenase, a conversão de acetaldeído em etanol é limitada, favorecendo a formação de ácido acético. Esta alteração resulta em menor produção de etanol e, consequentemente, em redução da perda de MS durante a fermentação.

Embora pesquisas anteriores tenham abordado os efeitos sinérgicos das BAL na produção desses ácidos orgânicos, há informações limitadas sobre suas interações metabólicas durante o processo de ensilagem (Jiang *et al.*, 2020).

2.4 Atuação das bactérias ácido-láticas durante a produção de silagem

As BAL são adicionadas para interromper o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes, reduzir o pH da silagem e aumentar a recuperação de matéria seca (Ren *et al.*, 2021). As principais alterações bioquímicas necessárias para a fermentação eficaz da silagem por inoculantes de BAL incluem a remoção de oxigênio, a fermentação, a concentração adequada de carboidratos solúveis (CHO), a redução do pH, a diminuição da capacidade

tampão, o murchamento, a manutenção de temperatura adequada e a remoção oportuna da silagem para alimentação (Okoye *et al.*, 2023).

O estágio aeróbico tem início durante a colheita e se estende até o esgotamento do oxigênio, o que ocorre logo após a ensilagem. Durante essa fase, os açúcares presentes na biomassa recém-picada são degradados em ácido lático, dióxido de carbono, água e calor pelas BAL e também são utilizados por microrganismos aeróbicos, como leveduras, fungos e bactérias, presentes na superfície da forragem. Esses microrganismos promovem intensa atividade respiratória, o que pode comprometer futuramente a estabilidade da silagem. O crescimento excessivo de leveduras e fungos aumenta a suscetibilidade ao aquecimento e à deterioração. Dessa forma, o processamento adequado da silagem, incluindo a inoculação com BAL, minimiza a atividade de microrganismos patogênicos (Pretz, 2020). Além disso, o uso de inoculantes combinados reduz a atividade de leveduras, fungos e bactérias aeróbicas, que consomem o ácido lático produzido por BAL homofermentativas (Muck *et al.*, 2018; Nazar *et al.*, 2020).

No estágio de fermentação anaeróbica, ocorre a sucessão de diferentes bactérias que fermentam os açúcares vegetais. Esse processo acontece naturalmente em ambientes anaeróbicos, mas sua eficiência na redução do pH depende da quantidade e das espécies de BAL presentes na forragem, o que pode levar a inibir a ação de microrganismos indesejáveis (Li *et al.*, 2018). Durante esse estágio, as BAL protegem a forragem ao produzir ácidos orgânicos benéficos e agentes antifúngicos, como bacteriocinas (Santos *et al.*, 2013). Além disso, as BAL homofermentativas apresentam maior capacidade de redução do pH, pois produzem exclusivamente ácido lático, enquanto as heterofermentativas produzem ácido acético, que reduz o pH de forma mais lenta (Oliveira *et al.*, 2019; Schmidt; Kung, 2010).

Após a atividade intensa das BAL e redução no pH, a silagem entra na fase de estabilidade. Desde que o silo permaneça adequadamente vedado, a atividade biológica ocorre em níveis mínimos (Borreani *et al.*, 2018). Silagens inoculadas com BAL mantêm o pH estável nesse período, criando um ambiente ácido que limita a proliferação de microrganismos indesejáveis. Espécies como *Clostridium* e *Bacillus* podem permanecer como esporos enquanto o silo se mantém fechado (Li; Nishino, 2011). Estudos indicam que as BAL contribuem para a manutenção do pH reduzido da silagem, além de favorecerem a produção de ácidos orgânicos e metabólitos benéficos, o que resulta em menor atividade patogênica (Bai *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021; Nazar *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021).

A silagem deve ser utilizada rapidamente após a abertura do silo para evitar degradação aeróbica. Com a exposição ao oxigênio, as leveduras metabolizam os ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação, elevando o pH e reativando a atividade aeróbica, o que acelera a deterioração da silagem (Han *et al.*, 2014; Reiber *et al.*, 2010). A estabilidade aeróbica das silagens durante a fase de desabastecimento do silo, depende dos ácidos orgânicos e metabólitos produzidos pelas BAL durante a fermentação. Certos ácidos, como butírico, acético e propiônico, apresentam maior toxicidade para leveduras e fungos do que o ácido láctico (Borreani *et al.*, 2018).

2.5 Co-cultura de inoculantes para silagens

A interação entre os microrganismos presentes no inoculante pode influenciar a eficiência da fermentação e a qualidade final da silagem. Pesquisas recentes indicam que a combinação de BAL homofermentativas e heterofermentativas em inoculantes pode unir as vantagens de ambos os grupos. As homofermentativas garantem uma rápida acidificação, enquanto as heterofermentativas promovem maior estabilidade aeróbica ao produzir ácido acético em concentrações moderadas. Essa abordagem é especialmente útil em cenários onde a estabilidade aeróbica e a conservação da qualidade da silagem são desafiadoras (Okoye *et al.*, 2023).

As homofermentativas, como *Lactiplantibacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*, produzem principalmente ácido láctico, promovendo uma rápida redução do pH e melhor conservação dos nutrientes (Kim *et al.*, 2021). Já as heterofermentativas, como *Lentilactobacillus buchneri*, produzem ácido acético e outros compostos antimicrobianos, contribuindo para a estabilidade aeróbica da silagem (Muck *et al.*, 2018).

Santos *et al.* (2019) isolou recentemente a cepa *L.farraginis* em silagem de milho planta inteira produzidas no estado de Minas Gerais. Dentre 88 cepas de bactérias ácido-láticas isoladas e caracterizadas metabólica e genotipicamente (Santos *et al.*, 2019), 53 foram pré-selecionadas com base em sua elevada produção de ácido láctico e acético, além de baixa produção de etanol (Costa *et al.*, 2021). Três dessas cepas pertencentes à espécie *L. farraginis* (CCMA 1362, CCMA 1363 e CCMA 1364) destacaram-se por promoverem menor perda de MS, maior estabilidade aeróbia, boa produção de ácidos e redução do pH, além de menor contagem de leveduras. A cepa CCMA 1362 (*L. farraginis*) demonstrou eficácia na redução das perdas de MS e na redução do desenvolvimento de leveduras durante o processo de

ensilagem. Com base nesses resultados, essas cepas foram posteriormente avaliadas em silagens de capim-elefante cultivar Capiacú. Nesse substrato, as cepas CCMA 1363 e CCMA 1364 (*L. farraginis*) apresentaram baixa perda de MS e alta estabilidade aeróbia (Amaral, 2020). Estes resultados evidenciam o potencial de cepas de *L. farraginis* na melhoria das características fermentativas e estabilidade aeróbia de silagens. No entanto, observa-se variação na eficiência entre cepas em função do substrato fermentado, ressaltando a importância da seleção de linhagens específicas para cada tipo de forragem.

A associação entre homofermentativas e heterofermentativas potencializa os benefícios de cada grupo. Inoculantes contendo *L. plantarum* e *L. buchneri* resultam em fermentação mais eficiente, com maior produção de ácido lático no início do processo e aumento do teor de ácido acético após armazenamento prolongado, favorecendo a estabilidade aeróbica (Okoye *et al.*, 2023). Além disso, a inclusão de enzimas nos inoculantes tem sido explorada para aumentar a disponibilidade de açúcares fermentáveis e melhorar a digestibilidade da fibra (Muck *et al.*, 2018). Inoculantes com *L. buchneri* demonstraram que além da melhoria na estabilidade aeróbica, pode reduzir significativamente a contagem de leveduras e aumentar a concentração de 1,2-propanodiol, composto associado à inibição de microrganismos deteriorantes (Huang *et al.*, 2021).

A interação entre os microrganismos presentes nos inoculantes exerce um papel importante na condução da fermentação em silagens. A seleção criteriosa baseada em critérios técnicos e a aplicação adequada dessas culturas microbianas são fatores importantes para a obtenção de resultados positivos, como a redução das perdas de MS, o aumento na produção de metabólitos microbianos desejáveis, a inibição de microrganismos indesejáveis e a melhoria da qualidade microbiológica e do valor nutricional da silagem. Para que o inoculante atue de forma eficiente, é necessário considerar as características específicas do substrato a ser ensilado, assim como as condições ambientais predominantes no processo de ensilagem. Diante disso, futuras investigações devem explorar com maior profundidade as interações entre diferentes cepas de bactérias ácido-láticas e outros microrganismos benéficos, com o objetivo de desenvolver inoculantes mais eficazes e adaptáveis a uma ampla variedade de condições.

REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A.; NEWMAN, Y. **Silage harvesting, storing and feeding**. IFAS Extension, University of Florida, Gainesville, 2014. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/AG/AG18000.pdf>.
- AMARAL, R. C. *et al.* Novel lactic acid bacteria strains enhance the conservation of elephant grass silage cv. BRS Capiacu. **Animal Feed Science and Technology**, v. 264, p. 114472, 2020.
- BAI, J. *et al.* Different lactic acid bacteria and their combinations regulated the fermentation process of ensiled alfalfa: ensiling characteristics, dynamics of bacterial community and their functional shifts. **Microbial Biotechnology**, v. 14, p. 1171, 2021.
- BINTSIS, T. Lactic acid bacteria as starter cultures: an update in their metabolism and genetics. **AIMS Microbiology**, v. 4, p. 665–684, 2018.
- BORREANI, G. *et al.* Silage review: factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 3952–3979, 2018.
- CARRIZO, N. I. *et al.* Selection and performance of antifungal lactic acid bacteria in corn mini-silos. **Arabian Journal of Science and Engineering**, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13369-021-05511-z> Acesso em: 20 mar. 2025.
- CARVALHO, B. F. *et al.* Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 341–355, 2020.
- CARVALHO, B. F.; SALES, G. F. C.; SCHWAN, R. F.; ÁVILA, C. L. S. Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, p. 341–355, 2021.
- COSTA, D. M. *et al.* New epiphytic strains of lactic acid bacteria improve the conservation of corn silage harvested at late maturity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 274, p. 114852, 2021.
- ELLIS, J. L. *et al.* Effects of lactic acid bacteria silage inoculation on methane emission and productivity of Holstein Friesian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 7159–7174, 2016.
- GUAN, H. *et al.* The microbiome and metabolome of Napier grass silages prepared with screened lactic acid bacteria during ensiling and aerobic exposure. **Animal Feed Science and Technology**, v. 269, p. 114673, 2020.
- HAN, K. J.; PITMAN, W. D.; CHAPPLE, A. Moisture concentration variation of silages produced on commercial farms in the south-central USA. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, p. 1436–1442, 2014.

- HUANG, Z. *et al.* WANG, M.; KE, W.; GUO, X. Screening of high 1,2-propanediol production by *Lactobacillus buchneri* strains and their effects on fermentation characteristics and aerobic stability of whole-plant corn silage. **Agriculture**, v. 11, p. 1–12, 2021.
- JIANG, F. G. *et al.* Treatment of whole-plant corn silage with lactic acid bacteria and organic acid enhances quality by elevating acid content, reducing pH, and inhibiting undesirable microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 3104, 2020.
- KIM, D. *et al.* Role of LAB in silage fermentation: effect on nutritional quality and organic acid production—An overview. **AIMS Agriculture and Food**, v. 6, p. 216–234, 2021.
- LI, Y.; NISHINO, N. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Appl. Microbiology**, v. 110, p. 1561–1570, 2011.
- LI, D. *et al.* Influence of lactic acid bacteria, cellulase, cellulase-producing *Bacillus pumilus* and their combinations on alfalfa silage quality. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, p. 2768–2782, 2018.
- LIU, Q. H. *et al.* Characteristics of *Lactobacillus parafarraginis* ZH1 and its role in improving the aerobic stability of silages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, p. 405–416, 2014.
- MUCK, R. *et al.* Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 3980–4000, 2018.
- NAZAR, M. *et al.* The feasibility and effects of exogenous epiphytic microbiota on the fermentation quality and microbial community dynamics of whole crop corn. **Bioresource Technology**, v. 306, p. 123106, 2020.
- NI, K. *et al.* Natural lactic acid bacteria population and silage fermentation of whole-crop wheat. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, p. 1123, 2015.
- NING, T. *et al.* Effects of microbial enzymes on starch and hemicellulose degradation in total mixed ration silages. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, p. 171–180, 2017.
- NURYANA, I. *et al.* Analysis of organic acids produced by lactic acid bacteria. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 251, p. 1-7, 2019.
- OKOYE, C. O. *et al.* Comparative genomics reveals the organic acid biosynthesis metabolic pathways among five lactic acid bacterial species isolated from fermented vegetables. **New Biotechnology**, v. 25, p. 73-83, 2022.
- OKOYE, C. O. *et al.* The performance of lactic acid bacteria in silage production: a review of modern biotechnology for silage improvement. **Microbiological Research**, v. 266, p. 127212, 2023.
- OLIVEIRA, P. H.; TOUCHON, M.; CURY, J. The chromosomal organization of horizontal gene transfer in bacteria. **Nature Communications**, p. 1–10, 2017.

OLIVEIRA, E. R. *et al.* Effects of exogenous amylolytic enzymes on fermentation, nutritive value, and aerobic stability of rehydrated ground corn silage and on performance of lambs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 254, p. 114–124, 2019.

PENG, C. *et al.* Isolation, identification, and utilization of lactic acid bacteria from silage in a warm and humid climate area. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

PEREIRA, M. V. G. *et al.* How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances** v. 36, p. 2060-2076, 2018.

PRETZ, J. **Understanding the process of corn silage fermentation and starch availability**. Hubbard Feed, set. 2020. Disponível em: <https://www.hubbardfeeds.com/blog/understanding-process-corn-silage-fermentation-and-starch-availability> Acesso em: 26 abr. 2025.

REIBER, C. *et al.* Promotion and adoption of silage technologies in drought-constrained areas of Honduras. **Tropical Grasslands**, v. 44, p. 231–245, 2010.

REN, H. *et al.* Enhancing the Co-ensiling performance of corn stover and cabbage waste via the addition of cellulase. **Bioresources**, v. 16, p. 6342-6362, 2021.

SAIZEN, A. *et al.* Fermentation of peanut slurry with *Lactococcus lactis* species, *Leuconostoc* and *Propionibacterium freudenreichii* sub sp. *Globosum* Enhanced Protein Digestibility. **Foods**, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37761158/>. Acesso em: 25 abr. 2025.

SANTOS, A. O.; ÁVILA, C. L. S.; SCHWAN, R. F. Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 7777–7789, 2013.

SANTOS, A. O. *et al.* Lactic acid bacteria diversity in corn silage produced in Minas Gerais (Brazil). **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 1445-1459, 2019.

SCHMIDT, R. J.; KUNG, L. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 4, p. 1616-1634, 2010.

SU, JIAQI *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* and lignocellulose enzyme on the fermentation parameters, bacterial communities, in vitro digestibility, and aerobic stability of sweet corn stalk silage. **Animals**, v. 14, n. 23, p. 3442, 2024.

TYROLOVA, Y.; BARTOŇ, L.; LOUČKA, R. Effects of biological and chemical additives on fermentation progress in maize silage. **Czech Journal of Animal Science**, v. 62, p. 306–312, 2017.

WANG, Y. *et al.* Improvement of feed intake, digestibility, plasma metabolites, and lactation performance of dairy cows fed mixed silage of sugar beet pulp and rice straw inoculated with lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 105, p. 269-280, 2021.

YITBAREK, M. B.; TAMIR, B. Silage additives: review. **Open Journal of Applied Sciences**, v. 4, p. 258–274, 2014.

ZHAO, J. *et al.* Effects of lactic acid bacteria and molasses on fermentation dynamics, structural and nonstructural carbohydrate composition and in vitro ruminal fermentation of rice straw silage. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 32, p. 783, 2019.

ZOPOLLATTO, M. Conservação de forragens: orientações práticas para produção de silagem de alta qualidade. Curitiba: **Sistema FAEP**, 2020. Disponível em: https://www.sistемаfaep.org.br/wp-content/uploads/2021/11/PR.0349-Conservacao-de-forragens_web.pdf. Acesso em: 23 jan. 2025.

SEGUNDA PARTE

Artigo- Elaborado conforme a norma NBR 6022	
Título do artigo:	Cepa epifítica de <i>Lentilactobacillus farraginis</i> em cultura única ou co-cultura na ensilagem de planta inteira de milho
Autores:	Carina dos Santos Celestino



CEPA EPITÍFICA DE *Lentilactobacillus farraginis* EM CULTURA ÚNICA OU CO-CULTURA NA ENSILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE MILHO

EPITIFIC STRAIN OF *Lentilactobacillus farraginis* IN SINGLE CULTURE OR CO-CULTURE IN WHOLE CORN PLANT SILAGE¹

Carina dos Santos Celestino

<https://orcid.org/0000-0002-5037-871X>

Carla Luiza da Silva Ávila

<https://orcid.org/0000-0001-6858-8016>

Beatriz Ferreira Carvalho

<https://orcid.org/0000-0002-6554-5517>

Resumo: As bactérias do ácido láctico (BAL) são os principais microrganismos inoculados em silagens para melhorar o processo fermentativo e aumentar a estabilidade aeróbia. A seleção de cepas epifíticas tem se mostrado uma técnica promissora para o desenvolvimento de novos inoculantes. O presente estudo avaliou o efeito de diferentes inoculantes microbianos na composição química, microbiológica e estabilidade aeróbia da silagem de milho de planta inteira. Foram testados cinco inoculantes: controle (sem inoculante), dois inoculantes comerciais (IC1 - 8 log UFC/g e IC2 - 8 log UFC/g), cepa *Lentilactobacillus farraginis* (LF) 10 log UFC/g e combinação de IC1 com LF (IC1+LF) 9 log UFC/g e dois tempos de estocagem (14 e 60 dias). Aos 14 e 60 dias de estocagem os resultados indicaram que o pH não diferiu significativamente entre os tratamentos (média de 3,78), mantendo-se dentro do esperado para conservação de silagens. Os tratamentos LF e IC1+LF apresentaram menores perdas de matéria seca e redução da fibra em detergente neutro (FDN) ao longo do tempo. A população de bactérias ácido-láticas foi superior nestes mesmos tratamentos contendo a cepa epifítica após 60 dias, enquanto as leveduras mostraram redução significativa. Os tratamentos LF e IC1+LF apresentaram maior produção de ácido acético e 1,2-propanodiol, compostos que demonstraram relação com o aumento da estabilidade aeróbia (atingindo 168 horas no tratamento IC1+LF) e com a redução da temperatura máxima durante o período de exposição ao oxigênio. Conclui-se que a combinação do inoculante comercial com *L. farraginis* (IC1+LF) foi a mais eficaz na melhoria da qualidade fermentativa e estabilidade aeróbia da silagem, destacando-se pela produção de metabólitos inibidores de microrganismos indesejáveis e pela preservação dos nutrientes. Esses resultados reforçam o potencial de cepas heterofermentativas, como *L. farraginis*, no desenvolvimento de inoculantes para ensilagem.

¹ Artigo científico apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola.

Palavras-chave: bactérias homofermentativas; estabilidade aeróbica; ácido láctico.

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) are the main microorganisms inoculated into silages to improve the fermentation process and increase aerobic stability. The selection of epiphytic strains has proven to be a promising technique for developing new inoculants. This study evaluated the effect of different microbial inoculants on the chemical and microbiological composition, and aerobic stability of whole-plant corn silage. Five inoculants were tested: control (no inoculant), two commercial inoculants (IC1 - 8 log CFU/g and IC2 - 8 log CFU/g), *Lentilactobacillus farraginis* (LF) strain (10 log CFU/g), and a combination of IC1 with LF (IC1+LF) (9 log CFU/g). Two storage periods (14 and 60 days) were used. At 14 and 60 days of storage, the results indicated that the pH did not differ significantly between treatments (average of 3.78), remaining within the expected range for silage conservation. The LF and IC1+LF treatments showed lower dry matter losses and a reduction in neutral detergent fiber (NDF) over time. The lactic acid bacteria population was higher in these same treatments containing the epiphytic strain after 60 days, while yeast showed a significant reduction. The LF and IC1+LF treatments showed greater production of acetic acid and 1,2-propanediol, compounds that demonstrated a relationship with increased aerobic stability (reaching 168 hours in the IC1+LF treatment) and with a reduction in maximum temperature during the oxygen exposure period. It is concluded that the combination of the commercial inoculant with *L. farraginis* (IC1+LF) was the most effective in improving the fermentation quality and aerobic stability of the silage, notably producing metabolites that inhibit undesirable microorganisms and preserving nutrients. These results reinforce the potential of heterofermentative strains, such as *L. farraginis*, in the development of silage inoculants.

Keywords: homofermentative bacteria; aerobic stability; lactic acid.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de inoculantes de novas gerações podem trazer benefícios mesmo para silagens geralmente bem preservadas como a silagem de milho planta inteira que apresentam problemas de deterioração após abertura. Durante a fermentação, as BAL metabolizam os carboidratos solúveis presentes na forragem, como glicose, frutose e sacarose, convertendo-os em ácidos orgânicos por meio de diferentes vias metabólicas, sendo as principais a via glicolítica (Embden-Meyerhof-Parnas) e a via das pentoses fosfato (Kim *et al.*, 2021). As BAL homofermentativas obrigatórias utilizam predominantemente a via glicolítica, na qual uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de ácido láctico, com rendimento energético de 2 mol de ATP por mol de glicose. Essa fermentação eficiente é típica de espécies como *Lactiplantibacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*, que promovem uma rápida acidificação da silagem, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis (Lahtinen *et al.*, 2012).

Já as BAL heterofermentativas obrigatórias, como *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus farraginis*, utilizam a via das pentoses fosfato, resultando em ácido láctico, ácido acético (ou etanol) e dióxido de carbono. Essa via gera apenas 1 mol de ATP por mol de glicose, mas os produtos metabólicos possuem efeito antimicrobiano, especialmente contra leveduras e fungos, favorecendo a estabilidade aeróbia da silagem (Lahtinen *et al.*, 2012). Algumas espécies heterofermentativas utilizam o ácido láctico, convertendo-o em ácido acético e 1,2-propanodiol, sendo eles associado à maior resistência da silagem à deterioração durante o período de exposição ao oxigênio (Okoye *et al.*, 2023).

Cepas epifíticas de bactérias lácticas têm se mostrado como inoculantes promissores para a melhoria da qualidade da silagem, apresentando vantagens significativas em relação às BAL exógenas. Diferentes isolados de *Lentilactobacillus farraginis* foram isolados de silagem de planta inteira de milho em Minas Gerais (Santos *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2021). Três cepas de *L. farraginis* (CCMA 1362, 1363 e 1364) destacaram-se por reduzir perdas de MS, aumentar a estabilidade aeróbia e reduzir a população de leveduras. Essas cepas foram posteriormente avaliadas em silagens de capim-elefante. Nesse substrato, as cepas CCMA 1363 e CCMA 1364 (*L. farraginis*) apresentaram baixa perda de MS e alta estabilidade aeróbia (Amaral *et al.*, 2020). Esses resultados demonstram o potencial de *L. farraginis* para melhorar a fermentação e estabilidade aeróbia, embora sua eficiência varie conforme o substrato, reforçando a necessidade de seleção de linhagens específicas.

A combinação de cepas homo e heterofermentativas em inoculantes tem sido investigada como estratégia para unir os benefícios de ambos os grupos: acidificação rápida e maior resistência à deterioração aeróbia (Muck *et al.*, 2018). Arriola *et al.* (2011) avaliaram diferentes combinações bacterianas, constatando que a associação entre *Pediococcus pentosaceus* (homofermentativo) e *Lentilactobacillus buchneri* (heterofermentativo) resultou em maior concentração de ácido láctico, ácido acético e menor pH, indicando uma fermentação eficiente. No mesmo trabalho, analisado isoladamente *L. buchneri* se mostrou mais eficaz na redução de perdas de matéria seca. Zhang *et al.* (2021) verificaram melhoria significativa na estabilidade aeróbia quando *L. buchneri* (heterofermentativo) foi combinado com cepas homofermentativas (*L. plantarum* e *P. pentosaceus*) em silagem de milho. Assim, ambos os estudos sugerem que a combinação estratégica de cepas homo e heterofermentativas pode contribuir para a otimização do processo. Diante disso, este projeto teve como objetivo avaliar o efeito de uma cepa epifítica de *Lentilactobacillus farraginis*, aplicada isoladamente ou em combinação com inoculantes comerciais compostos por diferentes espécies de bactérias ácido-

láticas (BAL), sobre os parâmetros fermentativos e a estabilidade aeróbia da silagem de planta inteira de milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ensilagem e amostragem

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A forragem foi colhida e picada utilizando uma colhedora de forragens acoplada (JF máquinas – modelo JF 120C). A forragem foi ensilada em silos experimentais com capacidade de 5L, sendo compactada manualmente até atingir uma densidade média de $590,1\text{kg/m}^2 \pm 9,4$. Os silos foram fechados, pesados, mantidos em temperatura ambiente e protegidos de luz solar e chuvas.

Foram testados cinco inoculantes: controle (CTR) – sem inoculante; inoculante comercial 1 (IC1) composto por *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Latilactobacillus curvatus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Propionibacterium acidipropionici* e enzima celulolítica 5% (taxa de inoculação de 8 log UFC/g); inoculante comercial 2 (IC2) (8 log UFC/g); cepa epifítica *Lentilactobacillus farraginis* (LF), cultivada em laboratório de acordo com a metodologia descrita por Ávila *et al.* (2009) (-10 log UFC/g) e a combinação do IC1 com LF (IC1 + LF) (9 log UFC/g). A população da cepa *L. farraginis* foi mensurada pelo método de plaqueamento em gotas antes da aplicação na forragem.

Após cada período de estocagem (14 e 60 dias) os silos foram novamente pesados para avaliação de perda de matéria seca (MS) e abertos. Amostras foram coletadas para análises químicas, quantificação microbiana e estabilidade aeróbica.

2.2 Quantificação de microrganismos

Um extrato foi preparado misturando 30g de amostra com 270ml de água peptonada (0,01% estéril) e homogeneizado em agitador orbital (shaker 120 RPM) durante 20 minutos. Diluições decimais (10^{-1} – 10^{-6}) foram preparadas para quantificar os grupos microbianos em diferentes meios específicos usando a técnica de plaqueamento em superfície, sendo o

plaqueamento realizado em duplicata. A população de leveduras e fungos filamentosos foram avaliados em meio DRBC Agar (Difco; Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA).

As placas foram incubadas a 28°C por 72 horas para leveduras e 168 horas para fungos filamentosos. As leveduras foram diferenciadas dos fungos filamentosos pela aparência das colônias. Para avaliação da população de BAL foi utilizado meio MRS Agar (M641I, Himedia), com incubação a 37°C por 48 horas. Foi utilizado o meio Ágar EMB para quantificação de enterobactérias, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Para a avaliação da população de bactérias aeróbias formadoras de esporos o extrato foi pasteurizado a 80°C por 15 minutos e espalhado em placas com meio Agar Nutriente e posteriormente incubadas a 37°C durante 72 horas. Após o tempo de incubação foi realizado a quantificação de microrganismos e considerada a diluição em que a contagem estava entre 30 e 300 colônias.

2.3 Análises químicas

As amostras destinadas às análises químicas foram coletadas antes do processo de ensilagem e após a abertura dos silos, em cada período de armazenamento. Para a determinação dos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN), as amostras foram submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada a 55°C por um período de 72 horas. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho tipo Willey, utilizando peneira com abertura de malha de 1 mm. A correção da MS foi realizada em estufa a 105°C por 24 horas. A quantificação da PB foi efetuada em um autoanalisador de nitrogênio LECO® modelo FP828 (LECO Corporation, Michigan, EUA). A concentração de FDN foi avaliada utilizando amilase termoestável de acordo com Senger *et al.* (2008).

Para avaliação do pH, nitrogênio amoniacal (N-amoniacal), carboidratos solúveis em água (CSA) e concentração de ácidos orgânicos e álcoois, foi preparado um extrato aquoso utilizando 30 g da amostra homogeneizados em 270 mL de água deionizada (agitador orbital; 120 RPM; 20min). A determinação do pH foi realizada por meio de leitura em potenciômetro (HI 2221, Hanna Instruments). A concentração de N-amoniacal foi quantificada por meio da reação de indofenol catalisada, sendo as amostras comparadas com uma curva padrão de cloreto de amônia para a quantificação (Chaney; Marbach, 1962). A determinação de CSA foi realizada com a reação de fenol-ácido sulfúrico, seguida de leitura em espectrofotômetro, sendo as amostras comparadas com uma curva padrão de glicose para quantificação (Dubois *et al.*, 1956).

As concentrações dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico, bem como dos álcoois 1,2-propanodiol e etanol, foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu equipado com bomba quaternária modelo LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-20A, desgaseificador modelo DGU-20A5, interface modelo CBM-20A e injetor automático com amostrador automático modelo SIL-20A. As separações foram realizadas utilizando uma coluna Supelcogel 8H 300mm x 7,8mm (cat. 59246-U) e pré-coluna Supelcogel 8H 10mm x 7,8mm.

A eluição foi realizada em sistema isocrático, utilizando solução tampão H₂SO₄ 0,005 mol/L como fase móvel. O fluxo foi de 0,6mL/min, com temperatura de 50° C para análises de ácidos e de 0,5 mL/min, com a temperatura de 30°C para álcoois. O volume injetado de amostras e padrão foi de 20 µL, e os ácidos foram analisados em 210 nm e os álcoois no detector de índice de refração. Os compostos foram identificados comparando o tempo de retenção das amostras com os padrões. A quantificação foi feita utilizando padronização externa.

2.4 Análise de estabilidade aeróbia

A estabilidade aeróbia (EA) foi avaliada a partir de amostras de 2 kg de silagem, que foram colocadas em baldes plástico, sem compactação. Para evitar contaminação das amostras, duas camadas de gaze foram colocadas sobre as silagens, que foram mantidas expostas ao ar durante 168 horas (7 dias), em temperatura ambiente. A temperatura, tanto da sala quanto das silagens, foi registrada a cada 30 minutos por meio de sensores data-loggers (Modelo RC5+ Elitech, RS, Brasil), sendo 1 para cada amostra e 2 para monitorar o ambiente. A estabilidade aeróbia foi definida como o tempo total, em horas, em que a silagem permaneceu estável antes de atingir uma temperatura de 2°C acima da temperatura ambiente (Moran *et al.*, 1996).

2.5 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado – DIC. Os tratamentos foram dispostos em arranjo fatorial de 5 inoculantes (IC1, IC2, LF, IC1 + LF e controle) e 2 tempos de estocagem (14 e 60 dias) com quatro repetições, totalizando 40 silos experimentais. Os dados foram submetidos à análise de variância através do pacote computacional Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados (SISVAR®)

(Ferreira, 2008). O modelo utilizado foi $Y_{ijk} = \mu + T_i + E_j + (T \times E)_{ij} + \epsilon_{ijk}$, onde, μ é a média geral; T_i é o efeito do inoculante; E_j é o efeito do tempo de estocagem; $(T \times E)_{ij}$ é o efeito da interação entre o inoculante e tempo de estocagem; ϵ_{ijk} é o erro experimental. As médias foram comparadas usando o teste de Scott Knot ao nível de 5% de probabilidade em caso de significância no teste F. Os dados da avaliação de estabilidade aeróbia foram analisados em cada tempo de estocagem. O modelo utilizado continha somente efeito dos inoculantes.

3 RESULTADOS

A forragem de milho utilizada para ensilagem apresentou pH de 6,36, com 29,21% de MS, teor de FDN de 53,36% e PB de 6,87%. A concentração de CSA foi de 4,80%, e o teor de N-NH₃ foi de 2,01%PB. As populações de BAL, FF, leveduras, enterobactérias e esporos de BAFE foram respectivamente 7,31; 5,67; 6,21 6,03 e 4,91 log UFC/g (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização da forragem antes do processo de ensilagem

Variável	Média	DP
Ph	6,36	0,09
Matéria Seca (%)	29,21	-
Fibra em Detergente Neutro (%MS)	53,36	4,59
Proteína Bruta (%MS)	6,87	0,42
CSA* (%MS)	4,80	1,23
N-NH ₃ (%PB)	2,01	0,23
População de microrganismos (log UFC/g)		
Bactérias do Ácido Lático	7,31	0,23
Bactérias Aeróbias Formadoras de Esporos	4,91	0,25
Leveduras	6,21	0,18
Fungos Filamentosos	5,67	0,20
Enterobactérias	6,03	0,64

*CSA= Carboidrato solúvel em água; N-NH₃= Nitrogênio Amoniacal.

Fonte: Elaboração própria.

Não houve efeito ($P > 0,05$) de nenhum dos fatores avaliados sobre os valores de pH, com média de 3,78 (Tabela 2). O teor de MS não foi alterado pelos inoculantes $P = 0,38$ (Tabela 2), mas diferiu entre os tempos de estocagem ($P = 0,01$), com maior teor aos 14 dias (28,85%) em relação aos 60 dias (28,49%). A perda de MS também não foi alterada pelos inoculantes ($P = 0,64$), mas foi significativamente ($P < 0,01$) menor após 14 dias (2,05%) em comparação aos 60 dias (3,29%).

Houve efeito da interação entre inoculante e período de estocagem sobre a concentração de FDN nas silagens ($P < 0,05$). Com 14 dias de estocagem, as silagens inoculadas com IC1, IC2 e LF apresentaram as maiores concentrações de FDN, aos 60 dias, a FDN não diferiu entre os tratamentos. Em IC1 e IC2, houve redução da FDN com maior tempo de estocagem (Figura 1). Não houve efeito dos inoculantes ($P = 0,93$) sobre a concentração de PB na silagem, porém foi observada uma redução de 6,98% para 6,59% de 14 para 60 dias de estocagem ($P < 0,01$). Não houve efeito dos tratamentos avaliados sobre a concentração de CSA nas silagens (Tabela 2).

A concentração de N-NH_3 foi significativamente influenciada pela interação entre inoculante e tempo de estocagem ($P < 0,01$) (Figura 2). Aos 14 dias de estocagem, os tratamentos CTR, IC1 e IC2 apresentaram as menores concentrações de N-NH_3 (média 2,03%PB). Enquanto os tratamentos com LF sozinho ou combinado com IC1, apresentaram as maiores concentrações de N-NH_3 (média 5,50%PB). Após 60 dias de estocagem, observou-se aumento na concentração de N-NH_3 em todas as silagens, sem diferenças significativas entre os inoculantes, com média de 7,04% da proteína bruta.

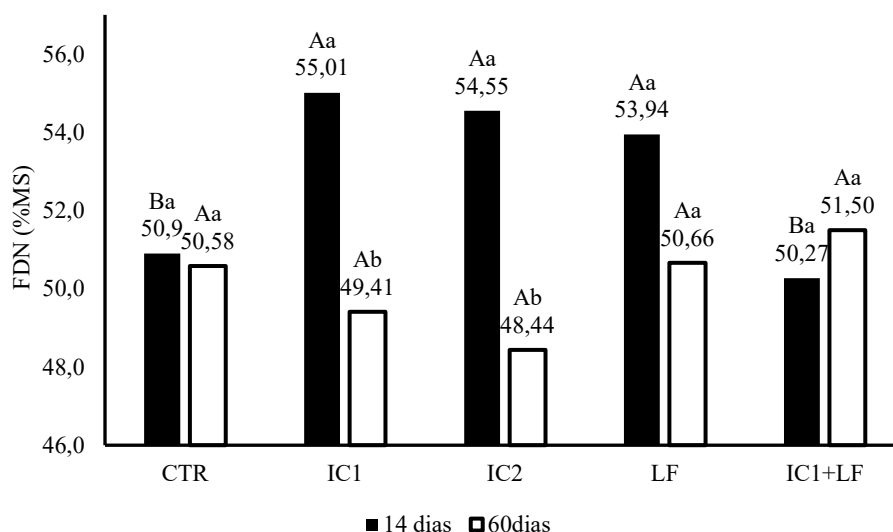
Tabela 2 - Parâmetros fermentativos e composição química e microbiológica da silagem de planta inteira de milho tratado com diferentes inoculantes.

Variável	Inoculante					Estocagem		EMP	Valor <i>p</i>		
	CTR	IC1	IC2	LF	IC1+LF	14	60		I	E	IxE
p.H	3,73 A	3,70 A	3,71 A	4,04 A	3,71 A	3,72 a	3,84 a	0,17	0,55	0,43	0,37
Matéria Seca (%)	28,65 A	28,47 A	28,59 A	28,79 A	28,86 A	28,85 a	28,49 b	0,15	0,38	0,01	0,46
Perda MS (% do inicial)	2,77 A	3,07 A	2,99 A	2,30 A	2,21 A	2,05 b	3,29 a	0,50	0,64	<0,01	0,54
Proteína Bruta (%MS)	6,76 A	6,70 A	6,88 A	6,80 A	6,78 A	6,98 a	6,59 b	0,14	0,93	<0,01	0,74
CSA (%MS)	4,85 A	4,00 A	4,30 A	3,69 A	4,10 A	4,33 a	4,05 a	0,43	0,42	0,47	0,60
BAFE (UFC/g)	4,48 B	5,11 A	4,26 B	4,30 B	4,19 B	4,30b	4,63 a	0,13	<0,01	0,01	0,06
Leveduras (UFC/g)	4,09 B	4,61 A	4,99 A	3,51 B	4,17 B	5,04 a	3,52 b	0,22	<0,01	<0,01	0,06
Ácido Propiônico (%MS)	0,75 A	0,63 B	0,59 B	0,56 B	0,55 B	0,60 a	0,63 a	0,03	<0,01	0,32	0,84
Ácido Isovalérico (%MS)	0,83 A	0,76 A	0,63 B	0,74 A	0,61 B	0,82 a	0,61 b	0,05	0,01	<0,01	0,37
Etanol (%MS)	0,49 A	0,40 B	0,57 A	0,34 B	0,27 B	0,41 a	0,41 a	0,05	<0,01	0,96	0,31

CRT – controle, IC1 – Inoculante comercial 1, IC2 – Inoculante comercial 2, LF – *Lentilactobacillus farraginis*, IC1+LF – Combinação do inoculante comercial 1 e *Lentilactobacillus farraginis*) após 14 e 60 dias de estocagem. EMP= Erro padrão da média; I= Inoculante; E= Estocagem; IxE= Interação de Inoculante e Estocagem. Letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos (CRT – controle, IC1 – Inoculante comercial 1, IC2 – Inoculante comercial 2, LF – *Lentilactobacillus farraginis*, IC1+LF – Combinação do inoculante comercial 1 e *Lentilactobacillus farraginis*) dentro de cada tempo de estocagem, enquanto letras minúsculas representam comparações entre os tempos de estocagem (14 e 60 dias) dentro de cada tratamento. O teste Scott-Knott foi usado para comparação de médias, com nível de significância de p (<0,05).

Fonte: Elaboração própria.

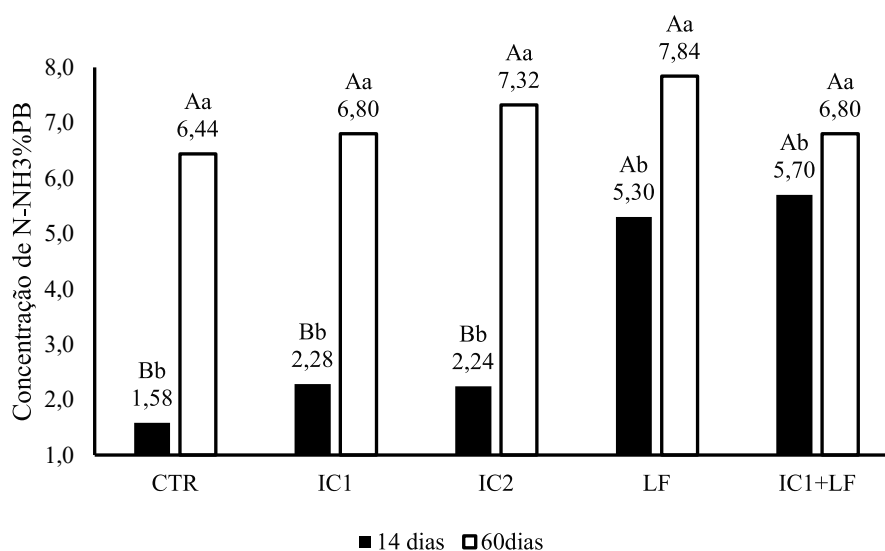
Figura 1 – Concentração de fibra em Detergente Neutro - FDN em silagens de planta inteira de milho após 14 e 60 dias de estocagem com diferentes inoculantes.



CRT – controle, IC1 – Inoculante comercial 1, IC2 – Inoculante comercial 2, LF – *Lentilactobacillus farraginis*, IC1+LF – Combinação do inoculante comercial 1 e *Lentilactobacillus farraginis*). As letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos dentro de cada tempo de estocagem (E: $p > 0,70$), enquanto letras minúsculas representam comparações entre os tempos de estocagem dentro de cada inoculante (I: $p < 0,01$). IxE (Interação de inoculante e estocagem): $p < 0,05$. O teste Scott-Knott foi usado para comparação de médias, com nível de significância de $p < 0,05$. EMP:1,37

Fonte: Elaboração própria.

Figura 2 - Concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) na silagem de milho de planta inteira após 14 e 60 dias de estocagem com diferentes inoculantes.



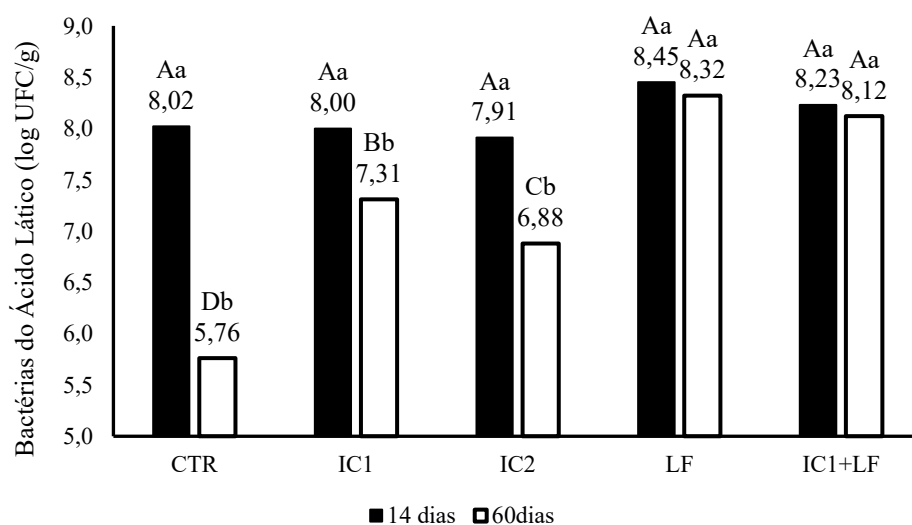
CRT – controle, IC1 – Inoculante comercial 1, IC2 – Inoculante comercial 2, LF – *Lentilactobacillus farraginis*, IC1+LF – Combinação do inoculante comercial 1 e *Lentilactobacillus farraginis*. Letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos dentro de cada tempo de estocagem (E: $p < 0,01$), enquanto letras minúsculas representam comparações entre os tempos de estocagem dentro de cada inoculantes (I: $p < 0,01$). IxE (Interação do inoculante e estocagem): $p < 0,01$. Para comparação das médias foi realizado o teste Scott-Knott com nível de significância de $p < 0,05$. EMP=0,45.

Fonte: Elaboração própria.

A população de BAFE foi maior na silagem inoculada com IC1 (5,11 log UFC/g) em relação a todos os outros tratamentos, com aumento para todos os tratamentos dos 14 (4,30 log UFC/g) aos 60 dias de estocagem (4,63 log UFC/g) (Tabela 2). A maior população de leveduras foi observada nas silagens inoculadas com IC1 (4,61 log UFC/g) e IC2 (4,99 log UFC/g) (Tabela 2), independente do tempo de estocagem. A população desse grupo de microrganismos reduziu ao longo do tempo ($P < 0,01$), em média de 5,04 para 3,52 log UFC/g. Houve interação entre inoculante e tempo de estocagem sobre a população de BAL ($P < 0,01$).

Aos 14 dias de estocagem, não houve diferença entre a população de BAL entre as silagens. Aos 60 dias a maior população desse grupo de bactérias foi observado nos tratamentos em que foi utilizado LF sozinho ou combinado, seguido dos tratamentos IC1 e IC2 e pelo CTR, com menor população (Figura 3). A população de fungos filamentosos e enterobactérias aos 14 e 60 dias de estocagem ficou abaixo do mínimo detectável (2 log UFC/g) em todos os tratamentos.

Figura 3 - Interação entre inoculantes e tempo de estocagem sobre a população de BAL na silagem de milho após 14 e 60 dias de Fermentação.



Letras maiúsculas indicam comparações entre os inoculantes (CTR – controle, IC1 – Inoculante comercial 1, IC2 – Inoculante comercial 2, LF – *Lentilactobacillus farraginis*, IC1+LF – Combinação do inoculante comercial 1 e *Lentilactobacillus farraginis*). Letras minúsculas indicam comparações entre os tempos de estocagem (14 e 60 dias). O teste Scott-Knott foi usado para comparação de médias, com nível de significância de $p < 0,05$. Inoculante (I): $p < 0,01$. Estocagem (E): $p < 0,01$. IxE (Interação de inoculante e estocagem): $p < 0,01$. EPM=0,17.

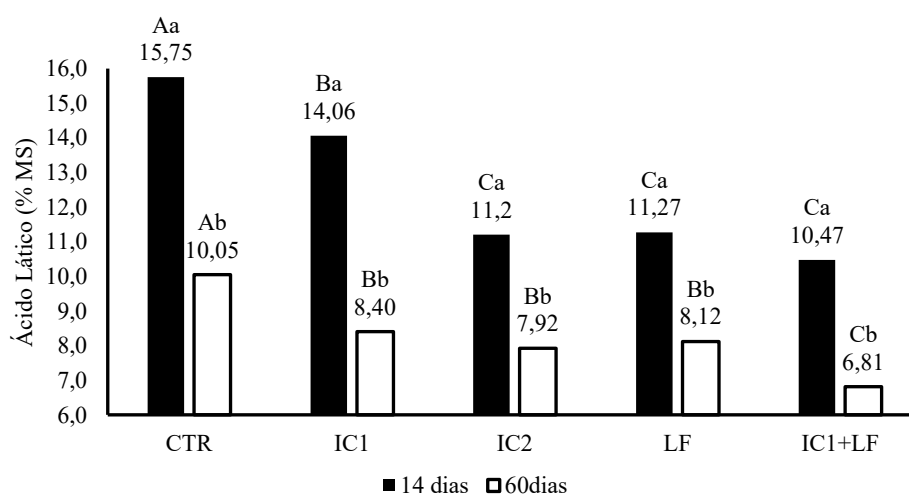
Fonte: Elaboração própria.

A concentração de ácido lático na silagem também foi influenciada pela interação entre inoculante e tempo de estocagem ($P < 0,01$). Aos 14 dias a silagem CTR teve maior teor de

ácido láctico, seguida pela silagem IC1 e por último pelas silagens IC2, LF e IC1+LF, cujos valores foram semelhantes entre eles. Aos 60 dias, o efeito dos inoculantes foram diferentes, com maior valor para CTR, seguido por IC1, IC2 e LF e por último por LF+IC1 (Figura 4).

Foi observada redução na concentração de ácido láctico nas silagens de 14 para 60 dias em todos tratamentos. Após 60 dias de estocagem a maior concentração de ácido láctico foi observada no tratamento IC1 (média 8,40).

Figura 4 - Concentração de ácido láctico em silagens de planta inteira de milho após 14 e 60 dias de estocagem com diferentes inoculantes.



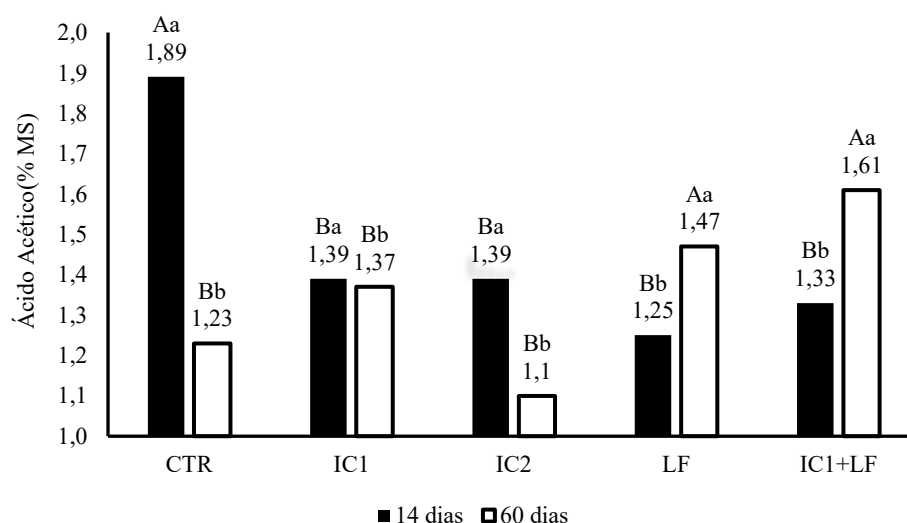
CRT – controle, IC1 – Inoculante comercial 1, IC2 – Inoculante comercial 2, LF – *Lentilactobacillus farraginis*, IC1+LF – Combinação do inoculante comercial 1 e *Lentilactobacillus farraginis*). As letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos dentro de cada tempo de estocagem (E: $p < 0,01$), enquanto letras minúsculas representam comparações entre os tempos de estocagem dentro de cada inoculante (I: $p < 0,01$). IxE (Interação de inoculante e estocagem): $p < 0,01$. O teste Scott-Knott foi usado para comparação de médias, com nível de significância de $p < 0,05$. EMP=0,36.

Fonte: Elaboração própria.

Houve interação entre inoculante e tempo de estocagem sobre as concentrações de ácido acético (Figura 5). Aos 14 dias, os maiores valores desse ácido foram observados na silagem CTR (1,89% MS) com valores semelhantes para as outras silagens. Com 60 dias, as silagens LF e IC1+LF apresentaram valores semelhantes e superiores as outras silagens (1,47 e 1,61% MS respectivamente). O ácido propiônico foi alterado pelos inoculantes ($P < 0,01$), com maior concentração no CTR (0,75%) que os demais tratamentos (Tabela 2).

A concentração de ácido succínico variou entre as silagens, com interação significativa entre inoculante e tempo de estocagem ($P < 0,01$) (Figura 6). Após 14 dias de estocagem a silagem inoculada com IC2 apresentou maior concentração de ácido succínico (0,49%MS), seguida pelos tratamentos LF e pelos outros tratamentos. Aos 60 dias de estocagem, as silagens CTR, IC1 e IC2 apresentaram maior concentração de ácido succínico (média 0,20%MS).

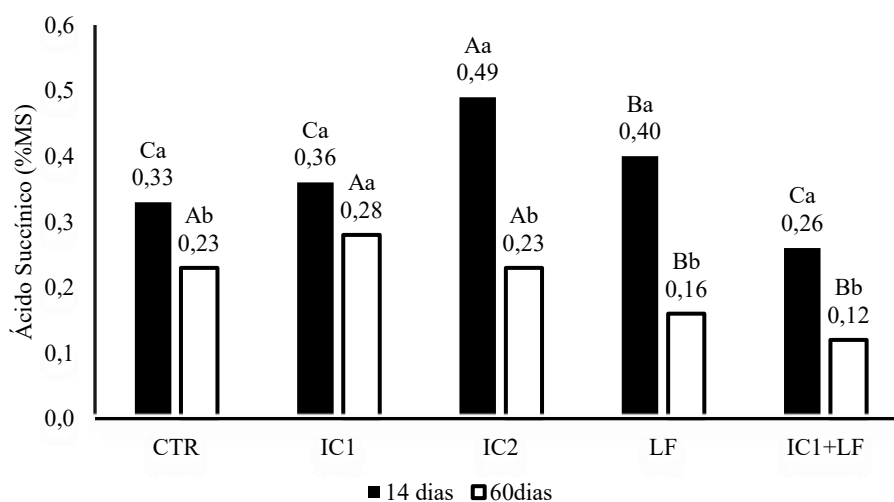
Figura 5 - Concentração de ácido acético em silagens de planta inteira de milho após 14 e 60 dias de estocagem com diferentes inoculantes



CRT – controle, IC1 – Inoculante comercial 1, IC2 – Inoculante comercial 2, LF – *Lentilactobacillus farraginis*, IC1+LF – Combinação do inoculante comercial 1 e *Lentilactobacillus farraginis*. As letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos dentro de cada tempo de estocagem (E: $p < 0,01$), enquanto letras minúsculas representam comparações entre os tempos de estocagem dentro de cada inoculante (I: $p < 0,01$). IxE (Interação de inoculante e estocagem): $p < 0,01$. O teste Scott-Knott foi usado para comparação de médias, com nível de significância de $p < 0,05$. EMP:0,81.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 - Concentração de Ácido Succínico em silagens de planta inteira de milho após 14 e 60 dias de estocagem com diferentes inoculantes.



CRT – controle, IC1 – Inoculante comercial 1, IC2 – Inoculante comercial 2, LF – *Lentilactobacillus farraginis*, IC1+LF – Combinação do inoculante comercial 1 e *Lentilactobacillus farraginis*. As letras maiúsculas indicam comparações entre os tratamentos dentro de cada tempo de estocagem (E: $p < 0,01$), enquanto letras minúsculas representam comparações entre os tempos de estocagem dentro de cada inoculante (I: $p < 0,01$). IxE (Interação de inoculante e estocagem): $p < 0,05$. O teste Scott-Knott foi usado para comparação de médias, com nível de significância de $p < 0,05$. EMP:0,31.

Fonte: Elaboração própria.

A concentração de ácido isovalérico foi maior nas silagens CTR, IC1 e LF (média 0,77% MS) que nas silagens IC2 e IC1+LF (média 0,62% MS) (Tabela 2). A produção de etanol foi significativamente diferente entre inoculantes ($P < 0,01$), com maiores concentrações em IC2 (0,57%) e CTR (0,49%) (Tabela 2). O 1,2-propanodiol foi encontrado somente nas silagens inoculadas com LF e IC1+LF. Aos 14 dias a silagem LF apresentou concentração de $0,08 \pm 0,02$ MS de 1,2-propanodiol e aos 60 dias $0,11 \pm 0,02$ MS. A concentração de 1,2-propanodiol nas silagens inoculadas com IC1+LF aos 14 dias de estocagem foi de $0,04 \pm 0,01$ MS e aos 60 dias foi $0,06 \pm 0,01$ MS. A concentração de ácido butírico não foi detectado aos 14 e 60 dias de estocagem em nenhum dos inoculantes.

Após 14 dias de estocagem, a estabilidade aeróbia (EA) e a temperatura máxima não diferiu entre os tratamentos (Tabela 3). Entretanto o tempo que as silagens atingissem a T.M. foi diferente ($P = 0,01$). As silagens inoculadas com IC1 e IC2 atingiram a temperatura máxima em menos tempo que as demais silagens (55 e 53,5 h, respectivamente). Após 60 dias de estocagem, houve efeito significativo dos tratamentos sobre EA ($P < 0,01$) (Tabela 4). As silagens inoculadas com IC1+LF permaneceram 168 h estáveis com resultado superior aos demais inoculantes. A T.M. também foi menor valor nessas silagens (20°C). O tempo para atingir T.M. não diferiu entre os tratamentos.

Tabela 3 - Avaliação da estabilidade aeróbia da silagem de planta inteira de milho tratado com diferentes inoculantes após 14 dias de estocagem.

Variável	Inoculante						Valor p
	CTR	IC1	IC2	LF	IC1+LF	EMP	T
EA (h)	31,37 A	49,62 A	62,87 A	96,75 A	61,00 A	16,27	0,12
T.M (°C)	29,90 A	30,02 A	30,02 A	29,72 A	29,40 A	0,81	0,98
Tempo T.M (h)	70,00 A	55,00 B	53,50 B	71,75 A	70,62 A	4,12	0,01

EMP= erro médio padrão. Avaliação da estabilidade aeróbia (EA), temperatura máxima (T.M) e tempo para atingir a temperatura máxima (Tempo T.M) em silagens de planta inteira de milho tratadas com diferentes inoculantes (CTR – controle, IC1 – Inoculante comercial 1, IC2 – Inoculante comercial 2, LF – *Lentilactobacillus farraginis*, IC1+LF – Combinação do inoculante comercial 1 e *Lentilactobacillus farraginis*) após 14 dias de estocagem. Letras maiúsculas indica comparação entre os tratamentos. O teste Scott-Knott foi usado para comparação de médias, com nível de significância de $p (< 0,05)$ para os efeitos dos tratamentos (T).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Avaliação da estabilidade aeróbia da silagem de planta inteira de milho com diferentes inoculantes após 60 dias de estocagem.

Variável	Inoculante						Valor <i>p</i>
	CTR	IC1	IC2	LF	IC1+LF	EMP	T
E.A (h)	73,00 B	97,65 B	88,12 B	77,50 B	168,0 A	16,09	< 0,01
T.M (°C)	23,27 A	26,03 A	24,52 A	23,90 A	20,00 B	0,84	< 0,01
Tempo T.M(h)	105,00 A	96,67 A	115,87 A	114,5	98,12 A	11,09	0,56

EMP= erro médio padrão. Avaliação da estabilidade aeróbia (EA), temperatura máxima (T.M) e tempo para atingir a temperatura máxima (Tempo T.M) em silagens de planta inteira de milho tratadas com diferentes inoculantes (CTR – controle, IC1 – Inoculante comercial 1, IC2 – Inoculante comercial 2, LF – *Lentilactobacillus farraginis*, IC1+LF – Combinação do inoculante comercial 1 e *Lentilactobacillus farraginis*) após 60 dias de estocagem. Letras maiúsculas indica comparação entre os tratamentos. O teste Scott-Knott foi usado para comparação de médias, com nível de significância de *p* (<0,05) para os efeitos dos tratamentos (T).

Fonte: Elaboração própria.

4 DISCUSSÃO

O pH das silagens avaliadas estão dentro dos valores observados em silagens de milho (Silva *et al.*, 2021; Kung *et al.*, 2018). Os inoculantes avaliados não alteraram a concentração de MS (28,7%) nem a porcentagem de perdas de MS (2,67% MS) na silagem de milho. As perdas de MS observada nesse estudo estão dentro ou abaixo dos valores reportados na literatura para silagem de milho produzida em silos experimentais (Costa *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2024). A planta de milho tem características que favorecem a fermentação e somente inoculantes com desempenho superior são capazes de reduzir perdas de MS nessas silagens. Nos estudos de Silva *et al.* (2021) e Silva *et al.* (2024) diferentes combinações de inoculantes foram avaliadas e não foram observadas diferenças nas perdas de MS de silagens de milho. As baixas perdas podem ser devido ao baixo pH da silagem já aos 14 dias, sugerindo inibição dos microrganismos indesejáveis como enterobactérias e fungos filamentosos. Alguns trabalhos têm mostrado aumento nas perdas de MS em silagem inoculadas com cepas heterofermentativas obrigatórias. A inoculação com *Lentilactobacillus buchneri* (NCIMB 40788) aumentou as perdas de MS em silagem de milho aos 30, 100 e 250 dias (Ferrero *et al.* 2018). Entretanto, a inoculação com *Lentilactobacillus farraginis* CCMA1362 e *Lactiplantibacillus plantarum* CCMA1365 reduziu as perdas de MS da silagem de milho após 10, 32 e 100 dias de ensilagem (Costa *et al.*, 2021).

A alteração no teor de FDN em função dos inoculantes, apresentou comportamento distinto. O teor de FDN na forragem foi de 53% com 14 dias de estocagem, as silagens controle e a combinação IC1+LF, tiveram um teor de FDN de aproximadamente 51% enquanto as silagens IC1 e IC2 valores próximos de 55%, esse maior valor nestas silagens poderia ser explicado por perdas de MS, porém estas não foram observadas, é possível que tenha havido produção de algum composto volátil. Nestas silagens, foi observada redução significativa da FDN dos 14 aos 60 dias. Essa redução pode ser explicada pela ação de enzimas contidas no inoculante ou possivelmente devido à atividade de enzimas fibrolíticas produzidas por cepas como *Bacillus subtilis*, que promovem a degradação parcial da parede celular vegetal (Su *et al.*, 2024). Neste trabalho, a contagem de esporos teve um leve aumento dos 14 aos 60 dias, sendo possível atividade destes microrganismos.

A redução no teor de PB dos 14 aos 60 dias foi por elevação nas concentrações de N-NH₃ em todos os tratamentos, mesmo que em intensidades diferentes caracterizando um processo de proteólise (Santos; Ávila; Schwan, 2013; Kung *et al.*, 2018). Os tratamentos LF e IC1+LF apresentaram maior concentração de N-NH₃ já aos 14 dias, o que pode estar associado à atividade proteolítica inicial, possivelmente influenciada por enzimas vegetais ou microrganismos indesejáveis presentes antes do estabelecimento das BAL, especialmente em condições com maior disponibilidade de substrato. Os principais microrganismos conhecidos por ação proteolítica em silagens são as enterobactérias e os clostrídeos, estes microrganismos podem ser inibidos pelo pH baixo. Neste trabalho não foram detectados enterobactérias aos 14 dias, e nem houve diferença nos valores de pH, porém é possível que tenham tido alguma atividade inicial antes dos 14 dias. Segundo Oliveira *et al.* (2019), níveis elevados de N-NH₃ refletem a ação de proteases microbianas e podem estar associados tanto à degradação de proteínas vegetais quanto à atividade de microrganismos proteolíticos.

Os CSA não apresentaram variações significativas em função dos tratamentos, tempo de estocagem ou sua interação. Tal estabilidade pode estar relacionada à degradação parcial do amido, liberando açúcares que compensam a queda esperada nos níveis de CSA ao longo do tempo (Zhao *et al.*, 2019). Em silagens que contém o amido, como a silagem de grão de milho reidratado e planta inteira de milho, a presença de microrganismos capazes de secretar enzimas amilolíticas é desejável, uma vez que essas enzimas promovem a hidrólise do amido em açúcares simples, aumentando a digestibilidade ruminal desse carboidrato (Carvalho *et al.*, 2020).

A contagem de esporos de BAFE aumentou significativamente de 14 para 60 dias, sugerindo crescimento destes microrganismos ao longo do tempo de estocagem, apesar do ambiente anaeróbio da silagem ser inabitável para muitas bactérias aeróbias, os esporos possuem alta resistência a condições adversas e podem permanecer viáveis por longos períodos. O ácido succínico, secretado por BAFE, enterobactérias e outros microrganismos apresentou maior concentração no tratamento IC2 aos 14 dias, enquanto LF e IC1+LF exibiram menores teores aos 60 dias, indicando inibição de BAFE nesses tratamentos. O ácido succínico é um subproduto da fermentação e sua presença e concentração podem variar dependendo da comunidade microbiana e das condições de fermentação, os valores encontrados estão dentro do relatado na literatura (Guo *et al.*, 2020).

A redução na população de leveduras de 14 para 60 dias, pode estar associada à baixa disponibilidade de substratos ou à ação inibitória de ácidos orgânicos, como o ácido acético (Kung *et al.*, 2018). A concentração de etanol, produto do metabolismo de leveduras também não aumentou dos 14 aos 60 dias de estocagem. O teor de etanol foi maior nos tratamentos CTR e IC2, sendo que no IC2 também teve a maior população de leveduras. Em geral, a formação de etanol na silagem pode contribuir com a perda de matéria seca por ser produto principal da atividade metabólica de leveduras, reduzindo o valor nutritivo do alimento (Borreani *et al.*, 2018; Muck *et al.*, 2018).

A fase fermentativa na qual ocorre maior atividade microbiana está associada principalmente ao desenvolvimento da população de BAL dominante em silagens fermentadas com sucesso. Aos 14 dias de fermentação a população de BAL se manteve elevada em todos os tratamentos indicando grande atividade fermentativa. Já aos 60 dias foi observada diferenças significativas ($P < 0,05$) com população maior nos tratamentos LF e IC1+LF. As BAL são microrganismos acidotolerantes mas que podem ter uma redução na sua população em longos períodos de estocagem (Carvalho *et al.*, 2017; Woolford, 1984).

O metabolismo microbiano das BAL durante o processo fermentativo acarreta na alteração de diversos parâmetros da silagem. Espécies homofermentativas convertem açúcares por meio da glicólise para produzir ácido láctico como produto final, enquanto as espécies heterofermentativas geram, além do ácido láctico outros metabólitos (Lahtinen *et al.*, 2012). A concentração de ácido láctico reduziu entre 14 e 60 dias de fermentação. Essa diminuição pode ser atribuída à ação de microrganismos como BAL heterofermentativa que utilizam o lactato como substrato, convertendo-o em outros compostos (Santos *et al.*, 2018).

As BAL heterofermentativas produzem um mol de ácido láctico, um mol de dióxido de carbono e um mol de etanol ou ácido acético a partir da glicose (Muck, 2010). Os inoculantes LF e IC1+LF promoveram maior produção de ácido acético aos 60 dias, composto com ação antifúngica e antimicrobiana ampla (Driehuis *et al.*, 2018). A maior concentração de ácido acético nos tratamentos LF e IC1+LF aos 60 dias sugere uma fermentação heterolática ativa ao longo do tempo, diferindo do controle, que apresentou maior produção de ácido acético apenas nos estágios iniciais.

O composto 1,2-propanodiol foi observado nos tratamentos LF e IC1+LF aos 14 e 60 dias de fermentação. A presença do ácido acético e 1,2-propanodiol em silagens está associada ao controle eficaz de microrganismos deterioradores, como leveduras e clostrídios (Kung *et al.*, 2018). Estudos contendo cepas heterofermentativas, como *Lentilactobacillus buchneri* e *Lentilactobacillus farraginis*, demonstram que esses microrganismos são capazes de transformar ácido láctico em ácido acético e 1,2-propanodiol, compostos que aumentam significativamente a estabilidade aeróbia da silagem e reduzem a contagem de leveduras (Huang *et al.*, 2021; Amaral *et al.*, 2020). Além disso, a presença contínua desses metabólitos nos estágios mais avançados de fermentação pode indicar a viabilidade prolongada das cepas heterofermentativas aplicadas (Okoye *et al.*, 2023). Essa estabilidade microbiológica é crucial para a manutenção da qualidade da silagem após a abertura do silo, especialmente em condições de maior exposição ao oxigênio (Borreani *et al.*, 2018).

O ácido propiônico ocorre em menor concentração nas silagens, e é produzido em sua maioria por bactérias do ácido propiônico, como *Propionibacterium acidipropionici* e *Propionibacterium freudenreichii* e BAL heterofermentativas, como *Lentilactobacillus buchneri* que converte em menor proporção o ácido láctico em ácido propiônico (Saizen *et al.*, 2023). Este ácido tem potencial antifúngico, durante a fase inicial e final da ensilagem e pode ser eficaz em inibir atividade de microrganismos indesejáveis (Muck, 2010). Os valores de ácido isovalérico, indicador de fermentação proteolítica por *Clostridium* (Pinheiro, 2013), foram encontrados em baixa quantidade.

Aos 14 dias de fermentação não foi notado nenhuma diferença significativa na estabilidade aeróbia (EA). Já aos 60 dias de estocagem, o tratamento IC1+LF apresentou a maior EA, atingindo 168 horas, além de registrar a menor temperatura máxima durante o período de exposição ao ar. Esses resultados indicam que a associação entre estirpes homofermentativas e heterofermentativas, pode promover uma fermentação mais estável, resultando em menor atividade de microrganismos deteriorantes após a abertura do silo (Okoye

et al., 2023; Amaral *et al.*, 2020). A maior EA pode estar associada à produção de metabólitos antimicrobianos, como ácido acético e 1,2-propanodiol, produzidos por BAL heterofermentativas (Borreani *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2021). No processo de deterioração, substratos como açúcares residuais e lactatos são oxidados a CO₂, água e calor, principalmente por leveduras, resultando em aumento do pH, aumento da temperatura e no crescimento de outros microrganismos (Rooke; Hatfield., 2003).

5 CONCLUSÃO

A aplicação de inoculantes compostos por bactérias ácido-láticas na ensilagem de milho de planta inteira influenciou nos parâmetros fermentativos e na estabilidade aeróbia da silagem. Os resultados demonstram que a combinação do inoculante comercial com a cepa *Lentilactobacillus farraginis* (IC1+LF) promoveu maior estabilidade aeróbia e reduziu a atividade de microrganismos indesejáveis como leveduras e BAFE devido à produção de ácido acético associado a via fermentativa heterolática. Embora o tratamento combinado (IC1+LF) tenha apresentado resultados superiores, o uso exclusivo da cepa epifítica *Lentilactobacillus farraginis* (LF) também se mostrou uma estratégia eficaz e promissora. A cepa isolada também apresentou redução significativa da população de leveduras e BAFE, além do aumento expressivo na concentração de ácido acético.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, R. C. *et al.* Novel lactic acid bacteria strains enhance the conservation of elephant grass silage cv. BRS Capiçu. **Animal Feed Science and Technology**, v. 264, p. 114472, 2020.
- ARRIOLA, K. G.; KIM, S. C.; ADESOGAN, A. T. Effect of applying inoculants with heterolactic or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation and quality of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1511–1516, 2011.
- ÁVILA, C. L. S. *et al.* Effects of an 923 indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. 924 **Grass and Forage Science**, v. 64, n. 4, p. 384-394, 2009.
- BORREANI, G. *et al.* Silage review: factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 3952–3979, 2018.
- CARVALHO, B. F. *et al.* Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and 839 yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 122, n. 31, p. 589-600, 2017.
- CARVALHO, B. F. *et al.* Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 341–355, 2020.
- CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical chemistry**, 8 v., 2 n., 130-132 p., 1962.
- COSTA, D. M. *et al.* New epiphytic strains of lactic acid bacteria improve the conservation of corn silage harvested at late maturity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 274, p. 114852, 2021.
- DRIEHUIS, F. *et al.* Silage review: Animal and human health risks from silage. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4093–4110, 2018.
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric 983 method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28 v., 3 n., 984 350-356 p., 1956.
- FERRERO, F. *et al.* Effects of conservation period and *Lactobacillus hilgardii* inoculum on the fermentation profile and aerobic stability of whole corn and sorghum silages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 5, p. 2530-2540, 2018.
- GUO, X. S. *et al.* Effects of malate, citrate, succinate and fumarate on fermentation, chemical composition, aerobic stability and digestibility of alfalfa silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 267, p. 114604, 2020.
- HUANG, Z. *et al.* WANG, M.; KE, W.; GUO, X. Screening of high 1,2-propanediol production by *Lactobacillus buchneri* strains and their effects on fermentation characteristics and aerobic stability of whole-plant corn silage. **Agriculture**, v. 11, p. 1–12, 2021.

KIM, D. *et al.* Role of LAB in silage fermentation: effect on nutritional quality and organic acid production—Na overview. **AIMS Agriculture and Food**, v. 6, p. 216–234, 2021.

KUNG JUNIOR, 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.

LAHTINEN, S. *et al.* Lactobacillus: molecular biology and functional aspects. **Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group**, 2012. *E-book* (868 p.) ISBN 978-1-4398-3678-1. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/edit/10.1201/9781003352075/lactic-acid-bacteria-gabriel-vinderola-arthur-ouweland-seppo-salminen-atte-von-wright> Acesso em: 25 maio 2025.

MORAN, J. P. *et al.* A comparison of 1083 two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: **Proceedings of the 11th International Silage Conference**. University of Wales; Aberystwyth, UK. pp. 162–163.

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de 1087 Zootecnia**, v. 39, p. 183-191, 2010.

MUCK, R. *et al.* Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 3980–4000, 2018.

OKOYE, C. O. *et al.* The performance of lactic acid bacteria in silage production: a review of modern biotechnology for silage improvement. **Microbiological Research**, v. 266, p. 127212, 2023.

OLIVEIRA, E. R. *et al.* Effects of exogenous amylolytic enzymes on fermentation, nutritive value, and aerobic stability of rehydrated ground corn silage and on performance of lambs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 254, p. 114–124, 2019.

PINHEIRO, G. E. V. **Uso de inoculante microbiano na ensilagem da parte aérea da mandioca (Manihot esculenta Crantz)**. 2013. 71 f. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ROOKE, J. A; HATFIELD, R. D. Biochemistry of ensiling. **American Society of Agronomy**. 2003.

SAIZEN, A. *et al.* Fermentation of peanut slurry with Lactococcus lactis species, Leuconostoc and Propionibacterium freudenreichii sub sp. Globosum Enhanced Protein Digestibility. **Foods**, v. 12, n. 18, p. 3447, 2023.

SANTOS, A. O. *et al.* A survey of whole-plant corn silages from Minas Gerais dairy farms. **Scientia Agricola Research Article** v. 54, p. 1-10, 2019.

SANTOS, A. O.; ÁVILA, C. L. S.; SCHWAN, R. F. Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 7777–7789, 2013.

SENGER, C. C. D. *et al.* Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, n. 1–2, p. 169–174, 2008.

SILVA, E. B. da. *et al.* The effects of *Lactobacillus hilgardii* 4785 and *Lactobacillus buchneri* 40788 on the microbiome, fermentation, and aerobic stability of corn silage ensiled for various times. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 12, p. 12340–12355, 2021.

SILVA, E. B. da. *et al.* The use of *Lentilactobacillus buchneri* PJB1 and *Lactiplantibacillus plantarum* MTD1 on the ensiling of whole-plant corn silage, snaplage, and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 107, p. 883–901, 2024.

SU, J. *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* and lignocellulose enzyme on the fermentation parameters, bacterial communities, in vitro digestibility, and aerobic stability of sweet corn stalk silage. **Animals**, v. 14, n. 23, p. 3442, 2024.

WOOLFORD, M. K. The silage fermentation **New York: Marcel Dekker**, 1984. 305p.

ZHAO, J. *et al.* Effects of lactic acid bacteria and molasses on fermentation dynamics, structural and nonstructural carbohydrate composition and in vitro ruminal fermentation of rice straw silage. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 32, p. 783, 2019.

ZHANG, F. *et al.* Effects of homo- and hetero-fermentative lactic acid bacteria on the quality and aerobic stability of corn silage. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 101, n. 3, p. 523–531, 2021.

TERCEIRA PARTE

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O milho constitui a principal forrageira utilizada na alimentação animal em virtude da elevada produtividade, do valor nutritivo e tecnologia de cultivo. Embora as silagens sejam, em geral, bem preservadas, a deterioração aeróbia após a abertura permanece como um desafio recorrente. Nesse contexto, inoculantes de nova geração apontam como uma alternativa promissora para ampliar a estabilidade e a qualidade dessas silagens. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial da cepa epifítica *Lentilactobacillus farraginis*, aplicada isoladamente ou em co-cultura com inoculante comercial, na ensilagem de milho de planta inteira, buscando compreender sua atuação sobre os parâmetros fermentativos e a estabilidade aeróbia da silagem.

Os achados deste estudo se assemelham com relatos da literatura, nos quais diferentes isolados de *Lentilactobacillus farraginis* têm sido apontados como potenciais candidatos para a formulação de inoculantes, ainda que sua eficiência possa variar em função do substrato utilizado. Os resultados observados demonstraram que tanto a cepa *L. farraginis* quanto sua associação com inoculante comercial foram capazes de promover efeitos positivos sobre a qualidade fermentativa, elevando a produção de metabólitos antimicrobianos (como ácido acético e 1,2-propanodiol) inibindo microrganismos indesejáveis como BAFE e leveduras e aumentando a estabilidade aeróbia da silagem.

A pesquisa contribui para o avanço tecnológico na produção de silagens, oferecendo alternativas que podem reduzir perdas, assegurar alimento de maior qualidade e beneficiar diretamente sistemas de produção animal. Além de ampliar o conhecimento acerca da ação de espécies heterofermentativas, como *L. farraginis*, utilizada isoladamente ou como co-cultura em silagens. Estudos futuros podem validar os resultados em condições de campo para confirmar a eficácia dos tratamentos e avaliar os efeitos das silagens inoculadas sobre o desempenho animal.

Portanto conclui-se que *L. farraginis*, utilizada isoladamente ou em co-cultura, apresenta elevado potencial como inoculante para silagem de planta inteira de milho. Os resultados reforçam a relevância da seleção de microrganismos na formulação de inoculantes, com capacidade de promover avanços científicos e tecnológicos na conservação de forragens e na sustentabilidade da produção pecuária.

REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A.; NEWMAN, Y. **Silage harvesting, storing and feeding**. IFAS Extension, University of Florida, Gainesville, 2014. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/AG/AG18000.pdf>.
- AMARAL, R. C. *et al.* Novel lactic acid bacteria strains enhance the conservation of elephant grass silage cv. BRS Capiacu. **Animal Feed Science and Technology**, v. 264, p. 114472, 2020.
- ARRIOLA, K. G.; KIM, S. C.; ADESOGAN, A. T. Effect of applying inoculants with heterolactic or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation and quality of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1511–1516, 2011.
- ÁVILA, C. L. S. *et al.* Effects of an 923 indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. 924 **Grass and Forage Science**, v. 64, n. 4, p. 384-394, 2009.
- BAI, J. *et al.* Different lactic acid bacteria and their combinations regulated the fermentation process of ensiled alfalfa: ensiling characteristics, dynamics of bacterial community and their functional shifts. **Microbial Biotechnology**, v. 14, p. 1171, 2021.
- BINTSIS, T. Lactic acid bacteria as starter cultures: an update in their metabolism and genetics. **AIMS Microbiology**, v. 4, p. 665–684, 2018.
- BORREANI, G. *et al.* Silage review: factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 3952–3979, 2018.
- CARRIZO, N. I. *et al.* Selection and performance of antifungal lactic acid bacteria in corn mini-silos. **Arabian Journal of Science and Engineering**, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13369-021-05511-z> Acesso em: 20 mar. 2025.
- CARVALHO, B. F. *et al.* Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and 839 yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 31, p. 589-600, 2017.
- CARVALHO, B. F. *et al.* Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 341–355, 2020.
- CARVALHO, B. F.; SALES, G. F. C.; SCHWAN, R. F.; ÁVILA, C. L. S. Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, p. 341–355, 2021.
- CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical chemistry**, 8 v., 2 n., 130-132 p., 1962.
- COSTA, D. M. *et al.* New epiphytic strains of lactic acid bacteria improve the conservation of corn silage harvested at late maturity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 274, p. 114852, 2021.

DRIEHUIS, F. *et al.* Silage review: Animal and human health risks from silage. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4093–4110, 2018.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric 983 method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28 v., 3 n., 984 350-356 p., 1956.

ELLIS, J. L. *et al.* Effects of lactic acid bacteria silage inoculation on methane emission and productivity of Holstein Friesian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 7159–7174, 2016.

FERRERO, F. *et al.* Effects of conservation period and *Lactobacillus hilgardii* inoculum on the fermentation profile and aerobic stability of whole corn and sorghum silages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 5, p. 2530-2540, 2018.

GUAN, H. *et al.* The microbiome and metabolome of Napier grass silages prepared with screened lactic acid bacteria during ensiling and aerobic exposure. **Animal Feed Science and Technology**, v. 269, p. 114673, 2020.

GUO, X. S. *et al.* Effects of malate, citrate, succinate and fumarate on fermentation, chemical composition, aerobic stability and digestibility of alfalfa silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 267, p. 114604, 2020.

HAN, K. J.; PITMAN, W. D.; CHAPPLE, A. Moisture concentration variation of silages produced on commercial farms in the south-central USA. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 27, p. 1436–1442, 2014.

HUANG, Z. *et al.* WANG, M.; KE, W.; GUO, X. Screening of high 1,2-propanediol production by *Lactobacillus buchneri* strains and their effects on fermentation characteristics and aerobic stability of whole-plant corn silage. **Agriculture**, v. 11, p. 1–12, 2021.

JIANG, F. G. *et al.* Treatment of whole-plant corn silage with lactic acid bacteria and organic acid enhances quality by elevating acid content, reducing pH, and inhibiting undesirable microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 3104, 2020.

KIM, D. *et al.* Role of LAB in silage fermentation: effect on nutritional quality and organic acid production—An overview. **AIMS Agriculture and Food**, v. 6, p. 216–234, 2021.

KUNG JUNIOR, 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.

LAHTINEN, S. *et al.* *Lactobacillus*: molecular biology and functional aspects. **Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group**, 2012. *E-book* (868 p.) ISBN 978-1-4398-3678-1. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/edit/10.1201/9781003352075/lactic-acid-bacteria-gabriel-vinderola-arthur-ouweland-seppo-salminen-atte-von-wright> Acesso em: 25 maio 2025.

LI, Y.; NISHINO, N. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a

bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Appl. Microbiology**, v. 110, p. 1561–1570, 2011.

LI, D. *et al.* Influence of lactic acid bacteria, cellulase, cellulase-producing *Bacillus pumilus* and their combinations on alfalfa silage quality. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, p. 2768–2782, 2018.

LIU, Q. H. *et al.* Characteristics of *Lactobacillus parafarraginis* ZH1 and its role in improving the aerobic stability of silages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, p. 405–416, 2014.

MORAN, J. P. *et al.* A comparison of 1083 two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: **Proceedings of the 11th International Silage Conference**. University of Wales; Aberystwyth, UK. pp. 162–163.

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de 1087 Zootecnia**, v. 39, p. 183-191, 2010.

MUCK, R. *et al.* Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 3980–4000, 2018.

NAZAR, M. *et al.* The feasibility and effects of exogenous epiphytic microbiota on the fermentation quality and microbial community dynamics of whole crop corn. **Bioresource Technology**, v. 306, p. 123106, 2020.

NI, K. *et al.* Natural lactic acid bacteria population and silage fermentation of whole-crop wheat. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, p. 1123, 2015.

NING, T. *et al.* Effects of microbial enzymes on starch and hemicellulose degradation in total mixed ration silages. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, p. 171–180, 2017.

NURYANA, I. *et al.* Analysis of organic acids produced by lactic acid bacteria. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 251, p. 1-7, 2019.

OKOYE, C. O. *et al.* Comparative genomics reveals the organic acid biosynthesis metabolic pathways among five lactic acid bacterial species isolated from fermented vegetables. **New Biotechnology**, v. 25, p. 73-83, 2022.

OKOYE, C. O. *et al.* The performance of lactic acid bacteria in silage production: a review of modern biotechnology for silage improvement. **Microbiological Research**, v. 266, p. 127212, 2023.

OLIVEIRA, P. H.; TOUCHON, M.; CURY, J. The chromosomal organization of horizontal gene transfer in bacteria. **Nature Communications**, p. 1–10, 2017.

OLIVEIRA, E. R. *et al.* Effects of exogenous amylolytic enzymes on fermentation, nutritive value, and aerobic stability of rehydrated ground corn silage and on performance of lambs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 254, p. 114–124, 2019.

PENG, C. *et al.* Isolation, identification, and utilization of lactic acid bacteria from silage in a warm and humid climate area. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

PEREIRA, M. V. G. *et al.* How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances** v. 36, p. 2060-2076, 2018.

PINHEIRO, G. E. V. **Uso de inoculante microbiano na ensilagem da parte aérea da mandioca (Manihot esculenta Crantz)**. 2013. 71 f. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

PRETZ, J. **Understanding the process of corn silage fermentation and starch availability**. Hubbard Feed, set. 2020. Disponível em: <https://www.hubbardfeeds.com/blog/understanding-process-corn-silage-fermentation-and-starch-availability> Acesso em: 26 abr. 2025.

REIBER, C. *et al.* Promotion and adoption of silage technologies in drought-constrained areas of Honduras. **Tropical Grasslands**, v. 44, p. 231–245, 2010.

REN, H. *et al.* Enhancing the Co-ensiling performance of corn stover and cabbage waste via the addition of cellulase. **Bioresources**, v. 16, p. 6342-6362, 2021.

ROOKE, J. A; HATFIELD, R. D. Biochemistry of ensiling. **American Society of Agronomy**. 2003.

SAIZEN, A. *et al.* Fermentation of peanut slurry with *Lactococcus lactis* species, *Leuconostoc* and *Propionibacterium freudenreichii* sub sp. *Globosum* Enhanced Protein Digestibility. **Foods**, v. 12, n. 18, p. 3447, 2023.

SAIZEN, A. *et al.* Fermentation of peanut slurry with *Lactococcus lactis* species, *Leuconostoc* and *Propionibacterium freudenreichii* sub sp. *Globosum* Enhanced Protein Digestibility. **Foods**, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37761158/>. Acesso em: 25 abr. 2025.

SANTOS, A. O.; ÁVILA, C. L. S.; SCHWAN, R. F. Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 7777–7789, 2013.

SANTOS, A. O. *et al.* Lactic acid bacteria diversity in corn silage produced in Minas Gerais (Brazil). **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 1445-1459, 2019.

SCHMIDT, R. J.; KUNG, L. The effects of *Lactobacillus buchneri* with or without a homolactic bacterium on the fermentation and aerobic stability of corn silages made at different locations. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 4, p. 1616-1634, 2010.

SENGER, C. C. D. *et al.* Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, n. 1–2, p. 169–174, 2008.

SILVA, E. B. da. *et al.* The effects of *Lactobacillus hilgardii* 4785 and *Lactobacillus buchneri* 40788 on the microbiome, fermentation, and aerobic stability of corn silage ensiled for various times. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 12, p. 12340–12355, 2021.

SILVA, E. B. da. *et al.* The use of *Lentilactobacillus buchneri* PJB1 and *Lactiplantibacillus plantarum* MTD1 on the ensiling of whole-plant corn silage, snaplage, and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 107, p. 883–901, 2024.

SU, JIAQI *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* and lignocellulose enzyme on the fermentation parameters, bacterial communities, in vitro digestibility, and aerobic stability of sweet corn stalk silage. **Animals**, v. 14, n. 23, p. 3442, 2024.

TYROLOVA, Y.; BARTOŇ, L.; LOUČKA, R. Effects of biological and chemical additives on fermentation progress in maize silage. **Czech Journal of Animal Science**, v. 62, p. 306–312, 2017.

WANG, Y. *et al.* Improvement of feed intake, digestibility, plasma metabolites, and lactation performance of dairy cows fed mixed silage of sugar beet pulp and rice straw inoculated with lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 105, p. 269–280, 2021.

WOOLFORD, M. K. The silage fermentation **New York: Marcel Dekker**, 1984. 305p.

YITBAREK, M. B.; TAMIR, B. Silage additives: review. **Open Journal of Applied Sciences**, v. 4, p. 258–274, 2014.

ZHANG, F. *et al.* Effects of homo- and hetero-fermentative lactic acid bacteria on the quality and aerobic stability of corn silage. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 101, n. 3, p. 523–531, 2021.

ZHAO, J. *et al.* Effects of lactic acid bacteria and molasses on fermentation dynamics, structural and nonstructural carbohydrate composition and in vitro ruminal fermentation of rice straw silage. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 32, p. 783, 2019.

ZOPOLLATTO, M. Conservação de forragens: orientações práticas para produção de silagem de alta qualidade. Curitiba: **Sistema FAEP**, 2020. Disponível em: https://www.sistematicaep.org.br/wp-content/uploads/2021/11/PR.0349-Conservacao-de-forragens_web.pdf. Acesso em: 23 jan. 2025.