

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Escola De Veterinária  
Programa De Pós-Graduação Em Zootecnia

Henrique Fonseca Lopes

**Idade de corte da silagem de capim elefante cv. Cameroon microbiota, inoculada com fungos autóctones do rúmen perdas composição química e pH**

Belo Horizonte  
2022  
Henrique Fonseca Lopes

**Idade de corte da silagem de capim elefante cv. Cameroon microbiota, inoculada com fungos autóctones do rúmen perdas composição química e pH**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Escola de Veterinária de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Nutrição de Ruminantes

Orientador: Profa. Eloísa de Oliveira Simões Saliba

Belo Horizonte  
2022

L864i Lopes, Henrique Fonseca, 1990 -  
Idade de corte da silagem de capim elefante cv. Cameroon microbiota, inoculada com fungos autóctones do rúmen perdas composição química e pH / Henrique Fonseca Lopes. -2022.  
57f: il

Orientadora: Eloisa de Oliveira Simões Saliba  
Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.  
Inclui bibliografia

1- Bovino - Teses - 2 - Acidose - Teses - 3- Rúmen - Teses - I - Saliba, Eloisa de Oliveira Simões -II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD - 636.214 089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

### FOLHA DE APROVAÇÃO

**Idade de corte da silagem de capim-elefante ev. Cameroon microbiota, inoculada com fungos autóctones do rúmen perdas composição química e ph.**

**HENRIQUE FONSECA LOPES**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **31 de maio de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

**Mércia Regina Pereira de Figueiredo**

Instituto Capixaba de Pesquisa

**Geraldo Sérgio Senra Carneiro Barbosa**

UFV

**Diogo Gonzaga Jayme**

UFMG

**Hemilly Cristina Menezes de Sá**

UFMG

**Eloísa Oliveira Simões Saliba - Orientadora**

UFMG

Belo Horizonte, 24 de janeiro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Angela Maria Quintão Lana, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 24/01/2023, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2038860** e o código CRC **0557FE1F**.

À minha esposa e filhos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, socorro bem presente na tribulação, pelo sustento, cuidado e conforto constante em minha vida, responsável por cada vitória;

A Marina, Mel e Pedrinho que são os maiores presentes e incentivos para que eu siga em frente;

Aos meus pais, por todo apoio;

Aos meus irmãos, pelo companheirismo;

Aos meus sogros por me acolherem e apoiarem em mais uma passagem por BH;

A Prof.<sup>a</sup> Eloísa Saliba, pela orientação e paciência;

Aos professores Lúcio e Eduardo pela coorientação e acolhimento;

Aos amigos Ani, Valdo, Suze, Lavínia, por toda ajuda e animação e paciência;

Aos amigos do GIL, por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas;

Aos técnicos Kat, Sérgio, Fabiana e Gabriela, por sua disposição em ajudar;

Ao Laboratório de Nutrição da Escola de Veterinária da UFMG, por toda estrutura disponível para realização das análises;

Ao ICA, por disponibilizar a estrutura e materiais para a execução da etapa de campo do experimento;

A banca examinadora, pela disposição em contribuir com o crescimento desse trabalho;

A CAPES pela bolsa que me permitiu dedicação integral, FAPEMIG e CNPq por possibilitarem a execução dos nossos projetos;

A UFMG, por me acolher em 2008 como graduando de Medicina Veterinária.

## RESUMO

Com este trabalho o objetivo foi determinar a influência de fungos celulolíticos autóctones do rúmen bovino sobre a microbiota, pH, composição química e perdas do capim-elefante cv. cameroon ensilados aos 60 e 120 dias de rebrota. Os tratamentos foram: testemunha sem aditivo em ambas as idades de corte, inoculação com *Aspergillus terreus* aos 60 (AT60) e 120 dias de rebrota (AT120) aplicado a  $1,0 \times 10^5$  unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de matéria natural (MN), *Trichoderma longibrachiatum* aos 60 (TL60) e 120 dias de rebrota (TL120) aplicado a  $1,0 \times 10^5$  UFC/g de MN e estes fungos combinados a  $1,0 \times 10^5$  UFC/g de MN da forragem aos 60 (MIX60) e 120 dias de rebrota (MIX120). Após 56 dias de ensilagem não houve diferença entre a microbiota das silagens de forragem colhidas aos 60 dias. A população de bactérias lácticas (BAL) foi maior ( $P < 0,05$ ) para MIX120  $5,50 \log$  UFC/g MN em comparação com C120  $3,60 \log$  UFC/g MN. Os parâmetros pH, perdas de gases e efluentes não foram influenciados pela inoculação. Na silagem feita com capim cortado aos 60 dias as populações de BAL apresentaram correlações negativas com fungos  $-0,370$  ( $P < 0,044$ ) e perdas de gases  $-0,380$  ( $P < 0,037$ ). Enterobactérias apresentaram correlações positivas com contagem de leveduras  $0,369$  ( $P < 0,038$ ). Na segunda silagem LAB apresentou correlação positiva com pH  $0,361$  ( $P < 0,050$ ) e fungos também tiveram correlação positiva com pH  $0,395$  ( $P < 0,031$ ). O uso dos fungos na silagem de capim elefante cv. cameroon colhido após 60 dias de rebrota não alterou a silagem. Este inóculo quando realizado em forragem colhida aos 120 dias de crescimento proporciona maior desenvolvimento de bacilos Gram-positivos e BAL.

Palavras chave: Bactérias produtoras de ácido láctico. Gramínea tropical. Enzimas fibrolíticas. *Aspergillus terreus*. *Trichoderma longibrachiatum*. *Pennisetum purpureum* Schum..

## ABSTRACT

With this work, the objective was to determine the influence of autochthonous cellulolytic fungi from the bovine rumen on the microbiota, pH, chemical composition and losses of elephant grass cv. cameroon ensiled at 60 and 120 days of regrowth. The treatments were: control without additive at both cutting ages, inoculation with *Aspergillus terreus* at 60 (AT60) and 120 days of regrowth (AT120) applied at  $1.0 \times 10^5$  colony forming units (CFU) per gram of natural matter (MN), *Trichoderma longibrachiatum* at 60 (TL60) and 120 days of regrowth (TL120) applied at  $1.0 \times 10^5$  CFU/g of MN and these fungi combined at  $1.0 \times 10^5$  CFU/g of forage MN at 60 (MIX60) and 120 days of regrowth (MIX120). After 56 days of ensilage, there was no difference between the microbiota of forage silages harvested at 60 days. The lactic acid bacteria (LAB) population was higher ( $P < 0.05$ ) for MIX120  $5.50 \log$  CFU/g MN compared to C120  $3.60 \log$  CFU/g MN. The parameters pH, gas losses and effluents were not influenced by the inoculation. In the silage made with cut grass at 60 days, the LAB populations showed negative correlations with fungi  $-0.370$  ( $P < 0.044$ ) and gas losses  $-0.380$  ( $P < 0.037$ ). Enterobacteria showed positive correlations with yeast count  $0.369$  ( $P < 0.038$ ). In the second silage LAB showed a positive correlation with pH  $0.361$  ( $P < 0.050$ ) and fungi also had a positive correlation with pH  $0.395$  ( $P < 0.031$ ). The use of fungi in elephant grass cv. cameroon harvested after 60 days of regrowth did not change the silage. This inoculum, when performed on forage harvested at 120 days of growth, provides greater development of Gram-positive bacilli and LAB.

key words: Lactic acid bacteria. Tropical grass. Fibrolytic enzymes. *Aspergillus terreus*. *Trichoderma longibrachiatum*. *Pennisetum purpureum* Schum..

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição bromatológica do capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 60 e 120 dias de rebrota, em porcentagem da matéria seca.....	44
Tabela 2	População de microrganismos (log UFC/g MN) de capim-elefante cv. Cameroon fresco colhido aos 60 e 120 dias de rebrota.....	44
Tabela 3	População de microrganismos (log UFC/g MN) em silagem de capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 60 dias, inoculado com <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , <i>Aspergillus terreus</i> e MIX.....	45
Tabela 4	População de microrganismos (log UFC/g MN) em silagem de capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 120 dias, inoculado com <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , <i>Aspergillus terreus</i> e MIX.....	45
Tabela 5	Valores médios de pH, perda de gases (PG) e efluentes (PE) da silagem de capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 60, inoculadas com <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , <i>Aspergillus terreus</i> e MIX.....	46
Tabela 6	Valores médios de pH, perda de gases (PG), efluentes (PE) da silagem de capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 120, inoculadas com <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , <i>Aspergillus terreus</i> e MIX.....	47
Tabela 7	Composição bromatológica da silagem de capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 60 dias de rebrota, em porcentagem da matéria seca.....	47
Tabela 8	Composição bromatológica da silagem de capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 120 dias de rebrota, em porcentagem da matéria seca.....	48

## **LISTA DE SIGLAS**

BAL - Bactéria ácido lácticas

MN - Matéria natural

CS - Carboidratos solúveis

NT - Nitrogênio total

UFC - Unidades formadoras de colônias

EE – Extrato etéreo

FDA – Fibra em detergente ácido

FDN – Fibra em detergente neutro

MM – Matéria mineral

MS – Matéria seca

PB – Proteína bruta

## Sumário

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
CAPITULO 1 .....	13
REVISÃO DE LITERATURA .....	13
Capim-elefante.....	13
Microbiota e processo fermentativo .....	15
Uso de BAL como inoculantes para silagem .....	22
Inoculação de silagens com fungos e enzimas fibrolítica.....	24
CONCLUSÃO .....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
CAPÍTULO 2 .....	37
MICROBIOTA, PERDAS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PH DE SILAGEM DE CAPIM ELEFANTE CV. CAMEROON INOCULADAS COM FUNGOS AUTÓCTONES DO RÚMEN.....	37
INTRODUÇÃO .....	37
MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
Forragem utilizada .....	39
Inoculantes utilizados.....	39
Delineamento experimental e preparo das silagens .....	40
Análises microbiológicas .....	41
Análises de perdas.....	41
Análises bromatológicas .....	42
Análises estatísticas.....	42
RESULTADOS .....	42
Forragem “in natura” .....	42
Microbiota da silagem.....	43
Perdas e pH .....	45
Composição química da silagem .....	46
Correlações.....	47
DISCUSSÃO .....	47
Alteração da microbiota.....	47
pH e perdas da silagem .....	49
Composição química .....	51
Correlações.....	51
CONCLUSÃO .....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52

## INTRODUÇÃO GERAL

As pastagens são a principal fonte de alimentos para a produção de carne e leite, em especial nos países tropicais, onde a produção baseada em pastagens representa a maior parte da indústria pecuária (Moreno *et al.*, 2014). Porém, em grande parte dos sistemas de produção de bovinos a produção de forragem apresenta marcada estacionalidade, principalmente devido a intempéries climáticas: neve, inundações, secas intensas, etc.). Dessa forma, a conservação de alimento para a estação de escassez é uma maneira eficiente de manter a produtividade animal durante o ano.

A ensilagem é o método de preservação de forragem mais comum em sistemas de alimentação de ruminantes (Weinberg e Muck, 1996). A ensilagem é uma forma de armazenamento e preservação da forragem úmida fermentada em local fechado e isento de oxigênio (Weinberg e Chen, 2013). Para que o processo de ensilagem seja bem sucedido a escolha da forrageira deve considerar diversos fatores, como as características da cultura para promover a produção de silagem de qualidade. A produtividade e qualidade suficientes para ser conservada, baixo poder tampão, concentração de carboidratos solúveis (CS) suficiente para garantir o desenvolvimento da microbiota desejada e teor de matéria seca (MS) adequado (Jobim e Nussio, 2013).

Como o objetivo da produção de silagem é reservar alimento de qualidade para o período de escassez, cultivares mais produtivas tendem a ser as mais utilizadas para produção de silagem, visto que a maior quantidade de alimento estocado gera mais segurança para o produtor. O valor nutritivo da silagem está diretamente relacionado à composição e à digestibilidade da forrageira original e a ensilagem tem como objetivo preservar ao máximo essas características no material estocado (Tomich *et al.*, 2003). Diante disso o capim elefante se destaca como uma das gramíneas tropicais com maior produção por hectare e bom valor nutritivo.

O capim-elefante é uma gramínea altamente produtiva. Quando colhido aos 60 dias de rebrota, apresenta baixo teor de MS e CS e alta capacidade tampão. Em função disso, o processo de fermentação é difícil, resultando muitas vezes em silagem de baixa qualidade (Rodrigues *et al.*, 2005). Apesar destes problemas muitas vezes essa é a forrageira escolhida pelos produtores para ensilagem devido a sua alta produção e ciclo perene que reduz os custos e mão de obra.

Práticas como pré-murcha e uso de aditivos são frequentemente utilizadas para melhorar o processo de fermentação e a qualidade da silagem (Teixeira *et al.*, 2008).

Vários fatores podem influenciar os teores de carboidratos de uma planta como cultivares, o estágio de maturação, a luminosidade, a temperatura, a aplicação de fertilizantes e a precipitação pluviométrica (McDonald *et al.*, 1991).

No processo de conservação da silagem, as atividades enzimáticas e celulares dos vegetais são paralisadas em ambiente anaeróbio e os microrganismos presentes na massa ensilada convertem açúcares e compostos nitrogenados solúveis em ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico. Assim, as bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), promovem redução do pH e inibem o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis como *Clostridium* spp., *Enterobacteriaceae*, fungos filamentosos e leveduras (Danner *et al.*, 2003).

A população microbiana presente nas forrageiras recém colhidas é diferente da encontrada durante o processo de fermentação e no produto final da ensilagem. A microbiota autóctone das plantas é, em geral, equilibrada. Porém, os processos para a ensilagem do material, a escolha das espécies vegetais, uso ou não de outras espécies vegetais e aditivos, pode acarretar em variações nessa microbiota. A possibilidade de multiplicação dessas populações microbianas na massa ensilada está relacionada às condições do meio que naturalmente irá selecionar os grupos microbianos que se desenvolverão.

O objetivo da ensilagem é direcionar o desenvolvimento de microrganismos presentes nas plantas com a finalidade de promover boa fermentação e conservação do material ensilado. Alterações na umidade, anaerobiose e disponibilidade de substrato podem favorecer o crescimento de microrganismos indesejáveis em detrimento das BAL.

Dentro dos silos são produzidos diversos ácidos orgânicos (láctico, acético, butírico, isobutírico, propiônico, valérico, isovalérico, succínico, fórmico) (McDonald *et al.*, 1991). Especial destaque deve ser dado ao ácido láctico, principal responsável pela redução do pH da silagem. Em silagens bem fermentadas o ácido láctico está presente em maior concentração no material ensilado, conservando a massa ensilada. O ácido láctico é produzido principalmente por BAL homofermentativas e heterofermentativas em meio anaeróbio.

Objetivou-se com esta revisão, realizar levantamento da literatura sobre microbiota, processo fermentativo e uso de inoculantes em silagens de capim elefante.

## CAPITULO 1

### REVISÃO DE LITERATURA

#### Capim-elefante

A escolha da forrageira para ensilagem é multifatorial e leva em consideração variáveis como custo, produtividade, adaptação da cultura ao processo, manejo entre outras. A grande produtividade, baixo custo de produção em relação as culturas mais adaptadas ao processo de ensilagem como milho e sorgo e o fato de ser uma gramínea perene são algumas características do capim-elefante que o tornam a cultura de escolha de muitos pecuaristas. Apesar da baixa concentração de CS e alto teor de umidade do capim-elefante, as silagens produzidas com a gramínea, podem proporcionar silagens razoáveis (Ferrari Júnior e Lavezzo, 2001).

O capim-elefante é uma forrageira com alto potencial de produção, bem adaptada às condições climáticas e de solo de praticamente todo o território brasileiro, sendo considerada uma das forrageiras mais difundidas no país. Essa planta possui crescimento cespitoso e pode atingir entre 3 e 5 metros de altura. Seus colmos são eretos dispostos em touceira aberta ou não, com parênquima suculento, até 2 cm de diâmetro (Shimoya *et al.*, 2002).

O capim-elefante adapta-se bem desde o nível do mar até 2.200 metros de altitude, em regiões quentes e úmidas com precipitação anual acima de 1.000 mm. Essa forrageira não tolera períodos de seca muito severos e deve-se evitar solos com excesso de umidade. Solos de textura mediana ricos em matéria orgânica são mais indicados. O nível de fertilidade deve ser alto, já que a planta é considerada exigente e não tolera baixo pH e alumínio no solo. Apesar disso, a planta apresenta boa resposta à adubação e pode ser utilizada para pastejo, fornecimento picado fresco e conservado em silos (Gonçalves e Borges, 2006). Sua principal limitação é a propagação vegetativa, que deve ser realizada fazendo-se o transpasse de mudas com espaçamento de 0,5 a 1,0 m entre as linhas.

O ponto de corte ideal do capim-elefante para ensilagem deve buscar equilíbrio entre bom valor nutricional e alto rendimento de MS por área. Deve-se buscar elevado teor proteico e baixas frações fibrosas no material. Apesar disso, a colheita do material mais jovem e com maior qualidade resulta em forragem com baixo teor de MS. O excesso de umidade, pode acarretar em muitos casos condições que permitem fermentações indesejadas que reduzem a qualidade da silagem (Ferrari Júnior e Lavezzo, 2001).

Com objetivo de melhorar a qualidade da fermentação da silagem de capim-elefante diversas técnicas foram desenvolvidas, principalmente com objetivo de aumentar o teor de MS da massa ensilada ou adicionar nutrientes capazes de acelerar o processo de fermentação (Macêdo *et al.*, 2017). A opção mais barata para redução da umidade da gramínea é a pré-murcha, deixando o capim-elefante cortado e exposto ao sol por 6 a 24 horas, para aumentar o teor de MS. Embora não permita a obtenção de material com 30 a 35% de MS essa alteração de umidade é suficiente para melhorar a qualidade da fermentação da silagem (Ferrari Junior e Lavezzo, 2001; Carvalho *et al.*, 2007). O emurchecimento é recomendado para plantas com teor de MS abaixo de 20% (Nussio *et al.* 2002).

Outra alternativa para elevar o teor de MS do capim-elefante destinado a ensilagem é a adição de produtos com altos teores de MS. Podem ser usados como aditivos desde subprodutos da indústria a alimentos nobres como fubá de milho e farelo de soja (Monteiro *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2007; Tosi *et al.*, 1999).

Rodrigues *et al.* (2005) realizaram um estudo para avaliar a adição em níveis crescentes de polpa cítrica sobre a qualidade fermentativa e o valor nutritivo da silagem de capim-elefante colhido aos 90 dias de rebrota. Foi observado efeito crescente da adição de polpa cítrica sobre os teores de MS, CS e digestibilidade *in vitro* da MS, e redução nos teores de nitrogênio amoniacal e FDN. Os teores de ácidos orgânicos (acético, láctico e butírico) e etanol responderam de forma quadrática, com pontos de máxima para o ácido láctico de 5,8% e de mínima para os ácidos acético, butírico e o etanol, de 7,8; 7,2; e -3,7% respectivamente. Não foram observados efeitos sobre os valores de pH e lignina.

Em estudo conduzido por Tosi *et al.* (1999) foi avaliada a composição química, digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) de capim-elefante cv. Taiwan A-148. Os tratamentos utilizados foram controle; 20; 30; 40% de sabugo de milho; emurchecimento por 12 h; emurchecimento por 24 h; e esmagamento + emurchecimento por 24 h. A inclusão de 30 e 40% de sabugo de milho afetou negativamente a qualidade das silagens, que apresentaram maior proporção de N-NH<sub>3</sub> e reduziram a concentração de ácido láctico e a DIVMS das silagens. O esmagamento + emurchecimento por 24 h aumentou o teor de MS e reduziu a concentração de N-NH<sub>3</sub> e DIVMS. A divergência entre os resultados obtidos com a adição de polpa cítrica e sabugo de milho podem ser devido à grande diferença entre a qualidade nutricional dos alimentos adicionados às silagens.

Além das opções apresentadas acima, uma forma muito utilizada para melhorar a qualidade da silagem de gramíneas tropicais é a adição de microrganismos que aceleram a fermentação e promovem rápido declínio do pH. Em geral os inoculantes microbianos mais

usados são compostos por BAL (Guan *et al.*, 2020), a adição destes inoculantes no momento da ensilagem visa aumentar a população de microrganismos desejáveis e assim direcionar a fermentação da massa ensilada.

Pereira *et al.* (2007) avaliaram o pH, a relação nitrogênio amoniacal/nitrogênio total (N-NH<sub>3</sub>), a composição química a DIVMS e as populações microbianas de silagens de capim-elefante colhido aos 100 dias de rebrota, adicionadas de dois inoculantes bacterianos comerciais comparado a um controle sem inoculantes. Todas as silagens apresentaram pH próximo de 4,0 e DIVMS semelhantes à encontrada no controle, da mesma forma os teores de N-NH<sub>3</sub> não variaram entre os tratamentos. Conclui-se então que a boa qualidade da silagem controle dispensa a adição de inoculantes que as populações microbianas são adequadas para a manutenção de uma boa fermentação no silo. Em trabalho realizado por Zanine *et al.* (2007) foi avaliada a inoculação com *Lactobacillus plantarum* combinado ou não com farelo de trigo sobre as perdas por gases, recuperação da MS, pH, N-NH<sub>3</sub>, ácido láctico e composição bromatológica de silagens de capim-elefante. O tratamento com farelo de trigo e inoculante apresentou o menor valor de pH, maior valor de ácido láctico e menor perda por gás. Foi relatado menor teor de fibra em detergente neutro (FDN) nas silagens com aditivos. Os autores concluíram que a inoculação com *L. plantarum* e a adição do farelo de trigo reduzem as perdas de MS e melhoram a qualidade da silagem de capim-elefante, sendo os maiores efeitos quando os aditivos são combinados.

### **Microbiota e processo fermentativo**

O processo de ensilagem possui diversos pontos críticos, e o descaso com estes procedimentos pode acarretar em perdas significativas de MS. Essas perdas estão relacionadas a danos mecânicos durante a colheita, respiração vegetal e microbiana, desaminação, proteólise, perdas de efluentes e deterioração aeróbia (Grant e Adesogran, 2018). Muitas dessas perdas estão associadas a fermentações indesejáveis no silo.

Os principais microrganismos responsáveis pela conservação da forragem no silo são as BAL. Estes microrganismos são bactérias Gram positivo com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes. Podem ser cocos ou bastonetes não formadores de esporos que têm o ácido láctico como principal produto da fermentação (Salminen e Von Wright, 1993). Este grupo é composto por 13 gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*,

*Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Muck, 2010).

Considerando o metabolismo das BAL, destacam-se duas vias de fermentação de carboidratos: a via glicolítica, classificada como via homofermentativa, uma vez que todo o produto do metabolismo oriundo da oxidação dos CS é o ácido láctico, e a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase, também conhecida como via heterofermentativa, devido aos produtos de seu processo fermentativo serem variados como etanol, acetato, CO<sub>2</sub>, ácidos graxos voláteis e outros compostos aromáticos (Salminen e Von Wright, 1993). O gênero *Lactobacillus* é o principal representante do grupo de BAL. Apesar das exigências complexas, as BAL dominam a fermentação uma vez que condições anaeróbias são atingidas no interior do silo (Macêdo *et al.*, 2017).

Além das BAL, diversos microrganismos são encontrados nas silagens. Porém os demais microrganismos são em maior parte deterioradores. Segundo Muck (2010) as enterobactérias são uma família de bacilos Gram negativos, com várias propriedades em comum. Estas bactérias encontram-se amplamente distribuídas na natureza, sendo que a maioria habita os intestinos do homem e dos animais, como parte da microbiota autóctone ou agentes infecciosos.

Classificadas como anaeróbias facultativas, as enterobactérias conseguem se desenvolver imediatamente após o fechamento do silo. Por isso, estas bactérias dominam os estágios iniciais da fermentação e são também os principais concorrentes das BAL por substrato. Estas bactérias são as principais produtoras de gases no interior do silo, como consequência de fermentações indesejadas convertendo os CS em ácido acético, etanol e CO<sub>2</sub>. O crescimento em grandes proporções destes microrganismos está frequentemente associado à baixa concentração de MS na silagem (Araújo *et al.*, 2020). Apesar do grande potencial de danos, o pH ótimo para seu desenvolvimento é próximo de 7 e é inibido com valores de pH abaixo de 5,0 (Muck e Bolsen, 1991).

A ensilagem de materiais com alto teor de umidade, além de favorecer o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis produtores de gases como as enterobactérias, pode aumentar a produção de efluentes e maiores perdas de nutrientes devido à lixiviação, resultando em redução no valor nutritivo da silagem e possíveis contaminações do ambiente. (Gomes *et al.*, 2017).

Os efluentes drenados do silo, em geral infiltram no solo gerando mudanças de pH e impactando negativamente a microbiota natural, proporcionando aumento nos níveis de nitrogênio associados com a emissão de óxido nitroso, um dos gases de efeito estufa (Araújo *et*

*al.*, 2020). Quando o efluente é escoado para cursos d'água, as substâncias podem ser utilizadas por microrganismos e durante o processo, parte ou todo o oxigênio presente na água pode esgotar-se. A demanda bioquímica de oxigênio do efluente da silagem pode superar a do esgoto doméstico, tornando um grande poluente para os lençóis freáticos (Loures *et al.*, 2003).

A perda de MS de silagens por efluentes pode variar entre 5 a 10%. A maior parte dos efluentes são produzidos nos primeiros dias após a ensilagem, quando provavelmente a disponibilidade de oxigênio já se esgotou, isso contribui para ruptura da membrana celular das plantas, facilitando a perda de conteúdos celulares (Woolford, 1984).

Nutrientes como carboidratos solúveis, ácidos orgânicos, minerais e compostos nitrogenados solúveis, podem ser perdidos junto aos efluentes das silagens. Ocasionalmente assim à maior concentração de componentes da parede celular na massa ensilada, reduzindo assim a digestibilidade e qualidade do alimento. De acordo com Faria *et al.* (2010) a produção total de efluente na primeira semana após ensilagem de capim-elefante diminuiu com inclusão de até 18% de casca de café, de 68,5% para 36,8%. A inclusão do subproduto além de reduzir a produção de efluentes aumentou o teor de MS do material ensilado.

Os nutrientes encontrados na silagem são bons substratos para o desenvolvimento de fungos e leveduras. Além das perdas relacionadas a fermentação dos fungos nas silagens, o seu desenvolvimento pode levar a prejuízos maiores devido a produção de micotoxinas como produtos secundários do seu metabolismo. A microbiota epífita das forrageiras pode apresentar considerável variedade de fungos toxigênicos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* que podem produzir, entre outros, aflatoxinas, ocratoxina A e tricotecenos (Kostulak-Zielińska *et al.* 2002). O fornecimento de alimentos contaminados por fungos pode reduzir o consumo de matéria seca (CMS). As micotoxinas produzidas podem causar intoxicações e em casos mais graves levar à morte dos animais (Creppy, 2002). Especial atenção deve ser dada à aflatoxina B1 porque, após a ingestão por bovinos leiteiros, sofre transformações na forma M1 é excretada no leite, mantendo suas propriedades tóxicas e representando grave risco à saúde humana (Selwet, 2005).

As leveduras encontradas nas silagens são divididas em aeróbias (*Candida*, *Hansenula*), capazes de degradar AGV e anaeróbias (*Saccharomyces*), que produzem etanol e CO<sub>2</sub> (Selwet, 2006). Estes são os principais microrganismos envolvidos na deterioração aeróbica da silagem, principalmente as leveduras assimiladoras de lactato.

A contagem de UFC de leveduras em silagens deve ser analisada com cautela, por três principais razões: os resultados expressos pelos laboratórios representam o total de leveduras, sem diferenciar entre assimiladoras ou não de lactato, o desenvolvimento das leveduras em ágar

seletivo não implica necessariamente que são capazes de se desenvolver no ambiente da silagem. Portanto, uma silagem com quantidade moderada de leveduras pode apresentar relativa estabilidade aeróbica. O *Acetobacter* sp. pode iniciar a deterioração aeróbia, em especial na silagem de milho (Spoelstra *et al.*, 1988) e, portanto, silagens com baixa contagem de leveduras podem ser aerobicamente instáveis. Além disso, as silagens que sofreram grande deterioração podem ter um número muito baixo de leveduras e fungos devido à morte desses organismos por falta de substrato. O número de leveduras e fungos pode aumentar acentuadamente desde o momento da amostragem até a chegada ao laboratório, especialmente em climas quentes (Kung Jr. *et al.* 2018).

A contagem de leveduras no material fresco não é determinante em relação a população dos microrganismos na silagem. As unidades formadoras de colônia (UFC) encontradas no material “in natura” não demonstraram nenhuma correlação entre o número de leveduras totais em plantas de milho de planta inteira recém-picadas e o número final de leveduras em a silagem produzida (Kung Jr *et al.*, 2018).

A presença de grandes populações de *Clostridium* spp. em silagens está associada a baixo conteúdo de MS da forrageira e compactação excessiva no momento da ensilagem. Os *Clostridium* spp. são bacilos Gram positivos, anaeróbios e produtores de esporos. São microrganismos deterioradores da silagem e com potencial para gerar muitas perdas, seja por redução do CMS ou até morte de animais por intoxicação. As perdas de gases estão relacionadas a fermentação secundária, principalmente por microrganismos aeróbios e *Clostridium* spp. (Muck, 1996).

Pahlow *et al.* (2003) dividiram as espécies de *Clostridium* spp. mais comuns em três grupos, em função de suas propriedades de fermentação de proteínas e carboidratos. Os *Clostridium* spp. proteolíticos, fermentam carboidratos e proteínas como fonte de energia, o *Clostridium sporogenes* é a principal espécie desse grupo encontrada na silagem. O grupo dos *Clostridium butyricum* fermentam uma grande variedade de carboidratos, porém são incapazes de fermentar proteínas. O grupo dos *Clostridium tyrobutyricum*, fermenta uma variedade limitada de carboidratos, mas, tem a capacidade de fermentar ácido lático em ácido acético e ácido butírico em pH baixo.

Um dos representantes mais conhecidos do gênero *Clostridium* é o *C. botulinum*, agente causador do botulismo, que raramente é encontrado na silagem. O botulismo é causado pela ingestão de neurotoxinas altamente potentes produzidas pelo *C. botulinum* (toxinas botulínicas). A ocorrência de *C. botulinum* e das toxinas na silagem estão muitas vezes associadas à contaminação da silagem com carcaças (Cobb *et al.* 2002) ou fezes de animais. O

*C. botulinum* é mais sensível a baixos valores de pH (Pahlow *et al.* 2003). Dessa maneira, o *C. botulinum* não se desenvolve em condições normais de ensilagem. Os *Clostridium* spp. apesar de serem sensíveis a baixos valores de pH também tem sua atividade modulada pela disponibilidade de água. Em silagens com teor de MS superior a 28% a atividade desses microrganismos é rara, enquanto em materiais com aproximadamente 15% de MS, valores de pH abaixo de 4 podem não ser suficientes para inibir totalmente seu crescimento (Edwards e McDonald, 1978; Leibensperger e Pitt, 1987; McDonald *et al.*, 1991).

A conservação do alimento na silagem ocorre em meio ácido, resultante da produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos. O mais importante ácido orgânico encontrado nas silagens é o ácido láctico, porém outros ácidos apresentam grande significância sobre a qualidade da silagem. O ácido acético é produzido em grande parte por BAL heterofermentativas e enterobactérias. Essa fermentação pode resultar em menor eficiência na redução do pH e acarretar maiores perdas de MS e energia da forragem ensilada. Esse ácido pode representar entre 20 e 30% do total de ácidos orgânicos no silo. Estudos realizados com BAL heterofermentativas demonstram o potencial do ácido acético como inibidor de microrganismos indesejáveis como fungos filamentosos e leveduras, e a sua presença em quantidades moderadas pode resultar em melhorias na estabilidade aeróbia de silagens com altas concentrações de ácido láctico e CS residuais (McDonald *et al.*, 1991).

Durante todo o período que o silo está fechado ocorrem reações diversas na massa ensilada, assim avaliação da silagem em vários momentos de abertura é muito importante, pois segundo Woolford (1984), o pH final não pode ser tomado isoladamente como um bom critério para avaliação das fermentações, pois a inibição de fermentações secundárias depende mais da velocidade de abaixamento do mesmo, da concentração iônica e da umidade do meio do que do pH final da silagem.

Assim como a redução do pH, a maioria dos processos fermentativos que devem ocorrer dentro do silo acontecem logo nos primeiros dias pós-fechamento. Em silagens com baixos teores de MS é preciso tomar todos os cuidados para direcionar e acelerar essas reações, com objetivo de reduzir a proteólise e a atividade clostridiana nessas silagens que são mais suscetíveis (Muck, 1988). Em estudo conduzido por Barcelos *et al.* (2018) o capim elefante sem aditivos apresentou pH de 4,27 e a adição de casca de café aumentou o teor de MS enquanto o pH foi menor que 4,0. Rodrigues *et al.* (2003) avaliaram silagens de capim elefante colhido aos 97 dias de rebrota, as variáveis analisadas indicaram silagens de boa qualidade com pH 3,54.

Ávila *et al.* (2003) em estudo com silagem de capim tanzânia demonstraram que a queda de pH das silagens a valores abaixo de 4,2 ocorreu até o terceiro dia após o fechamento do silo. Guimarães Júnior *et al.* (2005) trabalharam com silagem de milho e relataram que a estabilidade do pH ocorreu 14 dias após a ensilagem, porém no quinto dia o pH já era de 3,94.

A proteólise se inicia assim que a forragem é cortada, e continua durante a ensilagem, e sua extensão depende do tempo gasto para que as condições ácidas sejam estabelecidas. Dessa forma, é esperado que intervenções que influenciam os valores de pH e a velocidade de sua redução também reflitam em alterações nos teores de N-NH<sub>3</sub> (% N total) da silagem (Woolford, 1984).

A hidrólise de proteínas que se inicia no corte da gramínea, pode elevar os valores de NNP para aproximadamente 40% do NT, nas primeiras 24 horas de ensilagem. Este conteúdo pode atingir 70% na abertura do silo (Ohshima e McDonald, 1978). A proteólise inicial é mediada, principalmente, por enzimas da planta, enquanto as degradações subsequentes de aminoácidos ocorrem pela ação de microrganismos em grande parte deterioradores.

Em silagens bem conservadas, os aminoácidos constituem a maior parte da fração de NNP e a amônia presente está em baixas concentrações (Van Soest, 1994). A amônia oriunda da proteólise, além de inibir o consumo da silagem e reduzir a eficiência na utilização do nitrogênio para síntese protéica pelos microrganismos do rúmen, altera o curso da fermentação, impedindo a rápida queda do pH da massa ensilada (McKersie, 1985). Valores de N-NH<sub>3</sub> acima de 10% do nitrogênio total, são indicativos de fermentação indesejada e consequentes perdas (Tomich *et al.*, 2003).

Em pesquisa realizada por Barcelos *et al.* (2018) a concentração de N-NH<sub>3</sub> percentual do N total na silagem de capim elefante sem aditivo aberta após 60 dias foi de 44,49 e a inclusão de 30% casca de café reduziu para 14,00% do N total. Rodrigues *et al.* (2003) obtiveram resultado de N-NH<sub>3</sub>/NT de 7,24%, em silagens abertas aos 120 dias, não houve efeito da adição de inoculantes sobre o N-NH<sub>3</sub>.

Guimarães Júnior *et al.* (2005) observaram que as concentrações de N-NH<sub>3</sub> em relação ao N total em silagens de milho foram inferiores a 10%, porém a concentração foi crescente do primeiro até o 56º dia após ensilagem e não apresentou tendência de estabilizar. Ávila *et al.* (2003) relataram valores de N-NH<sub>3</sub> em relação ao N total abaixo de 5% e com concentração estabilizada entre 28 e 56 dias, em silagens de capim tanzânia. Estes valores são baixos e difíceis de atingir principalmente em silos de gramíneas tropicais.

A concentração de ácido butírico é um dos principais indicadores da baixa qualidade do processo de fermentação, sendo este um indicativo da proliferação de *Clostridium* sp. na massa

ensilada. A fermentação butírica resulta em perdas acentuadas de MS e energia da forragem original durante a fermentação, a concentração de ácido butírico está negativamente correlacionado ao consumo e a palatabilidade da silagem (Muck e Bolsen, 1991). O *C. tyrobutyricum* é o principal produtor de ácido butírico na silagem devido à sua tolerância a condições de baixo pH em combinação com sua capacidade de usar ácido láctico como substrato para o crescimento (Pahlow *et al.* 2003). As análises de *Clostridium* sp. na silagem em muitos casos são dispensáveis porque o acúmulo de ácido butírico é suficiente para confirmar sua presença (Kung Jr. *et al.* 2018).

A microbiota exerce papel determinante no processo de ensilagem, com predominância de diferentes microrganismos em cada fase. O processo de ensilagem possui quatro fases distintas com duração e intensidade diferentes (Weinberg e Muck, 1996; Pahlow *et al.*, 2003).

A fase aeróbica inicia com a colheita da forragem e segue pela trituração do material, transporte, enchimento e compactação e termina algumas horas após a vedação do silo, com a exaustão do oxigênio residual (Jobim e Nussio, 2013). Durante essa fase as rupturas das células em função do corte da forragem permitem o extravasamento de líquido celular com proteases, hemicelulases, amilases, polissacarídes da planta que podem hidrolisar proteínas em aminoácidos livre e carboidratos em monossacarídeos. A disponibilidade desses substratos proporciona condições ótimas para o desenvolvimento de microrganismos da microbiota epífita como fungos, leveduras e bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas (Weinberg e Muck, 1996).

A atividade destes microrganismos e a respiração das células vegetais, que apesar do processamento ainda apresentam estrutura suficiente para realizar respiração celular, que reduz a qualidade da silagem, por levar a perdas de MS, energia e reduzir a quantidade de CS disponíveis para a fermentação das BAL (Tomich *et al.*, 2003; Borreani *et al.*, 2018). Portanto deve-se abreviar ao máximo a duração desta fase, para reduzir as perdas no processo de conservação do alimento.

A fase de fermentação ativa tem duração variável, de acordo com as características do material ensilado e condições do processo de ensilagem. Após a remoção do oxigênio residual, o ambiente de anaerobiose proporciona condições ideais para a fermentação. Em ambiente anaeróbio ocorre competição entre as BAL e alguns microrganismos deletérios se desenvolvem, porém seu crescimento é limitado pela queda do pH abaixo de 4,5, quando suas populações reduzem rapidamente (Weinberg e Muck, 1996). Posteriormente as BAL dominam o ambiente, fermentam os CS e produzem ácidos orgânicos, isso resulta em redução do pH da silagem e inibição do desenvolvimento de outros microrganismos (Pahlow *et al.*, 2003). A produção de

ácido láctico em grandes proporções resulta em valores de pH que inibem até mesmo as BAL homofermentativas, finalizando a fase de fermentação.

Durante a fase de estabilidade, ocorre baixa atividade microorganismos devido à inibição pela grande quantidade de ácido láctico e consequente baixo pH do meio (Lima *et al.*, 2012). O pH permanece estável próximo a 4,0, inibindo atividades microbianas, porém algumas enzimas vegetais e microbianas ácido tolerantes continuam ativas.

Na fase de abertura do silo, o material fermentado é exposto ao oxigênio. Neste momento, o ácido láctico e os CS residuais podem ser utilizados para o desenvolvimento de microorganismos aeróbios deterioradores do alimento como fungos, leveduras e enterobactérias. O excesso de CS pode reduzir a estabilidade aeróbia das silagens (Weinberg e Muck, 1996). As leveduras, por sua vez, aceleram a degradação de carboidratos e ácido láctico, produzindo CO<sub>2</sub>, calor e água (Liu *et al.*, 2020). Como resultado ocorre a rápida elevação do pH do meio, proporcionando condições favoráveis ao desenvolvimento de outros microorganismos indesejáveis e queda substancial do valor nutricional da silagem (McDonald *et al.*, 1991).

### **Uso de BAL como inoculantes para silagem**

Segundo Muck *et al.* (2018) o uso de aditivos para silagem tem como objetivo resolver alguns dos principais problemas encontrados nas silagens. Para a produção de silagens de qualidade certos fatores exercem grande impacto, sendo os mais relevantes, a produção de ácido láctico e rápida redução do pH, evitando a fermentação por clostrídios, reduzindo as populações de leveduras para melhorar a estabilidade aeróbica da silagem e em função disso o desempenho animal. Em muitos casos estes objetivos são alcançados pois silagens tratadas com uma ou mais BAL muitas vezes apresentam menor pH, baixas concentrações de acético ácido, ácido butírico e nitrogênio amoniacal, maior teor de ácido láctico e melhor recuperação de MS quando comparadas a silagens não tratadas (Muck e Kung, 1997).

Em estudo realizado por Sifeeldein *et al.* (2018) para determinar o efeito da aplicação de três isolados de BAL e um inoculante comercial na dinâmica de fermentação, comunidade microbiana e estabilidade aeróbia da silagem de capim-elefante. O capim foi ensilado com ou sem adição de um inoculante de bactéria láctica a  $1,0 \times 10^6$  UFC/g de MN. Para acompanhar a dinâmica da fermentação durante a ensilagem foram retiradas amostras nos dias 7, 14, 30, 60 e 90 de ensilagem para análises químicas e microbiológicas. A estabilidade aeróbia foi avaliada 90 dias após o fechamento dos silos. Após 30 dias de ensilagem o único tratamento que

apresentou pH acima de 4,5 foi o controle, o grupo sem inoculantes também manteve valores mais altos que os demais para CS, nitrogênio amoniacal, bactérias aeróbicas e levedura, e menor conteúdo de ácido láctico e BAL. Apesar disso, a estabilidade aeróbia da silagem reduziu com o tratamento das cepas em comparação com o controle.

De acordo com Weinberg *et al.* (1993) a deterioração da silagem após exposição ao oxigênio ocorre porque a inoculação de BAL normalmente aumenta a concentração de ácido láctico, mas reduz a concentração de ácido acético, que possui forte ação antifúngica. Assim, fungos e leveduras voltam a se desenvolver na silagem aberta utilizando o ácido láctico como substrato.

Em trabalho conduzido por Amaral *et al.* (2020) com objetivo de caracterizar LAB a partir de silagens de capim elefante e, posteriormente, selecionar linhagens com potencial para ser usadas como inoculantes microbianos. A estabilidade aeróbia, o perfil fermentativo e a população microbiana das silagens de capim-elefante da cultivar BRS Capiçu foram avaliados 60 dias após o fechamento do silo. Não foram encontradas BAL no capim elefante antes da ensilagem. A fermentação da silagem de capim-elefante foi caracterizada pela sucessão de *Lactobacillus sakei*, grupo *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* e *L. brevis*. As silagens inoculadas apresentaram menor perda de MS em relação ao controle 38 g/kg e 123 g/kg respectivamente e maior estabilidade aeróbia 33,1h nas silagens inoculadas e 21,2h no controle.

Em trabalho avaliando os efeitos da inoculação de *Streptococcus bovis* JB1 e HC5 na concentração  $10^6$  UFC/g de MN em silagem de capim-elefante cortado aos 65 dias de rebrota, Ferreira *et al.* (2013) relataram redução na contagem de enterobactérias, fungos e leveduras nos grupos adicionados dos *S. bovis*. A silagem inoculada com a bactéria apresentou também maior contagem de BAL. Em contraponto aos resultados do presente estudo, a inoculação do microrganismo no trabalho de Ferreira *et al.* (2013) promoveu melhor desenvolvimento de microbiota desejável e inibição de deterioradores. Os valores de pH encontrados foram 3,83 e 3,96 nos tratamentos com *S. bovis* JB1 e HC5, respectivamente, inferiores ao valor observado de 4,01 no tratamento controle.

Uma meta-análise foi realizada por Oliveira *et al.* (2017) para avaliar os efeitos da inoculação de BAL na qualidade e preservação da silagem. 130 artigos atenderam aos critérios de seleção. A magnitude do efeito foi avaliada entre os tratamentos inoculados e não inoculados. A inoculação com BAL aumentou significativamente a fermentação da silagem e a recuperação da MS em gramíneas temperadas e tropicais, alfafa e outras leguminosas. Porém, para as silagens de milho, sorgo e cana-de-açúcar a inoculação não melhorou o padrão da fermentação. A inoculação com BAL reduziu o crescimento de *Clostridium* spp. e fungos, a produção de

ácido butírico e nitrogênio amoniacal em todas as silagens, mas não alterou a estabilidade aeróbia. A inoculação aumentou a produção de leite e a resposta teve baixa heterogeneidade. No entanto, a inoculação não afetou a digestibilidade da dieta e a eficiência alimentar.

A grande disponibilidade de CS no milho, sorgo e cana-de-açúcar proporcionou substrato suficiente para promover adequada fermentação nas silagens, porém em culturas que não apresentam características tão favoráveis a ensilagem, como é o caso do capim-elefante o uso de BAL é aconselhável por Oliveira *et al.* (2017). De acordo com Khota *et al.* (2016) nos casos que a microbiota epífita apresenta quantidade suficiente de BAL, o uso de inoculante para produção de silagem de qualidade não é necessário. Uma população de aproximadamente 108 BAL por grama de material ensilado suficiente para garantir adequada fermentação para a conservação da silagem (Muck, 1988).

### **Inoculação de silagens com fungos e enzimas fibrolítica**

Segundo Muck *et al.* (2018) a seleção de bactérias com potencial de produção de enzimas como: celulasas, esterases, proteases, amilases e cutinases, poderiam gerar opções para melhorar a conservação da silagem, sendo empregados como forma de otimizar a dinâmica de fermentação da silagem. Assim como as bactérias, os fungos, desde que não sejam deterioradores, ou patogênicos apresentam o mesmo potencial. As celulasas podem inibir a degradação de proteínas e promover a degradação de fibras, apresentando grande potencial como aditivo para a fermentação de silagens de gramíneas tropicais (Khota *et al.*, 2016). Alguns trabalhos foram conduzidos avaliando os efeitos da adição de enzimas fibrolíticas em silagens de forrageiras tropicais. Em menor proporção a inoculação de fungos e leveduras diretamente na massa de forragem também foram avaliados.

O uso de fungos e leveduras em silagens encontra uma barreira devido a associação destes microrganismos a má qualidade da fermentação, perdas e até mesmo produção de toxinas. Como as leveduras, particularmente assimiladoras de lactato, são as principais responsáveis pela deterioração aeróbia em silagens (Pahlow *et al.*, 2003), a presença desses microrganismos nas silagens é sempre vista como um problema. Porém, algumas espécies de leveduras podem promover resultados positivos quando inoculados na silagem. O principal objetivo da aplicação de leveduras como inoculantes deve ser a inibição de microrganismos que atrapalham a conservação do material (Muck *et al.*, 2018).

Duniere *et al.* (2015) utilizaram leveduras como inoculantes de silagens de milho. Foram comparados quatro tratamentos, silagem sem inoculantes, duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ( $10^3$  UFC/g) e uma cepa de *Saccharomyces paradoxos* ( $10^3$  UFC/g). O pH, e a concentração produtos da fermentação da silagem avaliados 90 dias após o fechamento dos silos não diferiram entre os tratamentos. As análises de digestibilidade *in situ* e *in vitro* das silagens não diferiram entre os tratamentos, assim como os parâmetros de desaparecimento de MS, produção de gás ou síntese de proteína microbiana. As três inoculações promoveram aumento da matéria mineral e reduziram a matéria orgânica das silagens. No tratamento com *S. cerevisiae* a contagem de leveduras foi superior a do controle, porém isso acarretou em deterioração aeróbica mais rápida. Nos demais tratamentos, a inclusão das leveduras na silagem não alterou a deterioração aeróbia ou a população de levedura em relação ao controle. Assim, estas cepas de leveduras não foram consideradas eficientes, porém os autores sugerem sua combinação com *Lactobacillus* spp.

A levedura, *Pichia anomala* J121 isolada de trigo de alta umidade mostrou forte atividade antifúngica, e atividade contra algumas bactérias gram-negativas. Olstorpe *et al.* (2010) compararam a silagem de cevada de alta umidade sem inoculantes ao material ensilado com *P. anomala* a  $10^5$  UFC/g MN e armazenados por 5 meses. A inclusão da levedura na silagem cevada aumentou a contagem de leveduras e reduziu a população de fungos. Não foram encontradas enterobactérias na silagem inoculada enquanto no grupo controle a contagem foi de 4,4 log UFC/g. Apesar dos resultados positivos descritos, questões regulatórias e outras têm sido barreiras à comercialização.

A aplicação de enzimas fibrolíticas em silagens de gramíneas tropicais tem sido avaliada, uma vez que o alto conteúdo de FDN e FDA destes materiais e o baixo teor de CS são fatores que dificultam o desenvolvimento dos microrganismos desejáveis nas silagens. Segundo Sun *et al.* (2012) a aplicação de enzimas fibrolíticas em silagens com altas concentrações de fibra podem aumentar a degradação da parede celular e a disponibilidade de CS para fermentação, levando a uma queda mais rápida do pH, especialmente em forragens com alto teor de carboidratos estruturais. Porém, de acordo com Van Soest (1994), a fração FDN da forragem nem sempre é reduzida na silagem tratada com enzimas.

Costa *et al.* (2019) realizaram trabalho com dois fungos do gênero *Trichoderma* sp. para produção de xilanases e posterior tratamento enzimático de forrageiras usadas na nutrição de ruminantes. Foram selecionadas enzimas que permaneceriam estáveis nas condições de pH e temperatura semelhantes às encontradas no rúmen. A aplicação das enzimas aumentou a digestibilidade do FDN no feno de tifton entre 5 e 7%, na silagem de milho entre 7 e 12% e na

silagem de cana-de-açúcar o resultado foi entre 5 e 9% melhor em relação ao material não inoculado. A aplicação das enzimas foi realizada após a abertura dos silos, portanto não passaram pelo processo de fermentação. Segundo os autores a adição de xilanases promove a quebra da hemicelulose e aumenta a exposição da celulose às enzimas presentes no rúmen.

Segundo Muck & Kung Jr. (1997), em experimentos com enzimas fibrolíticas, são apresentados resultados relativos à redução da fração fibrosa em silagens, aumento na degradabilidade da MS e da FDN, incremento na produção e no teor de gordura do leite e elevação na taxa de ganho de peso em bovinos. Contudo, em determinadas situações, a escassez de resultados positivos quanto à adição de enzimas fibrolíticas em silagens pode ser atribuída ao tipo de forragem, ao método de aplicação das enzimas, ao tempo requerido para as enzimas atuarem sobre o material, ao teor de MS da forragem e ao pH (Beauchemin *et al.*, 2002).

Em experimento realizado por Sun *et al.* (2009) foram testados os efeitos da adição de celulase ou BAL na fermentação da silagem e na produção de gás *in vitro* de várias frações da palha de milho. A palha do milho foi separada em lâmina foliar, bainha foliar, caule inteiro, ou mantida inteira. Cada fração foi ensilada durante 60 dias, inoculadas com 0, 10 e 20 ml de celulase ou 0,  $10^5$  e  $2 \times 10^5$  UFC/g LAB, por quilograma de material murcho. A bainha da folha apresentou composição química semelhante à do capim elefante quando colhido para ensilagem, principalmente para os valores de proteína bruta (PB), FDN e FDA. A adição de celulase ou LAB acelerou ( $P < 0,05$ ) a degradação dos CS, aumentou as concentrações de ácido láctico das silagens, reduziu as perdas de MS. Além disso, houve redução nos teores de FDN, PB e redução do pH da silagem. A energia metabolizável estimada a partir de 26 h de produção de gás foi positivamente influenciada pelos inóculos. Os maiores níveis de inoculação proporcionaram respostas melhores.

No mesmo trabalho a inoculação de BAL nas frações com mais CS resultaram em melhor resposta, enquanto a adição de enzimas na silagem de bainha da folha obteve melhor resposta. Assim, os autores concluíram que inoculantes microbianos são mais eficientes se utilizados em forrageiras com alto teor de CS e enzimas fibrolíticas são mais indicadas para forragem com baixo conteúdo de CS e altos níveis de FDN (Sun *et al.*, 2009). Em trabalho de Loures *et al.* (2005) os autores concluíram que a associação entre enzimas fibrolíticas e a pré-murcha de silagens foi mais eficiente em reduzir o teor de FDN, quando comparada à adição de enzimas fibrolíticas associadas ao inoculante bacteriano.

Lynch *et al.* (2015) conduziram um estudo para determinar os efeitos do uso de enzimas fibrolíticas, isoladas ou associadas a um aditivo bacteriano em silagem de milho. Os feitos foram avaliados sobre os parâmetros de composição química, características de conservação e

degradabilidade *in vitro*. No processo de ensilagem foram aplicadas enzimas fibrolíticas 2 ml/kg de MS (xilanasas e celulases) isoladamente ou em combinadas com o inoculante microbiano  $1,3 \times 10^5$  UFC/g MN. As amostras foram armazenadas por 7, 28 ou 70 dias.

Após 70 dias de ensilagem, as concentrações de ácido acético, etanol e a população de leveduras foram menores no grupo controle, em relação a esses parâmetros a silagem sem inóculo foi superior. Porém, o pH e as concentrações de FDN foram menores nas silagens produzidas com os inoculantes do que nas silagens não tratadas. Contudo a combinação dos inoculantes acarretou em maiores perdas de MS. A degradabilidade *in vitro* da MS, FDN e FDA após 24 h foi superior no grupo controle, no entanto após 48 h de incubação não foi encontrada diferença entre as silagens (Lynch *et al.*, 2015). O uso dos inoculantes na silagem de milho não melhorou a qualidade do material e além disso foram descritos efeitos negativos que podem comprometer a qualidade e a estabilidade aeróbia da silagem.

Em alguns casos, as enzimas podem atuar nos componentes mais digeríveis do FDN, deixando componentes indigestíveis intactos e, portanto, reduzindo a digestibilidade geral do FDN consumido (Dehghani *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2015). Assim, os resultados encontrados por Lynch *et al.* (2015) para digestibilidade do FDN podem ser explicados devido à maior presença de frações mais digestíveis no controle e, portanto, maior digestibilidade com 24h de incubação, porém, com maior tempo de retenção do alimento no rúmen os resultados se igualaram devido a capacidade de degradação de fibra da microbiota ruminal.

Para comparar os efeitos da inoculação de silagens capim-elefante e capim-Guiné com BAL ou enzimas fibrolíticas produzidas por fungos Khota *et al.* (2016) realizaram um ensaio, com a inoculação das enzimas combinadas ou não as BAL. O capim-guiné apresentou concentração de CS 0,39% MS e 2,38% MS no capim-elefante. A silagem de capim-guiné tratada com celulase apresentou menor pH e maior conteúdo de ácido láctico do que os tratamentos controle e LAB. Os tratamentos com maiores concentrações de enzimas apresentaram melhores resultados de qualidade da fermentação. Todas as silagens de capim-elefante apresentaram boa qualidade de fermentação, isso pode ser relacionado a maior concentração de CS na forrageira, proporcionando dessa forma condições mais favoráveis para a fermentação do material. As silagens tratadas com celulase apresentaram conteúdo de PB significativamente maior e redução nos teores de FDN e FDA. Os resultados relatados demonstraram a capacidade das celulases de melhorar a conservação de silagens de gramíneas tropicais, inibindo a proteólise e promovendo a degradação das fibras.

Além dos resultados ainda inconclusivos a sobre os efeitos da inoculação de enzimas fibrolíticas em silagens, outros entraves à disseminação desta tecnologia são: a complexidade

de cultivo e o alto custo de produção das enzimas, que dificultam sua produção em larga escala (Costa *et al.*, 2019). Dessa forma, alguns estudos foram realizados com o microrganismo adicionado diretamente ao alimento, contribuindo para o aumento da digestibilidade e rendimento protéico (Nayan *et al.*, 2018).

Em estudo realizado por Li *et al.* (2018) comparando diversos tipos de inoculantes em silagens de *Pennisetum sinense* quanto aos seus efeitos sobre as características de fermentação, degradação de carboidratos estruturais e rendimentos de conversão enzimática. Neste estudo a forrageira foi ensilada sem aditivo, com enzimas fibrolíticas ou com os microorganismos *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Trichoderma reesei*. As silagens foram avaliadas com 3, 7, 14, 30, 60 e 90 dias após a ensilagem.

Os resultados obtidos por (Li *et al.*, 2018) demonstraram que a inoculação com fungos, enzimas e *Enterococcus* foram eficientes em reduzir as concentrações de FDN e FDA em relação ao controle. O controle também apresentou maior perda de MS, e N-NH<sub>3</sub> que as silagens inoculadas. O pH em todas as silagens esteve sempre acima de 4 e não foi alterado pela adição dos inoculantes. Porém a proporção dos ácidos orgânicos variou, com pico de produção de ácido láctico aos 30 dias, após esse período houve grande retração na concentração do ácido na silagem sem aditivos, assim, apresentou a menor concentração de ácido láctico dos 60 aos 90 dias após ensilagem. A produção de ácido acético foi crescente até os 90 dias, com as menores concentrações nas silagens inoculadas com culturas microbianas. O desaparecimento dos CS nas silagens seguiu diferentes padrões, nos silos sem inoculante e com *L. plantarum* estabilizou-se aos 60 dias, enquanto, nas silagens inoculadas com *T. reesei*, enzimas e *E. faecium* a estabilidade foi alcançada aos 30 dias, indicando que nestes tratamentos a degradação de polissacarídeos continuou a fornecer CS mantendo os níveis estáveis.

O fungo *Piromyces* sp. é um microrganismo autóctone do rúmen com potencial para produção de enzimas celulolíticas, porém, é de difícil cultivo em laboratório. Para avaliar os efeitos do fungo ruminal *Piromyces* sp. CN6 CGMCC 14449 sobre a qualidade da fermentação, composição de nutrientes e DIVMS da silagem de milho Wang *et al.* (2019) realizaram a ensilagem em sacos de polietileno. Foram utilizados três tipos de inoculação, a controle sem aditivos, adição de fungo a 10<sup>5</sup> UFC/g de MN e adição de enzima composta a 0,033 mg/g MN (contendo celulase e xilanase com 6000 UI por grama, de cada enzima) as silagens foram abertas aos 10, 30 e 60 dias após ensilagem.

Os valores de FDN e FDA nas silagens inoculadas reduziram nas aberturas aos 10 e 30 dias, após esse período mantiveram-se estáveis. Constatou-se também maior proporção de CS e PB nas silagens aditivadas em relação ao grupo controle. O menor teor de PB nas silagens

sem inoculantes pode ser explicado pela maior proporção de N-NH<sub>3</sub>, que indica proteólise proteólise mais intensa, e conseqüente perda de nitrogênio. Os valores de pH 30 dias após a ensilagem foram maiores para o controle em relação aos demais, porém aos 60 dias não se observou diferença entre os grupos experimentais. O conteúdo de ácido láctico e a proporção de ácido láctico em relação ao ácido acético foram maiores nos grupos inoculados. Além da redução dos teores de fibra das silagens, o inoculante fúngico aumentou a DIVMS, FDN e FDA na silagem após 30 dias de fermentação (P <0,05).

Os resultados encontrados por Wang *et al.* (2019) demonstram potencial de aplicação de fungos celulolíticos para melhorar a conservação dos alimentos ensilados. Os fungos e as enzimas foram capazes de degradar os polissacarídeos em CS, confirmando o que foi indicado no trabalho de Li *et al.* (2018), e assim proporcionar ambiente mais favorável ao desenvolvimento de microrganismos desejáveis mesmo para culturas adaptadas ao processo de ensilagem como milho e sorgo.

## CONCLUSÃO

A inoculação de microrganismos em silagens de gramíneas tropicais ainda não apresenta resultados completamente claros. Porém, o uso de BAL vem se consolidando como uma estratégia eficiente para promover melhor padrão de fermentação das silagens.

A aplicação de fungos, leveduras e enzimas fibrolíticas ainda não apresentam volume de informações suficientes para um direcionamento sobre sua eficiência como inoculantes, apesar de demonstrarem bons resultados em alguns trabalhos. Dessa forma as pesquisas com estes inoculantes devem ser estimuladas, principalmente visando melhorar a qualidade das silagens de gramíneas tropicais, por resultarem em geral em silagens de qualidade inferior.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, R. C., Carvalho, B. F., Costa, D. M., Morenz, M. J. F., Schwan, R. F., & da Silva Ávila, C. L. 2020. Novel lactic acid bacteria strains enhance the conservation of elephant grass silage cv. BRS Capiaçú. *Animal Feed Science and Technology*, 264, 114472.
- Araújo, J. A. S., Almeida, J. C. C., Reis, R. A., Carvalho, C. A. B., & Barbero, R. P. 2020. Harvest period and baking industry residue inclusion on production efficiency and chemical composition of tropical grass silage. *Journal of Cleaner Production*, 266, 121953.
- Ávila, C. L. D. S., Pinto, J. C., Evangelista, A. R., Morais, A. R. D., Figueiredo, H. C. P., & Tavares, V. B. 2003. Perfil de fermentação das silagens de capim-tanzânia com aditivos teores de nitrogênio amoniacal e pH. *Ciência e Agrotecnologia*, 27, 1144-1151.
- Barcelos, A. F., Carvalho, J. R. R. D., Tavares, V. B., & Gonçalves, C. C. D. M. 2018. Valor nutritivo e características fermentativas da silagem de capim-elefante com diferentes proporções de casca de café. *Ciência Animal Brasileira*, 19.
- Beauchemin, K.A.; Colombatto, D.; Morgavi, D.P. et al. 2002. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science*, 81, E suppl. 2, p.E37-E47.
- Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R. J., Holmes, B. J., & Muck, R. E. 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3952-3979.
- Carvalho, G. G. P. D., Garcia, R., Pires, A. J. V., Pereira, O. G., Azevêdo, J. A. G., Carvalho, B. M. A. D., & Cavali, J. 2007. Valor nutritivo de silagens de capim-elefante emurchecido ou com adição de farelo de cacau. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(5), 1495-1501.
- Cobb, S. P., Hogg, R. A., Challoner, D. J., Sharpe, R. T., Brett, M. M., Livesey, C. T., & Jones, T. O. 2002. Suspected botulism in dairy cows and its implications for the safety of human food. *Veterinary Record*, 150(1), 5-8.
- Costa, A. C., Cavalheiro, G. F., de Queiroz Vieira, E. R., Gandra, J. R., e Buschinelli, R. H. D. T., da Paz, M. F., ... & Leite, R. S. R. 2019. Catalytic properties of xylanases produced by *Trichoderma piluliferum* and *Trichoderma viride* and their application as additives in bovine feeding. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101161.

- Creppy E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Letter* 127: 19-28.
- Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E., & Braun, R. 2003. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 562-567.
- Dehghani, M. R., Weisbjerg, M. R., Hvelplund, T., & Kristensen, N. B. 2012. Effect of enzyme addition to forage at ensiling on silage chemical composition and NDF degradation characteristics. *Livestock Science*, 150(1-3), 51-58.
- Duniere, L., Jin, L., Smiley, B., Qi, M., Rutherford, W., Wang, Y., & McAllister, T. 2015. Impact of adding *Saccharomyces* strains on fermentation, aerobic stability, nutritive value, and select lactobacilli populations in corn silage. *Journal of animal science*, 93(5), 2322-2335.
- Edwards, R.A., McDonald, P. 1978. *Fermentation of Silage - A Review*. West Des Moines: Iowa, 115.
- Faria, D. J. G., Garcia, R., Tonucci, R. G., Tavares, V. B., Pereira, O. G., & Fonseca, D. M. D. 2010. Produção e composição do efluente da silagem de capim-elefante com casca de café. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(3), 471-478.
- Ferrari Júnior, E., & Lavezzo, W. 2001. Qualidade da silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) emurhecido ou acrescido de farelo de mandioca. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(5), 1424-1431.
- Ferreira, D. J., de Paula Lana, R., de Moura Zanine, A., Santos, E. M., Veloso, C. M., & Ribeiro, G. A. 2013. Silage fermentation and chemical composition of elephant grass inoculated with rumen strains of *Streptococcus bovis*. *Animal Feed Science and Technology*, 183(1-2), 22-28.
- Gomes, R. dos S, de Carvalho Almeida, J. C., da Costa Carneiro, J., Azevedo, F. H. V., Lista, F. N., Elyas, A. C. W., & de Oliveira, T. S. 2017. Impacts of citrus pulp addition and wilting on elephant grass silage quality. *Bioscience Journal*, 33(3).
- Gonçalves, L. C., & Borges, I. 2006. Tópicos de forragicultura tropical. *Belo Horizonte: FEPMVZ*. 117p.
- Grant, R. J., & Adesogan, A. T. 2018. Journal of Dairy Science silage special issue: Introduction. *Journal of dairy science*, 101(5), 3935-3936.

- Guan, H., Shuai, Y., Ran, Q., Yan, Y., Wang, X., Li, D., ... & Zhang, X. 2020. The microbiome and metabolome of Napier grass silages prepared with screened lactic acid bacteria during ensiling and aerobic exposure. *Animal Feed Science and Technology*, 269, 114673.
- Guimarães Júnior, R., Gonçalves, L. C., Rodrigues, J. A. S., Jayme, D. G., Pires, D. A. D. A., Borges, A. L. C. C., ... & Borges, I. 2005. Matéria seca, proteína bruta, nitrogênio amoniacal e pH das silagens de três genótipos de milho [*Pennisetum glaucum* (L). R. Br.] em diferentes períodos de fermentação. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 4(02).
- Jin, L., Duniere, L., Lynch, J. P., McAllister, T. A., Baah, J., & Wang, Y. 2015. Impact of ferulic acid esterase producing lactobacilli and fibrolytic enzymes on conservation characteristics, aerobic stability and fiber degradability of barley silage. *Animal Feed Science and Technology*, 207, 62-74.
- Jobim, C. C., & Nussio, L. G. 2013. Princípios básicos da fermentação na ensilagem. Forragicultura–Ciência, tecnologia e gestão de recursos forrageiros. Jaboticabal: Editora FUNEP.
- Khota, W., Pholsen, S., Higgs, D., & Cai, Y. 2016. Natural lactic acid bacteria population of tropical grasses and their fermentation factor analysis of silage prepared with cellulase and inoculant. *Journal of dairy science*, 99(12), 9768-9781.
- Kostulak-Zielińska M, Potkański A, Przybylski M, Selwet M, Perkowski J. 2002. Hygienic value of corn silage with a chemical preservative. *Med Weter* 58: 792-795.
- Kung Jr, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of dairy Science*, 101(5), 4020-4033.
- Leibensperger, R. Y., & Pitt, R. E. 1987. A model of clostridial dominance in ensilage. *Grass and Forage Science*, 42(3), 297-317.
- Li, J., Yuan, X., Dong, Z., Mugabe, W., & Shao, T. 2018. The effects of fibrolytic enzymes, cellulolytic fungi and bacteria on the fermentation characteristics, structural carbohydrates degradation, and enzymatic conversion yields of *Pennisetum sinense* silage. *Bioresource technology*, 264, 123-130.

Lima Junior, I. F., da Silva, S. H. B., Figueiredo, A. N., dos Santos, T. M. C., Ferreira, D. A., & Duarte, M. E. 2012. Uso de diferentes aditivos em silagem de capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.). *PUBVET*, 6, Art-1429.

Liu, B., Yang, Z., Huan, H., Gu, H., Xu, N., & Ding, C. 2020. Impact of molasses and microbial inoculants on fermentation quality, aerobic stability, and bacterial and fungal microbiomes of barley silage. *Scientific reports*, 10(1), 1-10.

Loures, D.R.S.; Garcia, R.; Pereira, O.G. et al. 2003 Características do efluente e composição químico-bromatológica da silagem de capim-elefante sob diferentes níveis de compactação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32(6), 1851-1858, (supl.2).

Loures, D.R.S.; Nussio, L.G.; Paziani, S.F.; Pedroso, A.F.; Mari, L.J.; Ribeiro, J.L.; Zopollatto, M.; Schmidt, P.; Junqueira, M.C.; Packer, I.U.; Campos, F.P. 2005 Composição Bromatológica e Produção de Efluente de Silagens de Capim-Tanzânia sob Efeitos do Emurchecimento, do Tamanho de Partícula e do Uso de Aditivos Biológicos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34(3), 726-735.

Lynch, J. P., Baah, J., & Beauchemin, K. A. 2015. Conservation, fiber digestibility, and nutritive value of corn harvested at 2 cutting heights and ensiled with fibrolytic enzymes, either alone or with a ferulic acid esterase-producing inoculant. *Journal of dairy science*, 98(2), 1214-1224.

Macêdo, A. J. S., Santos, E. M., De Oliveira, J. S., & Perazzo, A. F. 2017. Microbiologia de silagens: Revisão de Literatura. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(9), 1-11.

McDonald, P., Henderson, A. R., & Heron, S. J. E. 1991. *The biochemistry of silage*. Chalcombe publications.

Monteiro, I. J. G., de Abreu, J. G., Cabral, L. D. S., Ribeiro, M. D., & dos Reis, R. H. P. 2011. Silagem de capim-elefante aditivada com produtos alternativos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 33(4), 347-352.

Moreno, L. S., Pedreira, C. G., Boote, K. J., & Alves, R. R. 2014. Base temperature determination of tropical *Panicum* spp. grasses and its effects on degree-day-based models. *Agricultural and Forest Meteorology*, 186, 26-33.

- Muck, R.E. 1988. Factors influencing silage quality and their implications for management. *Journal of Dairy Science*, 71(11), 2992-3002.
- Muck, R.E., Bolsen, K.K. 1991 Silage preservation and additive products. *Field Guide and Silage Management in North America*, 105-126.
- Muck, R. E. 1996. A lactic acid bacteria strain to improve aerobic stability of silages. *Research Summaries*, 42-43.
- Muck, R. E., & Kung Jr, L. 1997. Effects of silage additives on ensiling. *Silage: Field to feedbunk. Northeast Regional Agricultural Engineering Service (NRAES), Ithaca, New York, USA*.
- Muck, R. E. 2010. Microbiologia da silagem e seu controle com aditivos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 183-191.
- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung Jr, L. 2018. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of dairy science*, 101(5), 3980-4000.
- Nayan, N., Sonnenberg, A. S., Hendriks, W. H., & Cone, J. W. 2018. Variation in the solubilization of crude protein in wheat straw by different white-rot fungi. *Animal Feed Science and Technology*, 242, 135-143.
- Nussio, L. G.; Paziani, S. de F.; Nussio, C.M. B. 2002. Ensilagem de capins tropicais. In: Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 39., 2002, Recife, PE. Anais... Recife: SBZ: Ed. dos Editores, 2002. 4f. 1 CD-ROM.
- Oliveira, A. S., Weinberg, Z. G., Ogunade, I. M., Cervantes, A. A., Arriola, K. G., Jiang, Y., ... & Adesogan, A. T. 2017. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4587-4603.

- Olstorpe, M., Borling, J., Schnürer, J., & Passoth, V. 2010. *Pichia anomala* yeast improves feed hygiene during storage of moist crimped barley grain under Swedish farm conditions. *Animal feed science and technology*, 156(1-2), 47-56.
- OHSHIMA, M., McDONALD, P. A. 1978. review of changes in nitrogenous compounds in herbage during ensiling. *Journal of Science and Food Agriculture*, 29,(6) 497-505,.
- Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Elferink, S. J. O., & Spoelstra, S. F. 2003. Microbiology of ensiling. *Silage science and technology*, 42, 31-93.
- Pereira, O. G., Rocha, K. D., & Ferreira, C. L. D. L. F. 2007. Composição química, caracterização e quantificação da população de microrganismos em capim-elefante cv. Cameroon (*Pennisetum purpureum*, Schum.) e suas silagens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(6), 1742-1750.
- Rodrigues, P. H. M., Lopes, T. F. T., de Andrade, S. J. T., Melotti, L., de Sousa Lucci, C., de Lima, F. R., & Meyer, P. M. 2003. Adição de inoculantes microbianos sobre a composição química e perfil fermentativo da silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 25(2), 397-402.
- Rodrigues, P. H. M., Borgatti, L. M. O., Gomes, R. W., Passini, R., & Meyer, P. M. 2005. Effect of increasing levels of citrus pulp on the fermentation quality and nutritive value of elephantgrass silage. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34(4), 1138-1145.
- Rotz, C. A., & Muck, R. E. 1994. Changes in forage quality during harvest and storage. Forage quality, evaluation, and utilization, 828-868.
- Salminen, S.; Von Wright, A. *Lactic Acid Bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1993. 442p.
- Selwet M. 2005. Effects of preservatives based on formic acid on the development of yeasts and mould fungi in silages. *Med Weter* 61: 349-352.
- Selwet M. 2006. Effect of organic acids and bacterial-enzymatic preparations on number of fungal populations and silage aerobic stability. *Bull Vet Inst Pulawy* 50: 215-220.
- Shimoya, A., Pereira, A. V., Ferreira, R. D. P., Cruz, C. D., & Carneiro, P. C. S. 2002. Repetibilidade de características forrageiras do capim-elefante. *Scientia Agricola*, 59(2), 227-234.

- Sifeeldein, A., Xianjun, Y. U. A. N., Zhihao, D. O. N. G., Junfeng, L. I., & Tao, S. H. A. O. 2018. Effect of applying lactobacillus plantarum and pediococcus acidilactici isolated on fermentation dynamics, microbial community and aerobic stability of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) silage. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(3).
- Spoelstra, S. F., Courtin, M. G., & Van Beers, J. A. C. 1988. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. *The Journal of Agricultural Science*, 111(1), 127-132.
- Sun, Q., Gao, F., Yu, Z., Tao, Y., Zhao, S., & Cai, Y. 2012. Fermentation quality and chemical composition of shrub silage treated with lactic acid bacteria inoculants and cellulase additives. *Animal science journal*, 83(4), 305-309.
- Sun, Z. H., Liu, S. M., Tayo, G. O., Tang, S. X., Tan, Z. L., Lin, B., ... & Wang, M. 2009. Effects of cellulase or lactic acid bacteria on silage fermentation and in vitro gas production of several morphological fractions of maize stover. *Animal Feed Science and Technology*, 152(3-4), 219-231.
- Teixeira, F.A., Veloso, C.M., Pires, A.J.V., Silva, F.F., & Nascimento, P.V.N. 2008. Losses in silage of elephant grass added with sugar cane and cocoa meal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60, 227-233.
- Tomich, T. R., Pereira, L. G. R., Gonçalves, L. C., Tomich, R. G. P., & Borges, I. 2003. Características químicas para avaliação do processo fermentativo de silagens: uma proposta para qualificação da fermentação. Embrapa Pantanal-Documents (INFOTECA-E).
- Tosi, P.; Mattos, W.R.S.; Tosi, H.; Jobim, C.C.; Lavezzo, W. 1999. Avaliação do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) cultivar taiwan A-148, ensilado com diferentes técnicas de redução de umidade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 28(5), 947-954. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-35981999000500006>
- Van Soest, P.J. Nutrition and ecology of the ruminant. 2.ed., Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.
- Wang, D., Zhao, C., Liu, S., Zhang, T., Yao, J., & Cao, Y. 2019. Effects of *Piromyces* sp. CN6 CGMCC 14449 on fermentation quality, nutrient composition and the in vitro degradation rate of whole crop maize silage. *AMB Express*, 9(1), 1-8.

Weinberg, Z.G., & Chen, Y. 2013. Effects of storage period on the composition of whole crop wheat and corn silages. *Animal Feed Science and Technology*, 185(3-4), 196-200.

Weinberg, Z.G., & Muck, R.E. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(1), 53-68.

Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Hen, Y., & Azrieli, A. 1993. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 512-518.

Woolford, M.K. 1984. *The silage fermentation*. New York: Marcel Dekker, 322p.

Zanine, A.D.M., Santos, E. M., Ferreira, D.D.J., Pinto, L.F.B., Pereira, O.G. 2007. Características fermentativas e composição químico-bromatológica de silagens de capim-elefante com ou sem *Lactobacillus plantarum* e farelo de trigo isoladamente ou em combinação. *Ciência Animal Brasileira*, 8(4), 621-628.

## **CAPÍTULO 2**

### **MICROBIOTA, PERDAS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PH DE SILAGEM DE CAPIM ELEFANTE CV. CAMEROON INOCULADAS COM FUNGOS AUTÓCTONES DO RÚMEN**

#### **INTRODUÇÃO**

A produção de silagem de qualidade utilizando forrageiras tropicais é um desafio enfrentado por produtores rurais. Entre as forrageiras tropicais, o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) destaca-se por elevada produção por hectare (Trindade *et al.*, 2018; Queiroz Filho *et al.*, 2000), tornando-o uma das principais espécies escolhidas pelos produtores para ensilagem. Os principais fatores que dificultam a boa conservação destas gramíneas no silo são a baixa concentração de matéria seca (MS) e carboidratos solúveis (CS) (Rodrigues *et al.*, 2003). O alto teor de umidade destas silagens culmina com grande produção de efluentes e consequente perda de MS.

A conservação da silagem depende da rápida redução de pH do material pela fermentação dos CS pela microbiota epífita (Guimarães *et al.*, 2018). A queda do pH ocorre devido a fermentação dos CS gerando assim os ácidos orgânicos (Ni *et al.*, 2017). É desejável para a produção de silagem a presença em maior proporção das bactérias homofermentativas, pois estas produzem apenas o ácido láctico, mais eficiente em reduzir o pH do material ensilado (Muck *et al.*, 2018). O baixo conteúdo de MS e CS do capim-elefante promovem lenta redução do pH pela microbiota epífita, proporcionando assim ambiente favorável para bactérias indesejáveis como *Clostridium* spp. e *Listeria* spp. (Amaral *et al.*, 2020).

Segundo Pholsen *et al.* (2016), as gramíneas tropicais apresentam baixa contagem de bactérias produtoras de ácido láctico (BAL), fator este que atrapalha sua conservação no silo. A aplicação de inoculantes microbianos em silagens de capim-elefante pode reduzir fermentações indesejadas, a produção de efluentes e as perdas de MS (Borreani *et al.*, 2018; Muck *et al.*, 2018). Os microrganismos inoculados competem com a microbiota epífita, aceleram a queda de pH ou produzem compostos que inibem o crescimento de microrganismos deterioradores da silagem (Amaral *et al.*, 2020).

A aplicação de fungos celulolíticos como inoculantes para silagem é ainda um tema pouco estudado, esse cenário pode ser explicado por estes microrganismos estarem constantemente associados a perdas no processo de ensilagem, além de alguns apresentarem potencial para produção de micotoxinas. Apesar disso, segundo Wang *et al.* (2019) fungos anaeróbios do rúmen podem produzir enzimas capazes de romper a estrutura da célula vegetal e reduzir os teores de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), tornando assim o material mais exposto à degradação por microrganismos e enzimas do rúmen. A produção destas enzimas fibrolíticas por fungos encontrados no ambiente ruminal pode viabilizar seu uso como inoculantes para silagem.

A presença de celulasas em silagens é desejável por aumentar a degradação da fibra e assim disponibilizar maior quantidade de CS como substrato para produção de ácido láctico pelas BAL (Eun & Beauchemin, 2008) e pela quebra de carboidratos estruturais e consequente aumento da digestibilidade do alimento (McDonald *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2014).

Em estudos anteriores, Abrão *et al.* (2015; 2017) isolaram cepas de fungos celulolíticos do ambiente ruminal de bovinos criados na região semiárida do Norte de Minas Gerais. A produção de celulasas por estes fungos apresenta potencial para melhorar o padrão de fermentação do material ensilado por aumentar a disponibilidade de CS para as BAL. Desta forma, a inoculação da forragem com esses fungos celulolíticos poderia contribuir para melhor conservação da silagem. Com este estudo objetivou-se determinar a influência da inoculação

de dois isolados de fungos celulolíticos provenientes do rúmen de bovinos sobre a microbiota, pH e perdas da silagem de capim-elefante cv. cameroon colhido aos 60 e 120 dias de rebrota.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Forragem utilizada

O experimento foi realizado em Montes Claros, norte de Minas Gerais, Brasil (16°43' S e 44°52' W). Uma área de aproximadamente 800m de uma capineira de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) passou por corte de uniformização em outubro de 2019. A área foi dividida em 12 parcelas de aproximadamente 20m<sup>2</sup>, com distância mínima entre as parcelas de 1,5m e 1m das bordas. A temperatura média anual é de 24,2°C, com clima quente e seco e duas estações bem definidas, seca entre abril e outubro e período chuvoso de novembro a março.

### Inoculantes utilizados

Foram utilizados como inoculantes dois isolados de fungos celulolíticos do rúmen de novilhos Nelore criados em sistema extensivo em pastagem de *Urochloa decumbens* cv. Basilisk, com suplementação mineral contendo ureia (Abrão *et al.*, 2014). Além das características macroscópicas e micromorfológicas esses fungos foram identificados por análise de sequências do DNA ribossomal obtido da amplificação da região ITS do rDNA foram ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990). Os produtos foram analisados em DYEnamic™ (Amersham Biosciences, EUA) utilizando o sistema de sequenciação automatizado MegaBACETM 1000 no *GenomeAnalysisCenter e Gene Expression*. As sequências obtidas foram analisadas utilizando BLASTn v. 2.215 de BLAST 2.0 (Altschul, 1997). Considerou-se como essa espécie o isolado com similaridade de 99% ou mais. As sequências foram depositadas no GenBank, e foram identificados como *Aspergillus terreus* [KF781532] e *Trichoderma longibrachiatum* [KF781535].

## **Delineamento experimental e preparo das silagens**

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado para comparar quatro tipos de inoculação e seis repetições, em duas idades de corte, aos 60 e 120 dias de crescimento. Foram ensilados: controle sem aditivo nas idades 60 (C60) e 120 dias de rebrota (C120), inoculação com *Aspergillus terreus* nas idades 60 (AT60) e 120 dias de rebrota (AT120) aplicado a  $1,0 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de matéria natural (MN), *Trichoderma longibrachiatum* nas idades 60 (TL60) e 120 dias de rebrota (TL120) aplicado a  $1,0 \times 10^5$  UFC/g de MN e uma mistura contendo *A. terreus* e *T. longibrachiatum*, cada um a  $1,0 \times 10^5$  UFC/g de MN da forragem nas idades 60 (MIX60) e 120 dias de rebrota (MIX120). A escolha destas cepas baseou-se em sua maior produção de enzimas fibrolíticas, não produzirem toxinas e por sua presença em maior proporção no trato digestivo bovino (Abrão *et al.*, 2014; Abrão *et al.*, 2017).

Após crescimento em placas de petri contendo o meio ágar Potato Dextrose (KASVI®, Terámo, Itália) contendo 1,5% de solução de cloranfenicol (10%/v), o conteúdo das placas de cada fungo foi homogeneizado e quantificado. Para inoculação utilizou-se aproximadamente 1800g do capim fresco cortado aos 60 dias e 1500g do capim colhido com 120 dias de crescimento, a densidade de ensilagem foi de  $0,627\text{kg}/\text{dm}^3$  de MN e  $0,454\text{kg}/\text{dm}^3$  de MN para as colheitas realizadas aos 60 e 120 dias respectivamente. A forragem foi picada em ensiladeira estacionária regulada para partículas entre 0,5 e 2,5cm. Cada repetição do grupo experimental AT recebeu 20ml de meio de cultura com inóculo e 30ml de salina estéril. As repetições de TL, receberam 25ml de meio de cultura com inóculo e 25ml de salina estéril, as repetições do Mix foram adicionadas de 25ml de meio de cultura com inóculo e 25ml de salina estéril. O controle recebeu 20ml de meio de cultura estéril e 30ml de salina estéril para padronizar a quantidade de nutrientes adicionada via meio de cultura.

O material foi ensilado em sacos de polipropileno de  $200\mu\text{m}$ , em cada saco foi colocado aproximadamente 855g de areia envolvida por malha de TNT (tecido não tecido) para captação de efluentes. A areia dos drenos foi pré-secada em estufa de circulação forçada por 72 horas a  $55^\circ\text{C}$ . Cada estrutura completa (silo com dreno de areia) foi identificada e pesada com auxílio de balança semianalítica. Após o acondicionamento da forragem os silos foram fechados, vedados, pesados e armazenados lacrados durante 56 dias. Para determinar o pH foi utilizado o método descrito por Silva e Queiroz (2002) em pHmetro (PG1800 GEHAKA®, São Paulo, Brasil).

## **Análises microbiológicas**

Após 56 dias da ensilagem, os silos foram abertos para determinação da população microbiana, composição bromatológica, perda de MS, efluentes e pH. Toda forragem foi transferida para sacos plásticos estéreis, homogeneizada. Retirou-se uma alíquota de 5g a qual foi misturada em 30ml de água salina e 5ml de glicerina estéreis para congelamento em ultrafreezer e posterior análise microbiológica.

Foram avaliadas sub amostras de 5 g da forragem picada diluída em 35ml de água salina estéril e agitada por 5 minutos em vórtex. Posteriormente, alíquotas de 10 $\mu$ l das diluições de 10<sup>1</sup> a 10<sup>10</sup> foram inoculadas em placas de petri estéreis contendo o meio ágar MRS (Merck KGaA®, Darmstadt, Alemanha) para o crescimento de bactérias lácticas; ágar Potato Dextrose (KASVI®, Terámo, Itália) contendo 1,5% de solução de cloranfenicol (10%/v) para o crescimento de fungos; ágar MacConkey (KASVI®, Terámo, Itália), para o crescimento de Enterobacteriaceae. As placas de MRS foram incubadas a 37°C por 48 horas em jarras de anaerobiose com reatores de CO<sub>2</sub> (Permutation ®, Curitiba, PR, Brasil). As placas de MacConkey e Agar Potato Dextrose foram incubadas a 37°C em estufa BOD e monitoradas por dois até sete dias respectivamente.

As UFC de cada meio de cultura, foram quantificadas e diferenciadas conforme as estruturas morfológicas das colônias (coloração, tamanho e forma da colônia) com o auxílio de um contador (Murray *et al.*, 2007). Os fungos presentes foram isolados e avaliados em lâminas pelo método do microcultivo. Posteriormente, a identificação foi realizada com auxílio de microscópio ótico e por características macroscópicas e microscópicas (Germain e Summerbell, 2011).

## **Análises de perdas**

As perdas por gases foram calculadas pela seguinte equação:  $PG (\% \text{ da MS}) = [(PsChf - PsCha)/(MVFE \times MSFE)] \times 100$ , em que: PG – perdas por gases; PsChf – peso do silo cheio no fechamento da ensilagem (kg); PsCha – peso do silo cheio na abertura (kg); MVFE – matéria verde da forragem ensilada (kg); MSFE – matéria seca da forragem ensilada (%). As perdas de

efluentes foram quantificadas subtraindo o peso da areia no momento da ensilagem do peso obtido da areia e efluentes drenados na abertura.

### **Análises bromatológicas**

Foram retiradas amostras de aproximadamente 300g de forragem fresca de cada repetição. As amostras foram secas em estufa com circulação de ar forçada a 55°C por um período de 72 horas para determinação da matéria pré-seca. Retirados da estufa e após equilíbrio com a temperatura ambiente, cada amostra foi pesada e triturada individualmente em moinho de facas com peneira de 1mm. As concentrações de MS, matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) segundo as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990), e teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) em conformidade com Van Soest & Robertson, (1985).

### **Análises estatísticas**

As populações microbianas foram estimadas como UFC/g de MN de forragem ou silagem e foram transformadas em log x antes da análise estatística. As avaliações de perdas, pH, composição química e os dados microbiológicos foram avaliados em delineamento inteiramente ao acaso, considerando os quatro tipos de inoculação. Os parâmetros microbiológicos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis e Wilcoxon, as correlações foram avaliadas segundo Pearson as demais variáveis avaliadas foram analisadas pelo teste de Tukey, considerando-se o valor de  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Forragem “in natura”**

A composição bromatológica e a população de microrganismos da forragem fresca utilizada para a ensilagem do capim-elefante colhido aos 60 e 120 dias de rebrota estão apresentadas nas tabelas 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1 - Composição bromatológica do capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 60 e 120 dias de rebrota, em porcentagem da matéria seca

	MS	PB	FDN	FDA	MM	EE
Corte 60 dias	15,1	5,06	68,33	36,78	10,62	2,22
Corte 120 dias	23,91	2,64	70,93	41,57	8,32	1,62

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

Tabela 2 - População de microrganismos (log UFC/g MN) de capim-elefante cv. Cameroon fresco colhido aos 60 e 120 dias de rebrota

	BAL	Enterobactérias	Leveduras	Fungos micelianos
Corte 60 dias	3,25	3,42	2,20	4,61
Corte 120 dias	2,04	2,91	1,73	4,04

ND = Não detectável; BAL=Bactérias ácido lácticas; MN= Matéria natural

### Microbiota da silagem

Não foram detectadas diferenças significativas entre as populações de bacilos Gram positivos, diplococos, enterobactérias, leveduras e fungos micelianos nas amostras de silagem de capim-elefante colhido aos 60 dias, para os tipos de inoculantes avaliados (Tabela 3). Entretanto, para a silagem produzida com o capim cortado os 120 dias de crescimento, as populações de bactérias bacilos Gram positivos e BAL das silagens inoculadas com MIX120 foram significativamente maiores que aquelas observadas para a silagem C120 ( $P < 0,05$ ) (Tabela 4).

Tabela 3 - População de microrganismos (log UFC/g MN) em silagem de capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 60 dias, inoculado com *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus terreus* e MIX

	C60	AT60	TL60	MIX60
Bacilos Gram +	6,24	5,59	5,61	6,10
Diplococos	2,57	ND	1,57	1,82
BAL	6,27	5,59	5,62	6,12
Enterobactérias	1,64	1,33	1,13	ND
Leveduras	2,02	1,57	ND	2,15
Fungos micelianos	2,71	4,78	6,18	3,61

Teste de Kruskal-Wallis  $P < 0,05$ ; D.P: desvio padrão; ND = Não detectável; BAL=Bactérias ácido lácticas; C60: controle; AT60: *Aspergillus terreus* aplicado  $1,0 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias por grama de forragem fresca; TL60: *Trichoderma longibrachiatum*  $1,0 \times 10^5$  UFC/g de forragem fresca; MIX60: contendo *A. terreus* e *T. longibrachiatum*, a  $1,0 \times 10^5$  UFC/g da forragem fresca cada.

Tabela 4 - População de microrganismos (log UFC/g MN) em silagem de capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 120 dias, inoculado com *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus terreus* e MIX

	C120	AT120	TL120	MIX120
Bacilos Gram +	3,60 <sup>bc</sup>	3,32 <sup>c</sup>	5,31 <sup>ab</sup>	5,50 <sup>a</sup>
Diplococos	ND	ND	ND	ND
BAL	3,60 <sup>bc</sup>	3,32 <sup>c</sup>	5,31 <sup>ab</sup>	5,50 <sup>a</sup>
Enterobactérias	1,72	1,33	1,76	1,16
Leveduras	1,40	1,74	ND	2,25
Fungos micelianos	4,21	1,74	2,24	2,80

Valores seguidos por diferentes letras na linha indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis  $P < 0,05$ ; D.P: desvio padrão; ND = Não detectável; BAL=Bactérias ácido lácticas; C120: controle; AT120: *Aspergillus terreus* aplicado  $1,0 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias por grama de forragem fresca; TL120: *Trichoderma longibrachiatum*  $1,0 \times 10^5$  UFC/g de forragem fresca; MIX120: contendo *A. terreus* e *T. longibrachiatum*, a  $1,0 \times 10^5$  UFC/g da forragem fresca cada.

Ao comparar as contagens microbianas entre os materiais ensilados para as duas idades de corte do capim, verificou-se que a contagem de leveduras foi a única que não apresentou alteração com a idade de corte da forrageira. As populações de bacilos Gram positivos ( $P < 0,01$ ) 5,87 e 4,47 log UFC/g de MN, diplococcus ( $P < 0,01$ ) 1,74 e 0,00 log UFC/g de MN; BAL ( $P < 0,01$ ) 5,90 e 4,47 log UFC/g de MN e fungos micelianos ( $P < 0,02$ ) 4,32 e 2,75 log UFC/g de

MN foram maiores no capim colhido aos 60 dias. A contagem de enterobactérias foi superior ( $P < 0,03$ ) no capim colhido aos 120 dias em relação ao primeiro corte 1,28 e 1,49 log UFC/g de MN respectivamente.

As populações de fungos identificadas nas silagens foram predominantemente de *Aspergillus* sp. que foi identificado em todos os grupos experimentais, no grupo inoculado com *Aspergillus terreus* foram identificados também *Paecilomyces* sp. e *Rizopus* sp., nos silos tratados com *Trichoderma longibrachiatum* além dos fungos citados anteriormente foram encontrados também foi isolado *Trichoderma* sp., no grupo inoculado com os fungos combinados foram encontrados apenas *Aspergillus* sp., *Paecilomyces* ssp. e *Trichofyton* sp.

## Perdas e pH

Ao comparar as perdas das silagens produzidas nos dois períodos de corte, constatou-se que as perdas de efluentes foram mais elevadas nas silagens do capim cortado aos 60 dias ( $P < 0,01$ ). As variáveis de perdas e pH não diferiram entre os grupos experimentais (tabela 6) da forragem colhida aos 120.

Tabela 5 - Valores médios de pH, perda de gases (PG) e efluentes (PE) da silagem de capim-efefante cv. Cameroon colhido aos 60, inoculadas com *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus terreus* e MIX

	C60	AT60	TL60	MIX60
pH	4,76	4,53	4,64	4,58
PG (%)	8,79	8,03	8,78	7,57
PE (kg/t)	188,92	176,98	162,38	128,78

Médias avaliadas pelo teste de Tukey  $P < 0,05$ ; C60: controle; AT60: *Aspergillus terreus* aplicado  $1,0 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias por grama de forragem fresca; TL60: *Trichoderma longibrachiatum*  $1,0 \times 10^5$  UFC/g de forragem fresca; MIX60: contendo *A. terreus* e *T. longibrachiatum*, a  $1,0 \times 10^5$  UFC/g da forragem fresca cada.

Tabela 6 - Valores médios de pH, perda de gases (PG), efluentes (PE) da silagem de capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 120, inoculadas com *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus terreus* e MIX

	C120	AT120	TL120	MIX120
pH	4,69	4,60	4,62	4,81
PG (%)	7,53	6,57	7,53	7,13
PE (kg/t)	16,53	15,00	11,74	26,38

Médias avaliadas pelo teste de Tukey  $P < 0,05$ ; C120: controle; AT120: *Aspergillus terreus* aplicado  $1,0 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias por grama de forragem fresca; TL120: *Trichoderma longibrachiatum*  $1,0 \times 10^5$  UFC/g de forragem fresca; MIX120: contendo *A. terreus* e *T. longibrachiatum*, a  $1,0 \times 10^5$  UFC/g da forragem fresca cada.

### Composição química da silagem

As silagens de capim-elefante cortadas aos 60 e 120 dias de rebrota inoculadas ou não com os fungos não apresentaram variação em sua composição química para nenhuma das variáveis analisadas. Nas tabelas 7 e 8 estão apresentadas as composições químicas das silagens produzidas a partir da forragem colhida aos 60 e 120 respectivamente.

Tabela 7 - Composição bromatológica da silagem de capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 60 dias de rebrota, em porcentagem da matéria seca

	MS	PB	FDN	FDA	MM	EE
C60	16,62	3,94	71,74	41,25	10,41	2,86
AT60	17,50	4,07	71,19	40,82	10,81	2,95
TL60	15,94	4,27	70,71	40,09	10,36	2,90
MIX60	16,19	4,29	69,30	39,70	10,71	3,10

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral. Médias avaliadas pelo teste de Tukey  $P < 0,05$ ; C120: controle; AT120: *Aspergillus terreus* aplicado  $1,0 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias por grama de forragem fresca; TL120: *Trichoderma longibrachiatum*  $1,0 \times 10^5$  UFC/g de forragem fresca; MIX120: contendo *A. terreus* e *T. longibrachiatum*, a  $1,0 \times 10^5$  UFC/g da forragem fresca cada.

Tabela 8 - Composição bromatológica da silagem de capim-elefante cv. Cameroon colhido aos 120 dias de rebrota, em porcentagem da matéria seca

	MS	PB	FDN	FDA	MM	EE
C120	23,36	2,43	76,65	47,27	9,06	1,46
AT120	22,56	2,79	75,16	45,91	9,75	1,64
TL120	24,18	2,82	78,25	48,06	9,21	1,76
MIX120	22,97	2,80	75,15	45,35	9,62	1,72

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EE: extrato etéreo; MM: matéria mineral. Médias avaliadas pelo teste de Tukey  $P < 0,05$ ; C120: controle; AT120: *Aspergillus terreus* aplicado  $1,0 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias por grama de forragem fresca; TL120: *Trichoderma longibrachiatum*  $1,0 \times 10^5$  UFC/g de forragem fresca; MIX120: contendo *A. terreus* e *T. longibrachiatum*, a  $1,0 \times 10^5$  UFC/g da forragem fresca cada.

### Correlações

Entre as variáveis avaliadas para as silagens produzidas com o capim cortado aos 60 dias constatou-se as correlações significativas negativas entre bastonetes Gram<sup>+</sup> e perdas de gases (-0,372), BAL e fungos micelianos (-0,370), BAL e perdas de gases (-0,380) e positivas entre enterobactérias e leveduras (0,369). Entre as variáveis analisadas para as silagens produzidas com a gramínea colhida aos 120 dias constatou-se as correlações significativas positivas entre BAL e pH (0,361), fungos e pH (0,395) e perdas de gases e perdas de efluente (0,377).

## DISCUSSÃO

### Alteração da microbiota

A maior contagem de BAL no tratamento MIX120 pode ocorrer pelo potencial de produção de enzimas celulolíticas dos fungos inoculados, pois segundo Khota *et al.* (2018) a produção de celulasas pode promover incremento na quantidade de CS disponível para fermentação pelas BAL potencializando seu crescimento. Porém o conteúdo de FDN e FDA das silagens analisadas não foi alterado pela inoculação dos fungos. Segundo Petterson e Lindgren (1989) a concentração de 2,5% de CS na MS do material ensilado é suficiente para

promover a adequada conservação da silagem. Desta forma, para atingir essa concentração mínima de CS a quantidade de FDN degradado pelas enzimas dos fungos pode ser baixa a ponto de não apresentar diferença estatística.

Especial atenção deve ser dada ao *Trichoderma longibrachiatum* visto que nos materiais que foi inoculado houve maior desenvolvimento de BAL e bacilos Gram positivo em relação ao tratamento AT120. A maior população das BAL indica que as condições dentro do silo favoreceram este grupo de microrganismos, acarretando em maior eficiência na competição por substrato com as enterobactérias, culminando dessa forma com a menor população das deterioradoras na silagem do primeiro corte.

Os tratamentos inoculados com *Trichoderma longibrachiatum* cortado aos 120 dias de rebrota apresentaram maior contagem de BAL, porém as populações de microrganismos deterioradores, enterobactérias, fungos e leveduras, não foram afetados. De acordo com Weinberg *et al.* (1993) essa deterioração ocorre porque a inoculação de BAL normalmente aumenta a concentração de ácido lático, porém reduz a concentração de ácido acético, que apresenta forte ação antifúngica. A população de BAL apresenta relação positiva com a qualidade da fermentação e conservação da silagem (Khota *et al.*, 2016). Os resultados de BAL, fungos e leveduras encontrados com o capim colhido aos 60 dias foram semelhantes aos relatados por Gandra *et al.* (2017) em estudo com inoculante microbiano isolado ou associado a extrato de *Trichoderma longibrachiatum* com atividade de xilanase em silagem de *Panicum maximum* Jacq. cv. Mombaça. Os autores relataram que os tratamentos adicionados de enzimas oriundas de *Trichoderma longibrachiatum* aumentaram a contagem de bactérias aeróbias e anaeróbias, mas as populações de fungos, leveduras e BAL não foram afetadas.

Khota *et al.* (2018) realizaram experimento com silagens de capim-elefante e *Panicum maximum* colhidos aos 60 dias de rebrota, adicionadas de celulases produzidas por *Acremonium* spp. ou *Trichoderma* spp., nas concentrações de 0,0025, 0,005 e 0,01% da MN. Não houve efeito significativo para contagem de microrganismos nas silagens abertas após 30 dias, esses resultados corroboram os encontrados neste trabalho, demonstrando assim que a ação das celulases não foi suficiente para aumentar a disponibilidade de substrato a ponto de impactar no desenvolvimento das BAL.

A superioridade das populações de microrganismos desejáveis na silagem de capim com 60 dias de rebrota pode ser explicada pela menor concentração de fibra na forragem ao se comparar com o segundo corte, e conseqüentemente maior disponibilidade de nutrientes para serem usados pelas bactérias. Em experimento realizado por Queiroz Filho *et al.* (2000) foram avaliadas diferentes idades de corte de capim-elefante, os autores concluíram que a idade ideal

para o corte é entre 60 e 80 dias, aliando desta forma quantidade e qualidade de forragem. A colheita da forragem na idade indicada proporcionou melhor desenvolvimento de microrganismos desejáveis. A baixa contagem de leveduras encontrada nas silagens pode resultar em benefícios para a produção animal pois estes microrganismos podem reduzir a estabilidade aeróbica da silagem (Muck *et al.*, 2018) e pode reduzir o consumo voluntário de MS pelos ruminantes (Windle e Kung, 2013).

### **pH e perdas da silagem**

Os valores médios de pH encontrados neste trabalho, entre 4,53 e 4,81, estão acima dos indicados por Rabelo *et al.* (2017), entre 3,8 e 4,2 para silagens de gramíneas tropicais com boa fermentação. Valores de pH dentro da faixa citada acima são almejados pois em geral são indicativos de maior produção de ácido lático, e menor proporção de outros ácidos graxos voláteis e a proteólise dentro do silo (Muck, 1996). O valor médio de pH encontrado por Khota *et al.* (2018) nas silagens adicionadas das enzimas de *Trichoderma* sp. foi de 4,58, semelhante às médias registradas neste estudo, porém significativamente superior ao relatado pelos autores quando inoculadas enzimas de *Acremonium* sp.

Gandra *et al.* (2017) avaliaram os efeitos da inoculação de silagens de Mombaça com BAL, associadas ou não a xilanases produzidas por *Trichoderma longibrachiatum*. A adição das enzimas proporcionou redução do pH. Concluíram que houve pequeno efeito sinérgico entre os microrganismos enzimas inoculadas. Os autores relacionaram o aumento na contagem de BAL e menor pH encontrado nas silagens inoculadas com BAL a maior digestibilidade da FDN. O efeito da adição de enzimas fibrolíticas sobre o pH da silagem como relatado no trabalho descrito acima não foi demonstrado ao adicionar fungos com potencial produção de celulasas. Porém o efeito sobre a população de BAL foi semelhante nos dois estudos.

Lynch *et al.* (2015) adicionaram celulase e xilanase ao milho antes da ensilagem, as enzimas foram utilizadas isoladas e combinadas ao ácido ferúlico, a combinação resultou em redução do pH e maior conteúdo de CS que a silagem controle 70 dias após ensilagem. Isso demonstra que o uso isolado das enzimas fibrolíticas não foi suficiente para reduzir o pH da silagem assim como neste trabalho com aplicação de fungos celulolíticos.

Em estudo conduzido por Nurjana *et al.* (2016) avaliaram o inóculo do fungo *Trichoderma reesei* ou sua enzima bruta sobre a qualidade da fermentação da silagem de capim Napier colhido aos 60 dias. Os tratamentos foram: controle, inoculante de *T. reesei*  $2,13 \times 10^7$

UFC/kg, e enzima bruta de *T. reesei* 11,4 unidades internacionais /kg. Os silos foram abertos 21 dias após a ensilagem. A adição de enzimas aumentou pH da silagem de capim elefante. Entretanto, a inoculação com o fungo apesar de sua alta concentração não levou a alteração de pH, em concordância com os resultados expostos no presente estudo.

As silagens de gramíneas devem ter no mínimo 25% de MS para evitar perda excessiva de efluentes (McDonald *et al.*, 1991) valor muito acima do encontrado nas silagens que compõem este estudo, principalmente da colheita aos 60 dias de rebrota. Portanto, a menor concentração de MS do material colhido aos 60 dias pode explicar as maiores perdas de efluentes. Araújo *et al.* (2020) realizaram trabalho com silagem de capim-elefante colhido aos 70, 84 e 98 dias de rebrota, e não encontraram diferença entre as perdas de efluentes, porém a forrageira cortada aos 70 dias de rebrota apresentou maior perda de gases. Nesse trabalho, a perda de efluentes pode não ter sido alterada pela idade de corte dos materiais devido a pequena diferença entre o teor de MS em cada período experimental. A redução das perdas de efluentes nas silagens de material colhido aos 120 dias, 17,66 kg/t MV, em relação ao que foi colhido aos 60 dias, 165,76 kg/t MV. Isso demonstra a grande influência da MS sobre a perda de efluentes visto que o aumento da MS da forragem de 16,64% para 23,27% reduziu as perdas em quase 10 vezes.

O uso de enzimas fibrolíticas como inoculantes de silagem de capim-elefante foi avaliado por Desta *et al.* (2016) comparado a ácido fórmico ou melaço. Os autores concluíram que os aditivos usados foram eficientes para reduzir as perdas da silagem e o pH em relação ao controle, porém os valores de pH das silagens que passaram por tratamento enzimático se mantiveram acima de 4,2 até 90 dias após ensilagem.

Wang *et al.* (2019) avaliaram os efeitos do fungo *Piromyces* sp. CN6 CGMCC 14449, autóctone do rúmen, como inoculante na silagem de milho. O material foi ensilado a vácuo em sacos de polietileno. O trabalho comparou a adição do fungo a  $10^5$  UFC/g, adição de enzimas fibrolíticas e um grupo sem inoculantes. Os tratamentos com fungos e enzimas reduziram o pH aos 30 dias após ensilagem, porém aos 60 dias não foi encontrada diferença no pH das silagens. Essa alteração do pH das silagens inoculadas pode ser resultado da morte de microrganismos e consequente liberação de amônia no meio resultando assim na elevação do pH no interior dos silos após 60 dias de ensilagem. Os valores de pH semelhantes entre todos os grupos experimentais corroboram os encontrados no presente estudo, assim como os valores de perdas.

## Composição química

A baixa proporção de PB da forragem utilizada neste trabalho também foi relatada por Pinedo *et al.* (2020) em estudo com capim elefante colhido aos 60 dias. No estudo foram encontrados os valores de PB de 5,42%, porém com teor de MS de 25,68%, muito superior ao encontrado no presente estudo na mesma idade de corte. Rodrigues *et al.* (2003) avaliaram a aplicação de 3 inoculantes comerciais sobre a composição química da silagem de capim-elefante cv. Napier colhido aos 97 dias. Não foram observados efeitos da adição de enzimas celulolíticas sobre FDN e demais carboidratos na silagem.

De acordo com McDonald *et al.* (1991), a perda de MS como efluente pode ultrapassar 9% em silagens com 85% de umidade. O aumento no teor de FDN das silagens, 70,74%, 76,30, comparado ao capim fresco, 68,33%; 70,93%, colhidos aos 60 e 120 dias respectivamente, pode ser explicado segundo Faria *et al.* (2007) pela perda de componentes solúveis da MS pelo efluente, que aumenta a concentração dos componentes da parede celular. Parte deste conteúdo perdido por lixiviação pode ser ainda segundo estes autores compostos por frações nitrogenadas solúveis, resultando assim em menor teor de PB na silagem em relação ao material recém colhido, como ocorreu nas silagens colhidas aos 60 dias.

## Correlações

As altas correlações encontradas entre bacilos Gram positivos e BAL nas duas idades de corte comprovam a maior importância dos bacilos em detrimento dos diplococos na população total de BAL, visto que não foi constatada correlação entre BAL e diplococos em nenhum dos períodos. A correlação negativa entre BAL e perdas de gases e população de fungos micelianos nas silagens de capim colhido aos 60 dias atestam a grande influência exercida pelas BAL sobre a qualidade da silagem.

## CONCLUSÃO

A inoculação de *Trichoderma longibrachiatum* associado ao *Aspergillus terreus* em silagem de capim-elefante cv. cameroon colhido aos 120 dias de crescimento proporciona maior desenvolvimento da população de bacilos Gram positivos e BAL.

A aplicação dos microrganismos isoladamente não influencia nas perdas, composição química, pH e populações de microrganismos das silagens de capim-elefante cv. cameroon colhido aos 60 ou 120 dias de rebrota.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrão, F.O., Duarte, E.R., Freitas, C.E., Vieira, E.A., Gerassev, L.C., Silva-Hughes, A.F., Rosa, C.A. and Rodrigues, N.M., 2014. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. *Curr. Microbiol.* 69(2), 649-659.

Abrão, F. O., Duarte, E. R., de AraujoNigri, A. C., Silva, M. L. F., Ribeiro, I. C. O., da Silva, K. L., ... & Rodriguez, N. M., 2015. Caracterização físico-química e microbiológica e população de fungos no conteúdo ruminal de novilhos de corte hígdos ou com acidose ruminal. *Braz. J. Vet. Med.* 37(1), 7-14.

Abrão, F.O., Duarte, E.R., Pessoa, M.S., Santos, V.L., Freitas Júnior, L.F., Barros, K.O.; Silva-Hughes, A.F., Silva, T.D. and Rodriguez, N. M., 2017. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. *PLoSOne.* 12(8), 1-13.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research.* 25(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>

Amaral, R.C., Carvalho, B.F., Costa, D.M., Morenz, M.J.F., Schwan, R.F., Ávila, C. L.S., 2020. Novel lactic acid bacteria strains enhance the conservation of elephant grass silage cv. BRS Capiacu. *Anim. Feed Sci. Technol.* 264, 114472.

AOAC. (association of official analytical chemists), 1990. Official methods of analysis. 15.ed. Washington: AOAC.

Araújo, J.A.S., Almeida, J.C.C., Reis, R.A., Carvalho, C.A.B., Barbero, R.P., 2020. Harvest period and baking industry residue inclusion on production efficiency and chemical composition of tropical grass silage. *J. Clean. Prod.* 266, 121953.

Borreani, G., Tabacco, E., Schmidt, R.J., Holmes, B.J., Muck, R.E., 2018. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.* 101, 3952–3979. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>.

Desta, S.T., Yuan, X., Li, J., & Shao, T., 2016. Ensiling characteristics, structural and nonstructural carbohydrate composition and enzymatic digestibility of Napier grass ensiled with additives. *Bioresour. Technol.* 221, 447-454.

Eun J-S, Beauchemin K.A., 2008. Relationship between enzymic activities and *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 53-67.

Faria D.J.G, Garcia R, Pereira O.G, Fonseca D.M, Mello R, Rigueira J.P.S., 2007 Composição químico-bromatológica da silagem de capim-elefante com níveis de casca de café. *Revista Brasileira de Zootecnia.*; 36(2):301-08.

Gandra, J.R., De Oliveira, E.R., de Goes, R.H.T.B., De Oliveira, K.M.P., Takiya, C.S., Del Valle, T. Araki, H.M.C., Silveira, K., Silva, D., Pause, A.D.S., 2017. Microbial inoculant and an extract of *Trichoderma longibrachiatum* with xylanase activity effect on chemical composition, fermentative profile and aerobic stability of guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) silage. *J. Anim. Feed Sci.* 26(4), 339-347.

Germain, St.G., Summerbell, R.C., 2011 Identifying fungi: a clinical laboratory handbook. Star Pub.

Guimarães, C.G., Bonfá, C.S., Evangelista, A.R., Santos, A.S.D., Pantoja, L.D.A., Castro, G. H.D.F., 2018. Fermentation characteristics of elephant grass silages with macaúba cake. *Acta Sci. Anim. Sci.*, 40. Doi: 10.4025/actascianimsci.v40i1.42523

Khota, W., S. Pholsen, D. Higgs, and Y. Cai., 2016. Natural lactic acid bacteria population of tropical grasses and their fermentation factor analysis of silage prepared with cellulase and inoculant. *J. Dairy Sci.* 99, 9768–9781.

Khota, W., Pholsen, S., Higgs, D., & Cai, Y., 2018. Comparative analysis of silage fermentation and *in vitro* digestibility of tropical grass prepared with *Acremonium* and *Trichoderma* species producing cellulases. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 31(12), 1913.

Li, M., Zi, X., Zhou, H., Hou, G., Cai, Y., 2014. Effects of sucrose, glucose, molasses and cellulase on fermentation quality and *in vitro* gas production of king grass silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 197,206-212.

Lynch, J.P., Baah, j., Beauchemin, K.A., 2015. Conservation, fiber digestibility, and nutritive value of corn harvested at 2 cutting heights and ensiled with fibrolytic enzymes, either alone or with a ferulic acid esterase-producing inoculant. *J. Dairy Sci.* 98, 1214–1224.

McDonald, P., Henderson, A.R., Heron, S.J.E., 1991. *The biochemistry of silage*. Chalcombe publications.

Muck, R., 1996. Inoculant of silage and its effects on silage quality. In: *Informational Conference with Dairy and Forage Industries. Proceedings...US Dairy Forage Research*, 43-52.

Muck, R.E., Nadeau, E.M.G., Mc Allister, T.A., Contreras-Govea, F.E., Santos, M.C., Kung Jr, L., 2018. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. *J. Dairy Sci.* 101, 3980–4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>.

Murray, P., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Tenover, R.H., 2007. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Ni, K., Wang, F., Zhu, B., Yang, J., Zhou, G., Pan, Y., Tao, Y., Zhong, J., 2017. Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. *Bioresour. Technol.* 238, 706–715.

Nurjana, D.J., Suharti, S., 2016. Improvement of napier grass silage nutritive value by using inoculant and crude enzymes from *Trichoderma reesei* and its effect on *in vitro* rumen fermentation. *Media Peternakan.* 39(1), 46-52.

- Petterson, K.L.; Linderen, S., 1989. The influence of the carbohydrate fraction and additives on silage quality. *Grass For. Sci.*, 45, 223-233.
- Pholsen S., Khota W., Pang H., Higgs D., Cai Y., 2016. Characterization and application of lactic acid bacteria for tropical silage preparation. *Anim. Sci. J.* 87, 1202–1211. <https://doi.org/10.1111/asj.12534>
- Pinedo, L. A., de Oliveira, P. V. C., Firmino, S. S., Ribeiro, A. A., dos Santos, B. R. C., & Amorim, D. S., 2020. Parâmetros bromatológicos e fermentativos da silagem de capim elefante aditivado com subproduto de cupuaçu. *Research, Society and Development*, v.9 n.9.
- Queiroz Filho, J.L.D., Silva, D.S.D., Nascimento, I.S.D., 2000. Produção de matéria seca e qualidade do capim-elefante (*Pennisetumpurpureum*Schum.) cultivar Roxo em diferentes idades de corte. *R. Bras. Zootec.* 29(1), 69-74.
- Rabelo, C.H.S., Basso, F.C., Lara, E.C., Jorge, L.G.O., Hæarter, C.J., Mari, L.J., Reis, R.A., 2017. Effects of *Lactobacillus buchneri* as a silage inoculant or probiotic on in vitro organic matter digestibility, gas production and volatile fatty acids of low dry-matter whole-crop maize silage. *Grass Forage Sci.* 72, 534-544. <https://doi.org/10.1111/gfs.12273>.
- Rodrigues, P.H.M., Lopes, T.F.T., de Andrade, S.J.T., Melotti, L., Lucci, C.S., de Lima, F.R., Meyer, P.M., 2003. Adição de inoculantes microbianos sobre a composição química e perfil fermentativo da silagem de capim-elefante (*Pennisetumpurpureum*, Schum.). *Acta Sci. Anim. Sci.* 25(2), 397-402.
- Silva, D. J.; Queiroz, A. C., 2002. Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos. 3.ed. UFV, Viçosa. *Revista Ciência Agronômica.* 41, pp. 482-489. doi:10.1590/S1806-66902010000300023
- Trindade, P.C., Lana, R.P., Veloso, C.M., Pereira, D.S., 2018. Desempenho agrônomo e qualidade da silagem do capim elefante com adubação orgânica. *BJSA.* 8(2), 62-70.
- Van Soest, P.J., & Robertson, J.B., 1985. *Analysis of forages and fibrous foods.* Cornell University.
- Wang, D., Zhao, C., Liu, S., Zhang, T., Yao, J., Cao, Y., 2019. Effects of *Piromyces sp.* CN6 CGMCC 14449 on fermentation quality, nutrient composition and the in vitro degradation rate

of whole crop maize silage. *AMB Express*. 9(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0846-x>.

Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Hen, Y., Azrieli, A., 1993. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 512–518.

White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.J.W.T.; Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 18(1), 315-322.

Windle, M.C., Kung Jr., L., 2013. The effect of a feed additive on the feeding value of a silage-based TMR exposed to air. *J. DairySci.* 96, 16.