

ANIELE DE CÁSSIA RODRIGUES VELOSO

**INOCULAÇÃO DE SILAGEM DE CAPIM-ELEFANTE COM
MICROORGANISMOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Thiago Gomes dos Santos Braz

Coorientador: Prof. Eduardo Robson Duarte

**Montes Claros
2020**

ANIELE DE CÁSSIA RODRIGUES VELOSO

**INOCULAÇÃO DE SILAGEM DE CAPIM-ELEFANTE COM
MICROORGANISMOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Área de Concentração: Produção Animal

Linha de Pesquisa: Nutrição e Alimentação Animal

Orientador: Prof. Thiago Gomes dos Santos Braz

Montes Claros, 30 de julho de 2020

Veloso, Aniele de Cássia Rodrigues

V443i
2020

Inoculação de silagem de capim-elefante com microrganismos do trato digestório de bovinos [manuscrito] / Aniele de Cássia Rodrigues Veloso . Montes Claros, 2020. 98 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Produção Animal. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Thiago Gomes dos Santos Braz

Banca examinadora: Eduardo Robson Duarte, Luciana Castro Geraseev, Roberta Torres Careli, Leidy Darmony de Almeida Rufino.

Inclui referências: f. 35-44; 64-66; 94-98.

1. *Aspergillus terreus* -- Teses. 2. Alimentos -- Análise -- Teses.. 3. *Lactobacillus plantarum* -- Teses. 4. Microrganismos nativos -- Teses.. 5. *Trichoderma longibrachiatum* -- Teses. 6. Bovinos -- Teses. I. Braz, Thiago Gomes dos Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 636.2

ELABORADA PELA BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA DO ICA/UFMG
Nádia Cristina Oliveira Pires / CRB-6/2781

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais Alcides Ribeiro Veloso, Cláudia Rodrigues Fonseca Veloso e meus irmãos Bruno Felipe, Emerson Diego e Bruna Daniela, aos meus sobrinhos, pelo carinho e amor, por sempre estarem ao meu lado e acreditarem que eu seria capaz. Obrigado por serem minha fonte de inspiração e meu refúgio.

Aos meus amigos dos grupos de oração Missionário do Bom Samaritano e do Expressão de Louvor, agradeço pelas orações e tornando esse caminho mais alegre e leve.

Aos professores Thiago Gomes dos Santos Braz e Eduardo Robson Duarte agradeço pela disponibilidade em transmitir seus conhecimentos, pela paciência, confiança e amizade.

Aos membros dos Grupos de Estudos GEMP e GEFOR pelo apoio incondicional no desenvolvimento desse trabalho, sem o apoio de vocês não seria possível.

A Universidade Federal de Minas Gerais por disponibilizar apoio estrutural para execução dos experimentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para execução do projeto.

Obrigada!

Como disse Elisa Giroto, “Só precisamos dar as mãos e viver cada dia com
coragem”.

RESUMO

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) é utilizado na produção de silagem e apresenta suscetibilidade à deterioração por microrganismos indesejáveis durante a fermentação. O uso de microrganismos do trato digestório de bovinos pode ser estudado como forma de reduzir a deterioração. Assim, o objetivo foi avaliar a inoculação da *Lactobacillus plantarum* e das espécies fúngicas *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* do trato digestório de bovinos na fermentação do capim-elefante. Foram realizados dois experimentos. No primeiro, avaliaram-se duas concentrações de *L. plantarum* na ensilagem de capim-elefante pré-emurcheado e fermentado em tubo Falcon. No segundo experimento foi avaliado a inoculação dos fungos *A. terreus*, *T. longibrachiatum* e o mix de ambos nas concentrações de 10^5 unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) sobre a estabilidade aeróbica, composição bromatológica e microbiológica da silagem fermentada em minissilos de PVC. As diferentes inoculações e formas de conservação da forragem evidenciaram resultados distintos. A inoculação da *L. plantarum* não influenciou as perdas de matéria seca e efluente, o pH e a comunidade microbiológica da silagem fermentada em tubo Falcon, porém reduziu a população de enterobactérias e causou inexistência das bactérias não fermentadoras de lactose. Por outro lado, verificou-se que a inoculação dos fungos *A. terreus* e *T. longibrachiatum* afetou positivamente os teores de fibra em detergente neutro e carboidratos não fibrosos, a estabilidade aeróbica da silagem e a comunidade de microrganismos no momento de abertura e após 10 dias de exposição aeróbica da silagem. A silagem MIX foi a mais estável após exposição aeróbica, mas a

silagem controle, *A. terreus* e *T. longibrachiatum* apresentaram menores perdas de matéria seca ($P < 0,05$). Os tratamentos não afetaram os teores de matéria mineral, proteína bruta e estrato etéreo ($P > 0,05$). Apesar disso, a silagem inoculada com MIX apresentou maior concentração de fibras e menor teor de carboidratos não fibrosos que a inoculada com *T. longibrachiatum*. Apenas o pH final da silagem MIX assumiu valor acima de 4,2 considerado valor mínimo para uma boa fermentação. Verificou-se efeito do tipo de inoculação na população de *Diplococcus* na abertura da silagem e de Bastonetes, *Lactobacillus* e total de bactérias láticas após 10 dias de exposição aeróbica. Em conclusão, a inclusão de *A. terreus* isolado ou em mistura com *T. longibrachiatum* melhora a estabilidade aeróbica da silagem, mas eleva o teor de fibra em detergente neutro e reduz o teor de carboidratos não fibrosos.

Palavras-chave: *Aspergillus terreus*, composição bromatológica, *Lactobacillus plantarum*, microrganismos autóctones, *Trichoderma longibrachiatum*.

ABSTRACT

Elephant grass is used in the production of silage to supply animals when food is scarce, but it is susceptible to deterioration by undesirable microorganisms during fermentation. The objective of the work was to evaluate the inoculation of *Lactobacillus plantarum* and of the fungal species *Aspergillus terreus* and *Trichoderma longibrachiatum* from the bovine digestive tract in the ensiling of elephant grass (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon). Two experiments were carried out. In the first, two concentrations of *L. plantarum* in the silage of pre-wilted elephant grass and fermented in Falcon tube were evaluated. In the second experiment it was evaluated the inoculation of the fungi *A. terreus*, *T. longibrachiatum* and the mix of both fungi in the concentrations of 10^5 colony forming units per gram (CFU / g) on the aerobic stability and bromatological and microbiological composition of the fermented silage in PVC mini-silks. The different inoculations and ways of preserving forage showed different results. The inoculation of *L. plantarum* did not influence the losses of dry matter and effluent, the pH and the microbiological community of the silage fermented in Falcon tube, however it reduced the population of enterobacteria and caused the absence of non-fermenting lactose bacteria. On the other hand, it was verified that the inoculation of *A. terreus* and *T. longibrachiatum* positively affected the levels of neutral detergent fiber and non-fibrous carbohydrates, the aerobic stability of the silage and the community of microorganisms at the time of opening and after 10 days aerobic exposure of silage. The MIX silage was the most stable after aerobic exposure, but the control silage, *A. terreus* and *T. longibrachiatum* showed lower losses of dry matter ($P < 0.05$). The treatments

did not affect the levels of mineral matter, crude protein and ether layer ($P > 0.05$). Despite this, the silage inoculated with MIX presented a higher concentration of fibers and a lower content of non-fibrous carbohydrates than that inoculated with *T. longibrachiatum*. Only the final pH of the MIX silage assumed a value above 4.2 considered for good fermentation. There was an effect of the type of inoculation in the population of Diplococcus in the opening of silage and rods, Lactobacillus and total lactic acid bacteria after 10 days of aerobic exposure. In conclusion, the inclusion of *A. terreus* alone or in a mixture with *T. longibrachiatum* improves the aerobic stability of the silage, but increases the neutral detergent fiber content and reduces the non-fibrous carbohydrate content.

Keywords: *Aspergillus terreus*, bromatological composition, indigenous microorganisms, *Lactobacillus plantarum*, *Trichoderma longibrachiatum*.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO II

Figura 1: Valores de pH durante 10 dias de exposição aeróbica de silagem de capim-elefante inoculadas com *Aspergillus terreus* (AT15), *Trichoderma longibrachiatum* (TL20), com o mix dos dois fungos (MIX) e não inoculadas (Controle). 80

Figura 2: Médias de unidades formadoras de colônias (log de UFC) por grama de silagem de capim-elefante para diplococos crescidos em meio MRS provenientes de silagens de capim-elefante inoculadas com *Aspergillus terreus* (AT15), *Trichoderma longibrachiatum* (TL20), com o mix desses dois fungos (MIX) ou não inoculadas (Controle) no momento da abertura e 10 dias após a abertura..... 84

Figura 3: Médias de unidades formadoras de colônias (/log de UFC) por grama de silagem de capim-elefante para bactérias lácticas totais crescidas em meio MRS provenientes de silagens de capim-elefante inoculadas com *Aspergillus terreus* (AT15), *Trichoderma longibrachiatum* (TL20), com o mix desses dois fungos (MIX) ou não inoculadas (Controle) no momento da abertura e 10 dias após a abertura.. 87

LISTA TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1: Composição da microbiota epífita aeróbia do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) pré-ensilado..... 50

Tabela 2: Perda na matéria seca, pH e estabilidade aeróbica do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) fermentado inoculado com uma cepa de *Lactobacillus plantarum* autóctone de bovino e o controle não inoculado... 54

Tabela 3: Média de unidades formadoras de colônias /grama (UFC)/g) e desvio padrão (DP) da população de bactérias lácticas (BAL) em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) fermentado após inoculação com uma cepa de *Lactobacillus plantarum* autóctone de bovino..... 57

Tabela 4: Média de unidades formadoras de colônias /grama (UFC)/g) e desvio padrão (DP da população de bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) fermentado após inoculação com uma cepa de *Lactobacillus plantarum* autóctone de bovino e o controle não inoculado 58

Tabela 5: Média de unidades formadoras de colônias /grama (UFC)/g) e desvio padrão (DP da população de fungos em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) fermentado após inoculação com uma cepa de *Lactobacillus plantarum* autóctone de bovino e o controle não inoculado..... 59

Tabela 6: Distribuição de gêneros de fungos micelianos isolados da silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) após fermentação com uma cepa de *Lactobacillus plantarum* autóctone de bovino..... 62

Artigo II

Tabela 1: Composição da microbiota epífita aeróbia do capim-elefante (<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Cameroon) antes da ensilagem	77
Tabela 2: Características de pH, estabilidade aeróbica, perdas de massa seca (%) e por efluentes (g/kg de massa fresca) de silagens de capim-elefante com fungos provenientes do rúmen de bovinos.....	79
Tabela 3: Teores de matéria mineral (MM), fibra em detergente neutro (FDN), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e carboidratos não fibrosos (CNF) de silagens de capim-elefante com fungos provenientes do rúmen de bovinos ...	82
Tabela 4: Médias de unidades formadoras de colônias (log de UFC) por grama de silagem e erro padrão da média (ep) para microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos presentes em silagens de capim-elefante inoculadas com <i>Aspergillus terreus</i> (AT15), <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (TL20), com o mix desses dois fungos (MIX) ou não inoculadas (Controle) no momento da abertura e 10 dias após a abertura	90
Tabela 5: Distribuição de gêneros de fungos micelianos isolados das silagens de capim-elefante (<i>Pennisetum purpureum</i> cv. Cameroon) inoculadas com <i>Aspergillus terreus</i> (AT15), <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (TL20), com o mix desses dois fungos (MIX) ou não inoculadas (Cont) no momento da abertura e 10 dias após a abertura.....	92

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIações E UNIDADES

%	Porcentagem
AT15	<i>Aspergillus terreus</i> a 10^5 UFC/g
BAL	Bactéria lática
CHS	Carboidratos solúveis
CNF	Carboidratos não fibrosos
CONT	Controle
CV	Coeficiente de variação
DP	Desvio padrão
EE	Extrato etéreo
EF	Efluente
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
LACT5	<i>Lactobacillus plantarum</i> a $1,0 \times 10^5$ UFC/g de forragem
LACT9	<i>Lactobacillus plantarum</i> a $1,0 \times 10^9$ UFC/g de forragem.
MI	Mililitro
mm	Milímetro
MM	Matéria mineral
MS	Matéria seca
MSen	Quantidade de massa seca de forragem na ensilagem
MVFE	Massa verde de forragem ensilada
MSFE	Teor de matéria seca da forragem ensilada
NaCl	Cloreto de sódio
PB	Proteína bruta
PEab	Peso da estrutura (silo + areia úmida + tela) após abertura

PEen	Peso da estrutura (silo + areia seca + tela) na ensilagem
PG	Perdas gasosas
pH	Potencial Hidrogeniônico
PSab	Peso do silo cheio na abertura
PSen	Peso do silo cheio na ensilagem
PTab	Peso do tubo cheio imediatamente antes da abertura
PTen	Peso do tubo cheio na ensilagem
TL20	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> a 10^5 UFC/g
UI	Unidades Internacionais
μl	Microlitro
UFC/g	Unidades formadoras de colônia por grama

SUMÁRIO

1	Introdução geral	17
2	Objetivos	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	Revisão de literatura	20
3.1.1	Produção de silagem e processo fermentativo.....	20
3.1.2	FORAGEIRAS PARA ENSILAGEM.....	23
3.1.3	Inoculantes microbianos na conservação de silagem	26
3.1.4	Uso de inoculantes microbianos na silagem de capim-elefante	30
3.1.5	Fungos anaeróbios facultativos isolados do ambiente ruminal	32
3.2	Referências	35
4	Artigo 1 – Fermentação do capim-cameroon ensilado com bactéria láctica do trato digestório de bovinos	45
4.1	Introdução	47
4.2	Materiais e Métodos	48
4.2.1	Bactéria láctica avaliada.....	48
4.2.2	FORAGEIRA UTILIZADA.....	49
4.2.3	Procedimentos experimentais	51
4.3	Resultados e Discussão	54
4.4	Conclusões.....	63
4.5	Referências	64
5	Artigo 2- Inoculação de silagem de capim-elefante com fungos isolados do rúmen de bovinos	67
5.1	Introdução	69
5.2	Material e Métodos.....	70

5.2.1 Local e delineamento	70
5.2.2 Descrição da forragem utilizada	71
5.2.3 Descrição dos microrganismos utilizados.....	71
5.2.4 Análises microbiológicas	72
5.2.5 Manejo de preparo da forragem a ser ensilada.....	73
5.2.6 Análises após conservação da forragem.....	74
5.2.7 Análise bromatológica	75
5.2.8 Estabilidade aeróbica	76
5.2.9 Análise estatística	76
5.3 Resultados e Discussão	77
5.3.1 Composição química e população de microrganismos aeróbios na forragem <i>in natura</i>	77
5.3.2 Perdas no processo de ensilagem e estabilidade aeróbica.....	78
5.3.3 Composição bromatológica da forragem conservada	81
5.3.4 Composição microbiológica da forragem conservada e após perda da estabilidade aeróbica.....	83
5.3.5 Diversidade fúngica da silagem conservada e após desestabilidade aeróbica da forragem conservada.....	91
5.4 Conclusões.....	93
5.5 Referências	94

1 Introdução geral

A conservação de forragens na forma de silagem é a principal alternativa para contornar a escassez de alimento nos períodos de estiagem em regiões tropicais e semiáridas (Rigueira et al., 2017; Monção et al., 2020). Nessa situação, a forragem é produzida no período favorável do ano e armazenada úmida por meio do processo de ensilagem (Furtado et al., 2019). Essa técnica é definida como o processo de fermentação anaeróbica do volumoso úmido, armazenado em silos. A ensilagem já é amplamente distribuída no mundo e pode ser realizada em forrageiras como o capim-elefante (Oliveira et al., 2017; Borreani et al., 2018; Kung et al., 2018; Muck et al., 2018; He et al., 2020; Jiang et al., 2020; Monção et al., 2020).

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) apresenta elevada produtividade, principalmente no período das águas, quando frequentemente excede a demanda do rebanho. No período da seca, essa forragem apresenta perdas, tanto do ponto de vista quantitativo (senescência e acamamento), quanto qualitativo (aumento do teor de fibras e redução da proteína). Apesar da elevada produtividade, o capim-elefante apresenta limitações à ensilagem, como elevado teor de umidade, elevado poder tampão e, baixo teor de carboidratos solúveis, fatores que podem contribuir para fermentações indesejáveis a exemplo de clostrídeos e enterobactérias (Oliveira et al., 2014; Monção et al., 2020).

O processo de ensilagem pode ocorrer naturalmente pelos microrganismos epífitos presente na planta, entretanto a adição de inoculantes microbianos melhora o processo fermentativo, resultando em silagens de melhor qualidade (Wang et al., 2019b). A aplicação desses aditivos é capaz de

elevar a população de microrganismos desejáveis e reduzir, por competição, os indesejáveis no processo fermentativo.

Os inoculantes microbianos são representados principalmente por bactérias láticas homo e/ou heterofermentativas que atuam em ambiente anaeróbico produzindo ácido láctico em quantidades suficientes para suprimir as populações indesejáveis (Driehuis et al., 2010; Ferreira et al., 2013; Oliveira et al., 2017; Muck et al., 2018). Por outro lado, a utilização de fungos em silagens é controversa em função do potencial de deterioração de algumas espécies.

Em estudos desenvolvidos anteriormente, foram isoladas cepas de fungos celulolíticos do ambiente ruminal (Abrão et al., 2014, Abrão et al., 2017) e bactéria láctica com potencial probiótico de fezes de bezerros criados em região semiárida do Norte de Minas Gerais. A aplicação desses microrganismos na forragem de capim-elefante pode melhorar a qualidade da silagem produzida, reduzindo o pH, produzindo ácido láctico, inibindo microrganismos indesejáveis, mantendo as características nutricionais e melhorando a estabilidade aeróbica durante o fornecimento no cocho (Gimenes et al., 2006; Addah et al., 2011; Muck et al., 2018). Portanto, a avaliação de microrganismos autóctones do trato digestório de bovinos como aditivos no processo de ensilagem se justifica frente aos possíveis benefícios que poderiam ser alcançados tanto para a qualidade da silagem, quanto para a saúde dos animais.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da adição de microrganismos do trato digestório de bovinos no momento da ensilagem do capim-elefante.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da aplicação de *Lactobacillus plantarum* sobre o pH e perdas da silagem de capim-elefante armazenadas em microsilos.
- Avaliar os efeitos da inoculação de *Trichoderma longibrachiatum* e *Aspergillus terreus* sobre a composição bromatológica, perdas e estabilidade aeróbica da silagem de capim-elefante.
- Analisar os efeitos da adição desses inoculantes sobre a microbiota da silagem na abertura e após período de quebra da estabilidade aeróbica.

3 Revisão de literatura

3.1.1 Produção de silagem e processo fermentativo

A ensilagem consiste em processo onde a forragem é colhida, picada, armazenada compactada e vedada em silos para armazenamento e preservação da forragem úmida fermentada em local fechado e isento de oxigênio (Weinberg e Muck, 1996; Weinberg e Chen, 2013). Essa técnica tem como objetivo conservar as características nutricionais do alimento proporcionando o mínimo de perdas da massa ensilada, para posterior utilização na alimentação animal, principalmente em épocas de escassez de alimentos (Evangelista et al., 2004; Pereira et al., 2007b; Furtado et al., 2019).

Em meio anaeróbio, as atividades enzimáticas e celulares do vegetal são paralisadas e os microrganismos presentes na massa ensilada convertem açúcares solúveis (glicose, frutose, sacarose, arabinose, xilose, frutonas) e compostos nitrogenados solúveis (aminoácidos livres, oligopeptídeos, proteínas), em ácidos orgânicos. Assim, as bactérias produtoras do ácido lático (BAL), acidificam o meio, promovendo redução do pH e inibindo o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis como clostrídeos, enterobactérias, fungos filamentosos e leveduras (Danner et al., 2003; Weinberg e Chen, 2013).

A conservação adequada da forragem ensilada é extremamente dependente da produção de ácido lático e de baixa capacidade tamponante (Jobim et al., 2007). Essas condições inibem o crescimento de microrganismos deteriorantes, mantendo os valores nutricionais da forragem. Uma vez que a maioria dos microrganismos deteriorantes aeróbios e anaeróbios facultativos

crecem preferencialmente em pH mais elevado (McDonald et al., 1991; Borreani et al., 2018).

O processo de ensilagem consiste de quatro fases com tempo e intensidade diferentes (Pahlow et al., 2003; Wilkinson e Davies, 2012). A fase aeróbica ocorre durante o enchimento do silo e prolonga-se até poucas horas após a vedação do silo, culminando com a exaustão do oxigênio residual (Jobim e Nussio, 2013). Nessa fase, todos os microrganismos aeróbicos obrigatórios e facultativos (leveduras, fungos filamentosos e bactérias) estão ativos devido à presença de ar (Pahlow et al., 2003). Segundo Lima et al. (2012) neste estágio observa-se o crescimento de microrganismos aeróbicos como fungos, algumas bactérias e já há início da atividade de anaeróbicos. Devemos ressaltar que a atividade destes microrganismos bem como o processo respiratório consomem energia de forma acelerada, reduzindo os teores de carboidratos solúveis que serão utilizadas para fermentação nas próximas etapas.

A fase aeróbica também é caracterizada pela respiração das células vegetais que, apesar de terem passado pelo processo de colheita e picagem, ainda apresentam estrutura mínima que permite respiração celular e consumo dos carboidratos solúveis (CHS), importantes para a posterior fermentação (Borreani et al., 2018). Dessa forma, quanto menor a duração dessa fase, menores serão as perdas, sendo recomendando que a forragem seja picada, compactada e vedada rapidamente (McDonald et al., 1991).

A fase de fermentação ativa ou fase fermentativa principal ocorre após a exaustão do oxigênio no silo. Essa fase pode ser dividida em duas outras subfases (Jobim e Nussio, 2013), onde a primeira caracteriza-se pelo

crescimento e inibição de bactérias heterofermentativas (que produzem outros ácidos orgânicos além do láctico). A inibição desse grupo ocorre em função da menor tolerância à acidez que já se encontra em nível elevado. Na segunda sub etapa ocorre inibição do segundo grupo de BAL, que são as homofermentativas. Ao longo desta fase, as bactérias lácticas homo e heterofermentativas dominam o ambiente anaeróbico, usam os carboidratos solúveis em água para produzir ácidos orgânicos (ácido láctico, acético, etanol e dióxido de carbono), que diminuem o pH da silagem e inibem o desenvolvimento de outros microrganismos (Pahlow et al., 2003). Ao fim desse período, há inibição das próprias BAL homofermentativas, dando início à fase de estabilidade.

Na fase de estabilidade, ocorre baixa atividade microbiológica já que não há oxigênio na massa ensilada e a maior parte dos microrganismos foi inibida (Lima et al., 2012). O pH permanece estável, inibindo atividades microbianas, porém algumas enzimas vegetais e microbianas acidotolerantes permanecem ativas. Após a abertura do silo o pH ácido e as condições anaeróbicas mantêm a estabilidade da massa ensilada (Pahlow et al., 2003).

A fase de abertura consiste na exposição da massa ensilada ao oxigênio. O ar favorece o crescimento de leveduras, fungos filamentosos, enterobactérias e outros microrganismos indesejáveis. Segundo Pahlow et al. (2003) e Bumbieris Junior et al. (2017) as leveduras são anaeróbicas facultativas que, na presença de oxigênio, iniciam a deterioração aeróbica. As leveduras aceleram a degradação de carboidratos e ácido láctico, produzindo dióxido de carbono, calor e água (Liu et al., 2020). Esse processo resulta na elevação rápida do pH da massa ensilada e proporciona condições favoráveis

ao desenvolvimento de outros microrganismos indesejáveis (McDonald et al., 1991; Kleinschmit et al., 2005). Segundo Jobim et al. (2007), a perda da estabilidade pós-abertura pode ser definida como o ponto onde há elevação de 2 unidades de pH na massa ensilada. Oliveira et al. (2017) constatou que silagens com contagem alta de leveduras ocasionam rápida quebra da estabilidade aeróbica.

O correto manejo da abertura e fornecimento da silagem são indispensáveis para minimizar as perdas nessa fase (Pahlow et al., 2003). Além disso, o uso de aditivos microbianos é capaz de elevar a produção de ácidos orgânicos e modificar o perfil dos ácidos produzidos, que passa a ser constituído por maior proporção de ácido acético que, não faz parte do rol de substratos utilizados pelas leveduras para deterioração e quebra da estabilidade da silagem (Oliveira et al., 2017; Kung et al., 2018; Muck et al., 2018). Dessa maneira, o uso de microrganismo produtores de ácido acético de forma rápida e eficiente pode limitar a atuação das leveduras na deterioração da silagem (Wilkinson e Davies, 2012; Michel et al., 2017; Muck et al., 2018; Liu et al., 2020).

3.1.2 Forrageiras para ensilagem

A ensilagem tem sido um método preferencial na manutenção do teor de nutrientes e energia da forragem que garante um bom valor nutricional, portanto a utilização dessa técnica tem sido um desafio (Vervaeren et al., 2010; Borreani et al., 2018). Segundo Bernardes e Rêgo (2014) as culturais mais utilizadas no processo de ensilagem em fazendas leiteiras são o milho, sorgo, gramíneas tropicais e a cana-de-açúcar.

Uma cultura é considerada ideal para a produção de silagem quando ela apresenta quatro fatores: produção e qualidade suficientes para ser conservada, baixa capacidade ou poder tampão, elevado teor de carboidratos solúveis (CHS) e teor de matéria seca adequado (Jobim e Nussio, 2013). Segundo Ramos et al. (2016) as cultivares mais produtivas tendem a ser as mais utilizadas para confecção de silagem.

A capacidade ou poder tampão, por sua vez, pode ser definida como quantidade de miliequivalentes de prótons (H^+) necessária para reduzir o pH da silagem de 6 para 4 (Jobim et al., 2007). Portanto, silagens com baixo poder tampão apresentam baixa resistência a redução do pH a valores entre 3,8 e 4,2, considerados ideais (Van Soest, 1991). Os principais fatores responsáveis pela capacidade tampão são a presença de alguns nutrientes catiônicos (sódio, cálcio, potássio, entre outros), alguns ácidos orgânicos (ácido málico, malônico, aspártico, etc) e elevado teor de proteínas.

Já o teor de CHS é considerado adequado ao processo de fermentação quando se encontra em valores superiores a 8% da massa seca da forragem. Estes CHS são os principais substratos para o processo de fermentação e, portanto, indispensáveis para uma boa ensilagem. A fermentação irá resultar na queda expressiva do pH e atendimento dos objetivos com o processo de ensilagem (Jobim et al, 2007).

O teor de matéria seca é importante do ponto de vista da ensilagem e valores abaixo de 28% representam elevada quantidade de água na silagem e podem dificultar a queda do pH por meio da diluição dos ácidos produzidos durante o processo fermentativo (Pereira et al., 2007a). Kung et al. (2018) observaram que o conteúdo de matéria seca da forragem deve variar de 25% a

35% para uma boa fermentação da silagem. Por outro lado, silagens excessivamente secas estão associadas a elevada dificuldade no processo de compactação (Pereira et al., 2007a). A elevada quantidade de oxigênio residual retida na forragem mais seca favorece o consumo dos CHS via processo de respiração vegetal e microbiano (McAllister e Hristov, 2000; Borreani et al., 2018). Silagens nessas condições também são caracterizadas por elevadas populações de microrganismos indesejáveis, principalmente por leveduras (Brüning et al., 2017).

O uso de capins de clima tropical na produção de silagem tem sido frequente devido à alta produtividade, principalmente as gramíneas da espécie *Pennisetum purpureum* Schum. (Dantas e Negrão, 2010; Monção et al., 2020). Essas forrageiras apresentam elevada produção, perenidade, menor custo por quilograma de matéria seca e maior flexibilidade na colheita que as tornam estrategicamente interessantes como reserva de alimento na forma de silagem para a seca (Furtado et al., 2019). No entanto, os capins tropicais apresentam problemas que interferem na fermentação, como baixo teor de carboidratos solúveis, alto poder tampão e alto teor de umidade (Borreani et al., 2018; Kung et al., 2018; Rigueira et al., 2018).

Como alternativa para contornar esses problemas tem sido sugerida a aplicação de aditivos capazes de elevar a população de microrganismos desejáveis, melhorar o valor nutritivo e reduzir o teor de umidade, possibilitando melhor conservação (Dantas e Negrão, 2010; Guimarães et al., 2011; Muck et al., 2018). Os aditivos mais utilizados em silagens de capim são os aditivos microbianos (inoculantes), constituídos principalmente por BAL homo e heterofermentativas e aditivos sequestrantes de umidade, representados por

outros tipos de alimentos, com elevado teor de matéria seca e alta higroscopicidade (Muck et al., 2018). Estratégias de manejo na colheita como a pré-secagem e o uso de aditivos dessecantes (herbicidas) também tem sido apontados como formas para reduzir a MS.

3.1.3 Inoculantes microbianos na produção de silagem

Um aditivo microbiano ideal deve ser seguro para o homem e os animais, melhorar a qualidade higiênica da silagem, reduzir perdas de matéria seca, limitar a fermentação secundária, melhorar a estabilidade aeróbica, aumentar o valor nutritivo e dar ao agricultor um retorno maior do que o custo do aditivo (Merensalmi e Virkki, 1991). Os inoculantes abrangem microrganismos com rápido crescimento que devem gerar produtos finais que não inibam o consumo e a produção dos animais (Muck et al., 2018).

A possibilidade de multiplicação das populações microbianas na massa ensilada está relacionada com às condições do meio (Santos et al., 2010; Oliveira et al., 2017). Os microrganismos mais comuns nas plantas antes de serem ensiladas são: bactérias aeróbicas, bactérias produtoras do ácido láctico, enterobactérias, leveduras, fungos micelianos, clostrídeos, bacilos, bactérias produtoras de ácido acético e bactérias produtoras de ácido propiônico (Pahlow et al., 2003). Muitos deles, como clostrídeos, enterobactérias e leveduras são considerados indesejáveis, pois sua atividade pode resultar em fermentações consideradas indesejáveis para o processo de ensilagem. Os principais substratos utilizados pelos indesejáveis são proteínas, ácidos orgânicos e açúcares solúveis, que ao serem consumidos, aumentam o pH da silagem e reduzem a sua digestibilidade.

No processo de inoculação com aditivos microbianos, o principal objetivo é reduzir ou minimizar a atividade das populações citadas acima por meio do aumento da capacidade competitiva da população de microrganismos desejáveis (McDonald et al., 1991; Jobim et al., 2007). Muitas pesquisas vêm sendo realizadas nesse sentido, objetivando reduzir a deterioração aeróbica e o acúmulo de toxinas na silagem (Silva, et al., 2018; Muck et al., 2018). Uma das principais metas com a adição dos inoculantes microbianos é o aumento da população de microrganismos desejáveis, basicamente BAL homo e heterofermentativas, e a redução do pH da massa ensilada para valores entre 3,8 a 4,2, considerados ideais para obter silagem de boa qualidade (Van Soest, 1991).

Os principais microrganismos utilizados como inoculantes são as bactérias lácticas (BAL) homofermentativas, (Pahlow et al., 2003). As homofermentativas obrigatórias usam glicose para produzir quase exclusivamente o ácido láctico. As BAL heterofermentativas facultativas também usam glicose, mas possuem fosfocetolases que fermentam a pentose para produzir principalmente ácidos láctico e acético (Muck et al., 2018). A adição de microrganismos que produzem maiores quantidades de ácidos láctico é importante devido seu rápido efeito na redução do valor do pH (Ávila et al., 2014). A proporção de ácido láctico para ácido acético é indicativo de qualidade da fermentação da ensilagem (Kung et al., 2018). Esses autores afirmaram que boas fermentações têm proporção desses ácidos de cerca de 2,5 a 3,0.

Oliveira et al. (2017), afirmam que os efeitos dos inoculantes variam de acordo com a cultura. O inoculante microbiano SiloMax Centurium (Matsuda) utilizado na silagem do capim *Brachiaria brizantha* cv. Piatã proporcionou a

manutenção de maiores teores de proteína bruta do que silagens não inoculadas, provavelmente, isso ocorreu pelo controle dos microrganismos indesejáveis causadores da proteólise e desaminação (McDonald et al., 1991; Bolson et al. 2017).

Segundo Muck et al. (2018), a maior parte das bactérias consideradas homofermentativas no passado são classificadas hoje como heterofermentativas facultativas, sendo capazes de produzir maiores quantidades de ácido láctico, mas também ácido acético. Para estes mesmos autores a inoculação puramente com de BAL homofermentativas ou heterofermentativas facultativas reduz o pH das silagens de gramíneas temperadas, tropicais e de alfafa e outras leguminosas, mas reduz as concentrações de ácido acético, contribuindo para o crescimento de leveduras.

As estirpes heterofermentativas facultativas de BAL mais comuns utilizadas como aditivos microbiológicos para silagem incluem *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Enterococcus faecium* e diferentes espécies de *Pediococcus* (Muck et al., 2018). Oliveira et al. (2017) realizaram uma metanálise sobre inoculantes e constataram que 67% dos estudos envolveram *L. plantarum* na inoculação de silagens, que é considerada heterofermentativa facultativa (Ávila et al., 2014). As cepas de *L. plantarum* (UFLA SIL41, UFLA SIL42 e UFLA SIL46) foram eficientes para produzirem ácido propiônico na silagem (Ávila et al., 2014) e pesquisadores observaram que esse ácido contribuiu para preservação de proteínas durante a ensilagem e na exposição ao ar (He et al., 2020). No entanto, quando falta glicose, *L. plantarum* pode fermentar pentose em ácido láctico, dióxido de carbono e ácido acético (Holzer et al., 2003). Ström et al. (2002) isolaram a cepa de *L. plantarum* (MiLAB 393)

proveniente de silagem de gramíneas (*Phleum pratense* e *Festuca pratensis*) que foi capaz de produzir composto inibidor do crescimento de leveduras e fungos.

A presença de fungos micelianos na silagem não é desejável, pois esses eucariotos podem produzir micotoxinas que têm efeitos adversos na saúde animal e geram perdas na produção, além de comprometer a segurança dos produtos alimentares de origem animal (O'brien et al., 2008; Driehuis, 2011). Por outro lado, a adição de fungos e/ou enzimas fúngicas na dieta de ruminantes, pode melhorar a microbiota ruminal, estabilizar o pH ruminal, e promover melhora na degradação microbiana da parede celular vegetal (Tripathi et al., 2007; Alzahal et al., 2014). Os fungos possuem capacidade de solubilizar a biomassa lignocelulósica (Rouches et al., 2016). Segundo Li et al. (2018), os microrganismos fibrolíticos degradam a estrutura de carboidratos e liberam substratos fermentáveis para ocorrer a fermentação microbiana.

Wang et al. (2019a), ao inocular o fungo *Piromyces* sp. proveniente do ambiente ruminal na ensilagem de milho, promoveu melhora na qualidade da silagem e na taxa de degradação da fibra em relação á silagem não inoculada. Li et al. (2018) inocularam a espécie fúngica *Tricoderma reesei* na silagem de *Pennisetum sinense* reduzindo o pH da silagem para 4,20 e constataram teores de fibra em detergente neutro, hemicelulose e celulose inferiores ao controle. Para esses autores a silagem tratada com o fungo revelou baixos valores de ácido propiônico e ácido butírico, indicando preservação adequada e ausência de fermentação secundária. Lee et al. (2015), relataram redução significativa no conteúdo de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido

(FDA) e melhora na qualidade da silagem de palha de arroz inoculada com fungos anaeróbicos que tem atividade celulolítica.

3.1.4 Uso de inoculantes microbianos na silagem de capim-elefante

As gramíneas de espécie *Pennisetum purpureum* Shum. (Capim-elefante), são amplamente estudadas devido à alta produção em massa por unidade de área (Guim et al., 2002; Andrade et al., 2003; Ferreira et al., 2013; Monção et al., 2020). Em função da sua alta produtividade, há situações de perda de forragem onde o crescimento excessivo do período das águas acaba não sendo aproveitado de forma correta e resulta em declínio no valor nutricional da forragem (Guim et al. 2002). Nessas situações, a ensilagem do excedente seria a principal estratégia para evitar redução do valor nutritivo e perdas de forragem (Monção et al., 2020).

O capim-elefante é uma forrageira perene de clima tropical e metabolismo C4 (Rosa et al., 2019). Estas plantas são caracterizadas por elevada produção, mas possuem limitações que dificultam o processo fermentativo (Furtado et al., 2019; Silva et al., 2019; Monção et al., 2020). As limitações nutricionais estão relacionadas ao rápido crescimento e proporção de fibras que podem reduzir o valor nutritivo da silagem de capim-elefante (Rosa et al., 2019; Monção et al., 2020). Já as limitações à ensilagem estão associadas principalmente à grande capacidade tampão, elevado teor de umidade e baixo teor de carboidrato solúvel (Furtado et al., 2019).

O teor de matéria seca do capim-elefante é um fator limitante para a utilização na forma de silagem (Guim et al., 2002; Monção et al., 2020). Para obter fermentação satisfatória e silagem de alto valor nutricional é sugerido o uso de aditivos durante a ensilagem que estimulam a fermentação (Guim et al.,

2002; Andrade et al., 2003; Monção et al., 2020). Aditivos contendo bactérias láticas vem mostrando efeitos na estabilidade do processo fermentativo do capim-elefante (Patrizi et al., 2004; Ferreira et al., 2013; Ferreira et al., 2014; Shah et al., 2018). No entanto, os efeitos do uso de aditivos, está condicionado ao tipo de inoculante, a atividade biológica, à quantidade aplicada e o tipo de forragem, além do teor de matéria seca e composição química da forrageira (Penteado et al., 2007).

Ferreira et al. (2013) relataram que a inoculação de estirpes de *Streptococcus bovis* JB1, *S. bovis* HC5 a 10^6 UFC/ g na silagem de capim-elefante resultou em menor presença de enterobactérias, fungos e leveduras e maior número de bactérias do ácido lático. Os autores observaram que silagens inoculadas com *S. bovis* JB1 e HC5 apresentaram maiores valores de ácido lático e menores valores de ácido acético, butírico e propiônico, com consequente redução das perdas fermentativas. Ferreira et al. (2014) inoculou *S. bovis* isolado do rúmen na silagem de capim-elefante e notaram melhora no perfil fermentativo, no valor proteico e na degradabilidade dos nutrientes no rúmen.

Segundo Sifeeldein et al. (2018), ao adicionar *Pediococcus acidilactici* (AZZ1), *Lactobacillus plantarum* subsp. *Argentoratensis* (AZZ7) e *L. plantarum*, Ecosyl MTD/1 (CB) na ensilagem de capim Napier, constataram melhora na preservação e redução na estabilidade aeróbica da silagem. Segundo esses autores, ao expor a silagem ao ar, ocorreu um aumento significativo no crescimento de leveduras. De acordo com Vu et al. (2019), é importante identificar os principais fungos e leveduras de deterioração do capim-elefante

para evitar a degradação da silagem. Assim, a utilização de inoculantes na silagem capim-elefante pode melhorar a qualidade e estabilidade aeróbica.

3.1.5 Fungos anaeróbios facultativos isolados do ambiente ruminal

Os ruminantes dependem da microbiota ruminal simbiote para conversão da biomassa vegetal em proteína e ácidos graxos voláteis (McCann et al., 2014). Os microrganismos encontrados no trato digestivo desses animais são a base enzimática para o processo de degradação da estrutura lignocelulósica do vegetal (Solomon et al., 2016). No ambiente ruminal os fungos anaeróbios são os mais detectados (10^3 a 10^6 zoósporos por ml) (Resende et al., 2015; Elekwachi et al., 2017).

Os fungos anaeróbicos pertencem ao filo Neocallimastigomycota, que são os principais e mais diversificados fungos colonizadores do material vegetal do rúmen (Grununger et al., 2014). Os isolados fúngicos mais comuns do ambiente ruminal de animais domésticos e selvagens pertencem aos gêneros *Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Cyllamyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* e *Piromyces* (Grununger et al., 2014; Elghandour et al., 2020).

A propagação dos fungos dentro do rúmen ocorre por meio dos zoósporos liberados a partir de esporângios fúngicos. Esses zoósporos se aderem a superfícies e iniciam o processo de crescimento (Grununger et al., 2014). Já entre animais, isso ocorre por meio de zoósporos presentes no ambiente e provenientes de fezes de animais. A infecção também pode ocorrer pelo ar e pela saliva.

Quando os zoósporos dos fungos aderem ao material vegetal para degradá-lo, utilizam aminoácidos, ácidos graxos de cadeia curta e vitaminas

que estimulam o crescimento dos micélios (Guliye e Wallace, 2007; Edwards et al., 2008; Puniya et al., 2015). Segundo Edwards et al. (2008) os fungos colonizam preferencialmente locais onde há danos na parede celular vegetal. Além disso, juntamente com as bactérias e os protozoários do rúmen, esses fungos são responsáveis pela quebra do material lignocelulósico da parede celular vegetal. Sem a presença deste conjunto de microrganismos, não há possibilidade do hospedeiro aproveitar a energia e nutrientes da parede celular vegetal (Nicholson et al., 2005; Edwards et al., 2008; Naas e Pope, 2019).

A degradação da fibra vegetal é influenciada pela quantidade, estrutura e composição da lignina e pelas interligações com outros componentes presente na parede celular (Raffrenato et al., 2017). A degradação da celulose pela atividade microbiana ocorre principalmente por fungos e bactérias aeróbicos (Naas e Pope, 2019).

Os fungos anaeróbicos degradam os tecidos fibrosos difíceis de degradar através do crescimento de rizoides e secreções enzimáticas (Brunecky et al., 2013; Haitjema et al., 2014; Gruninger et al., 2014), desempenhando um importante papel na degradação da forragem (Bootten et al., 2011; Henske et al., 2018). Ranganathan et al. (2017) e Li et al. (2018) relatam que fungos anaeróbicos e suas enzimas fibrolíticas podem decompor a biomassa lignocelulósica em carboidrato solúvel em água.

No fluido ruminal também são encontrados fungos anaeróbios facultativos que estão em menores proporções em comparação com os fungos anaeróbios obrigatórios, sendo encontrados em aproximadamente 10^4 UFC/ml (Abrão et al., 2014). Os fungos anaeróbios facultativos utilizam o oxigênio ou

componentes orgânicos como acceptor final de elétrons, possibilitando a sobrevivência em diversos ambientes (Madigan et al., 2010).

O fungo filamentoso mesofílico *Trichoderma reesei*, isolado de equipamentos apodrecidos do Exército dos Estados Unidos nas Ilhas Salomão durante a Segunda Guerra Mundial, é o principal microrganismo de celulase em escala industrial (Bischof et al., 2016). *T. reesei* secreta grandes quantidades de enzimas celulase quando cultivada em celulose, permitindo rápida degradação desse polímero em moléculas de glicose (Sheir-Neiss e Montenecourt, 1984).

Facchini et al. (2011) e Gomes et al. (2014), constataram que os fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* apresentam potencial para suplementação animal e para fins biotecnológicos, além de serem os mais detectados no fluido ruminal de novilhos de corte alimentados com pastagens tropicais lignificadas (Abrão et al., 2014). De acordo com pesquisas, os fungos *Trichoderma longibrachiatum* e *Aspergillus terreus*, isolados do rúmen são produtores de celulases, xilases e fenoxidasas que degradam lignina e não produzem micotoxinas (Abrão et al., 2014; Abrão et al., 2017; Abrão et al., 2018). Preparações enzimáticas compostas, com celulase e xilase, estão sendo aplicadas no campo da fermentação da silagem e alcançam bons resultados (Wang et al., 2019a).

Na silagem, Wang et al. (2019a) relataram que fungos anaeróbios são capazes de destruir a estrutura da célula vegetal e reduzir o teor de FDN e FDA, facilitando a degradação por microrganismos e enzimas do rúmen durante a digestão *in vitro*. Portanto, os fungos anaeróbios presentes no rúmen produzem celulase, hemicelulases e pectinas que degradam fibras do

vegetal, acelerando o processo de digestão de forrageiras tropicais, aumentando a disponibilidade energética e de proteínas, para subsídio da população microbiana no rúmen (Paul et al., 2004; Paul et al., 2012; Gruninger et al., 2014).

3.2 Referências

ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; FREITAS, C. E.; VIEIRA, E. A.; GERASSEV, L. C.; SILVA-HUGHES, A. F.; ROSA, C. A.; RODRIGUES, N. M. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. **Current Microbiology**, v.69(2), p. 649-659, 2014. DOI 10.1007/s00284-014-0633-5

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.; RODRIGUEZ, N. M. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. **PLoSOne**, v.12(8), p.1-13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183628>

ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; PESSOA, M. S.; SANTOS, V. L.; RODRIGUEZ, N. M. Inocuidade micotoxicológica e viabilidade de *Aspergillus* spp. com potencial probiótico provenientes do trato digestório bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70(6), p. 1833-1839, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9853>

ADDAH, W.; BAAH, J.; GROENEWEGEN, P.; OKINE, E. K.; MCALLISTER, T.A. Comparison of the fermentation characteristics, aerobic stability and nutritive value of barley and corn silages ensiled with or without a mixed bacterial inoculant. **Canadian Journal of Animal Science**, v.91(1), p.133-146, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4141/CJAS10071>

ALZAHAL, O.; DIONISSOPOULOS, L.; LAARMAN, A. H.; WALKER, N.; MCBRIDE, B. W. Active dry *Saccharomyces cerevisiae* can alleviate the effect of subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v.97(12), p.7751-7763, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8212>

ANDRADE, S. J. T. D.; MELOTTI, L. Inoculantes bacterianos na ensilagem do capim-elefante (*Pennisetum purpurem*, Schum). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.219-223, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-95962003000900010>

ÁVILA, C. L. S.; CARVALHO, B. F.; PINTO, J. C.; DUARTE, W. F.; SCHWAN, R. F. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. **Journal of Dairy Science**, v.97(2), p.940-951, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6987>

BERNARDES, T. F.; RÊGO, A. C. do. Estudo das práticas de produção e utilização de silagem em fazendas leiteiras brasileiras. **Journal of Dairy Science**, v.97(3), p.1852-1861, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7181>

BISCHOF, R. H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Microbial cell factories**, v. 15 (1), p. 106, 2016. DOI 10.1186/s12934-016-0507-6

BOLSON, D. C.; PEREIRA, D. H.; PINA, D. S.; PEDREIRA, B. C.; MOMBACH, M. A.; XAVIER, I. M. Fermentative and bromatological value of Piatã palisadegrass ensiled with different additives. **Archivos de Zootecnia**, v.66(256), p.515-521, 2017. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49553571007>

BOOTTEN T. J.; JOBLIN K. N.; MCARDLE B. H.; HARRIS P. J. Degradation of lignified secondary cell walls of lucerne (*Medicago sativa* L.) by rumen fungi growing in methanogenic co-culture. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p.1086–1096, 2011. DOI:10.1111/j.1365-2672.2011.05127.x

BORREANI, G.; TABACCO, E.; SCHMIDT, R. J.; HOLMES, B. J.; MUCK, R. E. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, v.101(5), p.3952-3979, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>

BRUNECKY, R.; ALAHUHTA, M.; XU, Q.; DONOHOE, B. S.; CROWLEY, M. F.; KATAEVA, I. A.; YANG, S.-J.; RESCH, M. G.; ADAMS, M. W. W.; LUNIN, V. V.; HIMMEL, M. E.; BOMBLE, Y. J. Revealing nature's cellulase diversity: the digestion mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA. **Science** v.342, p.1513–1516, 2013. DOI:10.1126/science.1244273

BRÜNING, D.; GERLACH, K.; WEIß, K.; SÜDEKUM, K. H. Effect of compaction, delayed sealing and aerobic exposure on maize silage quality and on formation of volatile organic compounds. **Grass and forage science**, v.73(1), p.53-66, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/gfs.12288>

BUMBIERIS Junior, V. H.; GUIMARÃES, V. A. de P.; FORTALEZA, A. P. de S.; MASSARO Junior, F. L.; MORAES, G. J. de; MEZA, D. A. R. Aerobic stability in corn silage (*Zea mays* L.) ensiled with different microbial additives. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.39(4), p.357-362, 2017. Doi: 10.4025/actascianimsci.v39i4.34426

DANNER, H.; HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; BRAUN, R. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69(1), p.562-567, 2003.

DANTAS, C. C. O.; NEGRÃO, F. M. Produção de silagem pré-secada. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, 4, (33), Art. 932, 2010.

DRIEHUIS, F. Occurrence of mycotoxins in silage. In: II International symposium on forage quality and conservation. São Paulo, 2011. **Anais**. São Paulo: II International, 2011. P.85-104.

DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S. J. W. H. O.; WIKSELAAR, P. G. V. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass Forage Science**, v. 56, p.330–343, 2010.

EDWARDS, J. E.; KINGSTON-SMITH, A. H.; JIMENEZ, H. R.; HUWS, S. A.; SKØT, K. P.; GRIFFITH, G. W.; MCEWAN, N. R.; THEODOROU, M. K. Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. **FEMS microbiology ecology**, v.66(3), p.537-545, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00563.x>

ELEKWACHI, C. O.; WANG, Z.; WU, X.; RABEE, A; FORSTER, R. J. Total rRNA-seq analysis gives insight into bacterial, fungal, protozoal and archaeal communities in the rumen using an optimized RNA isolation method. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1814, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01814>.

ELGHANDOUR, M. M.; KHUSRO, A.; ADEGBEYE, M. J.; TAN, Z.; ABU HAFSA, S. H.; GREINER, R.; UGBOGU, E. A.; ANELE, U. Y.; SALEM, A. Z. M. Dynamic role of single-celled fungi in ruminal microbial ecology and activities. **Journal of Applied Microbiology**, v.128 (4), p.950-965, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.14427>

EVANGELISTA, A. R.; LIMA, J. A.; ABREU, J. G.; AMARAL, P. N. C. D.; PEREIRA, R. C.; SALVADOR, F. M.; SANTANA, R. A. V. Produção de silagem de capim marandu (*Uroclhoa brizantha* stapf cv. Marandu) com e sem emurhecimento. **Revista Ciência Agrotecnica**, v.28(2), p.446-452, 2004.

FACCHINI, F. D. A.; VICI, A. C.; REIS, V. R. A.; JORGE, J. A.; TEREZI, H. F.; REIS, R. A.; POLIZELI, M. L. Production of fibrolytic enzymes by *Aspergillus japonicus* C03 using agro-industrial residues with potential application as additives in animal feed. **Bioprocess and biosystems engineering**, v.34, p.347–355, 2011. DOI 10.1007/s00449-010-0477-8

FERREIRA, D. J.; LANA, R. P.; ZANINE, A. M. SANTOS; E. M.; VELOSO, C. M.; RIBEIRO, G. A. Silage fermentation and chemical composition of elephant grass inoculated with rumen strains of *Streptococcus bovis*. **Animal Feed Science and Technology**, v.183, p.22-28, 2013. DOI: 10.1016/j.anifeeds.2013.04.020

FERREIRA, D. J.; ZANINE, A. M.; LANA, R. P.; RIBEIRO, M. D.; ALVES, G. R.; MANTOVANI, H. C. Chemical composition and nutrient degradability in elephant grass silage inoculated with *Streptococcus bovis* isolated from the rumen. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.86, p.465-474, 2014.

FURTADO, R. N.; CARNEIRO, M. S. D. S.; COUTINHO, D. N.; CÂNDIDO, M. J. D.; SILVA, E. B. D. Fermentative losses and chemical composition of elephant grass silage added with castor bean hull. **Revista Ciência Agronômica**, v.50(1), p.140-147, 2019.

GIMENES, A. L. G.; MIZUBUTI, I. Y.; MOREIRA, F. B.; PEREIRA, E. S.; de AZAMBUJA RIBEIRO, E. L.; MORI, R. M. Composição química e estabilidade aeróbia em silage de milho preparada com inoculante bacteriano e/ou enzimático. **Acta Scientiarum Animal Science**, Maringá, v. 28(2), p. 153-158, 2006.

GOMES, J. E. G.; NASCIMENTO, T. C. E. S.; QUEIROZ, A. E. S. F.; JÚNIOR, J. I. S. S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MEDEIROS, E.V.; MOREIRA, K. A. Characterization and evaluation of in vitro digestion of phytases, xylanases and cellulases for feed industry. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, p. 551–58, 2014.

GRUNINGER, R.J.; PUNIYA, A. K.; CALLAGHAN, T. M.; EDWARDS, J. E.; YOUSSEF, N.; DAGAR, S. S.; FLIEGEROVA, K.; GRIFFITH, G. W.; FORSTER, R.; TSANG, A.; MCALLISTER, T.; ELSHAHED, M. S. Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. **FEMS microbiology ecology**, v.90(1), p. 1-17, 2014.

GUIM, A.; ANDRADE, P. D.; ITURRINO-SCHOCKEN, R. P.; FRANCO, G. L.; RUGGIERI, A. C.; MALHEIROS, E. B. Estabilidade aeróbica de silagens de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) emurcheado e tratado com inoculante microbiano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31(6), p.2176-2185, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982002000900004>

GUIMARÃES Filho, C. C.; MONTEIRO, K. D.; DEMINICIS, B. B. Utilização de silagem de capim para alimentação de ruminantes. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.**, Londrina, v.5, (36). Ed. 183, Art. 1234, 2011.

GULIYE, A. Y.; WALLACE, R. J. Effects of aromatic amino acids, phenylacetate and phenylpropionate on fermentation of xylan by the rumen anaerobic fungi, *Neocallimastix frontalis* and *Piromyces communis*. **Journal of applied microbiology**, v.103(4), p.924-929, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03327.x>

HAITJEMA, C. H.; SOLOMON, K. V.; HENSKE, J. K.; THEODOROU, M. K.; O'MALLEY, M. A. Anaerobic gut fungi: advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production. **Biotechnology and bioengineering**, v.111(8), p.1471-1482, 2014. DOI 10.1002/bit.25264

HE, L.; ZHOU, W.; XING, Y.; PIAN, R.; CHEN, X.; ZHANG, Q. Improving the quality of rice straw silage with *Moringa oleifera* leaves and propionic acid: Fermentation, nutrition, aerobic stability and microbial communities. **Bioresource Technology**, v.299, p.122579, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122579>

HENSKE, J. K.; WILKEN, S. E.; SOLOMON, K. V.; SMALLWOOD, C. R.; SHUTTHANANDAN V, EVANS, J. E.; THEODOROU, M. K.; O'MALLEY. Metabolic characterization of anaerobic fungi provides a path forward for bioprocessing of crude lignocellulose. **Biotechnology and bioengineering**, v.115, p.874–884, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.26515>

HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; DANNER, H.; BRAUN, R. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. **TRENDS in Biotechnology**, v.21(6), p.282-287, 2003. DOI:10.1016/S0167-7799(03)00106-9

JIANG, D.; ZHENG, M. L.; NIU, D. Z.; ZUO, S. S.; TIAN, P. J.; LI, R. R.; XU, C. C. Effects of steam explosion pretreatment and *Lactobacillus buchneri* inoculation on fungal community of unensiled and ensiled total mixed ration containing wheat straw during air exposure. **Journal of Applied Microbiology**, v.128(3), p.675-687, 2020.

JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G.; REIS, P. S.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.101-119, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007001000013>

JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G. Princípios básicos da fermentação na ensilagem. **Forragicultura: ciência, tecnologia e gestão de recursos forrageiros. Jaboticabal: Multipress**, p.649-660, 2013.

KLEINSCHMIT, D. H.; SCHMIDT, R. J.; KUNG Jr, L. The effects of various antifungal additives on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of dairy science**, v.88(6), p.2130-2139, 2005. DOI: 10.3168 / jds.s0022-0302 (05) 72889-7

KUNG JR, L.; SHAVER, R. D.; GRANT, R. J.; SCHMIDT, R. J. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of dairy Science**, v.101(5), p.4020-4033, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>

LEE, S. M.; GUAN, L. L.; EUN, J. S.; KIM, C. H.; LEE, S. J.; KIM, E. T., LEE, S. S. The effect of anaerobic fungal inoculation on the fermentation characteristics of rice straw silages. **Journal of applied microbiology**, v.118, p.564-573, 2015. DOI: 10.1111 / jam.12724

LI, J.; YUAN, X.; DONG, Z.; MUGABE, W., SHAO, T. 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**, v.264, p.123-130, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.059>

LIMA JUNIOR, I. F.; da SILVA, S. H. B.; FIGUEIREDO, A. N.; dos SANTOS, T. M. C.; FERREIRA, D. A.; DUARTE, M. E. Uso de diferentes aditivos em silagem de capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.). **PUBVET**, 6, Art-1429, 2012.

LIU, B.; YANG, Z.; HUAN, H.; GU, H.; XU, N.; DING, C. Impact of molasses and microbial inoculants on fermentation quality, aerobic stability, and bacterial and fungal microbiomes of barley silage. **Scientific Reports**, v.10(1), p.1-10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62290-7>

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010

MCALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N. The fundamentals of making good quality silage. **Advanced Dairy Science and Technology**, v.12, p.318-399, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.17648/diversitas-journal-v5i1-1035>

MCCANN, J. C.; WICKERSHAM, T. A.; LOOR, J. J. High-throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. **Bioinformatics and biology insights**, v. 8, p.109-125, 2014.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. The Biochemistry of Silage. **Chalcombe Publications**, Marlow, UK, pp. p.184-236, 1991.

MERENSALMI, M.; VIRKKI, M. The role of enzymes in the preservation and utilisation of forage. **Proc. 5th Int. Symposium Forage Preservation, Nitra, Czechoslovakia**, pp. p.43-46, 1991.

MICHEL, P. H. F.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUES, J. A. S.; KELLER, K. M.; RAPOSO, V. S.; LIMA, E. M.; SANTOS, E. M.; JAYME, D. G. Re-ensiling and inoculant application with *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium acidipropionici* on sorghum silages. **Grass and Forage Science**, v.72(3), p.432-440, 2017. DOI: 10.1111/gfs.12253

MONÇÃO, F. P.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; SILVA, J. T.; DE JESUS, N. G.; MARQUES, O. F. C.; RIGUEIRA, J. P. S.; GOMES, V. M. Nutritional Value of BRS Capiaçú Grass (*Pennisetum purpureum*) silage associated with cactus pear. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v.10(1), p.25-29, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n4-168>

MUCK, R. E.; NADEAU, E. M. G.; MCALLISTER, T. A.; CONTRERAS-GOVEA, F. E.; SANTOS, M. C.; KUNG Jr, L. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **Journal of dairy science**, v.101(5), p.3980-4000, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>

NAAS, A.E.; POPE, P. B. A mechanistic overview of ruminal fibre digestion. **PeerJ Preprints**, 2019.

NICHOLSON, M. J.; THEODOROU, M. K.; BROOKMAN, J. L. Molecular analysis of the anaerobic rumen fungus *Orpinomyces*—insights into an AT-rich genome. **Microbiology**, v.151(1), p.121-133, 2005. DOI 10.1099/mic.0.27353-0

O'BRIEN, M.; EGAN, D.; O'KIELY, P.; FORRISTAL, P. D.; DOOHAN, F. M.; FULLER, H. T. Morphological and molecular characterisation of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. **Mycological research**, v.112(8), p.921-932, 2008. DOI:10.1016/j.mycres.2008.01.023

OLIVEIRA, A. S.; WEINBERG, Z. G.; OGUNADE, I. M.; CERVANTES, A. A.; ARRIOLA, K. G.; JIANG, Y.; DONGHYEON K.; XUJIAO L.; GONÇALVES, M. C. M.; DIWAKAR V.; ADESOGAN, A. T. 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**, v.100(6), p.4587-4603, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11815>

OLIVEIRA, E. R.; MONÇÃO, F. P.; MOURA, L. V.; GABRIEL, A. M. A.; GÓES, R. H. T. B.; LEMPP, B.; NASCIMENTO, F. A. Valor nutricional de silagem de capim-mombaça com aditivos agroindustriais. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v.35(3), p.1543-1556, 2014. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n3p1543

PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S.; SPOELSTRA, S. F. Microbiologia da ensilagem. **Agronomy**, v.42, p.31-94, 2003.

PATRIZI, W. L.; MADRUGA JÚNIOR, C. R. F.; MINETTO, T. P.; NOGUEIRA, E.; MORAIS, M. G. Efeito de aditivos biológicos comerciais na silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56(3), p.392-397, 2004.

PAUL, K.; NONOH, J.O.; MIKULSKI, L.; BRUNE, A. "Methanoplasmatales", thermoplasmatales-related Archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.8245–8253, 2012. DOI:10.1128/AEM.02193-12

PAUL, S. S.; KAMRA, D. N.; SASTRY, V. R. B.; SAHU, N. P.; AGARWAL, N. Effect of anaerobic fungi on in vitro feed digestion by mixed rumen microflora of buffalo. **Reproduction Nutrition Development**, v.44(4), p.313-319, 2004. DOI: 10.1051/rnd:2004036

PENTEADO, D. C. S.; SANTOS, E. M.; CARVALHO, G. G. P. de; OLIVEIRA, J. S. de; ZANINE, A. M.; PEREIRA, O. G.; FERREIRA, C. L. L. F. Inoculação com *Lactobacillus plantarum* da microbiota em silagem de capim-mombaça. **Archivos de Zootecnia**, v.56(214), p.191-202, 2007.

PEREIRA, E. S.; MIZUBUTI, I. Y.; PINHEIRO, S. M.; VILLARROEL, A. B. S.; CLEMENTINO, R. H. Avaliação da qualidade nutricional de silagens de milho (*Zea mays*, L). **Revista Caatinga**, v.20(3), 2007a.

PEREIRA, O. G.; ROCHA, K. D.; FERREIRA, C. L. L. F. Chemical composition, characterization and quantification of the population of microorganisms in elephant grass cv. Cameroon (*Pennisetum purpureum*, Schum.) and silages. **Brazilian Journal of Animal Science**. v.36(6), p.1742–1750, 2007b.

PUNIYA, A. K.; SALEM, A. Z.; KUMAR, S.; DAGAR, S. S.; GRIFFITH, G. W.; PUNIYA, M.; RAVELLA, A. R.; KUMAR, N.; DHEWA, T.; KUMAR, R. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity: A review. **Journal of Integrative Agriculture**, v.14(3), p.550-560, 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60837-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60837-6)

RAFFRENATO, E.; FIEVISOHN, R.; COTANCH, K. W.; GRANT, R. J.; CHASE, L. E.; VAN AMBURGH, M. E. Effect of lignin linkages with other plant cell wall components on in vitro and in vivo neutral detergent fiber digestibility and rate of digestion of grass forages. **Journal of dairy science**, v.100(10), p.8119-8131, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12364>

RAMOS, J. P. F.; SANTOS, E. M.; SANTOS, A. P. M.; de SOUZA, W. H.; OLIVEIRA, J. S. Ensiling of Forage Crops in Semiarid Regions. In Advances in Silage Production and Utilization. **IntechOpen**, v.65, 2016.

RANGANATHAN, A.; SMITH, O. P.; YOUSSEF, N. H.; STRUCHTEMEYER, C. G.; ATIYEH, H. K.; ELSHAHED, M. S. Utilizing anaerobic fungi for two-stage sugar extraction and biofuel production from lignocellulosic biomass. **Frontiers in microbiology**, v.8, p.635, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00635

RESENDE, J. A.; de BARROS, R. A. M.; RÍSPOLI, T. B.; OTENIO, M. H.; RIBEIRO, M. T.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C.; ARCURI, P. B. Isolation and fermentative activity of rumen anaerobic fungi in dairy cows. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.14(1), p.92-95, 2015.

RIGUEIRA J. P. S.; MONÇÃO F. P.; SALES E. C. J.; REIS S. T.; BRANT L. M. S.; CHAMONE J. M. A.; ROCHA JÚNIOR V. R.; PIRES D. A. A. Fermentative profile and nutritional value of elephant grass silage with different levels of crude glycerin. **Semina: Ciências Agrárias**. v.39(2), p.833-844, 2018. DOI: 10.5433/1679-0359.2018v39n2p833

RIGUEIRA, J. P. S.; MONÇÃO, F. P.; SALES, E. C. J.; BRANT, L. M. S.; PIRES, D. A. A.; MATOS, A. M.; LEITE, G. D. O.; SILVA, J. T.; FONSECA, J. D. R.; MOURA, M. M. A.; ROCHA JÚNIOR, V. R. Níveis de glicerina bruta na ensilagem de capim Tifton 85 (*Cynodon dactylon*): perfil fermentativo e valor nutricional. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 40(3), p.654-663, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.19084/RCA16141>

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

ROUCHES, E.; HERPOELGIMBERT, I.; STEYERM J. P. Improvement of anaerobic degradation by White-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v.59, p.179-198, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.317>

SANTOS, M. V. F.; GÓMEZ CASTRO, A.G.; PEREIRA, J. M.; GARCIA, A.; GUIM, A.; PÉREZ HERNÁNDEZ, M. Fatores que afetam o valor nutritivo das silagens de forrageiras tropicais. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.25-43, 2010.

SHEIR-NEISS, G.; MONTENECOURT, B. S. Characterization of the secreted cellulases of *Trichoderma reesei* wild type and mutants during controlled fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20(1), p. 46-53, 1984.

SHAH, A. A.; XIANJUN, Y.; ZHIHAO, D.; JUNFENG, L.; SAO, T. Microbiological and chemical profiles of elephant grass inoculated with and without *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. **Archives of Microbiology**, v.200(2), p.311-328, 2018. DOI 10.1007/s00203-017-1447-1

SIFEELDEIN A.; YUAN X.; DONG Z.; LI J.; SHAO T. 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**, v.24(3), p.371-378, 2018. DOI: 10.9775/kvfd.2017.18999

SILVA, L. D.; PEREIRA, O. G.; SILVA, T. C.; LEANDRO, E. S.; PAULA, R. A.; SANTOS, S. A.; RIBEIRO, K. G.; VALADARES Filho, S. C. Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. **Grass and forage science**, v.73(3), p.660-670, 2018. DOI: 10.1111/gfs.12360

SILVA, M. C. A.; COSTA, N. M.; RIGUEIRA, J. P. S.; JESUS, D. L. S.; SILVA, N. B. S.; SILVA Filho, W. S.; SILVA, J. T.; ARAÚJO, J. J. S.; ROCHA Júnior, V. R.; ALVES, D. D.; HAMONE, J. M. A.; MONÇÃO, F. P. The Effect of Graded Levels of Crude Glycerin in BRS Capiçau Grass Silage: Fermentation Profile and Bromatological Composition. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v.9(4), p.597-602, 2019.

SOLOMON, K. V.; HAITJEMA, C. H.; HENSKE, J. K.; GILMORE, S. P.; BORGES-RIVERA, D.; LIPZEN, A.; BREWER, H. M.; PURVINE, S. O.; WRIGHT, A. T.; THEODOROU, M. K.; GRIGORIEV, I. V.; REGEV, A.; THOMPSON, D. A.; O'MALLEY, M. A. Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading enzymes. **Science**, v.351(6278), p.1192-1195, 2016. DOI: 10.1126/science.aad1431

STRÖM, K.; SJÖGREN J.; BROBERG, A.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. **Applied and environmental microbiology**, v.6, p.4322-4327, 2002.

TRIPATHI, V. K.; SEHGAL, J. P.; PUNIYA, A. K.; SINGH, K. Effect of administration of anaerobic fungi isolated from cattle and wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*) on growth rate and fibre utilization in buffalo calves. **Archives of Animal Nutrition**, v.61(5), p.416-423, 2007. DOI: 10.1080/17450390701556759

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of dairy science**, v.74, p.3583–3597, 1991. DOI: 10.31 / jds.s0022-0302 (91) 78551-2

VERVAEREN, H.; HOSTYN, K.; GHEKIERE, G.; WILLEMS, B. Biological ensilage additives as pre-treatment for maize to increase the biogas production. **Renewable Energy**, v.35, p.2089-2093, 2010.

VU, V. H.; LI, X.; WANG, M.; LIU, R., ZHANG, G.; LIU, W.; SUN, Q. Dynamics of fungal community during silage fermentation of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) produced in northern Vietnam. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v.32(7), p.996, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v42i1.50533>

WANG, D.; ZHAO, C.; LIU, S.; ZHANG, T.; YAO, J.; CAO, Y. 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**, v.9(1), p.121, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0846-x>

WANG, S.; DONG, Z.; LI, J.; CHEN, L.; SHAO, T. *Pediococcus acidilactici* strains as silage inoculants for improving the fermentation quality, nutritive value and in vitro ruminal digestibility in different forages. **Journal of applied microbiology**, v.126(2), p.424-434, 2019b. DOI: 10.1111 / jam.14146

WEINBERG, Z. G.; CHEN, Y. Effects of storage period on the composition of whole crop wheat and corn silages. **Animal and Feed Science Technology**, v.185, p.196–200, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.08.009>

WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, v.19, p.53–68, 1996. DOI: 10.1016 / 0168-6445 (96) 00025-3

WILKINSON, J. M.; DAVIES, D. R. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. **Grass and Forage Science**, v.68(1), p.1-19, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2494.2012.00891.x

4 Artigo 1 – Fermentação do capim-elefante ensilado com bactéria láctica do trato digestório de bovinos

Short communication - Este artigo foi elaborado conforme normas da revista

Pesquisa Agropecuária Brasileira

RESUMO: O objetivo com este trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação de cepa de bactéria láctica do trato digestório de bovinos na fermentação do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) pré-umurcheado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três grupos experimentais e seis repetições: (CONT) Controle sem aditivo, (LACT5) *Lactobacillus plantarum* a $1,0 \times 10^5$ UFC/g de forragem, (LACT9) *L. plantarum* a $1,0 \times 10^9$ UFC/g de forragem. As perdas de matéria seca e efluente e o pH após 31 dias de fermentação a 37°C não foram influenciadas pela inclusão da bactéria. Os grupos experimentais não influenciaram as populações *Lactobacillus* spp., Diplococos e fungos leveduriformes e micelíamios. Entretanto, ocorreu redução de aproximadamente um log de UFC/g na população de enterobactérias da silagem inoculada com LACT5 ou LACT9, e ausência de crescimento das bactérias não fermentadoras de lactose. Mais estudos devem avaliar melhores estratégias de inoculação dessa bactéria e para elucidarem essas diferenças constatadas na população de enterobactérias.

Palavras-chave: Cameroon, *Enterobacteriaceae*, inóculo, *Lactobacillus plantarum*, probiótico.

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate the effects of inoculation of a strain of lactic bacteria from the digestive tract of cattle on the fermentation of elephant grass (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon). The experimental design was completely randomized with three experimental groups and six replications: (CONT) Control without additive, (LACT5) *Lactobacillus plantarum* at 1.0×10^5 CFU / g of forage, (LACT9) *L. plantarum* at 1.0×10^9 CFU / g of forage. Losses of dry matter and effluent and pH after 31 days of fermentation at 37 °C were not influenced by the inclusion of the bacteria. The experimental groups did not influence the populations *Lactobacillus* spp., Diplococci and yeast and mycelial fungi. However, there was a reduction of approximately one log of UFC / g in the enterobacteria population of the silage inoculated with LACT5 or LACT9, and absence of growth of non-lactose fermenting bacteria. Further studies should evaluate better strategies for inoculation of this bacterium to elucidate the differences found in the population of enterobacteria.

Key-words: Cameroon, Enterobacteriaceae, inoculum, *Lactobacillus plantarum*, probiotic.

4.1 Introdução

Durante o processo de ensilagem são encontrados microrganismos autóctones da forrageira, a microbiota epífita (Guimarães et al., 2018). Entretanto a dinâmica das populações desses microrganismos varia de acordo com fatores do ambiente, do manejo da forrageira e características intrínsecas da planta, como teor de matéria seca e de carboidratos solúveis (Ferreira et al., 2013). Frequentemente, erros durante a ensilagem podem favorecer o crescimento de microrganismos indesejáveis e causar perdas da matéria seca e na qualidade da silagem (Borreani et al., 2018).

O uso de aditivos microbianos é uma das opções para minimizar fermentações indesejáveis na silagem, pois aumenta a população e o crescimento das bactérias de ácido láctico (BAL) no início do processo fermentativo. Os principais microrganismos utilizados nesses aditivos são as bactérias *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* e *Enterococcus faecium* (Bumbieris et al., 2011).

Bactérias lácticas têm sido amplamente utilizadas com a intenção de melhorar a qualidade da fermentação, pois convertem carboidrato solúvel em água e em ácidos orgânicos. Como consequência, há redução do pH e inibição do crescimento de enterobactérias e bactérias dos gêneros *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium* e de bactérias lácticas heterofermentativas (Ferreira et al., 2014; Zhang et al., 2019). Portanto, o uso de bactérias lácticas representa uma importante ferramenta para a produção de silagens de boa qualidade, reduzindo as perdas na produção da forragem conservada (Ferreira et al., 2013).

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa identificou e caracterizou uma cepa de *Lactobacillus* sp. proveniente do trato digestório de bezerros que apresentou potencial probiótico, demonstrando antagonismo contra cepas de *Escherichia coli* causadora de colibacilose de bezerros. Esta cepa se trata de *L. plantarum*, a mesma espécie utilizada em alguns inoculantes comerciais para silagens. Assim, o objetivo foi avaliar os efeitos da inoculação dessa cepa de bactéria láctica autóctone do trato digestório de bovino na fermentação *in vitro* do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) pré-emurcheado.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Bactéria láctica avaliada

O isolado de *Lactobacillus plantarum* foi proveniente de fezes de bezerro desmamado Girolando criado no Norte de Minas Gerais. Para a identificação dessa bactéria, o DNA total foi submetido à amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), como descrito por Lane (1991), e o gene 16S rRNA foi analisado em sequenciador automático MegaBACE® 1000 (GE Life Sciences, Chicago, EUA) no laboratório Myleus Biotechnology (Belo Horizonte, Brasil). A sequência do gene foi verificada pelo SeqScanner Software® v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e comparada com o banco de dados NCBI pelo servidor BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Adicionalmente à essa análise, a cepa bacteriana apresentou escores de identificação maiores que 2,0 quando analisados por espectrometria de massa com ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), usando o software MALDI-Biotyper v2.0.

A bactéria foi selecionada por apresentar resistência ao pH ácido, resistir a sais biliares e apresentar antagonismos contra cepas de *Escherichia coli* causadoras de colibacilose em bezerros (Veloso, 2016).

4.2.2 Forrageira utilizada

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) foi cultivado em fazenda situada na cidade de Montes Claros, no norte de Minas Gerais, Brasil (16°43' S e 44°52' W). A temperatura média anual é de 24,2 °C, com clima quente e seco com duas estações bem definidas, seca de abril a outubro e período chuvoso novembro a março.

A forragem foi cortada em abril de 2019, a 10 cm do nível do solo, manualmente, quando a forrageira possuía aproximadamente 3 metros de altura. Posteriormente, foi picada em ensiladora estacionária e padronizado o tamanho das partículas em aproximadamente 2 cm. O material foi pré-secado ao sol durante 2 horas e acondicionado em sacos de plásticos.

Determinou-se a matéria seca da forragem pré-secada em analisador de umidade (Shimadzu modelo MOC63, Japão), que indicou teor de 40%. O pH da forragem também foi mensurado, utilizando método descrito por Silva e Queiroz (2002). Promoveu-se a diluição de 9 gramas de forragem fresca e pré-secada em 60 ml de água destilada e leitura com um medidor de pH digital, modelo PG1800, após 30 minutos de repouso e o pH da forragem era de 5,8.

Para as análises microbiológicas, todas as amostras da forragem fresca ou fermentada foram manipuladas em capela de fluxo laminar. Cinco gramas da forragem pré-secada foram diluídos em 45 ml de solução NaCl 0,9% estéril e agitados por 5 minutos em vórtex. Posteriormente, quatro alíquotas de 10 µl das diluições de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ foram inoculadas em placas de *Petri* estéreis

contendo o meio ágar MRS (Merck KGaA®, Darmstadt, Alemanha) para bactérias láticas, ágar Potato Dextrose (KASVI®, Terámo, Itália) contendo 1,5% de solução de cloranfenicol (10%/v) para o crescimento de fungos e 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 dióxido de carbono (Permutation ®, Curitiba, PR, Brasil).

As placas de Agar Potato Dextrose e MacConkey foram incubadas a 37°C em estufa B.O.D. e monitoradas até dois e sete dias, respectivamente. As unidades formadoras de colônias por gramas (UFC/g) foram quantificadas e diferenciadas conforme aspectos morfológicos (coloração, tamanho e forma da colônia) com o auxílio de um contador de colônias (Murray et al., 2007). Esses procedimentos foram realizados em triplicata. Foi observada elevada contagem de fungos leveduriformes, fungos micelianos e enterobacteriaceae no capim antes de ser ensilado (Tab. 01).

Tabela 1: Composição da microbiota epífita aeróbia do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) pré-ensilado

Tipo de microrganismo	Contagem em UFC/mL na forragem
Fungos leveduriformes	$8,3 \times 10^7$
Fungos micelianos	$1,7 \times 10^7$
Enterobacteriaceae	$2,2 \times 10^7$
Lac+	$3,3 \times 10^7$
Lac-	$1,8 \times 10^7$

Lac+: bactérias fermentadoras de lactose; Lac-: bactérias não fermentadoras de lactose;

4.2.3 Procedimentos experimentais

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três grupos experimentais e seis repetições, sendo: (CONT). Controle sem aditivo, (LACT5) *L. plantarum* inoculado a $1,0 \times 10^5$ UFC/g de peso fresco da forragem e (LACT9) *L. plantarum* na concentração $1,0 \times 10^9$ UFC/g de peso fresco.

A bactéria foi avaliada em fase logarítmica após crescimento em meio líquido contendo 2,5% de fubá de milho, farinha de soja e açúcar. Para inoculação, as amostras de ± 26 gramas do capim foram misturadas a 9 ml de água destilada e 1,1 ml das suspensões microbianas, com massa específica de $0,50\text{kg}/\text{dm}^3$ de MS. O controle recebeu 9 ml de água destilada e 1,1ml do meio de cultura composto por 2,5% de fubá, farinha de soja e açúcar, sem microrganismos. A aplicação da água destilada corrigiu a matéria seca da forragem pré-ensilada para 28,8%.

Posteriormente a forragem contendo ou não a bactéria láctica foi acondicionada em microsilos constituídos por tubos Falcon de 50ml dotados de dreno para efluentes e válvula para escape de gases. Na parte inferior do tubo foram incluídos 2 g de areia lavada e seca para recuperação do efluente e disco de pano com diâmetro de 27mm para impedir aderência da areia à forragem. Nas tampas (parte superior) foram instaladas válvulas de escape de gases. Cada tampa foi furada e recebeu uma ponteira de pipetador automático. Na ponta de cada pipeta, foram colocados pequenos balões vazios para acúmulo dos gases produzidos durante a fermentação. Os frascos foram fechados, vedados e armazenados em estufa B.O.D. (Luca-161/01, São Paulo, Brasil) a 37°C durante 31 dias.

Inicialmente foi mensurado o peso dos frascos vazios com tampa, areia seca e o disco de pano em balança analítica. Foram também pesados, após a adição da forragem e os respectivos inóculos, para se obter o peso cheios. Após 31 dias de fermentação, os frascos foram novamente pesados para determinação da perda por gases e perda por efluente.

A perda por gases foi estimada pela diferença entre o peso de massa seca inicial e final dos silos experimentais em relação à quantidade de massa seca ensilada, descontados o peso do conjunto na ensilagem e na abertura, conforme a equação:

$$PG (\%) = [(PTen - PTab) / MSen] \times 100$$

Em que:

PG (%) = Perda por gases (%);

PTen = Peso do tubo cheio na ensilagem (g);

PTab = Peso do tubo cheio imediatamente antes da abertura (g);

MSen = Quantidade de massa seca de forragem na ensilagem (g);

Já a quantificação do efluente produzido, foi realizada conforme a fórmula:

$$EF (g \text{ kg}^{-1}) = [(PEab - PEen) / MVFE] \times 100$$

Onde:

EF = Produção de efluente (g/kg de massa verde);

PEab = Peso da estrutura (silo + areia úmida + tela) após abertura (kg);

PEen = Peso da estrutura (silo + areia seca + tela) na ensilagem (kg);

MVFE = Massa verde de forragem ensilada (kg).

Após o período de fermentação, toda forragem foi retirada do tubo, pesada em balança analítica (Marte ay220, Shimadzu Corporation, Minas Gerais, Brasil), homogeneizada e separada em duas sub amostras de 4

gramas para mensuração do pH inicial e pH com 48 horas, com intuito de determinar a estabilidade aeróbica da silagem.

Para o cultivo microbiano, o material foi manipulado em capela de fluxo laminar. Duas gramas da forragem foram diluídas em 18 ml de solução de NaCl 0,9% estéril, homogeneizada para diluição decimais seriadas. Posteriormente alíquotas das diluições foram inoculadas em placas de *Petri* contendo meios de cultura, como descrito anteriormente para o cultivo de fungos, bactérias lácticas e Enterobacteriaceae.

A identificação dos gêneros de bastonetes Gram Negativos aeróbios e anaeróbios facultativos mais frequentes ocorreu após reisolamento em placas contendo meio ágar MacConkey em estufa a 37°C por 24 horas. Após o crescimento exponencial, cada isolado foi inoculado em tubos contendo meio Rugai e Araújo, modificado por Pessoa e Silva. Nessa classificação foram consideradas a capacidade de produção de indol e sulfetos e gases, a utilização de triptofano, lisina, glicose, sacarose, ureia e a motilidade (Murray et al., 2007).

Para a identificação dos gêneros de fungos micelianos foram realizados microcultivos de 34 isolados provenientes das placas de meio Ágar Sabouraud (ACUMEDIA®, Michigan, Estados Unidos). As estruturas micromorfológicas foram evidenciadas em microscópio óptico nas objetivas de 10 e 40X, considerando as características típicas de cada gênero de fungo (Dugan, 2006).

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade. Quando apresentaram distribuição normal, foram submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas por teste Duncan a 5% de

probabilidade. Quando não apresentaram distribuição normal, os dados foram submetidos à análise não paramétrica utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. Todos os dados foram analisados no pacote estatístico SAEG 9.2.

4.3 Resultados e Discussão

Não foram observadas diferenças significativas entres os tipos de inoculantes sobre os parâmetros de qualidade relacionados à silagem ($P > 0,1$) (Tab. 02). Segundo Yuan et al. (2015) a *L. plantarum* é uma bactéria de ácido láctico homofermentativa ou heterofermentativa facultativa (LAB) capaz de fermentar uma ampla variedade de substratos e produzir rapidamente grandes quantidades de ácido láctico. Isso não foi observado no presente trabalho, possivelmente devido a problemas observados na válvula de escape de gases, que não permitiu adequada vedação e, conseqüentemente, permitiu entrada de ar nos silos.

Tabela 2: Perdas gasosas, efluentes, pH e estabilidade aeróbica do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) fermentado inoculado com uma cepa de *Lactobacillus plantarum* autóctone de bovino e o controle não inoculado

Variável	Grupos Experimentais			Desvio padrão	Erro padrão	P valor
	CONT	LAC5	LAC9			
Perdas gasosas (%)	15,32	17,94	12,38	2,79	1,13	0,3184
Efluentes (g/kg)	0,26	0,15	0,75	0,32	0,13	0,9475
pH na abertura	5,95	6,15	6,05	0,06	0,02	0,9090
pH após 48 horas	6,55	8,38	7,64	0,42	0,17	0,0655
Diferença de pH*	0,72	2,23	1,59	0,33	0,13	0,2542

CONT: controle; LACT5: *Lactobacillus plantarum* (10^5 UFC/g); LACT9: *Lactobacillus plantarum* (10^9 UFC/g); Diferença de pH* = pH 48h menos pH da abertura.

Não houve efeito dos inoculantes sobre a produção de efluentes (Tab. 02). Esse resultado poderia ter sido influenciado pelo teor de matéria seca

inicial. Além disso, os dados de quantificação de efluente na metodologia proposta apresentaram elevado coeficiente de variação (225,56%), o que pode ter prejudicado as comparações entre os grupos experimentais. Por outro lado, variações na produção de efluentes estão mais associadas a características físicas da silagem do que características microbiológicas (Tomaz et al., 2018). A produção de efluentes pode ocorrer em silagens de capim excessivamente úmidas, momento no qual apresentam melhor perfil nutricional (Daniel et al., 2019) e estão mais suscetíveis a fermentações indesejáveis. Dessa forma, as estratégias de pré-secagem e uso de aditivos tem sido importantes para reduzir o risco de deterioração e perdas de efluentes (Nussio, 2005),

O pH na abertura não foi influenciado pelos grupos experimentais e apresentou média de $6,05 \pm 0,06$, valor de pH superior ao da forragem antes da fermentação (5,8). Essa média pode ser considerada alta e pode ser indicativo de fermentações indesejáveis e deterioração da silagem. Segundo McDonald (1991), o pH ideal da silagem deve estar abaixo de 4,2. Ribeiro et al. (2014), em estudo com silagem do capim-elefante colhido com 1,8 m de altura e emurchecido, observaram silagem com pH de 3,7, valor inferior ao observado nesse estudo. Esses resultados podem ter sido influenciados pela dificuldade de vedação pela tampa com válvula de escape de gases na presente metodologia. A presença de oxigênio no silo é prejudicial ao processo fermentativo e pode ter ocasionado a elevação dos valores de pH.

Da mesma forma, o pH após 48h da abertura também não foi influenciado pelos tipos de inóculos (Tab. 02). A diferença de pH após a abertura de silos de forrageiras é considerada um indicativo de perda da estabilidade aeróbica, pois quanto maior o pH atingido, em menor intervalo de

tempo após abertura, menos estável é a silagem. Neste estudo a estabilidade foi estudada por meio do pH atingido após 48 horas e essa variável não foi influenciada pelos inoculantes (Tab. 02).

Não foi observado efeito significativo ($P > 0,5$) dos tratamentos sobre as populações microbianas avaliadas (Tab. 03, 04 e 05). Após a fermentação, observou-se baixa contagem de *Enterobacteriaceae*, com média de $6,85 \times 10^2$ UFC/g. A presença de *Enterobacteriaceae* prejudica o processo de conservação da forragem, principalmente nos primeiros dias de ensilagem, quando há uma maior concentração de oxigênio. Em condições normais, na ausência de oxigênio, ocorre a diminuição do pH, inibindo rapidamente a população dessas bactérias (Guimarães et al. 2018).

Contudo, constatou-se redução de aproximadamente um log de UFC/grama de forragem fermentada inoculados com LACT5 ou LACT9 na população de bastonetes Gram Negativos aeróbios e anaeróbios facultativos e ausência de crescimento de bactérias não fermentadoras de lactose, como aquelas do gênero *Salmonella*, responsáveis por graves infecções intestinais em humanos e animais (Maijala et al., 2005).

Tabela 3: Média de unidades formadoras de colônias por grama (UFC)/g) e desvio padrão (D.P.) da população de bactérias lácticas (BAL) em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) fermentado após inoculação com uma cepa de *Lactobacillus plantarum* autóctone de bovino

Grupos experimentais	<i>Lactobacillus</i> spp.UFC/g	DP	Diplococos UFC/g	DP	Total BAL (UFC/g)	D.P
CONT	$6,36 \times 10^7$	$\pm 7,97 \times 10^3$	$4,74 \times 10^6$	$\pm 2,18 \times 10^3$	$6,83 \times 10^7$	$\pm 8,27 \times 10^3$
LACT5	$2,69 \times 10^7$	$\pm 5,19 \times 10^3$	$4,67 \times 10^6$	$\pm 2,16 \times 10^3$	$3,16 \times 10^7$	$\pm 5,62 \times 10^3$
LACT9	$2,24 \times 10^7$	$\pm 4,73 \times 10^3$	$4,17 \times 10^6$	$\pm 2,04 \times 10^3$	$2,66 \times 10^7$	$\pm 5,51 \times 10^3$
Média geral	$3,76 \times 10^7$	$\pm 5,96 \times 10^3$	$4,52 \times 10^6$	$\pm 2,13 \times 10^3$	$4,22 \times 10^7$	$\pm 6,49 \times 10^3$
P-valor	0,8503		0,3526		0,1839	

Nota: CONT= controle; LACT5: *Lactobacillus plantarum* (10^5 UFC/g); LACT9: *Lactobacillus plantarum* (10^9 UFC/g).

Tabela 4: Média de unidades formadoras de colônias por grama (UFC)/g e desvio padrão (D.P.) da população de bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) fermentado após inoculação com uma cepa de *Lactobacillus plantarum* autóctone de bovino e o controle não inoculado

Grupos experimentais	LAC +	D.P.	LAC –	D.P.	Total Enterobac	D.P.
CONT	-	-	$1,67 \times 10^3$	$\pm 4,08 \times 10^1$	$1,67 \times 10^3$	$\pm 4,08 \times 10^1$
LACT5	$1,11 \times 10^2$	$\pm 1,01 \times 10^1$	-	-	$1,11 \times 10^2$	$\pm 1,05 \times 10^1$
LACT9	$2,78 \times 10^2$	$\pm 1,67 \times 10^1$	-	-	$2,78 \times 10^2$	$\pm 1,67 \times 10^1$
Média geral	$1,30 \times 10^2$	$\pm 9,07$	$5,56 \times 10^2$	$\pm 1,36 \times 10^1$	$6,85 \times 10^2$	$\pm 2,27 \times 10^1$
P-valor	0,3998		0,5592		0,9963	

Nota: CONT= controle; LACT5: *Lactobacillus plantarum* (10^5 UFC/g); LACT9: *Lactobacillus plantarum* (10^9 UFC/g); Enterobac.: *Enterobacteriaceae*; LAC+: Bactérias fermentadoras de lactose; LAC-: Bactérias não fermentadoras de lactose.

Tabela 5: Média de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) e desvio padrão (D.P.) da população de fungos em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) fermentado após inoculação com uma cepa de *Lactobacillus plantarum* autóctone de bovino e o controle não inoculado

Grupos Experimentais	Leveduras	D.P.	Fungos micelianos	D.P.	Total de fungos	D.P.
CONT	$3,49 \times 10^6$	$\pm 1,87 \times 10^3$	$6,60 \times 10^5$	$\pm 8,13 \times 10^2$	$4,15 \times 10^6$	$\pm 2,04 \times 10^3$
LACT5	$7,49 \times 10^6$	$\pm 2,74 \times 10^3$	$1,12 \times 10^8$	$\pm 1,06 \times 10^4$	$1,19 \times 10^8$	$\pm 1,09 \times 10^4$
LACT9	$4,84 \times 10^6$	$\pm 2,20 \times 10^3$	$2,86 \times 10^7$	$\pm 5,35 \times 10^3$	$3,35 \times 10^7$	$\pm 5,79 \times 10^3$
Média geral	$5,27 \times 10^6$	$\pm 2,27 \times 10^3$	$4,71 \times 10^7$	$\pm 5,58 \times 10^3$	$5,24 \times 10^7$	$\pm 6,24 \times 10^3$
P-Valor	0,5866		0,8370		0,6939	

Nota: CONT= controle; LACT5: *Lactobacillus plantarum* (10^5 UFC/g); LACT9: *Lactobacillus plantarum* (10^9 UFC/g).

Na forragem fermentada, a quantificação média de leveduras foi de $5,27 \times 10^6$ UFC/g e não foi influenciada pelos inóculos utilizados. A presença desses microrganismos é indesejável, pois consomem carboidratos solúveis (CHTS) e convertem em etanol, dióxido de carbono e água durante a fase de armazenamento e consomem ácido láctico após abertura do silo, reduzindo a estabilidade aeróbica. Ao consumirem CHTS no início do processo fermentativo, esses fungos prejudicam o desenvolvimento das bactérias do ácido láctico, promovendo aumento do pH, elevação das perdas de matéria seca e aumento na proporção de fibras (Evangelista et al., 2009). Quando ocorre a redução na população de leveduras é indicativo que o inóculo têm potencial de utilização como aditivo na silagem. Portanto, a presença de contagem elevada de leveduras no início do processo fermentativo pode prejudicar a fermentação em função da competição com as bactérias do ácido láctico (BAL) desejáveis (Driehuis, 2011).

Os fungos micelianos foram detectados na forragem conservada com média de $4,71 \times 10^7$ UFC/g (Tab. 05) e suas concentrações também não foram influenciados pelos inóculos utilizados. Esses microrganismos degradam grande variedade de nutrientes, incluindo açúcares, ácido láctico e carboidratos estruturais. A presença desses eucariotos na silagem é indicativo de que havia oxigênio nos silos experimentais, permitindo aumento da população aeróbia. A presença desses fungos também poderia estar associada à produção de micotoxinas que causam danos à saúde dos animais e do homem. Por isso, estratégias que reduzam a contaminação com esses agentes trazem benefícios ao processo de ensilagem. Neste trabalho, o uso da *L. plantarum* do trato digestório bovino não foi eficiente na redução do crescimento de fungos

indesejáveis. Esse resultado poderia ser atribuído à metodologia e ao tipo de silo experimental utilizados. Acredita-se que houve entrada de oxigênio capaz de estimular o crescimento de diversas espécies de fungos micelianos. Além disso, sabe-se que o pH ideal para o crescimento de fungos anaeróbicos está entre faixa de 6 e 7 (Orpin et al., 1997), com isso justifica-se um alto crescimento da população de fungos neste estudo, visto que o pH das silagens estava dentro dessa faixa.

Foram identificados um total de 34 isolados fúngicos na forragem fermentada (Tab. 06). Os gêneros mais frequentes foram o *Aspergillus* e o *Monascus* que corresponderam a 35,29% e 26,47% dos isolados respectivamente (Tab. 06). Neste estudo observou-se a presença do fungo *Monascus ruber* proveniente da forragem fermentada inoculada com LACT5. Essa espécie está associada à produção da micotoxina monacolina K, que têm a capacidade de diminuir a biossíntese de colesterol e os níveis de colesterol total (Silva e Xará, 2013). Esse fungo também possui a micotoxina citrinina que possui metabólito tóxico, tendo efeito antibacteriano, causando toxicidade hepática e renal (Renhe et al., 2006; Silva e Xará, 2013). De acordo com Driehuis (2011), as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* crescem em locais da silagem que ocorrem a penetração de ar, contribuindo para perdas por deterioração na superfície do silo. Além disso, esses os fungos também produzem micotoxinas que são prejudiciais aos animais e humanos (McDonald, 1991).

Tabela 6: Distribuição de gêneros de fungos micelianos isolados da silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) após fermentação com uma cepa de *Lactobacillus plantarum* autóctone de bovino

Gêneros/ espécies	Total	CONTR		LACT5		LACT9	
	N	n	%*	n	%	n	%
<i>Aspergillus spp.</i>	12**	5	14,70	5	15,70	2	5,88
<i>Aspergillus sp.</i>	2	1	2,94	1	2,94	-	-
<i>A. fumigatus</i>	3	-	-	3	8,82	-	-
<i>A. nidulans</i>	1	-	-	1	2,94	-	-
<i>A. terreus</i>	6	4	11,76	-	-	2	5,88
<i>Monascus ruber</i>	9	-	-	9	26,47	-	-
<i>Trichoderma spp.</i>	1	-	-	-	-	1	2,94
Total	34						

CONTR: controle; LACT5: *Lactobacillus plantarum* (10^5 unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g)); LACT9: *Lactobacillus plantarum* (10^9 UFC/g); *Frequência = número de observações de cada fungo dividido pelo número de isolados. **Gênero de fungo mais frequente ($P < 0,01$, teste do qui-quadrado).

Uma das estratégias para a prevenção de micotoxinas na silagem é a retirada do oxigênio. O oxigênio tem efeito prejudicial na qualidade da silagem porque permite o crescimento de diferentes grupos de microrganismos aeróbicos tolerantes a ácidos, o que pode levar à completa deterioração da silagem (Driehuis, 2011).

Geralmente a presença dos fungos são resultados de práticas inadequadas no manejo da silagem, já que a maioria das espécies são aeróbicos, portanto, não se desenvolvem em silagem bem preservada. Os fungos comumente detectados nas silagens são *Penicillium roqueforti* e *P. paneum*, *Monascus ruber*, *Aspergillus fumigatus*, *Byssoschlamys nivea*, *Mucoraceae* (em particular *Rhizopus nigricans*) e *Chrysonilia sitophila* (Driehuis, 2011).

4.4 Conclusões

A inoculação com as concentrações da cepa de *L. plantarum*, não alterou o pH de abertura e após 48 horas, as perdas de matéria seca, produção de efluente e estabilidade aeróbica do capim-elefante pré-emurcheado e fermentado.

As contagens de bactérias lácticas, fungos micelianos e leveduras também não foram influenciados pela inclusão dessa bactéria. Entretanto, ocorre redução de aproximadamente um log de UFC/g de forragem fermentada inoculada com LACT5 ou LACT9, na população de enterobactérias e ausência de crescimento de bactérias não fermentadora de lactose. Futuros estudos devem ser realizados para avaliarem melhores estratégias de inoculação de *L. plantarum*, para elucidar as possíveis diferenças proporcionadas por esses microrganismos na fermentação do capim-elefante.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código Financeiro 0001), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG) e a Connan – Nutrição Animal.

4.5 Referências

BORREANI, G.; TABACCO, E.; SCHMIDT, R. J.; HOLMES, B. J.; MUCK, R. E. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, v.101(5), p.3952-3979, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13837>

BUMBIERIS, J. V. H.; OLIVEIRA, M. R.; BARBOSA, M. A. A. F.; JOBIM, C.C. Use of winter cultures for forage conservation. **International Symposium on Forage Quality and Conservation**. v.2, p.65-84, 2011.

DANIEL, J. L. P.; BERNARDES, T. F.; JOBIM, C. C; SCHMIDT, P.; NUSSIO, L.G. Production and utilization of silages in tropical areas with focus on Brazil. **Grass and Forage Science**, v.74(2), p.188-200, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/gfs.12417>

DRIEHUIS, F. Ocorrência de micotoxinas na silagem. In: II Simpósio Internacional of Forage Quality and Conservation, São Pedro, 2011. **Anais**. São Pedro: Simpósio Internacional of Forage Quality and Conservation, 2011, p. 85-104.

DUGAN, F. M. The identification of fungi: an illustrated introduction with keys, glossary, and guide to literature. **St. Paul, Minn.: American Phytopathological Society**, p. 176, 2006.

EVANGELISTA, A. R.; SIQUEIRA, G. R.; LIMA, J. Á.; LOPES, J.; REZENDE, A. V. Alterações bromatológicas e fermentativas durante o armazenamento de silagens de cana-de-açúcar com e sem milho desintegrado com palha e sabugo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.20- 26, 2009. DOI: 10.1590/S1516-3598200900010000

FERREIRA, D.J.; LANA, R.P.; ZANINE, A.M; SANTOS, E.M.; VELOSO, C.M.; RIBEIRO, G.A. Silage fermentation and chemical composition of elephant grass inoculated with rumen strains of *Streptococcus bovis*. **Animal Feed Science and Technology**, v.183, p.22-28. 2013. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2013.04.020

FERREIRA, D.J.; ZANINE, A.M.; LANA, R.P.; RIBEIRO, M.D.; ALVES, G.R.; MANTOVANI, HC. Chemical composition and nutrient degradability in elephant grass silage inoculated with *Streptococcus bovis* isolated from the rumen. In: **Anais** da Academia Brasileira de Ciências, v.86, p.465-474, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-37652014112312>

GUIMARÃES, C. G.; BONFÁ, C. S.; EVANGELISTA, A. R.; SANTOS, A. S. D.; PANTOJA, L. D. A.; CASTRO, G. H. D. F. Fermentation characteristics of elephant grass silages with macaúba cake. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, on-line, v.40, 2018, DOI: 10.4025/actascianimsci.v40i1.42523

LANE D. J. 16S/23S rRNA sequencing In: E Stackebrandt and M Good fellow, ed Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. **Chichester: Wiley**. p.115-175, 1991.

MAIJALA R.; RANTA J.; SEUNA E.; The efficiency of the Finnish Salmonella Control Programme. **Food Control**, v.16(8), p.669-675, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.06.003>

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON. S. J. E. The biochemistry of silage. **New York: JohnWiley**, p.226, 1991.

MURRAY, P.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, p.2488, 2007.

NUSSIO, L. G. Silage production from tropical forages. In R. S. Park, M. D. Stronge (Eds.), Proceedings of the XIV International Silage Conference, Belfast, UK, 2005. **Anais**. Belfast, UK: Proceedings of the XIV International Silage Conference, p.97-107, 2005.

ORPIN, C. G.; JOBLIN, K. N. The rumen anaerobic fungi. In The Rumen Microbial Ecosystem eds Hobson, P.N. and Stewart, C.S. **London, UK: Chapman and Hall**, p.140-195, 1997.

RENHE, I. R. T.; VOLP, A.; VIDIGAL, J.; STRINGHETA, P. Monascus na nutrição e saúde. **Brazilian Journal of food and nutrition**, v.17(3), p.337-343, 2006.

RIBEIRO, L.; PIRES, A. J. V.; CARVALHO, G. G. P. DE; PEREIRA, M.; SANTOS, A. B. dos; ROCHA, L. C. Características fermentativas, composição química e fracionamento de carboidratos e proteínas de silagem de capim-elefante emurcheado ou com adição de torta de mamona. **Semina: Ciências Agrárias**, v.35, p.1447-1462, 2014. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n3p1447

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa: UFV, 235p. **Revista Ciência Agrônômica**, v.41, p.482-489, 2002. DOI:10.1590/S1806-66902010000300023

SILVA, S.; XARÁ, S. Levedura de arroz vermelho no tratamento da hipercolesterolemia. **Revista Nutricias**, (19), p.24-27, 2013.

TOMAZ, P. K.; ARAUJO, L. C. DE; SANCHES, L. A.; ARAUJO, S. N. S. DOS; DE LIMA, T. O.; LINO, A. D. A.; FERREIRA, E. M. Effect of sward height on the fermentability coefficient and chemical composition of Guinea grass silage. **Grass and Forage Science**, v.73, p.588-598, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/gfs.12349>

VELOSO, V. A. Bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes de bezerros leiteiros desmamados criados no semiárido. **Monografia**, Curso (Engenharia de Alimentos) - Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, 2016.

ZHANG, Y. C.; LI, D. X.; WANG, X. K.; LIN, Y. L.; ZHANG, Q.; CHEN, X. Y.; YANG, F. Y. Fermentation quality and aerobic stability of mulberry silage

prepared with lactic acid bacteria and propionic acid. **Animal Science Journal**. v.90(4), p.513-522, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/asj.13181>

YUAN, X.; GUO, G.; WEN, A.; DESTA, S.T.; WANG, J.; WANG, Y.; SHAO, T. The effect of different additives on the fermentation quality, in vitro digestibility and aerobic stability of a total mixed ration silage. **Animal Feed Science and Technology**, v.207, p.41-50, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.06.001>

5 Artigo 2- Inoculação de silagem de capim-elefante com fungos isolados do rúmen de bovinos

Este artigo foi elaborado conforme normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

RESUMO: O objetivo com este estudo foi avaliar o impacto da inoculação com *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* aplicados juntos ou separadamente sobre estabilidade aeróbica, perdas, composição bromatológica e microbiológica de silagem de capim-elefante. Foram avaliados quatro tratamentos: *A. terreus* a 10^5 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) de forragem fresca (AT15), *Trichoderma longibrachiatum* a 10^5 UFC/g (TL20), mix de ambos microrganismos com 10^5 UFC/g cada (MIX) e um tratamento controle sem fungos (CONT). A silagem MIX foi a mais estável, mas a silagem controle, AT15 e TL20 apresentaram menores perdas de matéria seca ($P < 0,05$). A silagem inoculada com MIX apresentou maior concentração de fibras e menor teor de carboidratos não fibrosos que a inoculada com TL20. Apenas o pH final da silagem MIX assumiu valor acima do mínimo de 4,2 considerado ideal para uma boa fermentação. Verificou-se a presença da população de *Diplococcus* na abertura nas silagens tratadas com TL20 e CONT. Constatou-se que após a exposição aeróbia, a população de bastonetes, *Lactobacillus* e total de bactérias lácticas foram maiores nas silagens tratadas com TL20 e MIX. O crescimento de leveduras e fungos foi maior após exposição aeróbica da silagem para todos os tratamentos. Em conclusão, a inclusão de *A. terreus* isolado ou em mistura com *T. longibrachiatum* melhora a estabilidade aeróbica da silagem, mas eleva o teor de fibra em detergente neutro e reduz o teor de carboidratos não fibrosos. O uso de

T. longibrachiatum proporciona menor teor de fibra em detergente neutro da silagem em relação às demais estratégias de inoculação utilizadas.

Palavras-chave: *Aspergillus terreus*, composição bromatológica, perdas de matéria seca, qualidade da ensilagem, *Trichoderma longibrachiatum*.

INOCULATION OF ELEPHANT GRASS SILAGE WITH RUMEN FUNGI

ABSTRACT: The aim of the study was to evaluate the impact of inoculation with *Aspergillus terreus* and *Trichoderma longibrachiatum* applied together or separately on aerobic stability, losses, chemical and microbiological composition of elephant grass silage. Four types of inoculants were evaluated: *A. terreus* at 10^5 colony-forming units per gram (UFC / g) of fresh forage (AT15), *Trichoderma longibrachiatum* at 10^5 UFC / g (TL20), mix of both microorganisms with 10^5 CFU / g each (MIX) and a control treatment without fungi (CONT). The MIX silage was the most stable, but the control silage, AT15 and TL20 showed lower losses of dry matter ($P < 0.05$). The silage inoculated with MIX showed a higher concentration of fibers and a lower content of non-fibrous carbohydrates than that inoculated with TL20. Only the final pH of the MIX silage assumed a value above the minimum of 4.2 considered for good fermentation. The presence of the *Diplococcus* population at the opening in the silages treated with TL20 and CONT was verified. It was found that after aerobic exposure, the population of rods, *Lactobacillus* and the total lactic acid bacteria were higher in the silages treated with TL20 and MIX. The growth of yeasts and fungi was greater after aerobic exposure of silage for all treatments. In conclusion, the inclusion of *A. terreus* alone or in a mixture with *T.*

longibrachiatum improves the aerobic stability of the silage, but increases the neutral detergent fiber content and reduces the non-fibrous carbohydrate content. The use of *T. longibrachiatum* provides a lower content of neutral detergent fiber in the silage compared to the other inoculation strategies used.

Key-words: *Aspergillus terreus*, chemical composition, dry mass loses, ensilage quality, *Trichoderma longibrachiatum*.

5.1 Introdução

A presença de fungos na silagem está associada à deterioração aeróbica e produção de micotoxinas em silagens. Entretanto, a literatura científica também relata efeitos benéficos de algumas espécies de fungos celulolíticos (Lee et al., 2015; Rouches et al., 2016; Wang et al., 2019a). Os fungos autóctones do rúmen são aptos para utilizarem oxigênio do ambiente e são produtores de celulases, hemicelulases e pectinases que degradam fibras vegetais, (Paul et al., 2012; Gruninger et al., 2014).

Estudos mostram que os fungos *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* isolados de conteúdo ruminal não produzem micotoxinas e apresentam atividade fibrolítica (Abrão et al., 2014; Abrão et al., 2017), o que poderiam contribuir para melhorar a digestibilidade da silagem.

A silagem de capim-elefante é uma das mais utilizadas entre os produtores em ambientes tropicais (Bernardes e Rêgo, 2014). Essa forrageira apresenta elevada produção, porém com elevados teores de fibra, elevado teor de umidade e baixo teor de carboidratos solúveis que podem reduzir o aproveitamento pelos ruminantes e dificultar a fermentação na produção de

silagem (Santos et al., 2013; Monção et al., 2020). A inoculação microbiológica da forragem a ser ensilada com fungos capazes de degradar biomassa lignocelulósica poderia melhorar a fermentação do capim-elefante ensilado. Adicionalmente, poderia representar uma estratégia para a inoculação desses fungos para o ambiente ruminal com o fornecimento dessa silagem para os ruminantes.

Com este trabalho, os objetivos foram avaliar o efeito da inoculação com fungos *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* sobre as perdas fermentativas, composição bromatológica, estabilidade aeróbica e população microbiana de silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon).

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Local e delineamento

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) foi cultivado em Montes Claros, no norte de Minas Gerais, Brasil (16°43' S e 44°52' W). A temperatura média anual é de 24,2 °C, com clima quente e seco com duas estações bem definidas, seca de abril a outubro e período chuvoso de novembro a março.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com quatro grupos experimentais e sete repetições, sendo: Controle sem aditivo (CONTR), *Aspergillus terreus* (AT15) aplicado a $1,0 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de peso da forragem fresca, *Trichoderma longibrachiatum* (TL20) aplicado a $1,0 \times 10^5$ UFC/g de peso fresco e uma mistura (MIX) contendo *A. terreus* e *T. longibrachiatum*, cada um a $1,0 \times 10^5$ UFC/g de peso fresco da forragem.

5.2.2 Descrição da forragem utilizada

O capim-elefante foi cortado em outubro de 2019, de forma manual com aproximadamente 2 metros de altura a 10 cm do nível do solo. Posteriormente foi picado em ensiladora estacionária regulada para partículas entre 0,5 e 2,5 cm e armazenado em sacos plásticos.

Determinou-se a matéria seca do capim fresco em um analisador de umidade (Shimadzu modelo MOC63, Japão) e foi mensurado o pH da forragem utilizando o método descrito por Silva e Queiroz (2002). Nesse processo, foram diluídas 9 g da forragem picada em 60 ml de água destilada e, após 30 minutos de repouso, realizou-se a leitura com um medidor de pH digital, modelo PG1800 e o resultado foi de 6,28.

5.2.3 Descrição dos microrganismos utilizados

As cepas de fungos utilizados foram provenientes 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 MegaBAC™ 1000 no Genome Analysis Center e Gene Expression. As sequências obtidas foram analisadas utilizando BLASTn v. 2.2.15 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].

Essas cepas foram selecionadas por estarem em maiores proporções no trato digestório bovino, por não produzirem micotoxinas, e pela maior produção de enzimas fibrolíticas (Abrão et al., 2014; Abrão et al., 2017).

5.2.4 Análises microbiológicas

Para as análises microbiológicas da forragem fresca, uma amostra de 5 g da forragem picada foi diluída em 45 ml de solução de NaCl a 0,9% estéril e a mistura foi agitada por 5 minutos em vórtex. Posteriormente, alíquotas de 10µl das diluições de 10^{-1} a 10^{-10} 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 dióxido de carbono (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.

Para análise de *Clostridium* spp., as diluições 10^0 a 10^{-3} foram inoculadas pelo método *Pour-plate*, utilizando 50 µl da diluição em placas de *Petri* com ágar TST (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil), com os antibióticos lidosporim (12.000 UI/mL + 45,4 mg/mL) e nistatina (100.000 UI/mL. Após o ágar ficar sólido, as placas foram incubadas em jarras de anaerobiose com

reatores de dióxido de carbono (Permutation ®, Curitiba, PR, Brasil) e colocadas em BOD a 37°C durante 72 horas.

As unidades formadoras de colônia de cada meio de cultura, MRS, MacConkey, Potato Dextrose e *Clostridium* 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 do manual “Identifying Fungi: a clinical laboratory handbook” (Germain e Summerbell, 2011).

Todos os procedimentos relacionados à análise microbiológica foram realizados em triplicatas, tanto na forragem fresca (uma amostra) quanto em cada unidade experimental da silagem no momento da abertura e após a perda de estabilidade.

5.2.5 Manejo de preparo da forragem a ser ensilada

Os fungos utilizados como inoculantes foram quantificados em fase logarítmica após o crescimento em meio líquido contendo 2,5% de fubá de milho, farinha de soja e açúcar. Para inoculação utilizou-se ± 2200 gramas do capim fresco (DM), picado com densidade de empacotamento de (0,78 kg / dm³ de MS). Cada repetição do grupo experimental AT15 recebeu 45 ml do inóculo e 55 ml de meio de cultura estéril. As repetições de TL20, receberam 55 ml do inóculo e 45 ml de meio de cultura, já as repetições do Mix foram misturadas a 45 ml do inóculo AT15 e 55 ml do inóculo TL20. O controle recebeu 100 ml de meio de cultura estéril para padronizar a quantidade de nutrientes adicionada via meio de cultura.

Posteriormente, a forragem contendo ou não os inóculos foi acondicionada em silos experimentais de PVC com capacidade para 3,0 litros. Cada tubo foi constituído por uma tampa adaptada com válvula tipo Bunsen para o escape de gases e 200 gramas de areia envolvida por malha de TNT como dreno de efluentes. A areia presente nos drenos foi pré-secada em estufa de circulação forçada por 72 horas a 65°C. Cada estrutura completa (silo + dreno de areia + tela protetora) foi identificada e pesada com auxílio de balança semianalítica. Após acondicionamento da forragem os silos foram fechados, vedados, pesados novamente e armazenados lacrados durante 31 dias.

5.2.6 Análises após conservação da forragem

Decorridos os 31 dias de fermentação, os silos foram abertos para determinação das comunidades microbiológicas, composição bromatológica, perdas de MS e efluentes e estabilidade aeróbica. Toda forragem foi transferida para sacos plásticos estéreis, homogeneizada. Retirou-se uma alíquota de 5 g a qual foi misturada em 30 ml de solução de NaCl 0,9% esteril e 5 ml de glicerina ambos estéreis para congelamento em ultrafreezer e posterior análise microbiológica.

Após o período de armazenamento, a estrutura cheia e vazia foi pesada novamente para determinação da perda total e por efluente. A perda total de matéria seca foi estimada pela diferença entre o peso de massa seca inicial e final dos silos experimentais em relação à quantidade de massa seca ensilada, descontando o peso do tubo mais a tampa e a areia na ensilagem e na abertura, conforme a equação:

$$PG (\%MS) = [(PSen - PSab) / (MVFE \times MSFE)] \times 100$$

Em que:

PG (%MS) – perdas por gases em porcentagem da matéria seca;

PSen – peso do silo cheio na ensilagem (kg);

PSab – peso do silo cheio na abertura (kg);

MVFE – massa verde da forragem ensilada (kg);

MSFE – teor de matéria seca da forragem ensilada (%).

A mensuração das perdas por efluente foi realizada de acordo com a equação 2 descrita em Jobim et al. (2007).

$$EF (g \text{ kg}^{-1}MV) = [(PEab - PEen) / MVFE] \times 100$$

Onde:

EF = Produção de efluente (g/kg de massa verde);

PEab = Peso da estrutura (silo + areia úmida + tela) na abertura (kg);

PEen = Peso da estrutura (silo + areia seca + tela) na ensilagem (kg);

MVFE = Massa verde de forragem ensilada (kg).

Para a determinação do pH na abertura, amostras de 9 g da silagem de cada silo experimental foram coletadas, diluídas em 60 ml de água destilada e deixadas em repouso por 30 minutos para leitura do pH com potenciômetro digital, de acordo com a técnica de Silva e Queiroz (2002).

5.2.7 Análise bromatológica

Uma amostra de aproximadamente 300 g de cada unidade experimental foi colocada 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 dotado de peneira com crivo de dois milímetros. Posteriormente foram determinados os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e proteína bruta (PB) segundo as metodologias descritas pela

Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990 a, b), e teores de fibra em detergente neutro (FDN) em conformidade com Goering e Van Soest (1970). O teor de estrato etéreo (EE) foi quantificado usando o procedimento da AOCS Am 5-04 (2005), com extrator Marconi. Os teores de carboidratos não fibrosos (CNF) foram estimados pela equação $CNF = 100 - (PB\% + FDN\% + EE\% + MM\%)$.

5.2.8 Estabilidade aeróbica

Para estudar a estabilidade aeróbica da forragem conservada, o remanescente de cada repetição foi deixado em saco plástico transparente, exposto ao ar, em temperatura ambiente controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 1,3^{\circ}\text{C}$). O pH do material foi medido a cada 24 horas durante 10 dias de exposição, conforme a metodologia de Silva e Queiroz (2002). Segundo Jobim et al. (2007), a estabilidade aeróbica pode ser medida por meio do tempo necessário para que a silagem atinja duas unidades de pH acima da inicial. Ao final do período de avaliação da estabilidade, uma alíquota de 5 g da forragem foi conservada em ultrafreezer com 30 ml de solução de NaCl a 0.9% e 5 ml de glicerina ambas estéreis para análise microbiológica após exposição ao ar e quebra da estabilidade.

5.2.9 Análise estatística

As populações microbianas foram estimadas como unidade formadora de colônias (UFC) por grama de MS de forragem ou silagem e foram transformadas em log antes da análise estatística. Os parâmetros de ensilagem, a estabilidade aeróbia e os dados microbianos foram avaliados em delineamento inteiramente ao acaso, considerando os quatro grupos experimentais (AT15, TL20, MIX e CONTR), usando o teste de média Duncan

a nível de 5% de probabilidade. Além disso, foi realizado uma análise de variância usando os grupos experimentais e o tempo (abertura e após 10 dias) para determinar diferenças significativas nos índices de diversidade das populações microbianas e o teste de média utilizado foi o Duncan ao nível de 10% de probabilidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o pacote estatístico RStudio.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Composição química e população de microrganismos aeróbios na forragem *in natura*

Foi observada elevada contagem de fungos leveduriformes, fungos micelianos e Enterobacteriaceae no capim antes de ser ensilado. A presença de fungos leveduriformes no início do processo fermentativo pode prejudicar a fermentação em função da competição com bactérias do ácido láctico (BAL), consideradas desejáveis (Driehuis, 2011). Wambacq et al. (2016) relataram a presença de isolados fúngicos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* em milho e capins antes da ensilagem. O capim-elefante fresco não apresentou contagem de bactérias lácticas. Para Ferreira et al. (2013) as gramíneas tropicais apresentam número baixo de bactérias lácticas, abaixo de 10^6 UFC/ g de forragem fresca.

Tabela 1: Composição da microbiota epífita aeróbia do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) antes da ensilagem

Microrganismo	Contagem (UFC/mL)
Leveduras	$2,0 \times 10^6$
Fungos micelianos	$3,3 \times 10^5$
Diplococos	$1,2 \times 10^4$

O capim-elefante antes de ser ensilado, apresentava teores de proteína bruta 4,16%, extrato etéreo de 1,8%, FDN de 70,28%, matéria mineral 12,57%, matéria seca de 21,94%, CNF de 11,19% e pH 6,28. Jobim e Nussio (2013) afirmaram que para ocorrer uma fermentação ideal, a forragem a ser ensilada tem de apresentar de 28 a 40% da matéria seca. Para os autores, nessas condições, os teores de carboidratos solúveis de 6 a 8% seriam suficientes para desencadear fermentação láctica, desde que o poder tampão não seja elevado.

5.3.2 Perdas no processo de ensilagem e estabilidade aeróbica

Os resultados mostraram que o capim-elefante com 21,94% de MS apresentou fermentação ideal, já que a maioria das médias dos valores de pH dos tratamentos ficaram abaixo de 4,2 (Tab. 02). O valor do pH é considerado um dos principais fatores que influenciam a qualidade da silagem e a extensão da fermentação (Liu et al., 2020).

O valor do pH na abertura foi afetado pelos grupos experimentais em estudo (Tab. 02). Nota-se os grupos CONTR, AT15 e TL20 apresentaram valores de pH abaixo de 4,2 e não diferiram entre si (Tab. 02). A silagem tratada com o MIX apresentou pH mais elevado, ficando acima do valor recomendado. Wang et al. (2019a), estudando o efeito da inoculação com fungo ruminal *Piromyces sp.* na silagem de planta inteira de milho, reportou pH abaixo de 4,0 em todos os tratamentos de silagem. Portanto, pode-se dizer que as silagens dos grupos CONTR, AT15 e TL20 foram bem conservadas durante

o período de armazenamento, pois na abertura dos silos elas apresentaram pH dentro de um patamar adequado, 3,8 a 4,2 (McDonald et al., 1991).

Tabela 2: Características de pH, estabilidade aeróbica, perdas de massa seca (%) e por efluentes (g/kg de massa fresca) de silagens de capim-elefante com fungos provenientes do rúmen de bovinos

Grupo experimental	pH na abertura	pH máximo	TQE (dias)	Perdas de matérias seca (%)	Perdas por efluentes (g/kg de massa fresca)
AT15	4,10b	8,40a	6,1ab	3,89ab	22,9a
TL20	4,17ab	8,42a	6,4ab	3,86ab	23,5a
MIX	4,40a	7,91a	7,4a	4,56a	23,2a
CONTROLE	4,05b	8,43a	4,4b	3,13b	19,4b
CV (%)	5,71	7,70	28,36	17,83	12,15

(AT15): *Aspergillus terreus* aplicado $1,0 \times 10^5$ UFC/g de peso da forragem fresca; (TL20): *Trichoderma longibrachiatum* $1,0 \times 10^5$ UFC/g de forragem fresca; MIX: contendo *A. terreus* e *T. longibrachiatum*, cada um a $1,0 \times 10^5$ UFC/g de peso fresco da forragem; Controle: não inoculadas; CV: coeficiente de variação (%); TQE= Tempo para quebra de estabilidade. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

A estabilidade aeróbia da silagem é a resistência da massa ensilada à deterioração após exposição ao ar, ou seja, a velocidade da oxidação dos ácidos, etanol e açúcares solúveis, resultando em aumento do pH e redução na digestibilidade e no conteúdo de energia (Jobim et al., 2007). O valor de pH máximo alcançado após abertura não foi afetado pelos grupos experimentais, mas é necessário destacar que o tempo para quebra da estabilidade aeróbica da silagem do capim-elefante cv. Cameroon foi afetado pelos grupos experimentais ($P < 0,05$) (Tab. 02; Figura 1).

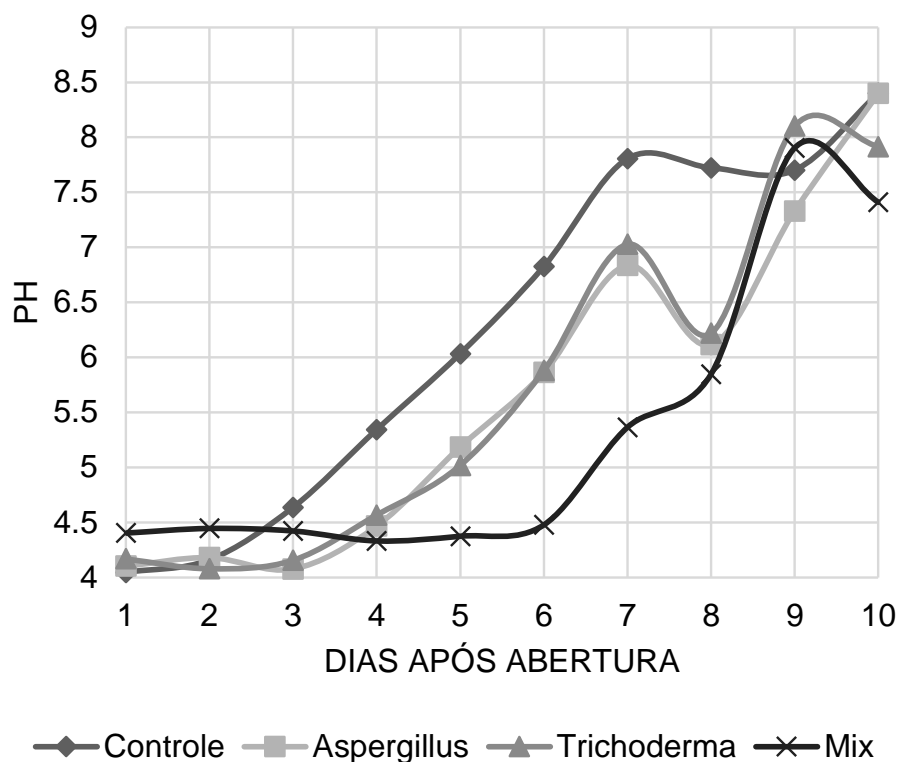


Figura 1: Valores de pH durante 10 dias de exposição aeróbica de silagem de capim-elefante inoculadas com *Aspergillus terreus* (AT15), *Trichoderma longibrachiatum* (TL20), com o mix dos dois fungos (MIX) e não inoculadas (Controle).

O tempo para quebra da estabilidade foi estatisticamente igual entre os tratamentos CONTR, AT15 e TL20 (Tab. 02). Nota-se que apenas o grupo MIX diferiu do controle. Após o quarto dia de exposição aeróbica, houve a quebra da estabilidade da silagem do controle. Já nas silagens tratadas com AT15 e TL20 a quebra de estabilidade ocorreu no sexto dia. A silagem tratada com mix, por sua vez, apresentou quebra após o sétimo dia. A exposição ao oxigênio promove consumo de ácido lático pelas leveduras o que eleva rapidamente o pH do meio (Duniere et al., 2017). Porém, a baixa produção de ácido lático, passível de ser observada em silagens com pH superior a 4,2, pode resultar em maior tempo para quebra da estabilidade, conforme observado no MIX. Além disso, a maior quantidade de fungos inoculados no

tratamento MIX pode ter resultado em maior competição com as leveduras no período pós-abertura e, conseqüente, maior estabilidade.

Os grupos experimentais afetaram significativamente ($P < 0,05$) as perdas de matéria seca e por efluente (Tab. 02). As silagens inoculadas com AT15, TL20 e o CONTR apresentaram menores perdas de MS e não diferiram entre si. Apenas o tratamento MIX apresentou perda de MS significativamente superior CONTR pelo teste Dunnett. É possível que a maior quantidade de fungos inoculada no MIX tenha resultado em maior competição com as bactérias lácticas e maiores perdas fermentativas.

Foi observado que as silagens dos grupos experimentais AT15, TL20 e MIX perderam mais efluente do que a silagem do controle (Tab. 02). Segundo Neto et al. (2009), a perda de efluente está diretamente relacionada com o teor de umidade da massa ensilada. As perdas de efluentes são capazes de reduzir o valor nutricional da massa ensilada, pois o efluente carrega consigo compostos solúveis do conteúdo celular (Silva et al., 2019).

Nota-se que a presença de fungos foi fator importante para a produção de efluentes, pois acredita-se que a perda da estrutura celular e de sua parede pode ser resultante da ação de fungos anaeróbicos do rúmen e suas enzimas. Nesse sentido, ao produzirem celulases, hemicelulases, estearases e celulosomas altamente ativos, os fungos degradam as paredes das células vegetais expondo seu conteúdo celular (Wang et al., 2011; Wang et al., 2019a).

5.3.3 Composição bromatológica da forragem conservada

Em relação às características bromatológicas, os tratamentos não foram capazes de afetar os teores de matéria mineral (MM), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE). Por outro lado, houve efeito significativo de tipo de

inoculação sobre os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e carboidratos não fibrosos (CNF) (Tab. 03).

Os valores de MM foram considerados elevados para a forrageira. Segundo Silva et al., (2019), o teor de MM do capim-elefante cv. BRS Capiaçú colhido com 70 dias de rebrota é de 9,8%. O teor de proteína bruta foi considerado baixo já na forragem fresca. O baixo teor de proteínas pode ser uma limitação ao aproveitamento da fibra pelos microrganismos ruminais, já que a amônia proveniente da degradação de aminoácidos é fator de crescimento para microrganismo fibrolíticos.

Tabela 3: Teores de matéria mineral (MM), fibra em detergente neutro (FDN), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e carboidratos não fibrosos (CNF) de silagens de capim-elefante com fungos provenientes do rúmen de bovinos

Grupo experimental	Teor na matéria seca (%)				
	MM	FDN	PB	EE	CNF
AT15	11,22a	74,30ab	3,79a	2,43a	8,25ab
TL20	11,57a	72,00b	3,86a	2,62a	9,94a
MIX	11,45a	75,56a	3,45a	2,38a	7,16b
Controle	11,50a	72,80ab	3,81a	2,81a	9,08ab
CV (%)	5,05	3,72	10,28	32,86	24,60

(AT15): *Aspergillus terreus* aplicado $1,0 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias por grama de peso da forragem fresca; (TL20): *Trichoderma longibrachiatum* $1,0 \times 10^5$ UFC/g de forragem fresca; MIX: contendo *A. terreus* e *T. longibrachiatum*, cada um a $1,0 \times 10^5$ UFC/g de peso fresco da forragem; Controle: não inoculadas; CV: coeficiente de variação (%). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

Para os valores de FDN foi observado que a silagem tratada com o MIX, não diferiu do AT15 e CONTR. Esse resultado pode indicar que a inoculação com TL20 pode ter sido mais eficiente na ação celulolítica e redução da FDN,

apesar deste tratamento não ter diferido do CONTR. Além disso, o valor mais elevado de FDN no MIX também pode indicar maior consumo de compostos solúveis da silagem. Segundo Brunecky et al. (2013) e Haitjema et al. (2014), fungos anaeróbicos do rúmen (*Neocallimastigomycota*) degradam tecidos fibrosos das forrageiras através do crescimento de rizoides e secreções enzimáticas. Wang et al. (2019a) relatou que durante a ensilagem a inoculação de fungos ruminais melhoraram a degradação da fibra bruta.

Os resultados observados são promissores, pois a inoculação com TL20 pode resultar em maior produção de estearase ou enzimas fibrolíticas capazes de quebrar a estrutura da hemicelulose e melhorar a digestibilidade do FDN.

Em relação ao teor de CNF, o grupo experimental MIX, apresentou teores de CNF menores que o controle e não diferiu do TL20 e AT15 (Tab. 03). No entanto não houve diferença da silagem dos grupos experimentais MIX, AT15 e controle. Esse resultado pode estar associado ao maior consumo de carboidratos não fibrosos pelo MIX, que foi inoculado com duas espécies e apresentava contagem mais elevada de fungos já no início do processo de ensilagem.

5.3.4 Composição microbiológica da forragem conservada e após perda da estabilidade aeróbica

Os microrganismos presentes na silagem desempenham um papel crítico no processo de fermentação (Wang et al., 2019b). Na composição da comunidade das bactérias lácticas com morfologia de diplococos, encontrou-se interação significativa entre momento de avaliação e tipos de inoculação ($P < 0,005$; Tab. 04). Na abertura constatou-se que a população dessas bactérias foi significativamente maior no CONTR e no TL20 em relação aos demais

tratamentos, onde não foram registrados diplococos. Entretanto, após a abertura a média da contagem dessas bactérias foi semelhante entre os tipos de inoculação. Para o CONTR e o TL20 a população foi maior na abertura do que 10 dias pós-abertura, diferentemente do MIX, onde a contagem foi significativamente maior após 10 dias de abertura ($P < 0,01$; Figura 2).

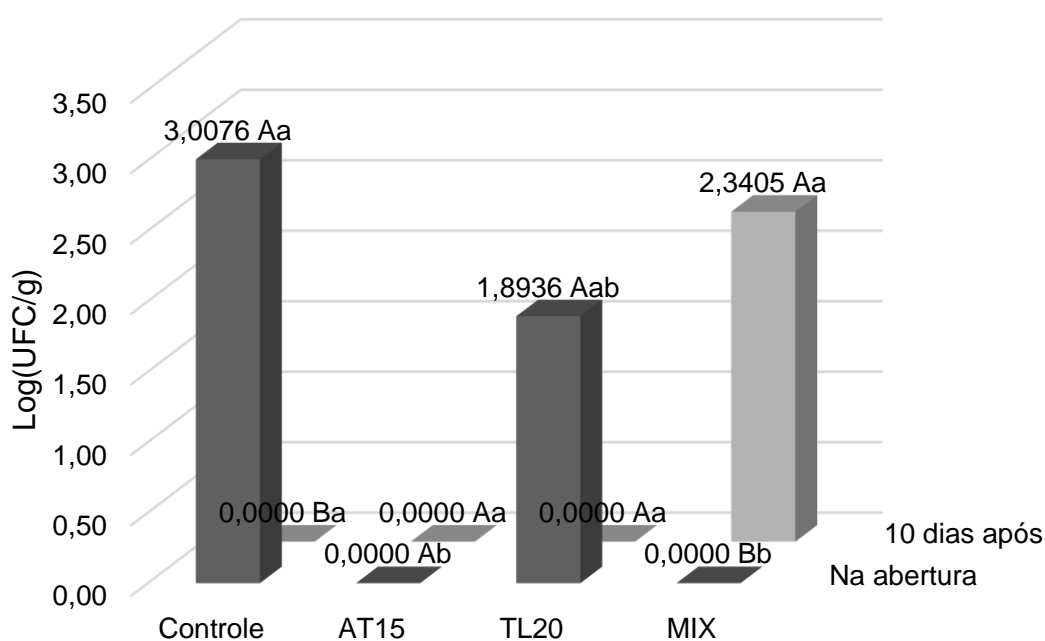


Figura 2: Médias de unidades formadoras de colônias (log de UFC) por grama de silagem de capim-elefante para diplococos crescidos em meio MRS provenientes de silagens de capim-elefante inoculadas com *Aspergillus terreus* (AT15), *Trichoderma longibrachiatum* (TL20), com o mix desses dois fungos (MIX) ou não inoculadas (Controle) no momento da abertura e 10 dias após a abertura. Médias seguidas pela mesma letra minúscula dentro de cada período de avaliação e maiúscula dentro de cada tipo de inoculação não diferem entre si pelo teste Duncan ($P < 0,05$).

Para a população de estreptobastonetes Gram positivos foi registrado efeito apenas de momento de avaliação ($P < 0,01$), quando a contagem na abertura dos silos, $2,42 \times 10^6$ UFC/mL (3,9416), foi estatisticamente superior a

avaliação realizada 10 dias após abertura, com $2,08 \times 10^3$ UFC/mL (1,1541). Pode-se dizer que a maior contagem deste microrganismo na abertura deve ser atribuída ao ambiente anaeróbico.

Já para Bastonetes, foi observado efeito significativo de tipo de inoculação ($P = 0,0533$) e de momento de avaliação ($P = 0,0012$). Ao se avaliar o efeito de tipo de inoculação, nota-se que apenas no período de 10 dias após abertura, quando houve quebra total da estabilidade, houve diferença entre os tratamentos (Tab. 04). Nesse sentido, houve maior contagem deste microrganismo no tratamento TL20, que não diferiu estatisticamente do MIX. Já a menor contagem foi registrada no grupo AT15, que não diferiu estatisticamente do controle e MIX.

A presença de *T. longibrachiatum* foi importante para a manutenção de maiores populações de bastonetes após quebra da estabilidade. De fato, esse fungo produz enzimas (celulases, xilases e fenoxidasas) que solubilizam a lignina e permitem a degradação da celulose em glicose, que é utilizada para produzir exclusivamente o ácido lático pelas BAL. O ácido lático, por sua vez, tem efeito na redução do pH, justificando o maior quantidade de bastonetes e maior tempo para quebra da estabilidade da silagem tratada com o TL20 e MIX (Ávila et al., 2014; Abrão et al., 2014; Abrão et al., 2017; Abrão et al., 2018; Muck et al., 2018).

Para a população de *Lactobacillus*, também foi observado efeito de tipo de inoculação ($P < 0,0694$) e momento de avaliação ($P < 0,0001$). Ao se avaliar o efeito de momento de avaliação, nota-se que a contagem na abertura, $1,28 \times 10^7$ UFC/mL (5,8295) foi estatisticamente maior que após 10 dias de abertura $5,51 \times 10^6$ (3,0710). Esse resultado indica que a ausência total de oxigênio foi

importante para a manutenção da população de *Lactobacillus* e que a abertura resultou em queda na sua contagem.

Ao se avaliar o efeito do tipo de inoculação sobre a população *Lactobacillus*, constatou-se variação entre os grupos experimentais após 10 dias de abertura. Assim, o tratamento TL20 apresentou maior contagem e não diferiu estatisticamente do MIX, indicando que a presença do *T. longibrachiatum* foi importante no efeito da população de *Lactobacillus*, ocorrida após abertura. Os valores da contagem de *Lactobacillus* do TL20 durante a abertura e após 10 dias foram semelhantes. Possivelmente o TL20 pode ter liberado enzimas que favoreceram o crescimento das bactérias lácticas. Para Cai et al. (1998) os cocos como *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Enterococcus spp.* iniciam a fermentação láctica no início do processo da ensilagem e as bactérias lácticas em forma de bastonete (*Lactobacillus spp.*) dominam no estágio posterior. Segundo (Wang et al., 2019b) as bactérias *Lactobacillus spp.* evitam a deterioração aeróbia da silagem, devido a produção de ácidos lácticos e redução do valor do pH. A conversão de ácido láctico em ácido acético inibe o crescimento de leveduras e fungos (Liu et al., 2020).

Para as bactérias lácticas totais, constatou-se efeito significativo do tipo de inoculação ($P < 0,0086$), do momento de avaliação ($P < 0,001$) e interação significativa entre os fatores ($P < 0,0628$). No momento da abertura, a contagem de BAL foi semelhante entre os tipos de inoculação. Contudo, após 10 dias de exposição ao ar, a contagem dessas bactérias foi significativamente maior para TL20 e MIX (Figura 03). Para a silagem CONTR e AT15 as contagens de bactérias lácticas totais foi superior no momento da abertura em relação ao período final. Para TL20 e MIX essa contagem foi semelhante entre os dois

períodos (Figura 03). Esse resultado também indica que a presença do *T. longibrachiatum* foi importante para a manutenção das populações de bactérias lácticas totais.

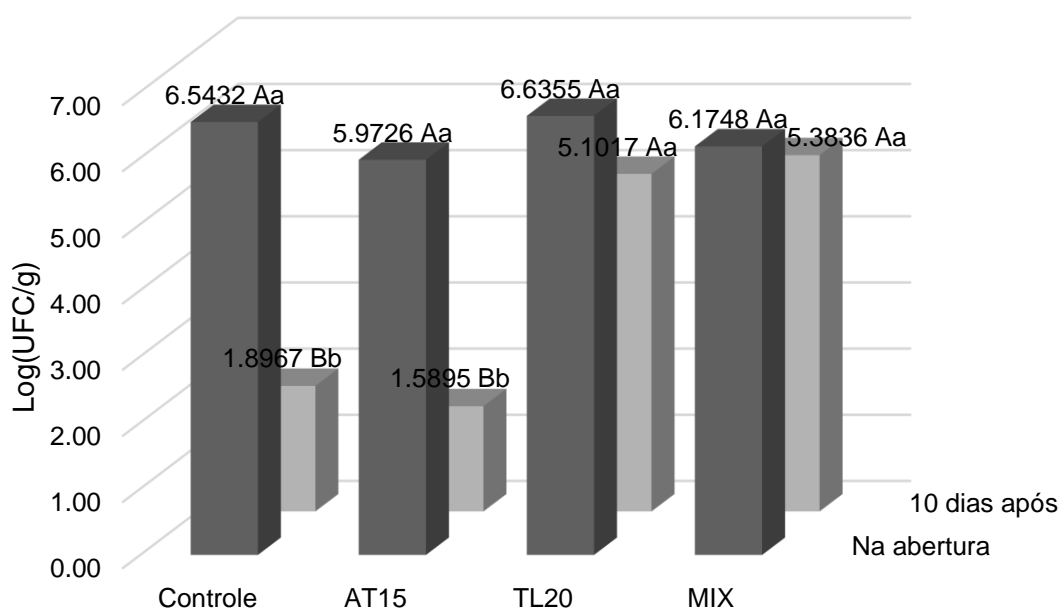


Figura 3: Médias de unidades formadoras de colônias por grama (log de UFC) de silagem de capim-elefante para bactérias lácticas totais crescidas em meio MRS provenientes de silagens de capim-elefante inoculadas com *Aspergillus terreus* (AT15), *Trichoderma longibrachiatum* (TL20), com o mix desses dois fungos (MIX) ou não inoculadas (Controle) no momento da abertura e 10 dias após a abertura. Médias seguidas pela mesma letra minúscula dentro de cada período de avaliação e maiúscula dentro de cada tipo de inoculação não diferem entre si pelo teste Duncan ($P < 0,05$).

Ao se avaliar bactérias do gênero *Clostridium*, a contagem foi baixa e não verificou-se diferença significativa para o tipo de inoculação e momento de avaliação ($P > 0,05$; Tab. 04). A maioria das espécies de *Clostridium* existente na silagem é de esporos inativos (Zheng et al., 2017). Portanto, observa-se o crescimento de *Clostridium* spp. quando o crescimento do BAL está estagnado e o pH é muito alto ou em silagem com alto teor de umidade (Pahlow et al.,

2003). Bactéria do gênero *Clostridium* é considerada formadora de esporos estritamente anaeróbica (Ávila e Carvalho, 2020). Nas condições anaeróbicas da silagem o *Clostridium* utiliza compostos solúveis do conteúdo celular das plantas como substrato para o crescimento (Zheng et al., 2017).

Neste estudo a contagem de *Enterobacteriaceae* spp. foi baixa e não se verificou influência do tipo de inoculação ($P > 0,05$; Tab. 05). Wang et al. (2019b) e Zheng et al. (2017) constataram baixa contagem de enterobactérias na silagem inoculada com *Lactobacillus plantarum*, cepa L20JPL65 e correlacionaram o resultado com o rápido declínio do pH da silagem.

Durante a ensilagem a presença de *Enterobacteriaceae* é indesejável, pois estes microrganismos podem competir por substrato com as bactérias produtoras do ácido lático (Wang et al., 2019b; Ávila e Carvalho, 2020). Além disso, algumas espécies de *Enterobacteriaceae* podem degradar proteínas e produzirem amônia e aminas biogênicas, indesejáveis na silagem (McDonald et al., 1991).

As leveduras causam perda de matéria seca da silagem, pois metabolizam carboidratos solúveis e produzem álcool (Ávila et al., 2014). Na contagem de leveduras e fungos micelianos não se verificou influência do tipo de inoculação. Contudo, para todos os tipos de silagem constatou-se que as médias das concentrações de leveduras e fungos micelianos foram estatisticamente maiores após 10 dias de abertura ($1,45 \times 10^{10}$, $1,43 \times 10^9$) do que no momento de abertura da silagem ($4,16 \times 10^7$, $2,42 \times 10^7$) ($P < 0,001$) (Tab. 05). As leveduras são consideradas deteriorantes da silagem e possuem tolerância a ambientes ácidos, permanecendo viáveis na ausência de oxigênio. Além disso, quando a silagem é exposta ao ar, há rápido crescimento das

leveduras, causando perdas adicionais de matéria seca (Ávila e Carvalho, 2020).

Romero et al. (2017), relataram que a inoculação com cepas de *Lactobacillus buchneri* e enzimas fibrolíticas de *Trichoderma reesei* na silagem de aveia não afetou a comunidade fúngica. Portanto, a baixa contagem das unidades formadora de colônias (UFC) dos fungos na abertura dos silos, podem ser explicadas devido à menor disponibilidade de oxigênio durante o processo de fermentação. Após a exposição ao oxigênio, a contagem de UFC aumentou, representando maior atividade fúngica, resultados também observados por Guim et al. (2002), que avaliaram a estabilidade aeróbica de silagens de capim-elefante inoculada com bactérias ácido lácticas e leveduras.

Tabela 4: Médias de unidades formadoras de colônias (log de UFC) por grama de silagem e erro padrão da média (ep) para microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos presentes em silagens de capim-elefante inoculadas com *Aspergillus terreus* (AT15), *Trichoderma longibrachiatum* (TL20), com o mix desses dois fungos (MIX) ou não inoculadas (Controle) no momento da abertura e 10 dias após a abertura

Variáveis	Média de UFC/g (Log de UFC) na abertura				Média de UFC/g (Log de UFC) 10 dias após				EP
	CONTR	AT15	TL20	MIX	CONTR	AT15	TL20	MIX	
<i>Diplococcus</i>	1,78×10 ⁶ a (3,01a)	0,00×10 ⁰ b (0,00b)	4,00×10 ⁵ ab (1,89ab)	0,00×10 ⁰ b (0,00b)	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	2,79×10 ⁷ a (2,34a)	9,83×10 ⁶ (0,84)
Estreptobastonetes	2,44×10 ⁶ a (5,06a)	1,19×10 ⁵ a (2,63a)	6,30×10 ⁶ a (3,37a)	8,19×10 ⁵ a (3,02a)	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	8,33×10 ³ a (0,78a)	1,98×10 ⁶ (0,95)
Bastonetes	1,02×10 ⁶ a (3,96a)	1,61×10 ⁶ a (4,9517a)	8,44×10 ⁶ a (5,42a)	1,28×10 ⁶ a (5,96a)	5,00×10 ⁴ b (0,91b)	1,72×10 ⁴ b (0,83b)	7,59×10 ⁶ a (5,10a)	5,04×10 ⁷ ab (2,48ab)	1,77×10 ⁷ (1,02)
<i>Lactobacillus</i> spp.	3,46×10 ⁶ a (5,36a)	1,73×10 ⁶ a (5,97a)	1,47×10 ⁷ a (5,53a)	2,10×10 ⁶ a (6,13a)	5,00×10 ⁴ b (0,91b)	1,72×10 ⁴ b (0,83b)	7,59×10 ⁵ a (5,10a)	5,05×10 ⁷ ab (3,26ab)	1,80×10 ⁷ (0,92)
Total bactérias lácticas	5,24×10 ⁶ a (6,54a)	1,73×10 ⁶ a (5,97a)	1,51×10 ⁷ a (6,63a)	2,27×10 ⁶ a (6,17a)	1,67×10 ⁵ b (1,89b)	2,28×10 ⁴ b (1,58b)	7,59×10 ⁵ a (5,10a)	7,91×10 ⁷ a (5,38a)	2,76×10 ⁷ (0,74)
<i>Clostridium</i> spp.	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	6,80×10 ² a (1,10a)	1,30×10 ² a (0,48a)	1,67×10 ³ a (2,25a)	1,67×10 ⁴ a (0,83a)	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	5,01×10 ⁴ a (1,33a)	4,00×10 ⁴ a (0,89a)	2,34×10 ⁴ (0,37)
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	5,56×10 ¹ a (0,42a)	1,67×10 ¹ a (0,56a)	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	2,22×10 ² a (0,52a)	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	8,10×10 ¹ (0,27)
Leveduras	4,17×10 ⁴ a (0,89a)	1,67×10 ⁸ a (1,50a)	0,00×10 ⁰ a (0,00a)	5,00×10 ³ a (0,67a)	1,64×10 ¹⁰ a (9,52a)	1,67×10 ¹⁰ a (9,35a)	1,67×10 ¹⁰ a (9,13a)	8,44×10 ⁹ a (8,74a)	3,69×10 ⁹ (0,83)
Fungos micelianos	8,33×10 ³ a (0,78a)	8,37×10 ⁷ a (2,56a)	8,38×10 ⁶ a (2,18a)	5,04×10 ⁶ a (3,25a)	1,29×10 ⁸ a (6,66a)	9,57×10 ⁸ a (7,24a)	4,01×10 ⁸ a (7,69a)	4,24×10 ⁹ a (7,61a)	1,49×10 ⁹ (1,10)

Letras iguais na linha para o momento de abertura das silagens ou para 10 dias após abertura não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

5.3.5 Diversidade fúngica da silagem conservada e após desestabilidade aeróbica da forragem conservada

Neste estudo, foi identificado um total de 10 isolados fúngicos na silagem no momento de abertura dos silos e 44 fungos após 10 dias de abertura. Na abertura dos silos, 100% dos isolados fúngicos foi do gênero *Aspergillus* spp.. Já 10 dias após exposição ao ar, foram identificados os gêneros *Aspergillus* spp. (45,45%), *Emmonsia* spp. (36,36%), *Trichoderma* spp. (13,63%) e *Rhizopus* spp. (4,54%) (Tab. 05). A contagem de UFC dos isolados fúngicos do gênero *Aspergillus* aumentou de 10 UFC no momento de abertura, para 20 UFC após exposição ao oxigênio, sendo o principal gênero encontrado (Tab. 05). Para Ávila e Carvalho (2020) os principais gêneros de fungos encontrados em diferentes silagens são: *Aspergillus*, *Acremonium* e *Alternaria*. Em ambientes de clima temperado as principais espécies fúngicas encontradas em silagem são *Penicillium roqueforti* e *P. paneum*, mas em climas tropicais é o *Aspergillus fumigatus* (Wambacq et al., 2016).

Ávila e Carvalho (2020) destacam que, mesmo em baixas contagens de fungos, pode haver presença de micotoxinas ativas. Portanto, a presença de fungos na silagem está associada à presença de oxigênio e aumento nos valores de pH (Ávila e Carvalho, 2020). As condições ácidas e anaeróbicas da silagem são desfavoráveis ao crescimento de fungos (Romero et al., 2017). No entanto, muitas espécies de fungos podem entrar em estado dormente durante a ensilagem e se reativarem ao serem expostas ao oxigênio (McAllister et al., 2018). Portanto é necessário realizar mais pesquisas para melhorar o conhecimento das comunidades de fungos na ensilagem e estabilidade aeróbica.

Tabela 5: Distribuição de gêneros de fungos micelianos isolados das silagens de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) inoculadas com *Aspergillus terreus* (AT15), *Trichoderma longibrachiatum* (TL20), com o mix desses dois fungos (MIX) ou não inoculadas (Cont) no momento da abertura e 10 dias após a abertura

Gêneros	Abertura									10 dias após abertura								
	Tot.	Cont	%*	AT15	%*	TL20	%*	MIX	%*	Tot.	Cont	%*	AT15	%*	TL20	%*	MIX	%*
<i>Aspergillus spp.</i>	10	1	10,0	3	30,0	3	30,0	3	30,0	20	5	11,4	6	13,6	7	15,9	2	4,5
<i>Trichoderma spp.</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	6	2	4,5	1	2,3	1	2,2	2	4,5
<i>Rhizopus spp.</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1	2,23	-	-	1	2,3
<i>Emmonsia spp.</i>	0	-	-	-	-	-	-	-	-	16	3	6,8	4	9,1	5	11,4	4	9,1
Total	10									44								

Tot. = total de isolados fúngicos *Frequência é igual ao número de observações de cada fungo dividido pelo número de isolados.

5.4 Conclusões

As inoculações de *Aspergillus terreus* (AT15) aplicado a $1,0 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias por grama de peso da forragem (UFC/g), *Trichoderma longibrachiatum* (TL20) aplicado a $1,0 \times 10^5$ UFC/g e uma mistura (MIX) contendo *A. terreus* e *T. longibrachiatum*, cada um a $1,0 \times 10^5$ UFC/g foram eficazes na fermentação da silagem e na estabilidade aeróbica em relação ao tempo de exposição ao ar após a desensilagem.

A inoculação com a mistura de *T. longibrachiatum* e *A. terreus* proporciona aumento no teor de fibra em detergente neutro e redução nos carboidratos não fibrosos. Já a inoculação apenas com *T. longibrachiatum* proporciona menor teor de fibras em detergente neutro.

A inoculação com TL20 foi mais eficiente na manutenção das bactérias lácticas totais após a abertura da silagem.

A quebra da estabilidade esteve associada a aumento expressivo nas populações de leveduras e de fungos micelianos para as silagens analisadas.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código Financeiro 0001), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG) e a Connan – Nutrição Animal.

5.5 Referências

ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; FREITAS, C. E.; VIEIRA, E. A.; GERASSEV, L. C.; SILVA-HUGHES, A. F.; ROSA, C. A.; RODRIGUES, N. M. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. **Current Microbiology**, v.69(2), p. 649-659, 2014. DOI 10.1007/s00284-014-0633-5

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.; RODRIGUEZ, N. M. Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. **PLoSOne**, v.12(8), p.1-13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183628>

ABRÃO, F. O.; DUARTE, E. R.; PESSOA, M. S.; SANTOS, V. L.; RODRIGUEZ, N. M. Inocuidade micotoxicológica e viabilidade de *Aspergillus* spp. com potencial probiótico provenientes do trato digestório bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70(6), p. 1833-1839, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9853>

ADDAH, W.; BAAH, J.; GROENEWEGEN, P.; OKINE, E. K.; MCALLISTER, T.A. Comparison of the fermentation characteristics, aerobic stability and nutritive value of barley and corn silages ensiled with or without a mixed bacterial inoculant. **Canadian Journal of Animal Science**, v.91(1), p.133-146, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4141/CJAS10071>

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v.25(17), p.3389-3402, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>

ÁVILA, C. L. S.; CARVALHO, B. F.; PINTO, J. C.; DUARTE, W. F.; SCHWAN, R. F. The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. **Journal of Dairy Science**, v.97(2), p.940-951, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6987>

ÁVILA, C. L. S.; CARVALHO, B. F. Silage fermentation - updates focusing on the performance of micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**, v.128, n.4, p. 966-984, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.14450>

BERNARDES, T. F.; RÊGO, A. C. do. Estudo das práticas de produção e utilização de silagem em fazendas leiteiras brasileiras. **Journal of Dairy Science**, v.97(3), p.1852-1861, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7181>

BRUNECKY, R; ALAHUHTA, M; XU, Q.; DONOHOE, B. S.; CROWLEY, M. F.; KATAEVA, I. A.; YANG, S-J.; RESCH, M. G.; ADAMS, M. W. W.; LUNIN, V. V.; HIMMEL, M. E.; BOMBLE, Y. J. Revealing nature's cellulase diversity: the

digestion mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA. **Science**, v.342, p.1513–1516, 2013. DOI:10.1126/science.1244273

CAI, Y.; BENNO, Y.; OGAWA, M.; OHMOMO, S.; KUMAI, S.; NAKASE, T. Influence of *Lactobacillus spp.* from an inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc spp.* from forage crops on silage fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64(8), p.2982-2987, 1998. DOI: 0099-2240/98/\$04.0010

DRIEHUIS, F. Occurrence of mycotoxins in silage. In: II International symposium on forage quality and conservation. São Paulo, 2011. **Anais**. São Paulo: II International, p.85-104, 2011.

DUNIÈRE, L.; SINDOU, J.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; CHEVALLIER, I.; THÉVENOT-SERGENTET, D. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. **Animal Feed Science and Technology**, v.182(1-4), p.1-15, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.04.006>

DUNIERE, L.; XU, S.; LONG, J.; ELEKWACHI, C.; WANG, Y.; TURKINGTON, K.; FORSTER, R.; MCALLISTER, T. A. Bacterial and fungal core microbiomes associated with small grain silages during ensiling and aerobic spoilage. **BMC microbiology**, v.17(1), p. 50, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0947-0>

FERREIRA, D. J.; LANA, R. P.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M.; VELOSO, C. M.; RIBEIRO, G. A. Silage fermentation and chemical composition of elephant grass inoculated with rumen strains of *Streptococcus bovis*. **Animal Feed Science and Technology**, 28 v.183(1-2), p.22-28, 2013. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2013.04.020

GERMAIN, ST GUY; SUMMERBELL, RICHARD CHARLES. **Identifying fungi: a clinical laboratory handbook**. Star Pub., 2011.

GIMENES, A. L. G; MIZUBUTI, I. Y.; MOREIRA, F. B.; PEREIRA, E. S.; de AZAMBUJA RIBEIRO, E. L.; MORI, R. M. Composição química e estabilidade aeróbia em silage de milho preparada com inoculante bacteriano e/ou enzimático. **Acta Scientiarum Animal Science**, Maringá, v. 28(2), p. 153-158, 2006.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications. **Agricultural Research Service**, US Department of Agriculture, p.19, 1970.

GRUNINGER, R. J.; PUNIYA, A. K.; CALLAGHAN, T. M.; EDWARDS, J. E.; YOUSSEF, N.; DAGAR, S. S.; FLIEGEROVA, K.; GRIFFITH, G.W.; FORSTER, R.; TSANG, A.; MCALLISTER, T.; ELSHAHED, M.S. Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. **FEMS microbiology ecology**, v.90(1), p.1-17, 2014. DOI: 10.1111/1574-6941.12383

GUIM, A.; ANDRADE, P. D.; ITURRINO-SCHOCKEN, R. P.; FRANCO, G. L.; RUGGIERI, A. C.; MALHEIROS, E. B. Estabilidade aeróbica de silagens de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) emurchecido e tratado com inoculante microbiano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31(6), p.2176-2185, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982002000900004>

HAITJEMA, C. H.; SOLOMON, K. V.; HENSKE, J. K.; THEODOROU, M. K.; O'MALLEY, M. A. Anaerobic gut fungi: advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production. **Biotechnology and bioengineering**, v. 111(8), p.1471-1482, 2014. DOI 10.1002/bit.25264

JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G.; REIS, P. S.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.101-119, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007001000013>

JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G. Princípios básicos da fermentação na ensilagem. Forragicultura: ciência, tecnologia e gestão de recursos forrageiros. **Jaboticabal: Multipress**, p.649-660, 2013.

LEE, S. M.; GUAN, L. L.; EUN, J. S.; KIM, C. H.; LEE, S. J.; KIM, E. T.; LEE, S. S., The effect of anaerobic fungal inoculation on the fermentation characteristics of rice straw silages. **Journal of applied microbiology**, v.118(3), p.565-573, 2015. DOI 10.1111/jam.12724

LIU, B.; YANG, Z.; HUAN, H.; GU, H.; XU, N.; DING, C. Impact of molasses and microbial inoculants on fermentation quality, aerobic stability, and bacterial and fungal microbiomes of barley silage. **Scientific Reports**, v.10(1), p.1-10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62290-7>

MCALLISTER, T. A.; DUNIÈRE, L.; DROUIN, P.; XU, S.; WANG, Y.; MUNNS, K.; ZAHEER, R. Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. **Journal of dairy science**, v.101(5), p.4060-4074, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow. Chalcombe Publications, p. 226, 1991.

MONÇÃO, F. P.; ROCHA Júnior, V. R.; SILVA, J. T.; de JESUS, N. G.; MARQUES, O. F. C.; RIGUEIRA, J. P. S.; VENDAS DO T. J. E.; SILVA JÚNIOR, A. A. G.; ALVES, D. D.; CARVALHO, C. C. C.; GOMES, V. M.; LEAL, D. B. Nutritional Value of BRS Capiapu Grass (*Pennisetum purpureum*) silage associated with cactus pear. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v.10(1), p.25-29, 2020.

MUCK, R. E.; NADEAU, E. M. G.; MCALLISTER, T. A.; CONTRERAS-GOVEA, F. E.; SANTOS, M. C.; KUNG Jr, L. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **Journal of dairy science**, v.101(5), p.3980-4000, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.183-191, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300021>

MURRAY, P.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, p.2488, 2007.

NETO, G. B.; SIQUEIRA, G. R.; NOGUEIRA, J. R.; REIS, R. A.; ROTH, A. P. D. T. P.; ROTH, M. D. T. P. Perdas fermentativas e estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar aditivadas com cal virgem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, p.24-33, 2009. Disponível em: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rbspa-scielo>

PAUL, K.; NONOH, J. O.; MIKULSKI, L.; BRUNE, A. "Methanoplasmatales", thermoplasmatales-related Archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78(23), p.8245-8253, 2012. DOI: 10.1128/AEM.02193-12

PAHLOW, G.; MUCK, R. E.; DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S.; SPOELSTRA, S. F. Microbiologia da ensilagem. **Agronomy**, v.42, p.31-94, 2003.

ROMERO, J. J.; ZHAO, Y.; BALSECA-PAREDES, M. A.; TIEZZI, F.; GUTIERREZ-RODRIGUEZ, E.; CASTILLO, M. S. Laboratory silo type and inoculation effects on nutritional composition, fermentation, and bacterial and fungal communities of oat silage. **Journal of dairy science**, v.100(3), p.1812-1828, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11642>

ROUCHES, E.; HERPOELGIMBERT, I.; STEYERM J. P. Improvement of anaerobic degradation by White-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.59, p.179-198, 2016. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.317>

SANTOS, E. M.; SILVA, T. C.; MACEDO, C. H. O.; CAMPOS, F. S. Lactic acid bacteria in tropical grass silages. **Lactic acid bacteria. R & D for Food, Health and Livestock Purposes**. London: InTech, p.335-362, 2013. DOI: 10.5772/50703

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos. 3.ed. Viçosa: UFV, 235p. **Revista Ciência Agronômica**, v.41, p.482-489, 2002. DOI:10.1590/S1806-66902010000300023

SILVA, M. C. A.; COSTA, N. M.; RIGUEIRA, J. P. S.; JESUS, D. L. S.; SILVA, N. B. S.; SILVA FILHO, W. S.; SILVA, J. T.; ARAÚJO, J. J. S.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; ALVES, D. D.; HAMONE, J. M. A.; MONÇÃO, F. P. The Effect of Graded Levels of Crude Glycerin in BRS Capiapu Grass Silage: Fermentation Profile and Bromatological Composition. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v.9(4), p.597-602, 2019.

WAMBACQ, E.; VANHOUTTE, I.; AUDENAERT, K.; DE GELDER, L.; HAESAERT, G. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96(7), p.2284-2302, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7565>

WANG, D.; ZHAO, C.; LIU, S.; ZHANG, T.; YAO, J.; CAO, Y. 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**, v.9(1), p.121, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0846-x>

WANG, Y.; HE, L.; XING, Y.; ZHENG, Y.; ZHOU, W.; PIAN, R.; YANG, F.; CHEN, X.; ZHANG, Q. Dynamics of Bacterial Community and Fermentation Quality during Ensiling of Wilted and Unwilted *Moringa oleifera* Leaf Silage with or without Lactic Acid Bacterial Inoculants. **Msphere**, v.4(4), p.e00341-19, 2019b. Disponível em <https://doi.org/10.1128/mSphere.00341-19>

WANG, T.; CHEN, H.; LU, M.; CHEN, Y.; SUNG, H.; MAO, C.; CHO, H.; KE, H., HWA, T.; RUAN, S.; HUNG, K.; CHEN, C.; LI, J.; WU, Y.; CHEN, Y.; CHOU, S.; TSAI, Y.; CHU, T.; SHIH, C. A.; LI, W.; SHIH, M. Functional characterization of cellulases identified from the cow rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5 by transcriptomic and secretomic analyses. **Biotechnol Biofuels**, v.4(1), p.24, 2011. Disponível em: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/4/1/24>

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18(1), p.315-322, 1990.

ZHENG, M. L.; NIU, D. Z.; JIANG, D.; ZUO, S. S.; XU, C. C. Dynamics of microbial community during ensiling direct-cut alfalfa with and without LAB inoculant and sugar. **Journal of applied microbiology**, v.122(6), p.1456-1470, 2017. DOI:10.1111/jam.13456
0.1111/jam.13456