

Caracterização Microbiológica e Bromatológica da Silagem de Capim-Elefante Inoculada com Fungos Celulolíticos em Dois Tipos de Silos Experimentais

Microbiological and Bromatological Characterization of Elephant Grass Silage Inoculated with Cellulolytic Fungi in Two Types of Experimental Silos

Lavinia Francine Xavier Santos^a; Valdo Soares Martins Júnior^a; Aniele de Cássia Rodrigues Veloso^a; Eduardo Robson Duarte^{*a}; Thiago Gomes dos Santos Braz^a

^aUniversidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, MG, Brasil.

*E-mail: duartevet@hotmail.com

Resumo

A elaboração e utilização de minissilo de polietileno poderia contribuir para as análises de silagens experimentais, por utilizar material já empregado para a produção e comercialização de silagem ensacada, o que permitiria condições de fermentação mais próximas àquelas observadas no campo. Objetivou-se neste estudo, avaliar os perfis fermentativos das silagens de capim elefante em minissilos de tubo policrometo de vinila (PVC) ou de sacos de polietileno inoculados com fungos do trato digestório bovino. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em fatorial 2x2, comparando-se a adição (MIX) ou não (CONT) dos fungos celulolíticos para a fermentação do capim elefante acondicionado nesses dois tipos de minissilos, com sete repetições para cada tratamento. O uso do minissilo de saco de polietileno quando comparado com de tubo PVC não apresentou diferença significativas nos parâmetros bromatológicos, estabilidade aeróbica, pH na abertura, entretanto na contagem de estreptobastonetes houve diferença significativa para a contagem de populações microbianas na abertura. As médias dos valores de pH dos minissilos na abertura se mantiveram < 4,5, houve diferença entre o MIXSACO (4,4) e o controle saco (CONTSACO) (3,83) ($p=0,004$). Os minissilos CONTSACO apresentaram menor tempo de estabilidade (1,57 dias) em comparação com os demais minissilos ($p=0,002$). A utilização do saco de polietileno não prejudicou o processo fermentativo da forragem, sendo assim uma alternativa viável para substituição do silo de tubo PVC para produção de silos laboratoriais.

Palavras-chave: *Pennisetum purpureum*. Minissilo. Forragem Tropical. Microrganismos Ruminais. Conservação de Forragem

Abstract

The development and use of polyethylene minisilo could contribute to the analysis of experimental silages, by using material already used for the production and commercialization of baged silage, which would allow fermentation conditions closer to those observed in the field. The objective of this study was to evaluate the fermentative profiles of elephant grass silages in polyvinyl chloride tube (PVC) minisilos or polyethylene bags inoculated with fungi from the bovine digestive tract. The experiment was conducted in a completely randomized design, in a 2x2 factorial, comparing the addition (MIX) or not (CONT) of cellulolytic fungi for the fermentation of elephant grass packed in these two types of minisilos, with seven replications for each treatment. The use of the polyethylene bag minisilo when compared to PVC tube showed no significant difference in bromatological parameters, aerobic stability, pH at opening, however in the count of streptobastonetes there was a significant difference for the counting of microbial populations at the opening. The mean of the pH values of the minisilos at the opening remained < 4.5, there was difference between MIXBAG (4.4) and bag control (CONTBAG) (3.83) ($p=0.004$). CONTBAG minisilos showed shorter stability time (1.57 days) compared to other minisilos ($p=0.002$). The use of the polyethylene bag did not harm the forage fermentation process, thus being a viable alternative for replacing the PVC tube silo for the production of laboratory silos.

Keywords: *Pennisetum purpureum*. Minisilo. Tropical Forage. Ruminant Microorganisms. Forage Conservation

1 Introdução

Em regiões tropicais semiáridas, um dos principais fatores limitantes para criação de ruminantes é a disponibilidade de volumoso de qualidade e em quantidade durante todo o ano. Durante o período de chuva, a disponibilidade de volumoso é alta, podendo até exceder a demanda do rebanho. Entretanto, no período seco, a forrageira reduz a taxa de crescimento, o que ocasiona déficit na produção de alimento. Para atender essa demanda, estratégias como produção de silagem são utilizadas para garantir o fornecimento de volumoso aos animais nesse período (RIGUEIRA *et al.*, 2017).

Entretanto, uma má fermentação durante a ensilagem, pode resultar em problemas como a crescimento de

microrganismos deteriorantes o que promove redução na qualidade do produto ensilado (BORREANI *et al.*, 2018; WEINBERG; CHEN, 2013). Com intuito de reduzir essas perdas, o uso de inoculantes microbiológicos tem apresentado resultados promissores (WANG *et al.*, 2019; VELOSO, 2020). A inoculação desses microrganismos favorece a produção de ácidos orgânicos, reduzindo rapidamente o pH do material, e consequentemente melhorar a conservação da forrageira (DRIEHUIS *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2013; MUCK *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Devido sua alta produção de matéria seca e bom valor nutritivo no período chuvoso, o capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum), é uma forrageira comumente utilizada

como volumoso suplementar para os rebanhos no período da seca. Entretanto, devido ao seu alto teor de umidade, elevado poder tampão e baixa quantidade de carboidratos solúveis, a fermentação desse volumoso pode ser comprometida pelo crescimento exagerado de *Clostridium* spp., Enterobacteriaceae e leveduras (OLIVEIRA *et al.*, 2014; MONÇÃO *et al.*, 2020).

O uso de aditivos melhora o perfil fermentativo da silagem e proporciona melhor conservação. A inoculação de fungos celulolíticos no processo de ensilagem de forrageiras tropicais representa uma alternativa promissora para melhorar a fermentação de materiais ensilados, ao favorecerem a quebra da parede vegetal, disponibilizando carboidratos solúveis para ação das bactérias fermentativas (VELOSO, 2020).

Frequentemente, para as análises experimentais de silagens, tem-se utilizado minissilos de policrometo de vinila (PVC) para otimizar os procedimentos. Entretanto, a confecção dessas estruturas é laboriosa e onerosa e normalmente podem não refletirem acuradamente as condições de ensilagens ocorridas em condições de campo. A procura por materiais alternativos para confecção de silos experimentais tem como intuito viabilizar as análises laboratoriais, aproximando às condições reais do campo, sem prejudicar os resultados obtidos com os materiais tradicionais (ROMERO *et al.*, 2017).

Na maioria das propriedades rurais, nos últimos anos vem sendo difundido o uso do silo tipo Bag, que consiste em uma grande bolsa feita de polietileno (TAHER *et al.*, 2019), também tem sido utilizado sacos de polietileno para conservação e armazenamento de silagem, pois facilita o manejo de fornecimento aos animais e transporte da silagem. A elaboração e utilização de minissilo de polietileno poderia contribuir para as análises de silagens experimentais, por utilizar material já empregado no campo por produtores rurais, o que permitiria condições de fermentação mais próximas àquelas observados no campo.

Dessa forma, neste estudo os objetivos foram avaliar os perfis de fermentação, crescimento microbiológico e composição bromatológica das silagens de capim elefante em minissilos de tubo PVC ou em minissilos de sacos de polietileno e o efeito da adição de inoculados com fungos celulolíticos do trato digestório de bovinos.

2 Material e Métodos

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) foi colhido no município de Montes Claros, norte de Minas Gerais, Brasil (16°43' S e 44°52' W). Essa região apresenta temperatura média anual de 24,2 °C, com clima quente e seco com duas estações bem definidas, o período seco entre os meses de abril e outubro e período chuvoso entre novembro e março (ALVARES *et al.*, 2014).

A forrageira utilizada foi cortada de forma manual com altura média de três metros, o corte foi realizado a 10 cm do solo. Posteriormente, a planta foi processada em picadeira estacionária, regulada para proporcionar um tamanho de

partícula de 0,5 até 2 cm. O material picado foi acondicionado em sacos plásticos para o transporte e preparo das silagens.

Para determinação do pH do capim *in natura*, nove gramas da forragem picada foram misturados em 60 ml de água destilada e após 30 minutos de repouso, o pH foi lido com um medidor de pH digital (Gehaka modelo PG1800, São Paulo, Brasil), como estabelecido pela técnica de Silva e Queiroz (2002).

As cepas fúngicas utilizadas foram isoladas do rúmen de novilhos Nelore criados em sistema extensivo em pastagem de *Urochloa decumbens* cv. Basilisk, com suplementação mineral contendo ureia (ABRÃO *et al.*, 2017). Além das características macroscópicas e micro morfológicas 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. 2.215 de BLAST 2.0 (ALTSCHUL, 1997). Considerou-se como espécie o isolado com similaridade $\geq 99\%$. As sequências foram depositadas no GenBank, e os isolados 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.*, 2017).

Os fungos utilizados como inoculantes foram quantificados após o crescimento em meio líquido contendo 2,5% de fubá de milho, 2,5% de soja e 2,5% de açúcar. Posteriormente foram padronizadas a uma concentração de $1,0 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, comparando-se quatro tipos de minissilos: controle utilizando silo tubo de PVC (CONTTUBO), controle utilizando sacos plásticos de polietileno (CONTSACO), mistura dos fungos *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* em silos de tubo de PVC (MIXTUBO) e mistura dos fungos *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* em silos de sacos plásticos de polietileno (MIXSACO). Os procedimentos foram realizados com sete repetições, totalizando 28 minissilos.

Para a ensilagem, foram utilizados aproximadamente 2200 gramas do capim fresco picado com massa específica de 0,68 kg / dm³ de MS. Cada unidade experimental recebeu 100 mL do meio de cultura contendo a mistura em iguais proporções dos dois fungos celulolíticos. Para o controle, foram adicionados 100 mL do meio de cultura estéril ao mesmo volume de silagem por minissilo.

Posteriormente, as amostras de forragem, contendo ou

não os inoculantes, foram acondicionadas em minissilos experimentais de PVC ou sacos de polietileno. Cada minissilo continha um saco de tecido não tecido (TNT) com 200 gramas de areia seca em estufa de circulação forçada por 72 horas a 65 °C.

Os minissilos que foram confeccionados em tubo de PVC possuíam capacidade de 3,0 litros, uma tampa adaptada com válvula tipo Bunsen para o escape de gases. Alternativamente, foram confeccionados minissilos em lâmina de polietileno de 200 micras, utilizadas na vedação de silagens em silos de trincheira ou superfície. Esses minissilos possuíam 10,0 cm de diâmetro e 40,0 cm de altura, obtendo-se dimensões semelhantes aquelas dos minissilos em PVC (Figura 1).

Figura 1 - Minissilos experimentais confeccionados com lâminas de polietileno com 10,0 cm de diâmetro e 40,0 cm de altura



Fonte: os autores.

Os minissilos de PVC e saco de polietileno foram identificados, vedados com o auxílio de fita adesiva e pesados em balança semianalítica (Marte ay220, Shimadzu Corporation, Minas Gerais, Brasil) e armazenados por 30 dias em temperatura ambiente (aproximada de 25°C ± 1,3°C). Após esse período, os minissilos foram abertos para a determinação das comunidades microbiológicas aeróbias e anaeróbias facultativas e determinação do pH na abertura do silo.

Para a realização das análises microbiológicas do capim *in natura* e do material após o processo de ensilagem, uma amostra de 15 gramas do material de cada repetição foi diluída em 45 mL de solução salina estéril e a mistura foi agitada em vórtex por cinco minutos.

Posteriormente foram realizadas diluições decimais até a diluição 10⁻¹⁰, sendo inoculadas três alíquotas de 10 µL em

placas de Petri estéreis contendo o meio de cultura Ágar MRS (Merck KGaA®, Darmstadt, Alemanha) para avaliar o crescimento de bactérias lácticas (MURRAY *et al.*, 2007). Essas placas foram incubadas a 37° C por 48 horas em jarras de anaerobiose com reatores de CO₂ (Permutation®, Curitiba, PR, Brasil).

Alíquotas de 10 µL foram inoculadas em placas de Petri estéreis contendo Ágar Potato Dextrose (KASVI®, Terámo, Itália) acrescida de 1,5% de solução de cloranfenicol (10%/v). Essas placas foram incubadas a 37 °C em estufa BOD e o crescimento das colônias foi avaliado sete dias após a inoculação. Para análise de Enterobacteriaceae, as alíquotas foram inoculadas em placas contendo Ágar MacConkey (KASVI®, Terámo, Itália), e foram incubadas em estufa BOD a 37° C durante 48 horas (MURRAY *et al.*, 2007).

As colônias dos microrganismos foram quantificadas e diferenciadas conforme aspectos morfológicos (coloração, tamanho e forma) com o auxílio de um contador de colônia (Phoenix Lufenco, modelo CP-608, Araraquara, São Paulo, Brasil). Os gêneros dos fungos isolados foram identificados pelo método do micro cultivo e as lâminas foram observadas em microscópio óptico, utilizando-se as objetivas de 10X e 40X, considerando-se as características descritas por Germain e Summerbell (2011), no manual “Identifying Fungi: a clinical laboratory handbook”. Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados em triplicatas, tanto para a forragem *in natura* quanto para cada unidade experimental da silagem no momento da abertura.

Para a realização das análises bromatológicas, três amostras de aproximadamente 300 gramas do capim picado e uma amostra de cada unidade experimental após abertura dos silos foram acondicionadas em estufa com circulação de ar forçada a 55 °C por 72 horas para determinação da matéria pré-seca. Os materiais foram retirados da estufa e após equilíbrio com a temperatura ambiente, foram pesadas e trituradas individualmente em moinho de facas tipo Willey com peneira com crivo de dois milímetros. Posteriormente foram determinados os teores de matéria seca (MS), cinzas (CIN) e proteína bruta (PB) segundo as metodologias descritas pela Association Official Analytical Chemists (AOAC, 2010), e teores de fibra em detergente neutro (FDN) em conformidade com Goering e Van Soest (1970). Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram estimados pela equação CNF = 100 – (PB% + FDN% + EE% + MM%).

Para a determinação do potencial hidrogeniônico (pH) do material pós a abertura do silo, amostras de nove gramas do conteúdo de cada silo experimental foram coletadas e diluídas em 60 ml de água destiladas. Essa mistura permaneceu em repouso por 30 minutos para a leitura do potencial hidrogeniônico, com auxílio de potenciômetro digital (Gehaka modelo PG1800, São Paulo, Brasil) como descrito pela técnica de Silva e Queiroz (2002).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em fatorial 2x2, comparando os Minissilos

Controle – sem aditivo, utilizando tubo de PVC ou saco de polietileno (CONTTUBO e CONTSACO respectivamente) com minissilos inoculados com os fungos nesses mesmos dois tipos de material (MIXTUBO e MIXSACO). A avaliação do crescimento microbiano foi estimada pela quantificação UFC/g MS de forragem ou silagem e foram analisados após transformação em logX+10.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de normalidade dos resíduos pelo teste Shapiro-Wilk $p < 0,05$, para a análise da caracterização microbiológicas e valores de pH as medianas foram analisadas pelo teste de Kurskal Wallis $p < 0,05$ utilizando-se o pacote estatístico RStudio 3.6.0.

3 Resultados e Discussão

Neste estudo, a análise do capim-elefante antes do processo de ensilagem indicou elevada contagem de fungos micelianos ($3,3 \times 10^5$ UFC/ mL), fungos leveduriformes ($2,0 \times 10^6$ UFC/ mL) e Enterobacteriaceae ($1,0 \times 10^6$ UFC/ mL). Em estudo realizado por Wambacq et al. (2016) que ao avaliarem a população microbiológica presente em capins e milho antes do processo de ensilagem reportaram também a presença de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* no material.

Resultados observados no presente estudo se assemelha com os reportados por Romero et al. (2017) onde é observada a presença de uma população de leveduras ($\sim 4,9 \pm 0,097$ log UFC/g) e de fungos micelianos ($3,47 \pm 0,075$ log UFC/g) em aveia pré-ensilada. A maior população de fungos leveduriformes e micelianos e presença de Enterobacteriaceae poderia ser explicada pelo contato do material com o solo após a colheita e o favorecimento de condições de crescimento ideais para a espécie (McDONALD et al., 1991; PAHLOW et al., 2003; WILLIAMS et al., 2013).

Neste estudo não foram detectadas bactérias lácticas no capim-elefante pré-ensilado. Ferreira et al. (2013) apontam que gramíneas tropicais tendem a ter uma baixa contagem de bactérias lácticas, inferior a 10^6 UFC/ g de forragem fresca. Outros estudos demonstraram que elevadas concentrações de fungos leveduriformes na forragem pode promover dano no início do processo fermentativo, devido à competição com bactérias do ácido láctico (BAL), que são consideradas desejáveis (DRIEHUIS, 2010).

Observou-se que as médias dos valores de pH dos diferentes minissilos avaliados na abertura se mantiveram abaixo de 4,5, dentro da faixa de pH considerado como ótima para qualidade de silagem (McDONALD et al., 1991). Entretanto, observou-se diferença significativa na abertura com relação ao uso do inoculantes nos grupos que utilizaram o filme de lâmina de polietileno ($p = 0,004$; o MIXSACO apresentou o valor de pH de 4,24 e o CONTSACO de 3,93. (Quadro 2).

Quadro 2 - Características de pH e estabilidade aeróbica de silagens de capim-elefante conservado em minissilo de PVC ou de saco de lâmina de polietileno inoculados ou não com fungos do trato digestório de ruminantes e avaliação de tempo de quebra de estabilidade (TQE) após 10 dias de abertura da silagem

Grupo Experimental	pH na abertura	pH máximo*	TQE (dias)
CONTTUBO ¹	4,05 b	8,45 b	4,6 b
CONTSACO ²	3,93 b	8,83 a	1,57 c
MIXTUBO ³	4,4 a	8,36 b	7,6 a
MIXSACO ⁴	4,24 a	6,98 b	6 ab
CV(%)	6,42%	14,15%	38,66%

Nota: 1 CONTTUBO = controle utilizando silo tubo de PVC; 2 CONTSACO controle utilizando sacos plásticos de polietileno; 3 MIXTUBO = mistura dos fungos *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* em silos de tubo de PVC; 4 MIXSACO = mistura dos fungos *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* em silos de sacos plásticos de polietileno; Dados não paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$);

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste T ($p < 0,05$); *pH máximo obtido dentro dos 10 dias de avaliação após abertura; CV= coeficiente de Variação.

Fonte: Dados da pesquisa.

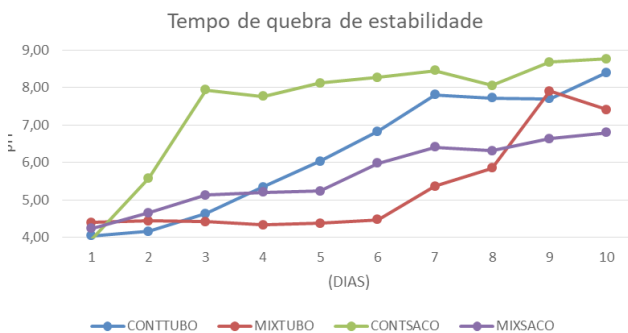
De acordo com Liu et al. (2020), o valor de pH influencia diretamente a qualidade da silagem e adequada fermentação, sendo este um dos principais fatores avaliados e importante para o processo de ensilagem.

Ao avaliar a interação do pH na abertura com relação ao tipo de minissilo (TUBO / SACO), não houve diferença significativa, demonstrando resultado semelhante ao descrito por Romero et al. (2017), que ao avaliar a silagem de aveia em silos de balde de plástico de 19 L e de sacos de polietileno e foi observado valores de pH 4,32 e 4,34 respectivamente ($p = 0,68$).

Rodrigues et al. (2002) observaram resultado semelhante em um experimento com capim-elefante, comparando os silos experimentais feitos de balde de plástico e de saco de plástico (pH de 3,8 e 4,2, respectivamente) em comparação ao silo comercial tipo trincheira (pH 4,6). Os autores indicaram que a melhor qualidade das silagens experimentais foi decorrência da melhor compactação nesses minissilos experimentais.

O valor de pH máximo após abertura em um período de 10 dias foi maior para os minissilos CONTSACO (8,83) em comparação ao MIXSACO (6,98), ($p = 0,002$). Para o no tempo de quebra de estabilidade (TQE) os tratamentos MIXSACO e CONTSACO (6 e 1,57 dias respectivamente) apresentaram resultados inferiores quando comparados aos minissilos MIXTUBO e CONTTUBO (7,6 e 4,6 dias respectivamente), ($p = 0,001$). Observou-se que o CONTSACO apresentou quebra de estabilidade logo no início do período de avaliação (Figura 2).

Figura 2 - Tempo de Quebra de Estabilidade das silagens de capim-elefante inoculadas com mix dos fungos *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* (MIX) ou não inoculadas (CONTROLE) e em diferentes formas de conservação (tubo e saco) analisados por um período de 10 dias



Fonte: Dados da pesquisa.

A manutenção da estabilidade aeróbica reduz a deterioração

Quadro 3 - Médias de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de silagem e erro padrão da média para microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos presentes em silagens de capim-elefante inoculadas com mix dos fungos *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* (MIX) ou não inoculadas (CONTROLE) e em diferentes formas de conservação (tubo e saco) no momento da abertura

Variáveis	CONTTUBO ¹	CONTSACO ²	MIXTUBO ³	MIXSACO ⁴	Erro Padrão
<i>Diplococos</i>	1,78 x10 ⁶	1,69 x10 ⁶	0,00 x10 ⁰	1,11 x10 ⁸	1,19 x10 ⁷
*Estreptobast	2,44 x10 ⁶ a	0,00 x10 ⁰ b	8,19 x10 ⁵ ab	1,73 x10 ⁵ b	2,41 x10 ⁵
Bastonete Gram +	1,02 x10 ⁶	3,49 x10 ⁶	1,28 x10 ⁶	1,18 x10 ⁶	2,53 x10 ⁵
<i>Lactobacillus</i>	3,46 x10 ⁶	3,49 x10 ⁶	2,10 x10 ⁶	1,36 x10 ⁶	2,28 x10 ⁵
Total bac. láctica	5,24 x10 ⁶	5,48 x10 ⁶	2,27 x10 ⁶	1,13 x10 ⁸	1,18 x10 ⁷
Bastonete Gram -	0,00 x10 ⁰	0,00 x10 ⁰	5,56 x10 ⁰	7,94 x10 ¹	5,79 x10 ¹
Cocobastonete	0,00 x10 ⁰	5,56 x10 ¹	1,11 x10 ¹	1,11 x10 ³	1,18 x10 ²
*Total enterobac	0,00 x10 ⁰	5,56 x10 ¹	1,67 x10 ¹	1,11 x10 ³	1,18 x10 ²
Levedura	4,17 x10 ⁴	6,67 x10 ³	5,00 x10 ³	1,51 x10 ³	4,07 x10 ³
Fungos	8,33 x10 ³ b	4,76 x10 ⁵ ab	5,04 x10 ⁶ ab	1,33 x10 ⁷ a	1,33 x10 ⁶

Nota: 1 CONTTUBO = controle utilizando silo tubo de PVC; 2 CONTSACO controle utilizando sacos plásticos de polietileno; 3 MIXTUBO = mistura dos fungos *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* em silos de tubo de PVC; 4 MIXSACO = mistura dos fungos *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* em silos de sacos plásticos de polietileno; Dados não paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste T ($p < 0,05$)*Enterobastonetes *Total enterobactérias.

Fonte: Dados da pesquisa.

Na composição da comunidade das bactérias lácticas com morfologia de diplococos, não se observou efeito significativo entre a forma de conservação (saco de polietileno ou tubo de PVC) e no tipo de inóculo. Não houve diferenças significativas para outras populações microbianas analisadas no momento da abertura dos minissilos (Quadro 3).

Não foi observada diferença significativa na contagem de leveduras entre os diferentes Minissilos inoculados ou não com MIX, demonstrando que não houve entrada de oxigênio durante o processo. Entretanto esse resultado difere daquele descrito por Romero *et al.* (2017), que analisou silos com baldes de plástico de 19 L em comparação saco de polietileno e observou que teve maior concentração de leveduras no silo balde (3,04 vs. 2,18 ± 0,484 log UFC/g), essas diferenças podem ser explicadas devido à maior disponibilidade de oxigênio durante o processo de fermentação em balde de plástico em comparação com sacos de polietileno (JOHNSON *et al.*, 2005).

Não houve diferença na concentração de UFC dos isolados

da silagem após exposição ao ar, ou seja, a taxa de oxidação dos açúcares solúveis, etanol e dos ácidos, e quando não há essa estabilidade, tem como resultado o aumento do pH e diminuição da digestibilidade e conteúdo energético (JOBIM *et al.*, 2007). Duniere *et al.* (2017) relatam que o consumo do ácido láctico por leveduras aumenta conforme a silagem é exposta ao oxigênio, o que faz com que ocorra a ascensão do pH do meio.

Nas análises microbiológicas pós fermentação, CONTTUBO apresentou maior contagem de estreptobastonetes Gram positivos em comparação ao CONTSACO ($p=0,036$, o Q 3). A maior contagem de estreptobastonetes Gram positivos poderia ser atribuída ao ambiente anaeróbico proporcionado pela compactação do material durante o processo de ensilagem (VELOSO, 2020).

fúngicos para o uso do inoculante ou não e entre os tipos de minissilos, que corroboram com estudos realizados comparando o uso de minissilo de tubo de vidro com minissilo de saco plástico a vácuo onde não apresentaram diferença significativa sobre a concentração fúngica. Romero *et al.* (2017) relatam que um ambiente anaeróbico e ácido da silagem não favorece o crescimento de fungos. Porém deve-se atentar, pois estudos mostraram que mesmo uma baixa contagem de fungos pode haver micotoxinas ativas presentes no meio, e que essa presença está associada a existência de oxigênio durante a fermentação e aumento no pH (ÁVILA; CARVALHO, 2020).

Após realizado as análises bromatológicas pós ensilagem, foi observado um maior teor de FDN nos grupos MIXTUBO e MIXSACO ($p= 0,017$) quando comparados aos grupos que não receberam os inóculos fúngicos, CONTTUBO e CONTSACO. Para as variáveis MM, PB, EE, CNF e FDA não houve diferença estatística quanto ao uso do inoculante ou o tipo de silo utilizado (Quadro 4).

Quadro 4 - 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 inoculadas com fungos provenientes do rúmen de bovinos após 30 dias de ensilagem

Grupo Experimental	MM	PB	EE	CNF	FDN	FDA
CONTTUBO ¹	11,50 ± 0,27	3,81 ± 0,39	2,81 ± 0,99	9,08 ± 1,50	72,80 ± 2,49	45,71 ± 4,49
CONTSACO ²	11,60 ± 0,41	4,13 ± 0,46	2,28 ± 0,61	8,10 ± 1,81	73,90 ± 1,91	49,06 ± 5,52
MIXTUBO ³	11,45 ± 0,41	3,46 ± 0,39	2,38 ± 0,53	7,17 ± 1,56	75,55* ± 2,32	45,59 ± 4,21
MIXSACO ⁴	11,30 ± 0,56	3,73 ± 0,67	2,15 ± 0,69	7,25 ± 1,65	75,57* ± 1,25	47,64 ± 2,80
CV (%)	4,06	14,2	32,36	22,62	2,95	10,03

Nota: 1 CONTTUBO = controle utilizando silo tubo de PVC; 2 CONTSACO controle utilizando sacos plásticos de polietileno; 3 MIXTUBO = mistura dos fungos *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* em silos de tubo de PVC; 4 MIXSACO = mistura dos fungos *Aspergillus terreus* e *Trichoderma longibrachiatum* em silos de sacos plásticos de polietileno;

Médias seguidas por * diferem entre si pelo teste T ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa.

Wang *et al.* (2019) observaram que o uso do fungo *Piromyces* spp. isolados do fluido ruminal potencializou a degradação da fibra bruta durante o processo fermentativo da silagem de milho. Fungos anaeróbicos provenientes do rumem tem como meio degradar os tecidos fibrosos do capim a partir da liberação de secreções enzimáticas e crescimento de rizoides (BRUNECKY *et al.*, 2013; HAITJEMA *et al.*, 2014).

Um experimento avaliando o efeito do uso de diferentes materiais para confecção de silos laboratoriais como balde plástico rígido, canos de PVC, sacolas de plástico flexível com capacidade para 5 kg e 10 kg, e garrafa pet com volume para 2 litros, demonstraram que não houve diferenças significativas nas variáveis PB, MM, EE e FDA, das forrageiras fermentadas para os diferentes tipos de mini silos utilizados, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho (ORTIZ *et al.*, 2021).

4 Conclusão

A utilização do saco de polietileno na confecção de minissilos experimentais não alterou os parâmetros bromatológicos, a contagem microbiológica, o pH na abertura além de não ter prejudicado o processo fermentativo da forragem, sendo assim uma alternativa viável para substituição do silo de tubo PVC para produção de silos em escala laboratorial.

Neste estudo, a inoculação com os microrganismos isolados do ambiente ruminal promoveu maior tempo de estabilidade aeróbica nas silagens, indicando melhor qualidade e conservação da silagem pós-abertura. Entretanto, é importante a continuidade dos estudos utilizando essa metodologia para maior elucidação dos seus efeitos utilizando outras espécies forrageiras ou inoculantes.

Referências

ABRÃO, F.O. *et al.* Notable fibrolytic enzyme production by *Aspergillus* spp. isolates from the gastrointestinal tract of beef cattle fed in lignified pastures. *PLoSOne*, v.12, n.8, p.1-13, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0183628

ALTSCHUL, S.F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997. doi: 10.1093/nar/25.17.3389

ALVARES C.A. *et al.* Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Zeitschrift*, v.22, n.6, p.711-728, 2014. doi: 10.1127/0941-2948/2013/0507

AOAC. Official Methods of Analysis. 19th ed. Association of Official Analytical Chemistry. Gaithersburg, 2010.

ÁVILA, C.L.S.; CARVALHO, B.F. Silage fermentation - updates focusing on the performance of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.*, v.128, n.4, p. 966-984, 2020. doi: 10.1111/jam.14450

BORREANI, G *et al.* Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *J. Dairy Sci.*, v.101, n.5, p.3952-3979, 2018. doi: 10.3168/jds.2017-13837

BRUNECKY, R. *et al.* Revealing Nature's Cellulase Diversity: The Digestion Mechanism of Caldicellulosiruptor besicii CelA. *Science* v.342, p.1513-1516, 2013. doi: 10.1126/science.1244273

DRIEHUIS, F. *et al.* Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass Forage Sci.*, v.56, n.4, p.330-343, 2010. doi: 10.1046/j.1365-2494.2001.00282.x

DUNIÈRE, L. *et al.* Bacterial and fungal core microbiomes associated with small grain silages during ensiling and aerobic spoilage. *BMC Microbiol.*, v.17, n.1, p.50, 2017. doi: 10.1186/s12866-017-0947-0

FERREIRA, D.J. *et al.* Silage fermentation and chemical composition of elephant grass inoculated with rumen strains of *Streptococcus bovis*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.183, n. 1-2, p.22-28, 2013. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2013.04.020

GERMAIN, G.; SUMMERBELL, R. Identifying filamentous fungi: a clinical laboratory handbook. Belmont: Star Publishing Company, 2011.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analyses: apparatus, reagents, procedures, and some applications. *Agricul. Res. Serv.*, n.379, p.19, 1970.

HAITJEMA, C. *et al.* Anaerobic gut fungi: advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production. *Biotechnol. Bioengin.*, v.111, n.8, p.1471-1482, 2014. doi 10.1002/bit.25264

JOBIM, C.C. *et al.* Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. *Rev. Bras. Zootec.*, v.36, p.101-119, 2007. doi: 10.1590/S1516-35982007001000013

JOHNSON, H.E. *et al.* Vacuum packing: a model system for laboratory-scale silage fermentations. *J. Appl. Microbiol.*, v.98, n.1, p.106-113. 2005. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02444.x

LIU, B. *et al.* Impact of molasses and microbial inoculants on fermentation quality, aerobic stability, and bacterial and fungal microbiomes of barley silage. *Scie. Rep.*, v.10, n.1, p.1-10, 2020.

doi:10.1038/s41598-020-62290-7

McDONALD, P. *et al.* The biochemistry of silage. *Chalcombe publications*. Edinburgh: Edinburgh School of Agriculture, 1991.

MONÇÃO, F.P. *et al.* Nutritional Value of BRS Capiacu Grass (*Pennisetum purpureum*) silage associated with cactus pear. *Iran. J. App. Anim. Sci.*, v.10, n.1, p.25-29, 2020. doi: 10.34117/bjdv6n4-168

MUCK, R. E. *et al.* Silage review: recent advances and future uses of silage additives. *J. Dairy Sci.*, v.101, n.5, p.3980-4000, 2018. doi:10.3168/jds.2017-13839

MURRAY, P. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 2007.

OLIVEIRA, A.S. *et al.* 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. *J. Dairy Sci.*, v.100, n.6, p.4587-4603, 2017. doi: 10.3168/jds.2016-11815

OLIVEIRA, E.R. *et al.* Valor nutricional de silagem de capim-mombaça com aditivos agroindustriais. *Semina Ciênc. Agrár.*, v.35, n.3, p.1543-1556, 2014. doi: 10.5433/1679-0359.2014v35n3p1543

ORTIZ, S. *et al.* Silos experimentais e a composição bromatológica de silagem de milho e sorgo. *Vivências*, p. 229-242. 2021. doi: 10.31512/vivencias.v17i33.462

PAHLOW, G. *et al.* Microbiology of ensiling. Silage science and technology. *Agron. Monograph*, v.42, p.31-94, 2003. doi: 10.2134/agronmonogr42.c2

RIGUEIRA, J. P. S. *et al.* Níveis de glicerina bruta na ensilagem de capim Tifton 85 (*Cynodon dactylon*): perfil fermentativo e valor nutricional. *Rev Ciênc. Agrár.*, v.40, n.5, p.654-663, 2017. doi: 10.19084/RCA16141

RODRIGUES, P.H.M. *et al.* Composição bromatológica e perfil fermentativo da silagem de capim-elefante obtida em

diferentes tipos de silos experimentais e no silo tipo trincheira. *Rev Bras. Zootec.*, v.31, p.2386-2392, 2002. doi:10.1590/S1516-35982002000900030

ROMERO, J.J. *et al.* Laboratory silo type and inoculation effects on nutritional composition, fermentation, and bacterial and fungal communities of oat silage. *J. Dairy Sci.*, v.100, n.3, p.1812-1828. 2017. doi:10.3168/jds.2016-11642

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análises de alimentos (métodos químicos e biológicos). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p. doi: 10.3168/jds.2016-11642

TAHER, H. I. *et al.* Caracterización del uso del silo bolsa en la provincia de Buenos Aires. *Cienc. Agrónom.*, v.33, n.19, p.25-30, 2019. doi: 10.35305/agro33.250

VELOSO, A.C.R. Inoculação de silagem de capim-elefante com microrganismos do trato digestório de bovinos. 2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/1843/36436>

WAMBACQ, E. *et al.* Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: a review. *J. Sci. Food Agricul.*, v.96, n.7, p.2284-2302, 2016. doi: 10.1002/jsfa.7565

WANG, D. *et al.* 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, n.1, p.121, 2019. doi: 10.1186/s13568-019-0846-x

WEINBERG, Z.G.; CHEN, Y. Effects of storage period on the composition of whole crop wheat and corn silages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.185, n.3/4, p.196-200, 2013. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2013.08.009

WHITE, T.J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, v. 18, n. 1, p.315-322, 1990.

WILLIAMS, T.R. *et al.* Season, irrigation, leaf age, and *Escherichia coli* inoculation influence the bacterial diversity in the lettuce phyllosphere. *PLoS One*, v.8, n.7, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0068642