



RAFAEL CARVALHO AMARAL

**SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA FOR
ENHANCING THE QUALITY OF ELEPHANT GRASS
SILAGE**

LAVRAS-MG

2018

RAFAEL CARVALHO AMARAL

**SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA FOR
ENHANCING THE QUALITY OF ELEPHANT GRASS
SILAGE**

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

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila

Orientadora

Dra. Beatriz Ferreira Carvalho

Coorientadora

LAVRAS – MG

2018

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

Amaral, Rafael Carvalho.

Selection of lactic acid bacteria for enhancing the quality of
elephant grass silage / Rafael Carvalho Amaral. - 2018.

78 p.

Orientador(a): Carla Luiza da Silva Ávila.

Coorientador(a): Beatriz Ferreira Carvalho.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Silagem de capim-elefante. 2. Seleção de bactérias do ácido
lático. 3. Inoculante. I. Ávila, Carla Luiza da Silva. II. Carvalho,
Beatriz Ferreira. III. Título.

RAFAEL CARVALHO AMARAL

**SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA FOR
ENHANCING THE QUALITY OF ELEPHANT GRASS
SILAGE**

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

APROVADA em 08 de maio de 2018

Prof^a Dr^a. Carla Luiza da Silva Ávila

Prof^a Dr^a. Rosane Freitas Schwan- UFLA

Dr. Mirton José Frota Morenz- Embrapa Gado de Leite

Profa. Dra. Carla Luiza da Silva Ávila
Orientadora

LAVRAS – MG

2018

Aos meus pais Arriel e Imelda pelo
carinho, incentivo e apoio
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Arriel e Imelda pelo esforço e tornar possível essa conquista

À CAPES pelo apoio financeiro

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realizar este trabalho

À professora Dra. Carla Luiza da Silva Ávila pela orientação, confiança e ensinamentos

À Dra. Beatriz pela coorientação, disposição e ensinamentos

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pelos ensinamentos

Ao Dr. Mirton José Frota Morenz e funcionários da Embrapa Gado de Leite pela parceria e receptividade

Ao meu irmão Douglas pelas dicas, apoio e amizade

À Patrícia pelo companheirismo, amor e incentivo

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia Agrícola, em especial à Rose pela paciência e auxílio, à Cidinha pela preocupação e boa disposição, à Ivani pela solicitude e ao Paulinho pelos momentos de descontração

À Daviane pela paciência, auxílio e dicas, o que tornou possível a realização deste trabalho

Ao Gustavo, Tatiane, Sillas e Lilian pela disposição em ajudar com as tarefas de laboratório

Aos alunos de Iniciação Científica, em especial ao Eloy pela disposição

Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia pela assistência

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial, José, Daelen, Cibelli e Suzana por dividirem momentos de descontração e angústia e pela amizade que formamos durante esses 2 anos

Aa todos os meus amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para a minha formação

Muito Obrigado!

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar a população de bactérias do ácido láctico de silagens de capim-elefante, selecionar cepas promissoras para serem utilizadas como inoculantes e avaliar o efeito destas em silagens de capim-elefante cultivar BRS Capiáçu. No experimento 1 foi feito o isolamento de BAL (bactérias do ácido láctico) de silagens de capim-elefante e a caracterização e seleção dessas cepas e de cepas de BAL previamente isoladas das silagens de milho e de cana-de-açúcar. No experimento 2 as treze cepas que apresentaram maior crescimento, redução do pH, produção de metabólitos de interesse e foram capazes de inibir microrganismos indesejáveis e a cepa CCMA 0170, foram avaliadas em silagens de capim-elefante cultivar BRS Capiáçu durante 60 dias de ensilagem. Foram avaliadas a composição química, características fermentativas, perdas de MS (matéria seca), população de microrganismos e estabilidade aeróbia. O processo fermentativo da silagem de capim-elefante foi caracterizado pela sucessão de *Lactobacillus sakei*, *L. plantarum* group, *Pediococcus pentosaceus* e *L. brevis*. As silagens inoculadas com as cepas CCMA 0170 (*L. hilgardii*) CCMA 1394 e CCMA 1402 (*L. plantarum*), CCMA 1409 (*L. brevis*), CCMA 1363 e CCMA 1364 (*L. farraginis*) apresentaram menores perdas de MS e alta estabilidade aeróbia. As silagens inoculadas com as cepas CE78, CE90, CCMA 1364, CCMA 1366, CCMA 0173 e CCMA 0170 apresentaram as menores populações de leveduras. Entre as cepas que resultaram em menores perdas de MS na silagem, a cepa CCMA 1364 se destaca por produzir silagens com menor população de leveduras, níveis não detectáveis de ácido butírico além de maior estabilidade aeróbia. Durante a avaliação das cepas foi evidenciado que embora cepas isoladas da própria silagem sejam adaptadas às características da forrageira, é possível encontrar cepas isoladas de diferentes silagens que podem ser promissoras para uso em diferentes forrageiras. Isso ressalta a importância da pesquisa e avaliação de novas cepas adaptadas ao processo fermentativo de cada forrageira.

Palavras-chave: MALDI-TOF. Inibição de microrganismos indesejáveis. Inoculante. Ácido láctico. Estabilidade aeróbia.

ABSTRACT

The goal of this study was to characterize the elephant grass silages lactic acid bacteria population to further select promising strains to be used as inoculants and to evaluate its effects on elephant grass cultivar BRS Capiaçú silage. In the experiment one, the isolation of LAB (lactic acid bacteria) from elephant grass silages and the characterization and selection of these strains and the previously isolated from maize and sugarcane silages were done. In the experiment two, thirteen strains showed the highest growth, pH reduction interesting metabolites production and ability to inhibit the growth of undesirable microorganisms. The strain CCMA 0170 was evaluated in elephant grass cultivar BRS Capiaçú silage during 60 days of ensilage. The chemical composition, fermentative characteristics, DM loss, microorganisms population and aerobic stability were evaluated. The fermentative process of elephant grass silage was characterized by a succession of *Lactobacillus sakei*, *L. plantarum* group, *Pediococcus pentosaceus* and *L. brevis*. The silages inoculated with CCMA 0170 (*L. hilgardii*, CCMA 1394 and CCMA 1402 (*L. plantarum*), CCMA 1409 (*L. brevis*), CCMA 1363 and CCMA 1364 (*L. farraginis*) strains showed lower losses of DM and high aerobic stability. The CCMA 1364 strain showed the lowest yeast populations in the silages inoculated with CE 78, CE 90, CCMA 1364, CCMA 1366, CCMA 0173 and CCMA 0170 strains. During the strains evaluation, was evidenced that, although strains isolated from the silage itself are adapted to the characteristics of the forage. It is possible to find isolated strains of different silages that can be promising for further use in different forages. This highlights the importance of the research and evaluation of new strains adapted to the fermentative process of each forage.

Keywords: MALDI-TOF. Inhibition of undesirable microorganisms. Inoculant. Lactic acid. Aerobic stability.

PRIMEIRA PARTE	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1 Utilização do capim-elefante como silagem.....	2
2.1.1 Capim-elefante cultivar BRS Capiacu.....	3
2.2 Processo de ensilagem.....	4
2.3 Microbiota da silagem	6
2.3.1 Bactérias do Ácido Lático (BAL).....	6
2.3.2 Bactérias do Ácido Propiônico (BAP).....	7
2.3.3 Gênero <i>Clostridium</i>	8
2.3.4 Gênero <i>Bacillus</i>	9
2.3.5 Gênero <i>Listeria</i>	10
2.3.6 Enterobactérias	11
2.3.7 Leveduras	11
2.3.8 Fungos Filamentosos	12
2.4 Utilização de inoculantes em silagens.....	13
2.5. Seleção de microrganismos para a utilização em inoculantes	16
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
SEGUNDA PARTE	28
SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA FOR ENHANCING THE QUALITY OF ELEPHANT GRASS SILAGE	28
Introduction	30
Materials and methods.....	31
Experiment 1: Selection of bacterial strains as inoculants	31
Elephant grass ensilage.....	31
Enumeration, isolation and identification of bacteria population from elephant grass silages	32
Origin of the strains used in the selection process.....	33
Growth evaluation at diferente temperatures.....	33
Growth evaluation, pH-reducing ability, and fermentation products products in aqueous extract of elephant grass	33
Microorganisms Inhibition Test.....	34
Experiment 2: Evaluation of preselected strains as inoculants in elephant grass silage	36
Forage and ensiling conditions	36

Analytical procedures	37
Evaluation of aerobic stability	38
Experimental design and statistical analysis	38
Results	38
Experiment 1: Selection of bacterial strains as inoculants	39
Experiment 2: Evaluation of pre-selected strains as inoculants in elephant grass silage.....	41
Discussion.....	43
Conclusions	51
References	58

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

Em países de clima tropical, onde se tem duas estações bem definidas (verão chuvoso e inverno seco), a produção de plantas forrageiras é sazonal. Esta sazonalidade é consequência de fatores como luminosidade, temperatura e precipitação pluviométrica, resultando no verão com excedente de forragens e inverno com escassez de forragens, sendo essas muitas vezes, de baixa qualidade. A conservação de forragens pelo método da ensilagem torna a produção agropecuária menos dependente das condições climáticas, sendo um ponto estratégico a ser considerado pelo produtor (SILVEIRA, 2009). O processo de ensilagem consiste na preservação da forragem úmida através da combinação entre o ambiente anaeróbio e a fermentação de bactérias do ácido láctico (BAL) presentes na cultura ou adicionadas através de aditivos, onde o objetivo principal é evitar a perda de nutrientes e de matéria seca (MS) através da inibição de microrganismos indesejáveis (MUCK, 2010).

Dentre as diversas culturas utilizadas como silagem, o capim-elefante vem se destacando atualmente devido à procura pela obtenção de máximo rendimento por área explorada, fator este importante para propriedades com áreas limitadas. Além disso, esta planta forrageira é facilmente cultivável, possui alta adaptabilidade e boa aceitabilidade pelos animais (LIMA & EVANGELISTA, 2001; PEREIRA et al., 2010).

Apesar de suas vantagens, o capim-elefante no momento ideal para o corte pode apresentar alto teor de umidade e baixo teor de carboidratos solúveis, o que torna inadequado o seu processo fermentativo e conseqüentemente, causa perdas significativas no valor nutritivo da silagem confeccionada (GUIM et al., 2002). Essas condições tornam favorável a presença de bactérias do gênero *Clostridium*, que fermentam os açúcares, o ácido láctico e aminoácidos, produzindo ácido butírico, aminas e amônia, com resultantes perdas na MS, aumento do pH, queda na estabilidade aeróbia e redução na palatabilidade da silagem (FLYTHE & RUSSEL, 2004), e além disso, pode ocorrer a perda de nutrientes pela formação de efluente (ZANINE et al., 2010). Com o objetivo de amenizar essas perdas, e auxiliar o processo fermentativo das silagens, tem-se utilizado inoculantes microbianos no processo de ensilagem (HARRISON & BLAUWIEKEL, 1994) para tornar mais eficiente a produção de ácidos orgânicos, acelerar a queda do pH, favorecer a recuperação da MS e preservar os nutrientes da forragem conservada através da inibição de microrganismos indesejáveis (KUNG JR. et al., 2003).

Os inoculantes microbianos são a classe de aditivos mais utilizadas no mundo, são compostos por BAL homofermentativas, heterofermentativas ou a combinação destas duas

(ZOPOLLATTO et al., 2009) e se destacam por não apresentarem efeitos corrosivos aos maquinários, não poluírem o meio ambiente, e por serem de fácil conservação e manuseio (FILYA et al., 2000). No entanto, em alguns estudos disponíveis na literatura, seus resultados nem sempre foram positivos sobre a composição química e parâmetros fermentativos das silagens (KUNG JR. et al., 2003; MUCK, 2010), tornando assim sua utilização questionável. A atuação dos inoculantes em silagens é afetada principalmente pela compatibilidade destes com a planta a ser inoculada devido a diferenças principalmente nas composições químicas e tipo de substratos armazenados nas diferentes culturas forrageiras (MUCK, 2008).

Recentemente, pesquisas relacionadas à seleção de inoculantes têm ganhado importância mundial devido à obtenção de cepas promissoras, no entanto, para silagens de capins tropicais existem ainda poucos dados tanto com relação ao perfil microbiano, quanto à seleção de inoculantes para este tipo de silagem.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Utilização do capim elefante como silagem

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é uma gramínea forrageira de clima tropical originária da África, introduzida no Brasil em 1920. Apresenta o ciclo vegetativo perene, crescimento cespitoso, propagação vegetativa, exigência em fertilidade do solo e não possuem tolerância ao frio, geadas e solos encharcados (REIS et al., 2014). Pode ser fornecido aos animais através de pastejo direto, capineira, silagem ou feno (PEREIRA et al., 2010).

Depois do milho e do sorgo, é uma das forrageiras tropicais que apresenta melhores características para ser ensilada, devido a sua alta produtividade, grande número de variedades, alta adaptabilidade, facilidade de cultivo, bom valor nutritivo (quando nova), boa aceitabilidade pelos animais (LIMA & EVANGELISTA, 2001) e resistência a condições climáticas desfavoráveis (QUEIROZ FILHO et al., 2000)

No momento da colheita do capim-elefante deve-se realizar um equilíbrio entre o rendimento da silagem e a sua qualidade, já que à medida que se aumenta a produção de matéria seca (MS) o valor nutritivo é reduzido. Recomenda-se então que, após a realização do primeiro corte (entre 15 a 20 cm acima do solo), seja feita a colheita da planta forrageira com a idade entre 60 e 90 dias, momento em que a planta atinge uma altura aproximada de 1,80 metros e possui rendimento em torno de 50 a 80 toneladas/hectares. No entanto, a planta nessa idade ideal de corte apresenta baixo teor de carboidratos solúveis (CHO), alto poder tampão e excesso

de umidade, fatores estes limitantes para a produção de silagens de boa qualidade (LIMA & EVANGELISTA, 2001). O alto teor de umidade além de prejudicar o processo de fermentação, pode causar perdas de nutrientes altamente digestíveis por efluentes gerados (SOUZA et al., 2003).

Com o objetivo de aumentar o teor de MS e a concentração de carboidratos solúveis dessa gramínea, tem-se adotado duas práticas, o emurchecimento e o uso de aditivos (SOUZA et al., 2003; TOSI et al., 1999), sendo a primeira uma prática contestável devido ao acréscimo de tempo entre o corte e a vedação do silo, o que é indesejável, já que resulta no aumento do processo respiratório e atividade proteolítica da planta, reduzindo assim os substratos para a fermentação e aumentando a concentração de nitrogênio não protéico (NNP) (McDONALD, 1991).

2.1.1 Capim-elefante cultivar BRS Capiáçu

A BRS Capiáçu é uma nova cultivar obtida pelo programa de melhoramento do capim-elefante realizado pela Embrapa Gado de Leite (Figura 1). Dentre suas características, destaca-se seu alto porte, podendo atingir 4,20 m de altura, formato ereto, boa resistência ao tombamento, o que a diferencia das demais cultivares, tolerância ao estresse hídrico, facilidade para a colheita mecânica e touceiras densas. Esta cultivar possui produção média de 300 t/ha/ano de biomassa, considerando três cortes ao ano, o que representa aproximadamente o triplo da produção de culturas como o milho e o sorgo (PEREIRA et al., 2016).

A colheita da BRS Capiáçu para a ensilagem deve ser realizada quando a planta forrageira atingir uma altura média entre 3,5 a 4 m, o que representa o momento em que possui a idade de rebrota de aproximadamente 90 a 110 dias, e desta forma, atinge uma boa relação entre produtividade e valor nutritivo. Apesar da silagem da BRS Capiáçu necessitar de maior quantidade de concentrado na dieta de vacas em lactação se comparada com a silagem de milho, a estimativa do custo médio de produção por hectare é aproximadamente 57% inferior, devido a sua alta produtividade, tornando-se desta forma, uma importante forma de suplementação volumosa (PEREIRA et al., 2016).



Figura 1- Capim-elefante cultivar BRS Capiacu

2.2 Processo de ensilagem

Ensilagem é um método utilizado na conservação da forragem úmida através da combinação de um ambiente anaeróbio com a fermentação dos carboidratos solúveis. Como principal produto desta fermentação tem-se o ácido lático, responsável pela queda do pH que age na inibição de microrganismos deteriorantes da silagem (MUCK, 2010).

O objetivo principal da ensilagem é manter a planta forrageira disponível durante todo o ano como fonte de alimentação para os ruminantes, apresentando o mínimo de perda do seu valor nutritivo (DUNIÈRE et al., 2013). Este processo pode ser dividido em quatro fases: 1) fase aeróbia; 2) fase de fermentação ativa; 3) fase estável e 4) fase de descarga ou desabastecimento do silo (WEINBERG & MUCK, 1996).

A fase aeróbia corresponde ao momento de enchimento do silo até poucas horas após o seu fechamento, intervalo de tempo em que a temperatura aumenta e o oxigênio atmosférico retido é reduzido constantemente como resultado da respiração das células da planta e dos microrganismos aeróbios. As enzimas das plantas como proteases e carboidrases ainda estão ativas nesta fase, pois o pH do meio se encontra na faixa de 6,0 a 6,5 que é comum em forragens frescas. A duração da fase aeróbia é dependente do tempo de enchimento, compactação e vedação do silo. Quanto maior essa duração, a silagem estará propícia ao aumento excessivo da temperatura, assim como à degradação de proteínas e carboidratos solúveis (McDONALD et al., 1991).

Na fase de fermentação ativa há a presença mínima de oxigênio, e sua duração varia de acordo com a característica da planta forrageira e das condições de ensilagem, podendo durar de 1 a 4 semanas (MUCK & PITT, 1993). Nesta fase os microrganismos indesejáveis anaeróbios facultativos e obrigatórios podem competir com as bactérias do ácido lático (BAL) por nutrientes (PAHLOW et al. 2003). A princípio ocorre a proliferação de enterobactérias que produzem o ácido acético e BAL heterofermentativas que produzem ácido acético, etanol, ácido lático e CO₂, favorecendo a queda progressiva do pH. Quando o pH atinge valores muito baixos, as BAL heterofermentativas decrescem, dando lugar as BAL homofermentativas que passam a dominar o processo fermentativo e produzir principalmente o ácido lático, reduzindo rapidamente o pH, fundamental na preservação da silagem (MCALLISTER & HRISTOV, 2002 apud PEREIRA et. al., 2004; SANTOS et al., 2013).

A fase estável se caracteriza pela diminuição do processo fermentativo, momento onde não ocorrem grandes mudanças desde que a silagem esteja bem vedada e com a ausência de oxigênio. Com a redução do pH e estabelecimento de condições anaeróbias, a quantidade de bactérias anaeróbias decresce e os microrganismo ácido tolerantes sobrevivem (algumas espécies de leveduras) ou através da formação de esporos (*Bacillus* e *Clostridium*) (PAHLOW et al. 2003).

A fase de descarga compreende o momento em que o silo é aberto e o material ensilado é exposto ao ar atmosférico, isto favorece a presença de microrganismos aeróbios indesejáveis. A deterioração se inicia através da degradação de ácidos orgânicos por leveduras e bactérias do ácido acético que aumentam a temperatura e o pH, favorecendo o crescimento de outros microrganismos indesejáveis como fungos filamentosos e enterobactérias (OUDE ELFERINK et al., 2000).

Para evitar falhas durante o processo de ensilagem, Oude Elferink et al. (2000) descreveram a importância de se controlar cada fase deste processo. Na primeira fase é importante que se combine boas técnicas de colheita com boas técnicas de enchimento do silo para minimizar a quantidade de oxigênio presente entre as partículas das plantas ensiladas, evitando a perda de carboidratos solúveis na respiração aeróbia e deixando-os disponíveis para a fermentação anaeróbia e posterior formação do ácido lático. As duas fases seguintes não podem ser controladas ativamente, contudo, há a possibilidade de se utilizar aditivos que são aplicados pouco antes do enchimento do silo, auxiliando o processo fermentativo nessas fases. Por fim, na quarta fase, é importante que a taxa de retirada da silagem seja suficiente para prevenir sua exposição prolongada ao ar. Outra opção é a utilização de aditivos para manter a estabilidade aeróbia após a abertura do silo.

2.3 Microbiota da silagem

Para a obtenção de sucesso na conservação da forragem, é necessário o conhecimento da microbiota presente durante o processo de fermentação da silagem e a interação entre esses diferentes microrganismos, visto que neste ambiente são encontrados dois grupos de microrganismos: os desejáveis e indesejáveis.

Os microrganismos desejáveis podem estar presentes na microbiota epifítica das plantas forrageiras ou através da aplicação de inoculantes, sendo as BAL aquelas de maior importância, pois são as principais responsáveis pela conservação do material ensilado. Os microrganismos indesejáveis, assim como os desejáveis, podem estar presentes na microbiota epifítica da planta forrageira, entretanto, também podem provir de contaminações da silagem tanto em condição de aerobiose como de anaerobiose. A presença destes microrganismos pode causar a deterioração da silagem, afetar o desempenho animal e causar danos à saúde de animais e humanos (DUNIÈRE et al., 2013).

2.3.1 Bactérias do Ácido Lático (BAL)

As BAL pertencem a um grupo de bactérias gram-positivas microaerófilas não formadoras de esporos, podendo apresentar a forma de cocos ou bacilos. Possuem a capacidade de crescer a uma ampla faixa de temperatura e baixas condições de pH e não são aptas a locomoção (PANG et al., 2011). A necessidade nutricional desses microrganismos é complexa, exigem vários aminoácidos e proteínas para que possam crescer (PAHLOW et al., 2003). É o principal grupo de microrganismos que atua no processo fermentativo da silagem, com destaque aos gêneros mais importantes: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, podendo ser encontradas diferentes espécies durante o processo de ensilagem (HAMMES et al., 1992). Os gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* são de extrema importância no estágio inicial da fermentação, pois são responsáveis por manter o ambiente ácido, propício para a colonização das bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (SANTOS et al., 2013).

O principal produto metabólico derivado da fermentação pelas BAL é o ácido lático, no entanto, elas podem formar outros produtos, como o ácido acético, etanol e dióxido de carbono. Essa produção metabólica torna possível dividi-las em três grupos: homofermentativas, heterofermentativas obrigatórias e heterofermentativas facultativas. As BAL

homofermentativas, produzem quase que exclusivamente o ácido láctico a partir da fermentação de hexoses pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), e não são capazes de fermentar pentoses, pois possuem apenas a enzima aldolase, responsável por quebrar frutose bifosfato em triose fosfato. As BAL heterofermentativas obrigatórias são capazes de fermentar hexoses em ácido láctico, ácido acético, CO₂ e etanol pela via das Pentoses Fosfato, não possuem a enzima aldolase, e sim a fosfoquetolase, que é responsável por oxidar a glicose 6-fosfato a 6-fosfogluconato. Já as bactérias heterofermentativas facultativas se assemelham às homofermentativas, devido à fermentação de hexoses a ácido láctico, contudo, são capazes de fermentar pentoses em ácido láctico e ácido acético, visto que possuem as enzimas aldolase constitutiva, e fosfoquetolase (ÁVILA, 2014).

As BAL são capazes de conservar a silagem através da redução do pH, condição que a maioria dos microrganismos indesejáveis são incapazes de tolerar pela produção dos ácidos acético e propiônico que possuem ação antifúngica, e além disso, uma variedade de espécies de BAL possui peptídeos antimicrobianos conhecidos como bacteriocinas, capazes de inibir o crescimento de algumas bactérias que possuem requisitos nutricionais semelhantes. Essas bacteriocinas interagem com um receptor presente na membrana celular das bactérias gram-positivas (gram-negativas possuem a membrana externa que limita a ação da bacteriocina) provocando uma força próton-motiva que resulta na formação de poros e consequente perda na viabilidade celular (ENNAHAR et al., 2000). Algumas BAL também podem crescer em ambiente aeróbio, e quando isso ocorre, produzem o peróxido de hidrogênio que pode inibir outros microrganismos (CONDON, 1987; MUCK, 2010).

2.3.2 Bactérias do Ácido Propiônico (BAP)

As BAP são bactérias gram-negativas, não esporulantes, anaeróbias ou anaeróbias facultativas, não móveis e apresentam a forma de bastonetes curtos ou de cocos (KIATPAPAN & MUROOKA, 2002), a obtenção de energia é realizada através da fermentação de açúcares e ácido láctico em acetato, propionato e CO₂, estes dois ácidos alifáticos de cadeia curta possuem a capacidade de inibir leveduras e fungos filamentosos em silagens (HIGGINBOTHAM et al., 1998). Contudo, existem poucas informações a respeito dessas bactérias.

Higginbotham et al. (1998) avaliaram o efeito do inoculante contendo *Propionibacterium acidipropionici* na fermentação da silagem de milho. O inoculante não foi capaz de alterar as concentrações de ácido láctico, CHO, ácidos graxos voláteis (AGV), etanol e pH da silagem, contudo, as silagens com este inoculante apresentaram tendência a se aquecerem

mais lentamente (2 horas a mais) em relação ao controle. Rowghani et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes através de inoculante contendo *Propionibacterium acidipropionici* associada a bactéria *Lactobacillus plantarum*, onde houve uma melhora significativa na estabilidade aeróbia da silagem de milho comparado ao controle (sem inoculante).

2.3.3 Gênero *Clostridium*

Clostridium é um gênero de bactérias gram-positivas anaeróbias obrigatórias formadoras de esporos, não fazem parte da microbiota epifítica das culturas, surgem através da contaminação do solo. A atividade dessa bactéria na silagem ocorre apenas quando o crescimento das BAL é estagnado, após utilizarem os açúcares presentes na forragem ensilada, momento em que o pH não é suficientemente baixo para inibir a contaminação (FLYTHE & RUSSEL, 2004; MUCK, 2010).

Essas bactérias fermentam os açúcares, o ácido láctico e aminoácidos, produzindo ácido butírico, aminas e amônia, com resultantes perdas na MS, aumento do pH, queda na estabilidade aeróbia e redução na palatabilidade da silagem (MAHANNA, 1994; OUDE ELFERINK, 2001;). Além disso, os esporos formados podem sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal dos ruminantes, fato importante em criações de vacas leiteiras, já que pode ocorrer a contaminação do leite pelas fezes dos animais no momento da ordenha. O leite contaminado, mesmo sob o processo de pasteurização pode conter esses esporos e com isso causar consideráveis perdas nos seus produtos derivados (VISSERS, 2007 apud DRIEHUIS et al., 2016).

Driehuis et al. (2016) em um estudo realizado na Holanda, verificaram a presença de bactérias produtoras do ácido butírico em amostras de solo, silagem de capim e milho, fezes de vacas leiteiras e leites produzidos em algumas fazendas de vacas leiteiras. Das três populações principais encontradas, duas delas pertencem ao gênero *Clostridium* (*C. tyrobutyricum* e *C.beijerinckii*), e a outra pertence ao gênero *Paenibacillus*. A proporção dessas três bactérias nas fezes das vacas, silagens e leite do tanque não variaram muito (*C. tyrobutyricum*: 67%, 58% e 60%, respectivamente; *C.beijerinckii*: 44%, 59% e 61%, respectivamente; *Paenibacillus* spp: 69%, 47% e 36%, respectivamente), isso sugere que essas espécies compartilham do mesmo habitat e rota de contaminação do leite.

As espécies mais importantes desse gênero podem ser classificadas em dois grupos de acordo com os principais compostos utilizados na fermentação: proteolíticas e sacarolíticas. Os microrganismos proteolíticos produzem diversos compostos através do catabolismo de

aminoácidos, como amônia, amina e CO₂, e os microrganismos sacarolíticos produzem ácido butírico, ácido acético, hidrogênio e CO₂ através do catabolismo de carboidratos e ácidos orgânicos (com destaque ao ácido láctico) (MUCK, 2010). A atividade metabólica desses dois grupos afeta de forma negativa a qualidade da silagem, pois o aumento da concentração de amina pode causar a redução no consumo da silagem pelos ruminantes (BOLSEN, 1995), o aumento do ácido butírico pode causar cetose em vacas leiteiras, principalmente em fase de transição (MUCK, 2010) e a fermentação do ácido láctico em ácido butírico pode causar uma perda de até 51% na MS da silagem (McDONALD et al., 1991).

2.3.4 Gênero *Bacillus*

As bactérias do gênero *Bacillus* possuem a forma de bastonete, são gram-positivas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, formadoras de esporos e possuem a capacidade de se locomover. Essas bactérias podem atuar no processo de deterioração da silagem quando o pH é superior a 4,5 e a temperatura aumenta em aproximadamente 40°C, graças a contaminação anterior por leveduras ou bactérias do ácido acético (McDONALD, 1991; MUCK & PITT, 1994).

As principais espécies encontradas em silagem são: *B. cereus*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B.licheniformis* e *B. polymyx* (TE GIFFEL et al., 2002), sendo que a espécie *B. cereus* é de grande importância, pois é causadora de intoxicações alimentares em produtos lácteos e tem como um dos principais vetores, a silagem de milho (ABEE et al., 2011).

Algumas espécies desse gênero de microrganismos são indesejáveis por favorecer a deterioração da silagem em condições aeróbias devido à degradação de uma variedade de carboidratos, formando ácidos orgânicos, álcoois, 2,3-butanodiol e glicerol, além disso, são capazes de produzir ácido láctico e ácido acético, mas não de forma eficiente (OUDE ELFERINK et al., 2001).

Assim como as bactérias do gênero *Clostridium*, os *Bacillus* sobrevivem à passagem pelo trato gastrointestinal dos ruminantes e são excretadas nas fezes na forma de esporos, e através das fezes podem contaminar o leite no momento da ordenha, apresentando assim riscos de intoxicação alimentar aos humanos devido ao consumo de alimentos derivados do leite (TE GIFFEL et al., 2002).

Apesar da presença deste gênero ser considerada indesejável nas silagens, recentemente tem-se estudado a utilização da espécie *Bacillus subtilis* em inoculantes devido a sua capacidade de produzir metabólitos com atividade antifúngica e antibacteriana (TODOVORA &

KOZHUHAROVA, 2009), tornando assim sua utilização uma boa alternativa para o controle da deterioração aeróbia em silagens (BASSO et al., 2012).

2.3.5 Gênero *Listeria*

O gênero *Listeria* é composto por bacilos gram-positivos anaeróbios facultativos não formadores de esporos, com a capacidade de se locomoverem. Estes microrganismos estão distribuídos em diversos ambientes, como água, solo, matéria orgânica e silagem, são resistentes a condições adversas como a alta concentração de sal, baixa temperatura e baixo pH (HASSAN et al. 2001).

Este gênero possui 6 espécies, sendo que a espécie *L. monocytogenes* é a que apresenta maior importância, pois é a causadora da doença listeriose em diversos animais e humanos, um tipo de infecção alimentar com alto índice de mortalidade, cujas manifestações clínicas incluem encefalite, aborto e septicemia. Muitas vezes essa contaminação em humanos se dá pela ingestão de leite não pasteurizado derivado de animais infectados (DUNIÈRE et al., 2013).

A principal fonte de infecção dessas bactérias em ruminantes é a silagem contaminada, resultante da sua má preservação (WIEDMANN, 2003). Schoder et al. (2011) avaliaram o impacto da *L. monocytogenes* sobre a contaminação do leite em 53 fazendas de criação de cabras destinadas a produção de leite na Áustria, onde observou-se que as fazendas na qual os animais eram alimentados com silagem apresentaram de 3 a 7 vezes maior contaminação por *L. monocytogenes* do que em fazenda onde os animais não eram alimentados por silagem, reforçando a importância da silagem como fonte de contaminação, quando essa não é bem manejada.

Um fator importante que favorece a presença da *Listeria* na silagem é a capacidade de sobreviverem ao ambiente ácido e às altas variações de temperatura. Abbas e Jaber (2012) isolaram *L. monocytogenes* de amostras de leite de bovinos, bubalinos e ovinos, coletadas em várias fazendas no Iraque e as incubaram em diferentes condições de pH e temperatura. Os resultados mostraram que tal espécie foi capaz de sobreviver em temperaturas de 5 a 45°C e pH 4, comprovando a capacidade de resistirem a ambientes adversos. Observando esse fato, faz-se necessária a busca de práticas adequadas de ensilagem que propiciem a redução no pH e ausência de oxigênio.

2.3.6 Enterobactérias

As enterobactérias são pertencentes a um grupo de bactérias gram-negativas anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos. Grande parte dos microrganismos deste grupo, encontrados na silagem, não são patogênicos (REVERBERI et al., 2010), apesar disso, são indesejáveis pois são os principais concorrentes das BAL na utilização dos açúcares disponíveis, sendo que seu principal produto final é o ácido acético, que resulta na menor redução de pH e perda da MS (McDONALD, 1991; MUCK, 2010).

Essas bactérias também têm a capacidade de degradar proteínas. Além disso, podem provocar a redução do valor nutritivo da silagem com a produção de aminas e ácidos graxos que são compostos tóxicos, e aumentar a capacidade tampão pela formação da amônia a partir de proteínas, condição que torna mais lenta a redução do pH da silagem, prejudicando o processo de fermentação (McDONALD, 1991).

Uma das espécies mais importantes presente neste grupo é a *Escherichia coli*, que apesar de não ser muito comum em silagens e sua grande maioria não ser patogêna, alguns sorotipos podem causar intoxicações de origem alimentar por falta de higiene. O sorotipo *Escherichia coli* O157:H7 é um importante exemplo desses patógenos, e pode ser encontrado em silagens de milho mal preservadas e com o pH acima do ideal (CERNICCHIARO et al., 2009).

2.3.7 Levedura

As leveduras são microrganismos eucariotos, anaeróbios facultativos, considerado o grupo de microrganismos indesejáveis mais importante encontrado na silagem, estão envolvidas na deterioração aeróbia da silagem, geralmente são os primeiros microrganismos a se desenvolverem devido ao contato do oxigênio com a silagem durante o processo de armazenamento, e como são capazes de crescer em pH entre 3,5 e 6,5 (algumas espécies podem sobreviver ao pH próximo de 2), se desenvolvem neste ambiente (OUDE ELFERINK et al., 2000).

Quando há presença de oxigênio, as leveduras aumentam o pH da silagem devido a degradação do ácido láctico, isso favorece a presença de outros microrganismos deteriorantes (McDONALD, 1991; MUCK, 2010; DUNIÈRE, 2013). Na ausência de oxigênio as leveduras convertem os carboidratos solúveis em CO₂ e etanol, prejudicando o valor nutritivo da silagem bem como a redução de sua matéria seca (PEDROSO et al., 2007).

Durante o período de ensilagem da planta forrageira, as leveduras são diretamente influenciadas por ácidos orgânicos e pela presença de oxigênio. O grau de aerobiose torna o

ambiente propício para o desenvolvimento desses microrganismos, no entanto, altas concentrações de ácido fórmico ou ácido acético causam efeito contrário, reduzindo assim sua presença (OUDE ELFERINK et al., 2000).

De forma geral, as leveduras são consideradas microrganismos indesejáveis na silagem, contudo, pode haver algum efeito positivo com relação a fermentação ruminal. Leveduras do gênero *Saccharomyces* tem sido estudadas como uma alternativa de promover, juntamente com outras bactérias, efeitos benéficos não somente na qualidade da silagem, mas também sobre a microbiota do rúmen. Afinal, podem atuar como probiótico, devido à capacidade de estimularem as bactérias celulolíticas, aumentando assim o potencial de digestão de fibras no rúmen e o equilíbrio do pH ruminal através do favorecimento de bactérias consumidoras de ácido láctico (GUEDES et al., 2008). Além disso, possuem como segundo mecanismo de ação a absorção da pequena concentração de oxigênio que entra no ambiente ruminal através das salivas ou alimentos ingeridos, favorecendo o crescimento de microrganismos anaeróbios (GATTAS, et al., 2008). Alguns microrganismos utilizados em inoculantes podem permanecer ativos até o acesso ao ambiente ruminal pela ingestão da silagem, e também agir sinergicamente com outras bactérias quando combinados. Essa associação além de melhorar o processo de fermentação, digestibilidade e estabilidade aeróbia da silagem, pode alterar a ecologia microbiana do rúmen (DUNIÈRE et al., 2015).

2.3.8 Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos são microrganismos pluricelulares, sua presença está relacionada à má compactação da silagem, alta quantidade de matéria seca, e tamanho inadequado das partículas ensiladas (PEREIRA & REIS, 2001), são encontrados em regiões periféricas e durante o desabastecimento da silagem, pois é o local e o momento onde há a maior probabilidade de ocorrer presença de oxigênio (DUNIÈRE, 2013). Quanto ao crescimento, os fungos filamentosos se desenvolvem mais lentamente comparado a outros microrganismos, sua presença se dá após a contaminação das leveduras que degradam os ácidos orgânicos, aumentando assim o pH, o que torna o ambiente propício ao seu desenvolvimento (MUCK & SHINNERS, 2001).

Outra característica de extrema importância dos fungos filamentosos é a capacidade de produzirem metabólitos secundários, com destaque às micotoxinas que podem permanecer na silagem mesmo com a morte do fungo, já que possuem maior resistência às adversidades (GONZALES PEREYRA, 2011). As micotoxinas são produzidas principalmente pelos gêneros

Aspergillus, *Penicillium* e *Fusarium*, e são tóxicas para os seres humanos e animais quando consumidas (BENNET and KLICH, 2003). Diversos estudos (O'BRIEN et al., 2005; PEREYRA et al., 2008; GONZALES PEREYRA et al., 2011; CARVALHO et al., 2016) constataram que a espécie encontrada em maior abundância em silagens é a espécie *A. fumigatus*, devido a sua capacidade de resistir a ambientes ácidos e com baixa presença de oxigênio, podendo ser localizado até mesmo na região central da silagem.

A síntese de micotoxinas é estimulada geralmente em condições de estresse por diferentes fatores, como concentração de oxigênio, pH, temperatura, atividade de água e substrato, que são específicos para cada espécie de fungo (MUCK; REVERBERI et al., 2010). As micotoxinas não apresentam problemas para a conservação da silagem, no entanto, se consumidas pelo animal, podem gerar sintomas variados, entre eles, comprometimento do sistema imunológico, aumento de infecções e desequilíbrios hormonais (MORGAVI & RILEY, 2007; MUCK, 2010).

2.4 Utilização de inoculantes em silagens

Os inoculantes são os aditivos mais comumente utilizados em silagens, tais produtos contêm principalmente BAL que são utilizadas para complementar àquelas já presentes na silagem, auxiliando-as no processo fermentativo (MUCK, 2010). Seu principal objetivo é promover a produção mais eficiente de ácidos orgânicos, acelerar a queda do pH, favorecer a recuperação da MS e preservar os nutrientes da forragem conservada por meio da inibição de microrganismos indesejáveis, sejam eles aeróbios ou anaeróbios. Os inoculantes também devem ser capazes de inibir as atividades de proteases e deaminases, e adicionar microrganismos benéficos para que predominem no processo de fermentação (KUNG JR. et al., 2003). Segundo Kung Jr. et al. (2003), a dose ideal de aplicação de um inoculante deve ser entre 10^5 e 10^6 bactérias por grama de forragem para que haja o domínio do processo fermentativo da silagem.

Dentre as vantagens de se utilizar o inoculante, pode-se citar a segurança e facilidade de manuseio, ausência de corrosões nos maquinários, facilidade de conservação, além de não poluírem o meio ambiente (FILYA et al., 2000). De acordo com Muck (1993), o sucesso na utilização de inoculantes depende de três fatores: das BAL epifíticas, do conteúdo de açúcar presente na forragem e das bactérias utilizadas no inoculante, em especial esta última, já que as bactérias inoculadas devem ser mais eficientes que a comunidade epífita da forragem e apresentar considerável efeito no processo fermentativo.

Cezário et al. (2015) avaliaram o efeito de um inoculante comercial (*L. plantarum*: 10×10^9 UFC/g; *P. acidilactici*: 10×10^8 UFC/g; *E. faecium*: 10×10^9 UFC/g) aplicado em silagens de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu sobre a digestibilidade total de nutrientes e desempenho de bovinos de corte, recuperação de MS e processo de fermentação da silagem. Os dados foram analisados e comparados entre silagens com e sem inoculantes, os resultados mostraram que não houve diferenças entre as duas silagens nos parâmetros analisados, o que sugere que as bactérias presentes no inoculante não foram capazes de dominar a microbiota da silagem ou que o teor de açúcares presentes na silagem não foi suficiente, tornando evidente a importância dos três fatores anteriormente citados.

O efeito de silagens inoculadas no desempenho de ruminantes é incerto devido à escassez de estudos, no entanto, muitos trabalhos indicam a hipótese de alguns inoculantes presentes na silagem consumida poder interagir com a microbiota ruminal, favorecendo a funcionalidade do rúmen (BERNARDES, 2006;). Contreras-Govea et al. (2013) avaliaram a produção ruminal in vitro de metano e ácidos graxos voláteis (AGV) utilizando silagens de milho e alfafa inoculadas com *Lactobacillus plantarum*. Não foram observadas mudanças significativas na produção de AGV e metano, contudo observou-se um aumento da biomassa microbiana ruminal e nitrogênio não amoniacal microbiano, os autores sugerem que tal efeito no ambiente ruminal é resultante da boa preservação de proteínas durante o processo de ensilagem. Em outros trabalhos publicados recentemente Cao et al. (2010) e O'Brien et al. (2014) estudando o efeito de inoculantes na fermentação ruminal em trabalhos diferentes obtiveram resultados semelhantes, onde observou-se redução na produção de metano e redução na produção de AGV.

No mercado há a disponibilidade de uma diversidade de inoculantes. Os inoculantes mais tradicionais são compostos por bactérias homofermentativas e heterofermentativas facultativas, sendo a bactéria *L. plantarum*, a espécie mais utilizada por apresentar um eficaz crescimento, tolerância ao meio ácido e alta produtividade de ácido lático. Contudo, outras espécies homofermentativas podem ser associadas a *L. plantarum*, em especial pode-se citar: *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *E. faecium* e *L. acidophilus* (WEINBERG & MUCK, 1996).

A principal função dos inoculantes contendo bactérias homofermentativas é garantir maior rapidez e eficiência na fermentação de carboidratos solúveis em ácido lático, causando a rápida redução no pH, e contribuindo assim com a preservação da silagem (WEINBERG et al., 1993). No entanto, tais inoculantes têm se mostrado incapazes de favorecer a estabilidade aeróbia após a abertura da silagem devido a baixas concentrações de ácido acético e altas concentrações de ácido lático e açúcares remanescentes, fatores que podem contribuir para o

crescimento de leveduras e outros microrganismos indesejáveis, e assim resultar na perda de MS (KRISTENSEN, et al., 2010; TAYLOR et al., 2002).

Com o objetivo de proporcionar melhor estabilidade aeróbia à silagem, inoculantes compostos por bactérias heterofermentativas obrigatórias foram desenvolvidos nos últimos anos, em especial contendo a espécie *L. buchneri* (KUNG JR., 2009), que teve sua eficiência comprovada em diversos estudos (ÁVILA et al. 2009; TABACCO et al., 2011; BASSO et al., 2012; SANTOS et al., 2013;). As bactérias heterofermentativas além de produzirem ácido láctico, são capazes de produzir ácido acético CO_2 e etanol. Apesar de o ácido acético apresentar baixa eficácia na redução do pH, ele age sobre o metabolismo de fungos filamentosos e leveduras, impedindo assim seu crescimento, gerando maior estabilidade aeróbia (MOON, 1983).

A utilização de inoculantes contendo bactérias heterofermentativas obrigatórias tem causado pequenas perdas no teor de MS durante o processo de fermentação, isso contribuiu com o recente desenvolvimento de inoculantes com dupla finalidade, através da associação de bactérias heterofermentativas obrigatórias com bactérias homofermentativas ou heterofermentativas facultativas, com o objetivo de promover o aumento na estabilidade aeróbia e a redução das perdas no teor de MS através da acidificação do meio (ARRIOLA et al., 2011a).

Zopollatto et al. (2009) realizaram um levantamento de 15 artigos publicados em periódicos científicos a respeito da utilização de inoculantes em silagens de capins tropicais no Brasil. Foram avaliadas as médias de diferentes parâmetros em resposta a utilização de inoculantes contendo bactérias homofermentativas, heterofermentativas ou a combinação destas duas. As bactérias homofermentativas apresentaram em média maior queda de pH, maior concentração de CHO, maior taxa recuperação de MS e uma leve redução nos teores de FDN e FDA, contudo, não foram capazes de reduzir a produção de efluentes. As bactérias heterofermentativas, em média, apresentaram maior teor de PB, redução na produção de efluentes e queda na recuperação de MS. Já a combinação entre as bactérias homofermentativas e heterofermentativas apresentou uma taxa de recuperação de MS razoável, altos teores de PB e MS, redução na produção de efluentes e queda no teor de FDA, porém o pH teve um leve aumento. Os autores ressaltaram que o número de trabalhos que permitam comparações mais confiáveis sobre os efeitos de inoculantes microbianos ainda pode ser considerado modesto, tornando assim os resultados insuficientes para se estabelecer uma conclusão mais clara acerca dos resultados.

2.5. Seleção de microrganismos para a utilização em inoculantes

Diversos estudos têm mostrado a eficiência do uso de inoculantes em silagens, através da melhora no processo fermentativo e estabilidade aeróbia, contudo, muitas vezes os resultados se mostram neutros ou até mesmo negativos, causando a redução na qualidade da silagem. Isso pode ocorrer devido à incompatibilidade entre o microrganismo e a planta forrageira utilizada, visto que o teor de carboidratos e a população epifítica variam entre a diversidade de plantas ensiladas (MUCK, 2008), desta forma, torna-se importante o processo de seleção de cepas bacterianas que melhor se adaptem a determinada cultura destinada à produção de silagens.

Publicações referentes à seleção de cepas bacterianas para a utilização como culturas iniciadoras em silagens ainda são escassas (ÁVILA et al., 2014; CARVALHO et al., 2014; SAARISALO et al., 2007; SANTOS ET AL., 2013), contudo, recentemente alguns trabalhos se mostraram eficazes quanto a obtenção de cepas promissoras.

Santos et al. (2013) selecionaram cepas de BAL isoladas da cana-de-açúcar e avaliaram seus efeitos sobre a qualidade da silagem de milho. Duas cepas da espécie *Lactobacillus buchneri* se destacaram. Elas foram capazes de aumentar a população de BAL da silagem e aumentar a estabilidade aeróbia.

Ávila et al. (2014) selecionaram cepas de BAL isoladas da cana-de-açúcar e avaliaram seus efeitos como inoculantes na silagem dessa mesma planta. Dentre as selecionadas, duas cepas da espécie *Lactobacillus hilgardii* apresentaram melhores resultados com a produção de maiores concentrações de ácidos acético e propiônico, menor concentração de etanol, redução da população de leveduras e redução nas perdas de MS.

Carvalho et al. (2014) utilizando as cepas previamente isoladas e selecionadas por Ávila et al. (2014) e obtiveram resultados semelhantes, onde as mesmas duas cepas da espécie *Lactobacillus hilgardii*, apresentaram os melhores resultados, sendo capazes de produzirem maiores concentrações de ácido acético e propiônico e reduzir as perdas de MS em 29%.

Outro fator importante, é que não necessariamente uma cepa isolada de determinada planta forrageira apresentará melhores efeitos no processo de fermentação dessa mesma planta do que cepas derivadas de outras plantas forrageiras ou de ambientes distintos. Além disso, existem diferenças entre as cepas pertencentes à mesma espécie de bactéria (ÁVILA et al., 2010; SAARISALO et al., 2007). Santos et al. (2015) inocularam 9 cepas de BAL (três cepas de *L. buchneri*, cinco cepas de *L. plantarum* e uma cepa *Leu. mesenteroides*) isoladas e selecionadas da silagem de cana-de-açúcar. Uma cepa de *L. buchneri* se mostrou eficiente na

redução da contagem de leveduras e fungos filamentosos durante a fermentação e promoveu maior estabilidade aeróbia

Segundo Saarisalo et al. (2007), existe uma série de critérios para a seleção de microrganismos com o intuito de se produzir um inoculante ideal para o uso em silagens. Os mais comuns são: 1) rápido crescimento na planta forrageira e possuir habilidade para competir com a microbiota epifítica; 2) intensa produção de ácido lático associada com o metabolismo homofermentativo; 3) promover a estabilidade aeróbia por inibição do crescimento de microrganismos deterioradores após a abertura do silo e 4) tolerar condições de estresse variáveis durante o processo de formulação industrial e serem estáveis durante o armazenamento.

Para que o processo de seleção ocorra de forma satisfatória, o primeiro passo, no entanto é conhecer o perfil fermentativo da forrageira em questão, para assim detectar os principais problemas e com isso selecionar microrganismos que possam corrigi-los. No caso do capim-elefante, ainda existem pouca informação sobre a microbiota presente e poucos trabalhos com a seleção de inoculantes específicos para essa forrageira.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A utilização do capim-elefante para a alimentação do rebanho tem sido muito requerida devido à sua alta produtividade, proporcionando ao produtor um grande rendimento de matéria seca por unidade de área, além de sua alta adaptabilidade, facilidade de cultivo e bom valor nutritivo. Porém a microbiota associada a essa gramínea tropical ainda é pouco explorada, assim como sua resposta ao uso de inoculantes.

Com o recente crescimento de pesquisas relacionadas à seleção de inoculantes estimulados pela obtenção de cepas promissoras e os resultados controversos do uso de inoculantes em silagens, torna-se relevante avaliar os efeitos de cepas selecionadas de diferentes culturas para serem avaliadas nesta silagem, e assim servir como base para novas pesquisas com o objetivo de proporcionar um alimento de melhor qualidade destinado ao rebanho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS B. A. and JABER G. M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk of ruminants. **Journal of Veterinary Science**, v. 26 n. 1 p. 47–51, 2012.

ABEE, T. et al. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. **Food microbiology**, v. 28, n. 2, p. 199-208, 2011.

AHMED, T.; KANWAL, R.; AYUB, N. Influence of temperature on growth pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus acidophilus* isolated from camel milk. **Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 481-486, 2006.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL METHODS ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analyses of the Association of Analytical Chemists**, 15.ed. Arlington: [AOAC], 1117 p, 1990.

ARRIOLA, K. G.; KIM, S. C.; ADESOGAN, A. T. Effect of applying inoculants with heterolactic or homolactic and heterolactic bacteria on the fermentation and quality of corn silage. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 3, p. 1511-1516, 2011.

ÁVILA, C.L.S. **Isolamento e uso de *Lactobacillusbuchneri* na ensilagem de capim-mombaça e cana-de-açúcar**. 2007. 175f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

ÁVILA, C.L.S. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, v.64, p.384-394, 2009.

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

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: S. SALMINEN and A. VON WRIGHT, ed. Marcel Dekker: **Lactic Acid Bacteria**. New York, NY, p. 1-63, 2004.

BASSO F.C. et al. Características da fermentação e estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com *Bacillus subtilis*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 14, p. 1009–1019, 2012.

BASSO F.C. et al. Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.7, p. 1789-1794, 2012.

BENNETT, J.W. and KLICH, M. **Mycotoxins**. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, p. 497–516, 2003.

BERNARDES, T. F.; Controle da deterioração aeróbia de silagens. **Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, 2006.

BERNARDES, T. F.; ADESOGAN, A. T. Aerobic deterioration of silages in warm climates. In: **Proceedings of the 6th symposium on strategic management of pastures**. (Eds OG Pereira, DM Fonseca, KG Ribeiro, FHM Chizzotti) pp. 2012. p. 249-268

BOLSEN, K. K. Silage: basic principles. **Forages**, v. 5, p. 163-176, 1995.

CANALE, A.; CIOTTI, A.; VALENTE, M.E. Metodi analitici per la valutazione della qualità di conservazione degli insilati, 21p. **Estratto da Annali Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino**, Italia, 1983.

CAO, Y.; TAKAHASHI, T.; HORIGUCHI, K.; YOSHIDA, N. Effect of adding lactic acid bacteria and molasses on fermentation quality and *in vitro* ruminal digestion of total mixed ration silage prepared with whole crop rice. **Grassland Science**, 56; pp. 19–25, 2010.

CARVALHO, B. F. et al. Effects of propionic acid and *Lactobacillus buchneri* (UFLA SIL 72) addition on fermentative and microbiological characteristics of sugar cane silage treated with and without calcium oxide. **Grass Forage Sci**, v. 67, n. 4, p. 462–471, 2012.

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

CARVALHO, B. F. et al. Occurrence of mycotoxins and yeasts and moulds identification in corn silages in tropical climate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 1181-1192, 2016.

CARVALHO, B.F. et al. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 3, 589-600. 2017.

CERNICCHIARO, N. et al. Risk factors associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Ontario beef cow-calf operations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 92, n. 1-2, p. 106–115, 2009.

CEZARIO, A. S. et al. Silages of *Brachiariabrizantha* cv. Marandu harvested at two regrowth ages: Microbial inoculant responses in silage fermentation, ruminant digestion and beef cattle performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 208, p. 33-43, 2015.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, p. 267-280, 1987.

CONTRERAS-GOVEA, E.; MUCK, R. E.; G. A. BRODERICK, WEIMER, P. J. *Lactobacillus plantarum* effects on silage fermentation and *in vitro* microbial yield. **Animal Feed Science and Technology**, v. 179, n. 1-4, p. 61–68, 2013.

DE JESUS FERREIRA, D. et al. Silage fermentation and chemical composition of elephant grass inoculated with rumen strains of *Streptococcus bovis*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 183, n. 1-2, p. 22-28, 2013.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **Vet. Q**, v. 22, n. 4, p. 212–216, 2000.

DRIEHUIS, F.; HOOLWERF J.; JAN L.W.R. Concurrence of spores of *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium beijerinckii* and *Paenibacillus polymyxa* in silage, dairy cow faeces and raw milk. **International Dairy Journal**, v.63, p.70-77, 2016.

DUNIÈRE, L. et al. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. **Animal Feed Science and Technology**, v. 182, n. 1-4, p. 1-15, 2013.

DUNIÈRE, L. et al. Impact of adding *Saccharomyces* strains on fermentation, aerobic stability, nutritive value, and select lactobacilli populations in corn silage. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 5, p. 2322-2335, 2015.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis. Structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 85-106, 2000.

EVANGELISTA, A. R.; LIMA, J.A. **Silagens do cultivo ao silo**. Lavras: UFLA. 200 p, 2000.

FENLON, D.R.; WILSON, J. The quantitative assessment of *Listeria monocytogenes* growth in a laboratory ensiling system allowing limited aerobic spoilage. **Grass and Forage Science**, v.53, n.3, p.292-295, 1998.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** (Lavras), v. 6, p. 36-41, 2008.

FILYA, I., G. ASHBELL, Y. HEN e Z. G. WEINBERG. The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of whole crop wheat silage. **Animal Feed Science Technology**, v. 88, n. 1-2, p. 39-46, 2000.

FLYTHE, M.D. and RUSSELL, J.B. The effect of pH and a bacteriocin (bovicin HC5 on *Clostridium sporogenes* MD1, a bacterium that has the ability to degrade amino acids in ensiled plant materials. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 2, p. 215-222, 2004.

GATTAS, C.B.A. et al. Efeito da suplementação com cultura de levedura na fermentação ruminal de bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.4, p-711-716, 2008.

GEVERS D.; HUYS G.; SWINGS J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiol Lett**, v. 205, n. 1, p. 31-36, 2001.

GONZALEZ PEREYRA, M. L. et al. Comparative analysis of the mycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 8, p. 1474-1481, 2011.

GUEDES, C. M. D. et al. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. **Animal Feed Science Technology**, v. 145, n. 1-4, p. 27-40, 2008.

GUIM, A. et al. Estabilidade aeróbica de silagens de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) emurcheado e tratado com inoculante microbiano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2176-2185, 2002.

HAMMES, W.P. et al. The genus *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS, A. et al. (Ed.). **The Prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 719-767.

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

HASSAN, L.; MOHAMMED, H.O.; MCDONOUGH, P.L. Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 51, n. 1-2, p. 63-73, 2001.

HENDERSON, N. Silage additives. **Animal Feed Science and Technology**, v.45, n. 1, p. 35-56, 1993.

HIGGINBOTHAM, G. E.; DEPETERS, E. J.; MUELLER, S. C. Effect of Propionic Acid Producing Bacteria on Corn Silage Fermentation. **The Professional Animal Scientist**, v. 12, n. 3, p. 176-180, 1996.

HIGGINBOTHAM, G. E. et al. Effects of Inoculants Containing Propionic Acid Bacteria on Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage1. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 8, p. 2185-2192, 1998.

KIATPAPAN, P.; MUROOKA, Y. Genetic manipulation system in propionibacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 93, n. 1, p. 1-8, 2002.

KRISTENSEN, N. B., et al. Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 8, p. 3764-3774, 2010.

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

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

LI, D. et al. Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn stover silage. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 28, n. 5, p. 620, 2015.

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

LIU, Q. et al. Characteristics of isolated lactic acid bacteria and their effectiveness to improve stylo (*Stylosanthes guianensis* Sw.) silage quality at various temperatures. **Animal science journal**, v. 83, n. 2, p. 128-135, 2012.

MAHANNA, B. Proper management assures high-quality silage, grains. **Feedstuffs**, n.10/17, p.12-56, 1994.

MACFADDIN, J. F. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. Ed. Médica Panamericana, 2003.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcombe Publications, 340p., 1991.

MOON, N.J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, v.55, p.453-460, 1983.

MORGAVI, D. P.; RILEY, R. T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with Fusarium toxins. **Animal feed science and technology**, v. 137, n. 3-4, p. 201-212, 2007.

MUCK, R. E.; PITT, R.E. **Ensiling and its effect on crop quality silage**. In: SILAGE PRODUCTION FROM SEED TO ANIMAL, 67, 1993. New York. Proceedings. New York: NRAES, p. 57-66, 1993.

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

MUCK R.E.; SHINNERS, K.J. **Conserved forage (silage and hay): progress and priorities**. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 29, 2001, São Pedro. Anais... São Pedro: SBZ. p. 753-762, 2001.

MUCK, R. E. **Improving alfalfa silage quality with inoculants and silo management**. In Proceedings of the 70th Annual Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers (pp. 137–146). Syracuse, NY: Cornell University, 2008.

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

O'BRIEN, M. et al. Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, n. 2, p. 131-135, 2005.

O'BRIEN, M. et al. Morphological and molecular characterisation of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. **Mycological research**, v. 112, n. 8, p. 921-932, 2008.

O'BRIEN, M. et al. Reducing in vitro rumen methanogenesis for two contrasting diets using a series of inclusion rates of different additives. **Animal production science**, v. 54, n. 2, p. 141-157, 2014.

OGUNADE, I. M. et al. Control of Escherichia coli O157: H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage additives. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 6, p. 4427-4436, 2016.

OHMOMO, S. et al. Silage and microbial performance, old story but new problems. **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 36, n. 2, p. 59-71, 2002.

OLIVEIRA, M. R. et al. Uso de aditivos biológicos na ensilagem de forrageiras. Use of biological additive in ensiling of forage. **Ambiência**, v. 7, n. 3, p. 589-601, 2011.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al.; Silage fermentation processes and their manipulation. **FAO Plant Production and Protection Papers**, p. 17-30, 2000.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 125-132, 2001.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In **Silage Science and Technology**. D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison (eds). ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI, v. 42, p. 31-93, 2003.

PANG, H. et al. Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis. **Systematic and applied microbiology**, v. 34, n. 3, p. 235-241, 2011.

PEDROSO, A. de F. et al. Efeito do tratamento com aditivos químicos e inoculantes bacterianos nas perdas e na qualidade de silagens de cana-de-açúcar. **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2007.

PENTEADO, D. C. S. et al. *Lactobacillus plantarum* from microbiota as inoculant for *Panicum maximum* silage. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, n. 214, p. 191-202, 2007.

PEREIRA, A. V. et al. BRS Capiaçú: cultivar de capim-elefante de alto rendimento para produção de silagem. **Embrapa Gado de Leite-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2016.

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

PEREIRA, J.R.A.; REIS, R.A. Produção de silagem pré-secada com forrageiras temperadas e tropicais. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, Maringá, 2001. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2001. p.64-86.

PEREIRA, O. G.; ROCHA, K. D.; FERREIRA, C. L. L. F. Composição química, caracterização e quantificação da população de microrganismos em capim-elefante cv. Cameroon (*Pennisetum purpureum*, Schum.) e suas silagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1742-1750, 2007

PEREIRA, O. G.; RIBEIRO, K.G.; PEREIRA, D.H. Produção e utilização de forragens conservadas. In: Semana de Zootecnia, 2, Diamantina. **Anais...** Diamantina. MG. 2004. p. 75-118.

QUEIROZ FILHO, JL de; SILVA, DS da; NASCIMENTO, IS do. Produção de matéria seca e qualidade do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) cultivar Roxo em diferentes idades de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 69-74, 2000.

RAJA, S.; DHANASEKAR, R. Succinic acid production from bovine rumen—isolation and optimization. **Int J ChemTech Res**, v. 3, n. 4, p. 1926-1931, 2011.

RANDBY, Å. T.; SELMER-OLSEN, I.; BAEVRE, L. Effect of ethanol in feed on milk flavor and chemical composition. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 420-428, 1999.

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

REVERBERI, M. et al. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 899-911, 2010.

ROIGE, M. B. et al. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. **Revista iberoamericana de micología**, v. 26, n. 4, p. 233-237, 2009.

ROOKE, J. A. The numbers of epiphytic bacteria on grass at ensilage on commercial farms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 51, n. 4, p. 525-533, 1990.

ROWGHANI, E. et al. The effects of *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium acidipropionici* on corn silage fermentation, ruminal degradability and nutrient digestibility in sheep. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 9, n. 4, p. 308-315, 2008.

SAARISALO, E. et al. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 327-336, 2007.

SANTOS, M. V. F. et al. Fatores que afetam o valor nutritivo das silagens de forrageiras tropicais. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 25-43, 2010.

SANTOS, A.O. **Seleção e avaliação de cepas bacterianas para ensilagem de milho**. 2012. 167p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SANTOS, A.O.; AVILA, C.L.S.; PINTO, J.C.; CARVALHO, B.F; DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Fermentative profile and bacterial diversity of corn silages inoculated with new tropical lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, p. 266-279, 2015.

SANTOS, A. O.; ÁVILA, C. L. S.; SCHWAN, R. F. Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 12, p. 7777-7789, 2013.

SANTOS, E. M. et al. Lactic acid bacteria in tropical grass silages. In: **Lactic Acid Bacteria- R & D for Food, Health and Livestock Purposes**. InTech, 2013.

SANTOS, E. M. et al. Microbial populations, fermentative profile and chemical composition of signalgrass silages at different regrowth ages. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 4, p. 747-755, 2011

SANTOS, S. F. et al. Principais tipos de silos e microrganismos envolvidos no processo de ensilagem. **Veterinária Notícias**, v. 19, p. 140-152, 2013.

SCHODER, D. et al. Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 6, p. 919-924, 2011.

SHAH, A. A. et al. Microbiological and chemical profiles of elephant grass inoculated with and without *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. **Archives of microbiology**, v. 200, n. 2, p. 311-328, 2018.

SILVEIRA, J. **Consumo e digestibilidade de silagem de híbridos de milho em função do estágio fenológico e processamento**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus Botucatu, 2009.

SOUZA, A.L.; BERNARDINO, F.S.; GARCIA, R. et al. Valor nutritivo da silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com diferentes níveis da casca de café. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 4, p. 828-833, 2003.

TABACCO, E. et al. Effect of *Lactobacillus buchneri* LN4637 and *Lactobacillus buchneri* LN40177 on the aerobic stability, fermentation products, and microbial populations of corn silage under farm conditions. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 11, p. 5589-5598, 2011.

TAYLOR, C.C. et al. The effect of treating whole-plant barley with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 85, p. 1793-1800, 2002.

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

TODOVORA, S; KOZHUHAROVA, L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1151-1161, 2009.

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

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral-detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583–3597, 1991.

VISSERS, M. M. M. et al. Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 7, p. 3278-3285, 2007.

WEINBERG, Z. G.; MUCK, R. E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 53-68, 1996.

WEINBERG, Z.G.; ASHBELL, G.; HEN, Y. et al. Ensiling peas, ryegrass and wheat with additives of lactic acid bacteria (LAB) and cell wall degrading enzymes. **Grass and Forage Science**, v. 48, p. 70-78, 1993.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. Oxford University Press, New York, 2011.

WIEDMANN, M. ADSA Foundation Scholar Award—an integrated science-based approach to dairy food safety: *Listeria monocytogenes* as a model system. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 1865–1875, 2003.

YANG, J. et al. Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 7, p. 3136-3145, 2010.

ZANINE, A. M. et al. Evaluation of elephant grass silage with the addition of cassava scrapings. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 12, p. 2611-2616, 2010.

ZOPOLLATTO, M. et al. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. spe, p. 170-189, 2009.

SEGUNDA PARTE

**SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA FOR ENHANCING THE QUALITY OF
ELEPHANT GRASS SILAGE**

**Article formatted in accordance with the standards of the Journal of Applied
Microbiology**

1 **Abstract**

2 **Aims:** To characterize the elephant grass silages lactic acid bacteria population to further select
3 promising strains to be used as inoculants and to evaluate its effects on elephant grass cultivar
4 BRS Capiaçú silage.

5 **Methods and Results:** In the experiment one, the isolation of LAB (lactic acid bacteria) from
6 elephant grass silages and the characterization and selection of these strains and the previously
7 isolated from maize and sugarcane silages were done. In the experiment two, thirteen strains
8 showed the highest growth, pH reduction, interesting metabolites production and ability to
9 inhibit the growth of undesirable microorganisms. The strain CCMA 0170 was evaluated in
10 elephant grass cultivar BRS Capiaçú silage during 60 days of ensilage. The chemical
11 composition, fermentative characteristics, DM loss, microorganisms population and aerobic
12 stability were evaluated. The fermentative process of elephant grass silage was characterized
13 by a succession of *Lactobacillus sakei*, *L. plantarum* group, *Pediococcus pentosaceus* and *L.*
14 *brevis*. The silages inoculated with CCMA 0170 (*L. hilgardii* CCMA 1394 and CCMA 1402
15 (*L. plantarum*), CCMA 1409 (*L. brevis*), CCMA 1363 and CCMA 1364 (*L. farraginis*) strains
16 showed lower losses of DM and high aerobic stability. The CCMA1364 strain showed the
17 lowest yeast populations in the silages inoculated with CE78, CE90, CCMA 1364, CCMA
18 1366, CCMA 0173 and CCMA 0170 strains. During the strains evaluation, was evidenced that,
19 although strains isolated from the silage itself, are adapted to the characteristics of the forage.

20 **Conclusions:** It is possible to find isolated strains of different silages that can be promising for
21 further use in different forages. This highlights the importance of the research and evaluation
22 of new strains adapted to the fermentative process of each forage.

23 **Keywords:** MALDI-TOF. Inhibition of undesirable microorganisms. Inoculant. Lactic acid.
24 Aerobics stability.

26 **Introduction**

27 The elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) is a tropical forage grass
28 traditionally exposed to animals through direct grazing, weeding, silage or hay (Pereira et al.,
29 2010). This forage has good characteristics to be ensiled due to its high productivity and high
30 quality fodder. However, when the plant reaches the ideal cutting age, it can presents low water
31 soluble carbohydrate (WSC) content, high buffering power and excess moisture, factors that
32 limit the production of high quality silages (Evangelista et al., 2004).

33 Recently, the elephant grass breeding program developed by Embrapa Gado de Leite
34 created a new cultivar, BRS Capiaçú, which stands out for its high size, ability to reach 4.20 m
35 in height, erect shape, good resistance to tipping, tolerance to water stress, easy mechanical
36 harvest, dense clump and high productivity, around 300 t/ha/year of biomass. Considering three
37 cuts per year, which represents approximately three times the production of crops such as maize
38 and sorghum (Pereira et al., 2016), being mainly recommended for silage use.

39 Many studies have been conducted in the past with the objective of studying the ensiling
40 process of different elephant grass cultivars (Rodrigues et al., 2003; Yahaya et al., 2004, Pereira
41 et al., 2007; de Jesus Ferreira et al., 2013). In the majority of studies, was concluded that the
42 inclusion of additives can improve the fermentation process.

43 Among the additives, inoculants are the class most commonly used in silages. Such
44 products contains mainly lactic acid bacteria (LAB), used to complement those already present
45 in silage. The application's results have been questionable in many cases, due to the lack of
46 effect of these additives in the chemical composition and fermentative parameters of the silages
47 (Muck, 2010). This efficiency imprecision regarding the use of inoculants open the possibility
48 to search for LAB strains that presents the ideal characteristic for each type of forage plant.
49 Studies have already been conducted with the aim of selecting bacterial strains to use as starter

50 cultures in maize (Santos et al., 2013) and sugarcane (Avila et al., 2014; Carvalho et al., 2014)
51 silages, among other temperate forages (Saarisalo et al., 2007).

52 In some studies, through selection tests, was possible to obtain promising strains to be
53 used as inoculants in large scale silos. Ávila et al. (2014) selected strains of LAB isolated from
54 sugarcane and evaluated their effects as inoculants in the silage of this same plant. Among these,
55 two strains of the *L. hilgardii* species presented better results such as higher concentrations of
56 acetic and propionic acids, lower concentration of ethanol, reduction of the yeast population
57 and DM loss. Santos et al. (2013) evaluated the effect of LABs isolated from sugarcane silage
58 and inoculated in corn silage and positive effects in the aerobic stability of these silages were
59 observed.

60 The inoculants selection for tropical grass silage is still scarce and to reach better results,
61 is necessary to know the LAB epiphytic population present in the culture and fermentation
62 process (Saarisalo et al., 2007). Thus, the objective of this study was to characterize the LAB
63 population during elephant grass silage to further select promising strains isolated from
64 elephant grass, sugarcane and corn silages to be used as inoculants and evaluate its effects in
65 elephant grass silages BRS Capiaçú cultivar.

66

67 **Material and Methods**

68 **Experiment 1: Selection of bacterial strains as inoculants**

69 **Elephant grass ensilage**

70 Elephant grass silages were produced in experimental silos to isolation strains for
71 screening. The elephant grass (cultivar Napier) was cut manually when it has reached
72 approximately 1.80 meters of height, chopped (PP-47, Pinheiro, Itapira, São Paulo, Brazil) and
73 ensiled in experimental polyvinyl chloride (PVC) mini silos, with 10 cm in diameter and 60
74 cm in height, adapted with Bunsen valves for gas release. The forage was manually compacted,

75 achieving 636 Kg/m³ density. The silos were sealed, weighed, and stored in a covered
76 environment protected from sunlight and rain and opened after 10, 30 and 45 days of
77 fermentation, when the samples were collected for the isolation of the strains.

78

79 **Enumeration, isolation and identification of bacterial population from elephant grass**
80 **silages**

81 The aqueous extract was prepared by adding 25g of elephant grass fresh or silage in 225
82 ml of sterile peptone water (0.1%). This extract was homogenized for 20 minutes at 120 rpm
83 on orbital shaker and then, sequential 10-fold dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) were prepared. For each
84 dilution, 0.1 ml of aliquots was spread-plated in duplicate on MRS agar (de Man Rogosa and
85 Sharpe - MERCK®) containing nystatin (4mL / L). The plates were incubated at 37 °C for 48
86 hours.

87 Bacteria were isolated according to the different colony morphologies present on the
88 MRS plates. The number of colony-forming units (CFU) was recorded and each colony type
89 was morphologically characterized. The colonies square root was measured for each type, re-
90 streaked and purified. The isolates were submitted to Gram staining and observed under a
91 microscope. The pure colonies were stored at -80°C for further selection tests. All
92 microorganisms isolated from elephant grass and its silage were analyzed, identified and
93 grouped according to their protein profile by the matrix-assisted laser desorption ionization
94 technique, followed by detection in a flight time type analyzer using Ultrafle Xtreme MALDI
95 -TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) according to the methodology proposed by
96 Carvalho et al. (2016) (Supplementary Figure 1). These experiments were performed in
97 duplicate and the scores were averaged. Interpretation was done according to the manufacturer's
98 recommendation: score of >2.3, reliable species level identification; 2.0 - 2.29, probable species
99 level identification; 1.7 - 1.9, probable genus level identification; <1.7, unreliable identification.

100

101 Origin of the strains used in the selection process

102 The selection process was initially conducted by using 87 BAL strains. Of these, 65
103 strains were isolated from elephant grass silages (Supplementary Table 1) and previously
104 identified as LAB. Seven strains previously isolated and selected for maize ensilage (Santos et
105 al., 2013) and fifteen strains of BAL previously isolated and selected for sugarcane silage (Ávila
106 et al., 2014). All strains isolated from corn silage and sugarcane silage used in this study and
107 most strains isolated from elephant grass silage are deposited in the Coleção de Culturas da
108 Microbiologia Agrícola (CCMA) of the Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brazil.

109

110 Growth evaluation at different temperatures

111 For the growth evaluation at different temperatures, the eighty-seven strains were
112 streaked in MRS agar (HIMEDIA®-M369) and incubated at 15, 25 and 45°C temperatures for
113 48 hours. The growth was evaluated according to the the biomass formation after the incubation
114 time. The growth was classified as: absence of growth (-), weak growth (W) or intense growth
115 (+) (Supplementary Table 1).

116

**117 Growth evaluation, pH-reducing ability and fermentation products in aqueous extract of
118 elephant grass**

119 The extract was obtained according to the methodology of Saarisalo et al. (2007) with
120 modifications. Elephant grass was chopped (1-2 cm) and homogenized in distilled water in one
121 kg ratio of forage to five liters of distilled water.

122 The mixture was heated in a water bath for 2 hours at 50°C, and the extract obtained was
123 filtered on filter paper, diluted in saline solution (0.85% NaCl) supplemented with glucose (1%)
124 in a ratio of 1:1. Centrifuge tubes containing 40 mL of the elephant grass extract were sterilized

125 (121°C, 15 min). The strains cultured in MRS broth (HIMEDIA®-M369) for 48 hours at 37°C
126 were standardized according to absorbance and inoculated in the aqueous extract of elephant
127 grass and incubated at 37 °C for 24 hours.

128 For the growth evaluation and pH reduction, each inoculum was added to aqueous
129 extract and samples were collected immediately after inoculation and after 24 hours of
130 fermentation. Growth was evaluated by drop plate on MRS Agar medium. The pH was
131 measured using a digital potentiometer. The 41 strains that showed the highest growth and
132 capacity to reduce pH were selected by analyzing the metabolites produced in the extract after
133 24 hours of fermentation. The metabolites were analyzed by high performance liquid
134 chromatography (HPLC) using Shimadzu, LC-10Ai (Shimadzu Corporation-Tokyo, Japan)
135 equipped with a dual detection system, consisting of an ultraviolet (UV) (UV-Vis/SPD-10Ai)
136 and a refractive index detector (RID 10A). Chromatographic was used to separate the acids, an
137 ion exclusion column (Shim-pack SCR-101H, 7.9 mm×30 cm) operated at 50°C. The mobile
138 phase consisted of a solution of perchloric acid with pH 2.1 and a flow rate of 0.6 ml min⁻¹.
139 The alcohols detection was made by refractive index and the organic acids detection was
140 measured by UV radiation with 210 nm wavelength. Among the 41 strains that had their
141 metabolites analyzed, 30 strains presented the best growth rates, the pH reduction efficiency
142 and greater production of lactic acid and acetic acid were evaluated according to their ability to
143 inhibit the growth of pathogenic and spoilage microorganisms.

144

145 **Microorganisms Inhibition Test**

146 The bacteria and yeast Inhibition test were performed following the methodology of
147 Harris et al. (1989) with modifications. The bacterium *Escherichia coli* (ATCC 25922) was
148 reactivated and cultured in BHI broth (Brain Heart Infusion - HIMEDIA®) for 48 hours at
149 37°C. This culture was inoculated in semisolid BHI medium (0.7% agar), 200 µL inoculum

150 ratio in 20 ml of culture medium. The culture medium containing the bacterium was poured
151 into the MRS agar containing the LAB strains, previously cultivated by drop plate medium in
152 triplicate, incubated in BOD at 37°C for 48 hours. The yeasts used were *Issatchenkia orientalis*
153 (CCMA 902) and *Candida rugosa* (CCMA 953). Each yeast was reactivated and cultured in
154 YEPG broth (0.3% yeast extract (MERCK®), 0.3% malt extract (MERCK®), 0.5% peptone
155 (HIMEDIA®), 1.0 % glucose (MERCK®), with 100 mg of chloramphenicol (Sigma-
156 Aldrich®), for 48 hours at 28°C. After the growth period, each yeast was inoculated in
157 semisolid YEPG medium (0.7% agar) at 200 µL ratio of the inoculum culture medium in 20
158 mL. The yeast-containing culture medium was poured into the MRS agar containing the LAB
159 strains previously cultured by drop plate medium in triplicate, then incubated at 28°C for 48
160 hours.

161 The ability of each strain to inhibit bacteria and yeast was evaluated by measuring halos
162 formed around them by a ruler. The LAB strains were evaluated for the ability to inhibit the
163 growth of *Aspergillus flavus*, reactivated in DRBC agar (Dicloran Rose Bengal
164 Chloramphenicol - HYMEDIA) and incubated in BOD at 25°C for 7 days.

165 LAB strains cultured on MRS agar for 24 hours were standardized comparing with the
166 McFarland 2 scale (approximately 6×10^8 CFU / mL). After standardization, 20 µL of each
167 inoculum was transferred to the medium MRS agar to be spread on one third of the Petri dish
168 and incubated in BOD at 37°C for 48 hours.

169 After growth of LAB strains, the filamentous fungus *A. flavus* previously cultured for 7
170 days, was transferred to a central point of the petri dish with the MRS agar medium containing
171 the strains. This procedure was performed in triplicate.

172 The plates were incubated in BOD at 25°C for 7 days. To evaluate the inhibition of the
173 fungus, the growth of the fungus was measured towards the border of the Petri dish and towards

174 the strains of LAB, the difference between the two measures was made and the inhibition
175 percentage was calculated comparing to the fungus total biomass.

176

177 **Experiment 2: Evaluation of preselected strains as inoculants in elephant grass silage**

178 **Forage and ensiling conditions**

179 After pre-selection, 13 strains of LAB that showed the highest growth rates during
180 fermentation, pH reducing efficiency, increased production of lactic acid and/or acetic acid,
181 ability to inhibit undesirable microorganisms were evaluated as inoculants in silages of elephant
182 grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) cultivar BRS Capiacu. The strain CCMA170 (*L.*
183 *hilgardii*) was evaluated, it is known for its good results in previous studies (Ávila et al., 2014
184 and Carvalho et al., 2014). The selected strains were cultivated in the laboratory according to
185 Ávila et al., 2009 and inoculated in the forage.

186 The inoculated population is described in Table 1. The elephant grass (with height of
187 approximately 3.8 m) was harvested and chopped. The inoculants were mixed with pure
188 distilled water and sprayed in the forage. The same volume of pure distilled water was added
189 to the control treatment. Four experimental polyvinyl chloride (PVC) mini-silos, sized 11 cm
190 in diameter and 30 cm in height, adapted with Bunsen valves for gas release, were used for each
191 treatment. The silage was conducted as mentioned in the item 1.1 reaching a density of 631
192 Kg/m³. The total loss of DM was calculated using DM contents weights of fresh forage and
193 silage.

194

195 **Analytical procedures**

196 The DM contents of each sample were determined using a forced-draft oven at 55°C for
197 72 h. Dried samples were ground in a Wiley-type grinder through a 1-mm screen. DM at 105°C
198 was determined by drying 1 g for 24 h. Neutral detergent fiber (NDF) was analyzed without a

199 heat stable amylase, using sodium sulfite according to van Soest et al. (1991), by means of an
200 ANKOM 200 Fiber Analyzer (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA). Crude
201 protein (CP) was determined according to the AOAC method 990.03 (AOAC 2006).

202 For the evaluation of the silage microbiota, as well as the fermentation products and the
203 pH, an aqueous extract was prepared as previously described. Sequential 10-fold dilutions (10^{-1}
204 to 10^{-6}) were prepared, and aliquots of 0.1 ml of each dilution were spreading duplicate on
205 culture media. Yeasts and molds were enumerated on a Dichloran Rose Bengal
206 chloramphenicol medium (DRBC; HiMedia Laboratories, Mumbai, India).

207 The plates were incubated at 28°C for 72 h. Yeasts were distinguished from molds by
208 colony appearance and cell morphology. For LAB enumeration, pour plating was performed on
209 de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS; Oxoid CM361, Basingstoke, Hampshire, UK) with
210 nystatin (4 ml l^{-1}) and 0,1% (v/v) cysteine-HCl used to maintain anaerobic conditions during
211 incubation.

212 The plates were incubated at 32°C for 72 h. For the aerobic spore-forming bacteria
213 enumeration (ASB), a sample of aqueous extracts was maintained at 80°C for 10 min and
214 further decimal dilutions were plated into the Nutrient Agar medium (HiMedia Laboratories,
215 Mumbai, India). The plates were incubated at 30°C for 72 h.

216 2 ml aliquots of aqueous extracts were acidified with 10 μL of 50% (v/v) H_2SO_4 and
217 frozen prior to analysis to determine glycerol, 1,2-propanediol, ethanol and tartaric, malic,
218 succinic, lactic, acetic, propionic, isobutyric, butyric and isovaleric acids content by high-
219 performance liquid chromatography according to the method previously described. The pH was
220 determined by digital potentiometer.

221

222 **Evaluation of aerobic stability**

223 To evaluate aerobic stability, 1,5 kg of silage was placed in plastic buckets and kept at
224 a controlled temperature of 25°C (ranging up to 29°C). A data logger (Cryopak, iMiniMX-IN-
225 S-8-L) programmed to measure the temperature every 15 min, placed in the center of each
226 bucket. The silage temperature was measured during 168 h. The aerobic stability was defined
227 by number of hours remained stable silage before rising more than 2°C above the ambient
228 temperature.

229

230 **Experimental design and statistical analysis**

231 The growth data at different temperatures, evaluation of the pH reduction capacity,
232 growth evaluation and fermentation products in elephant grass aqueous extract of 41 strains
233 (experiment 1) that showed better growth and efficiency in pH reduction were evaluated by
234 main component analysis using the XL Stat software (version 7.5.2; Addinsoft, New York).

235 The evaluation of inhibition of deteriorating microorganisms (experiment 1) was
236 conducted in a completely randomized design (CRD) with 3 replicates and 30 treatments (30
237 strains that presented better results). The experiment 2 was conducted with 15 treatments (14
238 strains of LAB and the control without inoculant) and 4 replicates, totaling 60 experimental
239 units. The data were submitted to analysis of variance (SISVAR®; Ferreira, 2008), and the
240 means were compared using the Scott-Knott test at the 5% probability level.

241

242 **Results**

243 **Experiment 1: Selection of bacterial strains as inoculants**

244 Sixty-five LAB strains isolated from of elephant grass silage with 10, 30 and 45 days of
245 fermentation were purified and identified. No LAB species were identified in fresh forage (time
246 0, Figure1). The species found at the beginning of the fermentation (10 days) were
247 *Lactobacillus sakei*, *L. plantarum* group and *Pediococcus pentosaceus*, at 30 days of

248 fermentation the species present in the silage belong to *L. plantarum* group. After 45 days,
249 microorganisms of *L. brevis* and *L. plantarum* group were found.

250 In the screening process, only strains isolated from corn silage showed growth at 45°C,
251 the other strains were not able to grow at this temperature (Supplementary Table 1). However,
252 no strain from the whole plant corn silage presented growth at 15°C, whereas the isolated strains
253 of elephant grass and sugarcane in most of them presented growth at that temperature. All
254 strains showed growth at 25°C.

255 After a fermentation period of 24 hours in elephant grass extract, the final population of
256 the strains varied between 6.0 and 8.85 log 6,0 and 8,85 log UFC/mL, and the final pH varied
257 between 3.27 and 4.78 (supplementary table 1). Strains identified as CCMA 1385, CCMA 1388,
258 CCMA 1389, CE46, CCMA 1392, CCMA 1393, CCMA 1394, CCMA 1396, CE64, CE65,
259 CCMA 1397, CCMA 1398, CE68, CE69, CE71, CE72, CE75, CCMA 1400, CE77, CCMA
260 1401, CE79, CE80, CCMA 1402, CCMA 1404 (*L. plantaraum* isolated from elephant grass
261 silage), CCMA 1406, CCMA 1407, CCMA 1408, CCMA 1409, CCMA 1410 (*L. brevis*)
262 isolated from elephant grass silage), CCMA 1362, CCMA 1363, CCMA 1364 (*L. farraginis*
263 isolated from corn silage) M22, CCMA 1365 (*L. plantaraum* isolated from corn silage), CCMA
264 1366 (*L. buchneri* isolated from corn silage), S1 , CCMA 0171, CCMA 0173, CCMA 0174 (*L.*
265 *brevis* isolated from sugarcane silage), CCMA 0176, CCMA 0178 e CCMA 0179 (*L. plantarum*
266 isolated from sugarcane silage) were selected for the analysis of fermentation products because
267 its excelled growth and pH reduction.

268 The production of lactic acid in the elephant grass extract ranged from 1.10 to 6.34 g/L, being
269 produced in bigger quantity by the strains CE52 and CE40 (both *L. plantarum*). The production
270 of acetic acid ranged from 0.17 to 0.49 g/L, with emphasis on the CCMA 1364 (*L. farraginis*)
271 and CCMA 1366 (*L. buchneri*) strains isolated from corn silage, which presented 0.49 and
272 0.460g/L, respectively. The production of succinic acid was low, ranging from 0.03 to 0.15 g/L.

273 However, the highest values were produced by *L. farraginis* strains (CCMA 1363 and CCMA
274 1364). The CCMA 1364 and CCMA 1366 strains that stood out in the production of acetic acid
275 were also the major producers of succinic acid, 0.15 and 0.13 g/L, respectively. Only strains
276 isolated from sugarcane silage and elephant grass silage, identified as CCMA 0173, CCMA
277 0174, S1, CCMA 0171, CCMA 1406, CCMA 1407, CCMA 1408 and CCMA 1410 showed
278 detectable levels of ethanol, which ranged from 0.35 to 0.55 g/L.

279 In the Principal Components Analysis (figure 2), the components F1 and F2 explain
280 73.22% of the total variance. In the figure, it is possible to observe the correlation analysis
281 between tolerance to different temperatures, growth, pH reduction and metabolite production
282 in the elephant grass extract. In the upper right quadrant are located the ethanol producing
283 strains and that had the highest pH in the extract. In the lower left quadrant are located the
284 strains that showed capacity to grow at 15°C, higher concentration of lactic acid and the lowest
285 pH in the extract.

286 In the lower right quadrant, are located the strains that had the capacity to grow at 45°C
287 and which produced the succinic and acetic acids in the extract. The CCMA 1385, CCMA 1388,
288 CCMA 1389, CCMA 1392, CCMA 1393, CCMA 1394, CCMA 1396, CE64, CCMA 1397,
289 CCMA 1398, CCMA 1399, CE72, CE75 CCMA 1400, CE77, CCMA 1401, C79, C80, CCMA
290 1402, CCMA 1404, CCMA 0176, CCMA 0178 e CCMA 0179 (*L. plantarum*), CCMA 1409,
291 CCMA 0173 (*L. brevis*), CCMA 1362 CCMA 1363, CCMA 1364 (*L. farraginis*), M22, CCMA
292 1366 (*L. buchneri*), strains were selected for the inhibition test of undesirable microorganisms
293 due to its higher pH reduction and higher concentrations of acetic acid and/or lactic acid.

294 The 30 strains evaluated showed an antagonistic relation to *E. coli* bacteria due to the
295 formation of a halo that varied from 2.08 to 7.50 mm in length (Supplementary Table 2). The
296 strains were also antagonistic to *A. flavus*, inhibiting the formation of its biomass, ranging from

297 13.4 to 29.8% (Supplementary Table 2). However, the strains were not able to inhibit yeasts *I.*
298 *orientalis* and *C. rugosa*.

299

300 **Experiment 2: Evaluation of pre-selected strains as inoculants in elephant grass silage**

301 The CCMA 1385, CCMA 1388, CCMA 1393, CCMA 1394, CCMA 1396, CCMA
302 1397, CCMA 1401, CCMA 1402 (*L. plantarum*), CCMA 1409, CCMA 0173 (*L. brevis*),
303 CCMA 1363, CCMA 1364 (*L. farraginis*) and CCMA 1366 (*L. buchneri*) strains were selected
304 according to its lactic and acetic acid production profile, reduction of pH and inhibition of
305 undesirable microorganisms and CCMA 0170 strain due to the good results in previous studies
306 (Ávila et. al, 2014 e Carvalho et al., 2014) totaling with the control (silage without inoculant)
307 15 treatments.

308 The chemical and microbiological composition of elephant grass before silage is
309 presented in Table 2. The DM, CP and NDF contents of elephant grass silage did not differed
310 between treatments ($P > 0,05$), with a mean of 21.33, 5.08 and 73.92% respectively (Table 3).

311 The DM loss values and pH presented differences ($p < 0.01$) between the treatments. The
312 silages inoculated with CCMA 1388, CCMA 1394, CCMA 1402 (*L. plantarum*), CCMA 1363,
313 CCMA 1364 (*L. farraginnis*), CCMA 1409 (*L. brevis*) and CCMA 0170 (*L. hilgardii*) strains
314 had the lowest losses of MS. The silages inoculated with the CCMA 1393, CCMA 1394 and
315 CCMA 1401 strains were all identified as *L. plantarum*, with the lowest pH values.

316 The concentration of lactic, acetic, succinic and butyric acids and ethanol varied
317 between treatments ($P < 0,01$). The silages inoculated with CCMA 1385, CCMA 1388, CCMA
318 1393, CCMA 1394, CCMA 1396, CCMA 1397, CCMA 1401, CCMA 1402 strains were
319 identified as *L. plantarum*, CCMA 1409 and CCMA 0173 strains identified as *L. brevis*, CCMA
320 1363 strain identified as *L. farraginis* and control, presented higher concentrations of lactic
321 acid, ranging from 43.37 to 49.55 g/kg DM.

322 The silages inoculated with CCMA 1363, CCMA 1364 (*L. farraginis*), CCMA 1366 (*L.*
323 *buchneri*), CCMA 0173 (*L. brevis*) and CCMA 0170 (*L. hilgardii*) strains showed higher acetic
324 acid concentration, ranging from 9.32 to 10.72 g/kg MS. Silages inoculated with CCMA 1385
325 and CCMA 1388 (*L. plantarum*) showed the lowest concentrations of this acid.

326 The silages inoculated with the CCMA 1385, CCMA 1393, CCMA 1396, CCMA 1397
327 and CCMA 1402 strains, both identified as *L. plantarum*, had the highest concentrations of
328 succinic acid, ranging from 2.52 to 2.86 g/kg DM. The silage inoculated with CCMA 1364 (*L.*
329 *farraginis*), CCMA 1366 (*L. buchneri*), CCMA 0173 (*L. brevis*), CCMA 0170 (*L. hilgardii*)
330 strains and control did not present detectable butyric acid levels. The other silages had
331 concentrations of this acid ranging from 0.21 to 0.23 g/kg DM. These same silages, with the
332 exception of the control, were the only ones that presented detectable levels of ethanol, ranging
333 from 0.51 to 0.90 g/kg DM (Table 3).

334 Differences were observed in the LAB and yeast populations between treatments ($P <$
335 $0,01$). The silage inoculated with the strain CCMA 1365 showed the highest LAB population
336 (7,46 log UFC/g silage), followed by CCMA 0173 and CCMA 0170 strains (Table 4). Silages
337 inoculated with CCMA 1409, CCMA 1364, CCMA 1365, CCMA 0170 and CCMA 0173
338 strains showed the lowest yeast populations, ranging from 2.64 to 3.16 log CFU/g of silage
339 (table 4). Differences were observed for the filamentous fungi ($P = 0,0157$) and ASB ($P =$
340 $0,0058$) populations between treatments, however, using the Scott-Knott test, it was not
341 possible to detect these differences. The filamentous fungi population found in the silages
342 varied from 2.50 to 3.22 log CFU/g of silage and the ASB population varied from 2.39 to 4.51
343 log CFU/g of silage (Table 4).

344 The silages inoculated with CCMA 1388, CCMA 1394, CCMA 1396, CCMA 1397 (*L.*
345 *plantarum*), CCMA 1363, CCMA 1364 (*L. farraginis*) e CCMA 0173 (*L. brevis*) strains showed
346 the highest aerobic stability ($P = 0.03$), ranging from 32.01 to 39.40 hours of air exposure.

347 Regarding the maximum temperature reached during the 7th day period, there were no
348 significant differences ($P > 0.05$) between the treatments, the temperatures reached varied from
349 30.1 to 34.5°C (table 5).

350

351 **Discussion**

352 Among the 81 strains of bacteria isolated from elephant grass and its silage, 3 non-LAB
353 species were isolated from fresh forage using MRS medium, *Staphylococcus xylosus*,
354 *Enterobacter asburiae* and *Klebsiella variicola* (Figure 1). These species were the only ones
355 recovered by forage plating on MRS medium. Although it is a culture medium destined to LAB
356 growth, bacteria that does not belong to this group were able to grow. These bacteria were also
357 isolated from samples of rehydrated corn and their silage at the beginning of fermentation in
358 MRS medium (Carvalho et al., 2016). From 10 days of ensiling, there was a succession of 4
359 species belonging to the LAB group: *L. sakei*, *P. pentosaceus*, *L. brevis* and *L. plantarum*.
360 *Pediococcus pentosaceus*, obligatory homofermentative, was found only at the beginning of the
361 fermentation process (10 days of ensiling). In a tropical grass silage studies review, the presence
362 of this species was evidenced in the forage plant and in the initial stage of the fermentation
363 process, a tendency of disappearance of these bacteria was observed within this period (Santos
364 et al., 2013).

365 *Lactobacillus sakei* was another species of facultative heterofermentative LAB found
366 only at the beginning of the fermentative process. Within 10 days of silage, this species
367 represented the largest LAB population in silage (7.26 log CFU/g silage). The presence of *L.*
368 *sakei* in silages has not been reported in the literature to date.

369 *Lactobacillus plantarum* (facultative heterofermentative) was present in all fermentation
370 periods evaluated. This species was dominant in the elephant grass silage analyzed after 30 and
371 45 days of ensilage. As in this study, the *L. plantarum* species was also predominant in the

372 fermentation process of brachiaria grass silage (*Brachiaria decumbens*) (Santos et al., 2011).
373 The species *L. brevis* was found in the silage in 45 days of fermentation. In addition to being
374 commonly found in silages, this obligatory heterofermentative species produces other
375 metabolites besides lactic acid, such as acetic acid, which prevents aerobic deterioration (Ávila
376 et al., 2014). However, they produce lower concentration of lactic acid compared to *L.*
377 *plantarum* (Carvalho et al. 2014).

378 The LABs have the capacity to grow at a wide temperature range, being a variable
379 characteristic among the species and one of the parameters that allows to differentiate them
380 (Ahmed et al., 2006). In the growth test at different temperatures, strains isolated from
381 sugarcane and elephant grass silages presented growth at 15°C, which is below, that normally
382 found in silages from tropical countries.

383 The ability of LABs to grow at low temperatures becomes important in silages preserved
384 in cold weather countries where low temperature may hinder their fermentation process. The
385 effect of temperature on corn epiphytic LAB was studied by Zhou et. al (2016). It was observed
386 that many species considered important in the ensiling process, many species did not survive at
387 temperatures of 10 and 5°C.

388 Strains isolated from whole corn plant silage were the only ones able to grow at 45°C.
389 This result can be associated to several factors such as forage cultivar, environmental
390 conditions, sampling time, silage preparation, among others (Zhou et. al, 2016). As observed in
391 this study, not all strains of LAB isolated from silages grow under the same temperature
392 conditions, LAB strains evaluated by Pang et al (2011) presented good growth at 15 to 40°C,
393 and no growth was observed at 45°C.

394 In the evaluation of growth in elephant grass extract, a variation was observed between
395 the growth of strains isolated from corn silage, sugar cane and elephant grass, there was no
396 predominance of one strain over the other, which indicates that strains originating from other

397 cultures can also adapt and perform their functions in the same way or even superior to the
398 strains originating from the same culture. This depends mainly on the compatibility between
399 the strain and the chemical characteristics of the plant, such as its ability to compete with the
400 epiphytic microbiota (Muck, 2010).

401 The strains isolated from corn silage presented, for the most part, higher pH values in
402 the extract. The lowest values were reached by strains isolated from elephant grass silage. These
403 values are directly related to the species, because the strains that were most efficient in reducing
404 pH belong to *L. plantarum* group, which is a facultative heterofermentative bacterium,
405 commonly used as inoculant because it provides the rapid decrease of pH in the silage due to
406 the high production of lactic acid (Yang et al., 2010).

407 According to the Principal Components Analysis (figure 1) there was no correlation
408 between growth and pH reduction. Saarisalo et al. (2007) obtained similar results when
409 evaluating the growth of LAB strains in the extracts of fescue grass (*Festuca pratensis*) and
410 timothy (*Phleum pratense*) for a period of 12 hours. However, Santos et al. (2013) when
411 evaluating LAB strains in the corn plant extract (*Zea mays*) for 48 hours of fermentation verified
412 the correlation between growth and pH reduction. This correlation might be related to the
413 metabolism routes of the sugars used by LABs. The strains that presented the highest growth
414 rate were *L. brevis*, (obligatory heterofermentative) and did not presented the same efficiency
415 in reducing the pH as homofermentative strains.

416 The production of succinic acid in the extract occurred in low concentrations. The strains
417 isolated from corn silage were those that produced succinic acid in larger quantity. In silage,
418 inoculation with strains (*L. plantarum* group) isolated from elephant grass silage resulted in a
419 higher concentration of succinic acid. Although commonly found, there are no reports in the
420 literature about the importance of this acid in silages. Succinic acid is mainly important to
421 ruminants energetic metabolisms. This acid is converted to propionic acid, one of the main

422 volatile fatty acids used in gluconeogenesis (Raja e Dhanasekar, 2011). Most strains isolated
423 from corn silage were prominent in the production of acetic acid in the extract and in elephant
424 grass silage, which justifies their selection, according to Santos et al. (2013).

425 The use of inoculants composed of obligatory heterofermentative bacteria in corn silage
426 has been increasing in recent years (Muck, 2010), because the aerobic deterioration is an issue
427 that affects the preservation of this culture, mainly in regions of tropical climate (Bernardes &
428 Adesogan, 2012).

429 The strains that produced ethanol presented low efficiency in reducing the pH when
430 compared to the other strains. Heterofermentative strains produce less lactic acid, mainly
431 responsible for the reduction in pH, due to the production of acetic acid and ethanol (Axelsson,
432 2004).

433 The CCMA 1397, CE72, CE77, CCMA 1402 and CCMA 1404 (*L. plantarum*) strains
434 stand out in the *Esc. coli* inhibition test, forming halos superior to 7 mm. These strains produced
435 higher concentrations of lactic acid and that showed better results in reducing the pH value in
436 elephant grass extract. This phenomenon could be related to the production of lactic acid. LAB
437 strains isolated from silage were submitted to the antimicrobial test and 2 strains of the *L.*
438 *plantarum* species were prominent by strongly inhibiting the *Esc. Coli* bacterium (Li et al.,
439 2015). The authors also evaluated the sensitivity of the production of the antimicrobial
440 substance and verified that it remained stable under acidic pH conditions, being inactive at pH
441 close when to 7.

442 In alfalfa silages experimentally contaminated with *Esc. Coli* O157: H7 and inoculated
443 with *L. plantarum* or with *L. buchneri* showed no growth of undesirable microorganism after
444 16 days of silage (Ogunade et al., 2016). *Escherichia coli*, an enterobacteria, which is a group
445 of bacteria present in the aerobic phase of silage. Although most of the species found in silages

446 are not pathogenic, they have an undesirable effect due to the available sugars competition with
447 LABs, metabolizing them in acetic acid, which is responsible for raising the pH (Muck, 2010).

448 The CCMA 1364, CCMA 1362 (*L. farraginis*) and CCMA 0173(*L. brevis*) strains
449 presented better results at inhibiting *A. flavus* growth, with the results of 29.8, 26.3 and 25.6%
450 of the total biomass of this filamentous fungus (Supplementary Table 2). These strains also
451 showed a good performance in the production of acetic acid in the elephant grass extract,
452 indicating that the two evaluation parameters may be correlated since heterofermentative
453 bacteria can produce acetic and propionic acids from pentoses, due to the capacity of acid
454 environments to control filamentous fungi growth (Santos et al., 2013).

455 None of the strains was able to present antagonistic activity to the species of yeast *I.*
456 *orientalis* and *C. rugosa*. Yeasts can tolerate low pH values but have their growth inhibited in
457 the presence of acetic acid (McDonald, 1991). The concentration of acetic acid produced by the
458 strains was below the necessary to inhibit the growth of these species.

459 Thomas et al. (2002), observed that the total acetic acid concentration required to inhibit
460 *Saccharomyces cerevisiae* yeast species was 104 mM associated with a pH 3 and 167 mM
461 associated with a pH 4.5. Narendranath et al. (2001), evaluating the effect of acetic acid on this
462 same species on a minimal medium reported was 100 mM.

463 The values of the chemical composition of the elephant grass (cultivar BRS Capiaçú)
464 forage plant (Table 4) resembled the values reported by Pereira et al. (2016) for the same
465 cultivar. The LAB population was smaller than the initial population studied by Pereira et al.
466 (2007), which was 4.92 log UCF/g of cultivar Cameroon elephant grass, while the filamentous
467 fungi and yeast populations was superior than studies by the same author (3.74 log UCF/g).

468 The DM, CP and NDF of the elephant grass (*BRS Capiaçú* cultivar) with cutting age after 110
469 days of growth was similar to the results found by Pereira et al. (2016). In comparison between
470 the NDF silage concentration and the plant forage, previous the silage process, presented a

471 higher value. Avila et al. (2014) attributed this fibrous fraction increment due to the results of
472 the fermentative process of the soluble carbohydrates. The CP content showed a decrease
473 compared to the forage plant before the silage process. This decrease can be attributed by the
474 proteolysis activity of the unwanted microorganism such as enterobacteria or the plants
475 enzymes, resulting a production of amines and ammonia (Weinberg & Muck, 1996).

476 Rodrigues et al. (2003) obtained similar results to this presented study. The evaluation
477 of the chemical composition of elephant grass (cultivar Napier) in laboratorial silages with
478 addition of the three different inoculants, Sil-All® (*Streptococcus faecium*, *Pediococcus*
479 *acidilactici*, *Lactobacillus plantarum*, amylase, hemicellulase e cellulase), Silobac® (*L.*
480 *plantarum*, *S. faecium* e *Lactobacillus* sp.) and Pioneer 1174® (*S. faecium* e *L. plantarum*).

481 The inoculants haven't showed effects on CP and NDF values. The authors emphasized
482 that in available studies contradicts themselves regarding the inoculant's effects in NDF values
483 of elephant grass forage inoculated with *Streptococcus bovis* JB1, *S. bovis* HC5 and
484 *Enterococcus faecium* strains, while the CP concentration was higher than in silages inoculated
485 with *S. bovis* JB1 and *S. bovis* HC5 (de Jesus Ferreira et al., 2013).

486 According to the authors, this can be explained by the reduction of proteolysis through
487 the inhibition of enterobacteria possibly carried out by bacteriocins derived from these bacteria.
488 The DM loss changed between treatments. The silage inoculated with CCMA 0170 strain
489 (obligatory heterofermentative) was the who presented the lowest loss, better results regarding
490 DM loss in previous studies (Ávila et al., 2014; Carvalho et al. 2014) in sugarcane silage. Any
491 changes was observed regarding the strains metabolisms DM loss percentage. Losses lower
492 than 4% was observed in silages inoculated with heterofermentative mandatory strains (*L.*
493 *farraginis* and *L. hilgardii*) and facultative heterofermentatives strains (*L. plantarum*).

494 The lowest values were observed in silages inoculated with *L. plantarum* strains (CCMA
495 1393, CCMA 1394 e CCMA 1401). Silages inoculated with these strains belong to the ones

496 with higher lactic acid content. Low pH content might be related to the strain's metabolism,
497 traditionally used as silage's inoculants due its capacity of producing high lactic acid and fast
498 pH reduction.

499 The silages inoculated with *L. plantarum* strain presented higher lactic acid
500 concentration. This result was already expected because metabolized content is 87% by these
501 bacteria is converted in lactic acid (Santos et al. 2013). Still, the silages with who has the higher
502 acetic acid was the ones inoculated with obligatory heterofermentative strains, selected from
503 corn and sugarcane silage. Among those strains, CCMA 0170 was more efficient in acetic acid
504 production in the sugarcane silage. Some heterofermentative strains doesn't present significant
505 values of acetaldehyde dehydrogenase enzyme, (Oude Elferink et al., 2001), responsible for
506 reducing acetyl-CoA in acetaldehyde which will be reduced in ethanol. The ethanol production
507 is basically zero and consequently, the acetic acid will increase as final product of the
508 fermentation process.

509 Another studies also evaluated the inoculant's effects on the synthesis of metabolites in
510 elephant grass silage. A increase was observed in acetic, butyric, lactic acids and ethanol when
511 *L. plantarum* e *P. acidilactici* was used (Shah et al., 2018). Other authors note the lactic acid
512 content was lower than the one found in this study, ranging from 19.16 to 28.99 g/Kg of DM.
513 The use of *S. bovis* JB1, *S. bovis* HC5 and *Ent. faecium* elephant grass silage inoculant caused
514 a increased on the lactic acid concentration (64.91 to 67.8 g/Kg of DM) and acetic and butyric
515 acids decrease (de Jesus Ferreira et al., 2013). The butyric acid values found by these authors
516 were similar to the ones in this study, ranging from 0.22 to 0.27 g/Kg.

517 The silage inoculated with the CCMA 1366 strain (*L. buchneri*) showed bigger LAB
518 population, followed by silages inoculated with CCMA 0173 (*L. brevis*) and CCMA 0170 (*L.*
519 *hilgardii*) strains, the first, isolated from corn silage and the last two sugarcane silage. The
520 bigger population could be attributed to the larger bacterial inoculant growth or the LAB could

521 have been bigger due to environmental changes, favoring the growth of others bacteria from
522 this group.

523 Silages inoculated with CCMA 1409, CCMA 1364, CCMA 1366, CCMA 0173 and
524 CCMA 0170 strains presented lower yeast population. On those silages were also observed
525 higher acetic acid content. CCMA 0173 and CCMA 0170 strains also inhibited the yeast growth
526 in sugarcane silage (Carvalho et al., 2014) and whole corn plant silage (Reis et al., 2018). It's
527 known that yeast re inhibited by acetic acid production which the hypothesis that these strains
528 were capable of producing enough acetic acid to decrease the yeast population.

529 In the opening phase of the silo the ensiled material is exposed to air, which favors the
530 growth of undesirable aerobic microorganisms. The deterioration process of the organic acids
531 caused by yeasts and acetic acid bacteria increased the temperature and pH, favoring the growth
532 of other unwanted microorganisms such as filamentous fungi and enterobacteria (Driehuis &
533 Oude Elferink, 2000). The silages inoculated with CCMA 1388, CCMA 1394, CCMA 1396,
534 CCMA 1397 (*L. plantarum*), CCMA 1363, CCMA 1364 (*L. farraginis*) and CCMA 0173
535 (*L.brevis*) strains presented higher aerobic stability.

536 The silages treated with CCMA 1363, CCMA 1364 and CCMA 0173 showed higher
537 lactic acid concentration (Table 3), which can be attributed to the inhibition of the filamentous
538 fungi and yeasts during the opening of the silo phase. development. Although heterolactic
539 fermentation positively influences the aerobic stability, which might be considered
540 disadvantageous when there is a possibility of greater DM losses during fermentation
541 (McDonald et al., 1991). Among the heterofermentive strains that increased the aerobic stability
542 of the elephant grass silage and CCMA 1363, CCMA 1364 (*L. farraginis*) strains, also reduced
543 the silage DM loss.

544

545 **Conclusions**

546 The fermentation process of elephant grass silage was characterized by the succession
 547 of four BAL species. During the evaluation it was evidenced that although strains isolated from
 548 the silage itself are adapted to the characteristics of the forage, it is possible to find isolated
 549 strains of different silages that may be promising for use in different forages. This highlights
 550 the importance of the research and evaluation of new strains adapted to the fermentative process
 551 of each forage. The silages inoculated with the CCMA 1388, CCMA 1394 (*L.plantarum*),
 552 CCMA 1363 and CCMA 1364 (*L. farraginis*) strains had lower loss of DM and greater aerobic
 553 stability. Among these, the CCMA 1364 strain stands out for producing silages with lower yeast
 554 populations, undetectable levels of butyric acid in addition to low loss of DM and greater
 555 aerobic stability. Further studies will be conducted using these promising strains in larger scale
 556 silos.

557 **References**

- 558 Ahmed, T., Kanwal, R., & Ayub, N. (2006). Influence of temperature on growth pattern of
 559 *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus acidophilus* isolated from camel
 560 milk. *Biotechnology*, **5**, 481-486.
- 561 Ávila, C. L. S., Carvalho, B. F., Pinto, J. C., Duarte, W. F., & Schwan, R. F. (2014). The use of
 562 *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. *Journal*
 563 *of Dairy Science*, **97**, 940-951.
- 564 Ávila, C. L. S., Pinto, J. C., Figueiredo, H. C. P., & Schwan, R. F. (2009). Effects of an
 565 indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane
 566 silage. *Grass and Forage Science*, **64**, 384-394.
- 567 Axelsson, L.T. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In *Lactic Acid*
 568 *Bacteria* ed. Salminen, S. and Von Wright, A. pp. 1–63. New York, NY: Marcel Dekker
- 569 Bernardes, T. F., & Adesogan, A. T. (2012, November). Aerobic deterioration of silages in
 570 warm climates. In *Proceedings of the 6th symposium on strategic management of pastures'*
 571 *(Eds OG Pereira, DM Fonseca, KG Ribeiro, FHM Chizzotti) pp (pp. 249-268)*
- 572 Bolsen, K. K. (1995). Silage: basic principles. *Forages*, **5**, 163-176.
- 573 Carvalho, B. F., Ávila, C. L. S., Bernardes, T. F., Pereira, M. N., Santos, C., & Schwan, R. F.
 574 (2017). Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated
 575 corn kernel silage. *Journal of applied microbiology*, **122**, 589-600.

- 576 Carvalho, B. F., Ávila, C. L. S., Pinto, J. C., Neri, J., & Schwan, R. F. (2014). Microbiological
577 and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic
578 acid bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, **195**, 1-13.
- 579 Contreras-Govea, F. E., Muck, R. E., Broderick, G. A., & Weimer, P. J. (2013). *Lactobacillus*
580 *plantarum* effects on silage fermentation and in vitro microbial yield. *Animal Feed Science and*
581 *Technology*, **179**, 61-68.
- 582 de Jesus Ferreira, D., de Paula Lana, R., de Moura Zanine, A., Santos, E. M., Veloso, C. M., &
583 Ribeiro, G. A. (2013). Silage fermentation and chemical composition of elephant grass
584 inoculated with rumen strains of *Streptococcus bovis*. *Animal Feed Science and*
585 *Technology*, **183**, 22-28.
- 586 Driehuis, F., & Elferink, S. O. (2000). The impact of the quality of silage on animal health and
587 food safety: a review. *Veterinary Quarterly*, **22**, 212-216.
- 588 Evangelista, A. R., Abreu, J. D., Amaral, P. D., Pereira, R. C., Salvador, F. M., & Santana, R.
589 A. V. (2004). Produção de silagem de capim-marandu (*Brachiaria brizantha* stapf cv.
590 Marandu) com e sem emurchecimento. *Ciência e Agrotecnologia*, **28**, 443-44.
- 591 Ferreira, D. F. (2008, July). SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística.
592 In *Revista symposium*, **6**, 36-41.
- 593 González Pereyra, M. L., Chiacchiera, S. M., Rosa, C. A., Sager, R., Dalcero, A. M., &
594 Cavaglieri, L. (2011). Comparative analysis of the mycobiota and mycotoxins contaminating
595 corn trench silos and silo bags. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**, 1474-1481.
- 596 Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E., & Klaenhammer, T. R. (1989). Antimicrobial
597 Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food*
598 *Protection*, **52**, 384-387.
- 599 Horowitz, W., & Latimer, G. W. (2006). Official methods of analysis of AOAC
600 International. *Gaithersburg, Md. AOAC International*.
- 601 Li, D., Ni, K., Pang, H., Wang, Y., Cai, Y., & Jin, Q. (2015). Identification and antimicrobial
602 activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn stover silage. *Asian-Australasian*
603 *journal of animal sciences*, **28**, 620.
- 604 Liu, Q., Chen, M., Zhang, J., Shi, S., & Cai, Y. (2012). Characteristics of isolated lactic acid
605 bacteria and their effectiveness to improve stylo (*Stylosanthes guianensis* Sw.) silage quality at
606 various temperatures. *Animal science journal*, **83**, 128-135.
- 607 McDonald, P. H., & Henderson, A. AR & Heron, SJE, 1991. The Biochemistry of Silage. *The*
608 *biochemistry of silage*.
- 609 Muck, R. E. (2008, October). Improving alfalfa silage quality with inoculants and silo
610 management. In *Proceedings of the 70th Annual Cornell Nutrition Conference for Feed*
611 *Manufacturers* (pp. 137-146). Cornell University Syracuse, NY.

- 612 Muck, R. E. (2010). Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira*
613 *de Zootecnia*, **39**, 183-191.
- 614 O'brien, M., Egan, D., O'kiely, P., Forristal, P. D., Doohan, F. M., & Fuller, H. T. (2008).
615 Morphological and molecular characterisation of *Penicillium roqueforti* and *P. paneum* isolated
616 from baled grass silage. *Mycological research*, **112**, 921-932.
- 617 Ogunade, I. M., Kim, D. H., Jiang, Y., Weinberg, Z. G., Jeong, K. C., & Adesogan, A. T.
618 (2016). Control of *Escherichia coli* O157: H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage
619 additives. *Journal of dairy science*, **99**, 4427-4436.
- 620 Oude Elferink, S. J., Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F., & Driehuis, F.
621 (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus*
622 *buchneri*. *Applied and Environmental microbiology*, **67**, 125-132.
- 623 Pang, H., Qin, G., Tan, Z., Li, Z., Wang, Y., & Cai, Y. (2011). Natural populations of lactic
624 acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal
625 RNA and recA gene analysis. *Systematic and applied microbiology*, **34**, 235-241.
- 626 Pell, A. N., & Schofield, P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure
627 forage digestion in vitro. *Journal of dairy science*, **76**, 1063-1073.
- 628 Penteado, D. C. S., Santos, E. D., Carvalho, G., Oliveir, J. D., Zanine, A. M., Pereira, O. G., &
629 Ferreira, C. L. L. F. (2007). *Lactobacillus plantarum* from microbiota as inoculant for *Panicum*
630 *maximum* silage. *Archivos de Zootecnia*, **56**, 191-202.
- 631 Pereira, A., Auad, A., Lédó, F. D. S., & Barbosa, S. (2010). *Pennisetum purpureum*. *Plantas*
632 *forrageiras*. Viçosa: UFV, 197-219.
- 633 Pereira, A. V., Ledo, F. D. S., Morenz, M. J. F., Leite, J. L. B., Brighenti, A. M., Martins, C.
634 E., & Machado, J. C. (2016). BRS Capiaçú: cultivar de capim-elefante de alto rendimento para
635 produção de silagem. *Embrapa Gado de Leite-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*.
- 636 Pereira, O. G., Rocha, K. D., & Ferreira, C. L. L. F. (2007). Composição química,
637 caracterização e quantificação da população de microrganismos em capim-elefante cv.
638 Cameroon (*Pennisetum purpureum*, Schum.) e suas silagens. *Revista Brasileira de*
639 *Zootecnia*, **36**, 1742-1750.
- 640 Reis, C. B., de Oliveira dos Santos, A., Carvalho, B. F., Schwan, R. F., & Ávila, C. L. D. S.
641 (2018). Wild *Lactobacillus hilgardii* (CCMA 0170) strain modifies the fermentation profile and
642 aerobic stability of corn silage. *Journal of Applied Animal Research*, **46**, 632-638.
- 643 Raja, S., & Dhanasekar, R. (2011). Succinic acid production from bovine rumen— isolation and
644 optimization. *Int J ChemTech Res*, **3**, 1926-1931.
- 645 Randby, Å. T., Selmer-Olsen, I., & Baevre, L. (1999). Effect of ethanol in feed on milk flavor
646 and chemical composition. *Journal of Dairy Science*, **82**, 420-428.

- 647 Rodrigues, P. H. M., Lopes, T. F. T., de Andrade, S. J. T., Melotti, L., de Sousa Lucci, C., de
648 Lima, F. R., & Meyer, P. M. (2003). Adição de inoculantes microbianos sobre a composição
649 química e perfil fermentativo da silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*,
650 Schum. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, **25**, 397-402.
- 651 Saarisalo, E., Skyttä, E., Haikara, A., Jalava, T., & Jaakkola, S. (2007). Screening and selection
652 of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *Journal of Applied Microbiology*, **102**,
653 327-336.
- 654 Santos, E. M., da Silva, T. C., Macedo, C. H. O., & Campos, F. S. (2013). Lactic acid bacteria
655 in tropical grass silages. In *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock*
656 *Purposes*. InTech.
- 657 Santos, E. M., Pereira, O. G., Garcia, R., Ferreira, C. L. L. F., Oliveira, J. S., Silva, T. C., &
658 Rosa, L. O. (2011). Microbial populations, fermentative profile and chemical composition of
659 signalgrass silages at different regrowth ages. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **40**, 747-755.
- 660 Shah, A. A., Xianjun, Y., Zhihao, D., Junfeng, L., & Sao, T. (2018). Microbiological and
661 chemical profiles of elephant grass inoculated with and without *Lactobacillus plantarum* and
662 *Pediococcus acidilactici*. *Archives of microbiology*, **200**, 311-328.
- 663 Thomas, K. C., Hynes, S. H., & Ingledew, W. M. (2002). Influence of medium buffering
664 capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Applied*
665 *and environmental microbiology*, **68**, 1616-1623.
- 666 Weinberg, Z. G., & Muck, R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and
667 use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, **19**, 53-68.
- 668 Yahaya, M. S., Goto, M., Yimiti, W., Smerjai, B., & Kawamoto, Y. (2004). Evaluation of
669 fermentation quality of a tropical and temperate forage crops ensiled with additives of
670 fermented juice of epiphytic lactic acid bacteria (FJLB). *Cellulose*, **31**.
- 671 Yang, J., Cao, Y., Cai, Y., & Terada, F. (2010). Natural populations of lactic acid bacteria
672 isolated from vegetable residues and silage fermentation. *Journal of dairy science*, **93**, 3136-
673 3145.
- 674 Zhou, Y., Drouin, P., & Lafrenière, C. (2016). Effect of temperature (5–25 C) on epiphytic
675 lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage. *Journal of applied*
676 *microbiology*, **121**, 657-671.

Table 1: Identification, origin and population of the lactic acid bacteria evaluated in the experimental silos.

LAB strain (code)	Identification	Inoculation rate
CCMA 1385	<i>Lactobacillus plantarum</i> *	6,2 log CFU g ⁻¹
CCMA 1388	<i>Lactobacillus plantarum</i> *	6,14 log CFU g ⁻¹
CCMA 1393	<i>Lactobacillus plantarum</i> *	6 log CFU g ⁻¹
CCMA 1394	<i>Lactobacillus plantarum</i> *	5,04 log CFU g ⁻¹
CCMA 1396	<i>Lactobacillus plantarum</i> *	6,07 log CFU g ⁻¹
CCMA 1397	<i>Lactobacillus plantarum</i> *	6,70 log CFU g ⁻¹
CCMA 1401	<i>Lactobacillus plantarum</i> *	5,27 log CFU g ⁻¹
CCMA 1402	<i>Lactobacillus plantarum</i> *	6,14 log CFU g ⁻¹
CCMA 1409	<i>Lactobacillus brevis</i> *	6,17 log CFU g ⁻¹
CCMA 1363	<i>Lactobacillus farraginis</i> **	6,53 log CFU g ⁻¹
CCMA 1364	<i>Lactobacillus farraginis</i> **	6,07 log CFU g ⁻¹
CCMA 1366	<i>Lactobacillus buchneri</i> **	6,23 log CFU g ⁻¹
CCMA 0173	<i>Lactobacillus brevis</i> ***	5,90 log CFU g ⁻¹
CCMA 0170	<i>Lactobacillus hilgardii</i> ***	6,20 log CFU g ⁻¹

* isolated strains of elephant grass silage, ** isolated strains of corn silage, *** isolated strains of sugarcane silage.

Table 2 - Chemical and microbiological composition of elephant grass (cv BRS Capiáçu) before silage.

Variable	Value
pH	6,3
Dry matter (g/Kg FM)	222,6
Concentração (g/Kg DM)	
Neutral detergent fiber	680,8
Crude protein	57,7
Acetic Acid	2,30
Lactic acid	0,35
Succinic acid	3,73
Population (log CFU/g (forage))	
LAB	3,58
Yeasts	5,02
Filamentous fungi	4,50
Aerobic spore-forming bacteria	2,69

Table 3 - Chemical composition of elephant grass silage (cv BRS Capiaçú) inoculated with different strains of lactic acid bacteria after 60 days of silage.

LAB strain	Concentration (%DM)					Concentration (g/Kg DM)				
	DM loss	DM %	NDF ¹	CP ¹	pH	Lactic Acid ²	Acetic Acid ²	Succinic Acid ²	Butyric Acid ²	Ethanol ²
CCMA 1385	7,12 ^a	21,95	74,23	5,08	3,90 ^a	45,46 ^a	3,76 ^d	2,83 ^a	0,21 ^b	ND ^{e*}
CCMA 1388	3,45 ^b	21,60	74,13	5,05	3,84 ^a	44,62 ^a	4,16 ^d	2,70 ^a	0,21 ^b	ND ^e
CCMA 1393	7,98 ^a	21,53	74,18	5,08	3,70 ^b	48,82 ^a	5,03 ^c	2,72 ^a	0,23 ^b	ND ^e
CCMA 1394	5,32 ^b	21,78	73,78	5,05	3,70 ^b	49,55 ^a	4,93 ^c	1,34 ^d	0,22 ^b	ND ^e
CCMA 1396	8,38 ^a	21,75	73,84	5,10	3,81 ^a	46,67 ^a	5,29 ^c	2,52 ^a	0,23 ^a	ND ^e
CCMA 1397	8,31 ^a	21,10	73,94	5,11	3,83 ^a	49,15 ^a	5,94 ^b	2,86 ^a	0,22 ^b	ND ^e
CCMA 1401	6,68 ^a	21,48	73,78	5,17	3,71 ^b	52,51 ^a	4,64 ^c	1,45 ^d	0,22 ^b	ND ^e
CCMA 1402	3,60 ^b	21,41	74,00	5,27	3,84 ^a	43,37 ^a	6,25 ^b	2,65 ^a	0,23 ^b	ND ^e
CCMA 1409	4,60 ^b	20,95	73,95	5,05	3,81 ^a	49,05 ^a	7,38 ^b	2,10 ^b	0,21 ^b	ND ^e
CCMA 1363	2,44 ^b	21,05	73,87	5,00	3,89 ^a	47,05 ^a	9,83 ^a	1,26 ^d	0,22 ^b	ND ^e
CCMA 1364	4,62 ^b	20,83	73,92	5,09	3,86 ^a	37,00 ^b	9,32 ^a	1,32 ^d	ND ^c	0,78 ^b
CCMA 1366	8,14 ^a	20,90	73,88	5,08	3,89 ^a	36,86 ^b	9,44 ^a	1,10 ^e	ND ^c	0,90 ^a
CCMA 0173	10,56 ^a	20,89	73,88	4,99	3,94 ^a	47,52 ^a	10,72 ^a	0,72 ^e	ND ^c	0,89 ^a
CCMA 0170	2,07 ^b	20,97	74,05	5,18	3,89 ^a	38,30 ^b	10,08 ^a	1,01 ^e	ND ^c	0,51 ^c
Control	12,25 ^a	21,33	73,88	5,09	3,89 ^a	46,32 ^a	6,75 ^b	1,81 ^c	ND ^c	ND ^b
SEm	1,56	0,41	0,42	0,05	0,04	2,79	0,37	0,12	0,01	0,39
P-value	<0,01	0,66	1,00	0,07	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

^{a-e}Means in columns with different letters differ (P <0,05) statistically by Scott-Knott test.

*Not detected.

Table 4 - Microbiological composition of elephant grass silage (cv BRS Capiaçú) inoculated with different strains of lactic acid bacteria after 60 days of fermentation.

LAB strain	População (Log CFU g ⁻¹ silagem)			
	LAB	Yeasts	Filamentous Fungi	ASB
CCMA 1385	5,27 ^d	3,72 ^a	2,50	2,39
CCMA 1388	5,36 ^d	3,80 ^a	2,69	3,96
CCMA 1393	5,25 ^d	4,11 ^a	2,74	3,54
CCMA 1394	5,33 ^d	4,16 ^a	2,80	3,20
CCMA 1396	5,42 ^d	4,32 ^a	2,86	3,84
CCMA 1397	5,52 ^d	4,16 ^a	3,22	3,47
CCMA 1401	6,43 ^c	4,16 ^a	2,63	3,07
CCMA 1402	6,41 ^c	4,15 ^a	2,90	3,01
CCMA 1409	6,40 ^c	2,64 ^b	2,60	3,30
CCMA 1363	5,51 ^d	4,22 ^a	2,54	3,72
CCMA 1364	6,65 ^c	2,83 ^b	2,39	3,30
CCMA 1365	7,48 ^a	3,06 ^b	2,24	3,58
CCMA 0173	7,19 ^b	3,20 ^b	2,84	4,51
CCMA 0170	6,96 ^b	2,67 ^b	2,72	3,87
Controle	6,33 ^c	3,93 ^a	2,53	2,53
SEm	0,1	0,22	0,15	0,32
<i>P</i> -value	<0,0001	<0,0001	0,0157	0,0058

^{a-d}Means in columns with different letters differ ($P < 0,05$) statistically by Scott-Knott test.

Table 5 - Evaluation of aerobic stability of elephant grass silage (cv. BRS Capiaçú) after 60 days of ensiling and maximum temperature reached after 7 days of exposure to air.

LAB strain	Aerobic stability (h)	Maximum temperature (°C)
CCMA 1385	22,91 ^b	30,10
CCMA 1388	32,01 ^a	31,40
CCMA 1393	25,41 ^b	33,00
CCMA 1394	35,16 ^a	31,00
CCMA 1396	32,81 ^a	32,03
CCMA 1397	35,16 ^a	34,53
CCMA 1401	27,58 ^b	32,86
CCMA 1402	28,83 ^b	33,13
CCMA 1409	28,16 ^b	32,70
CCMA 1363	39,40 ^a	32,86
CCMA 1364	36,75 ^a	32,86
CCMA 1365	26,58 ^b	33,60
CCMA 0173	38,58 ^a	31,63
CCMA 0170	30,08 ^b	33,90
Controle	21,16 ^b	33,83
SEm	3,62	1,10
<i>P</i> -value	0,0295	0,3339

^{a-b}Means in columns with different letters differ ($P < 0,05$) statistically by Scott-Knott test.

Figure 1: Estimates of the bacterial species isolated from MRS agar at different times of elephant grass (cv. Napier) silage.

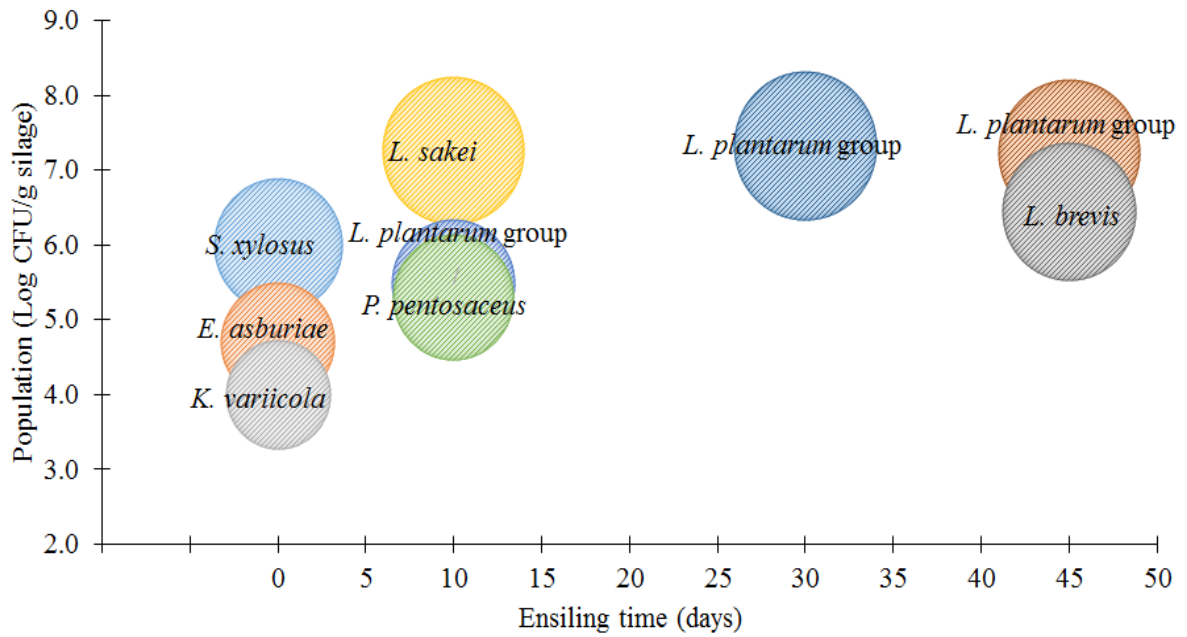
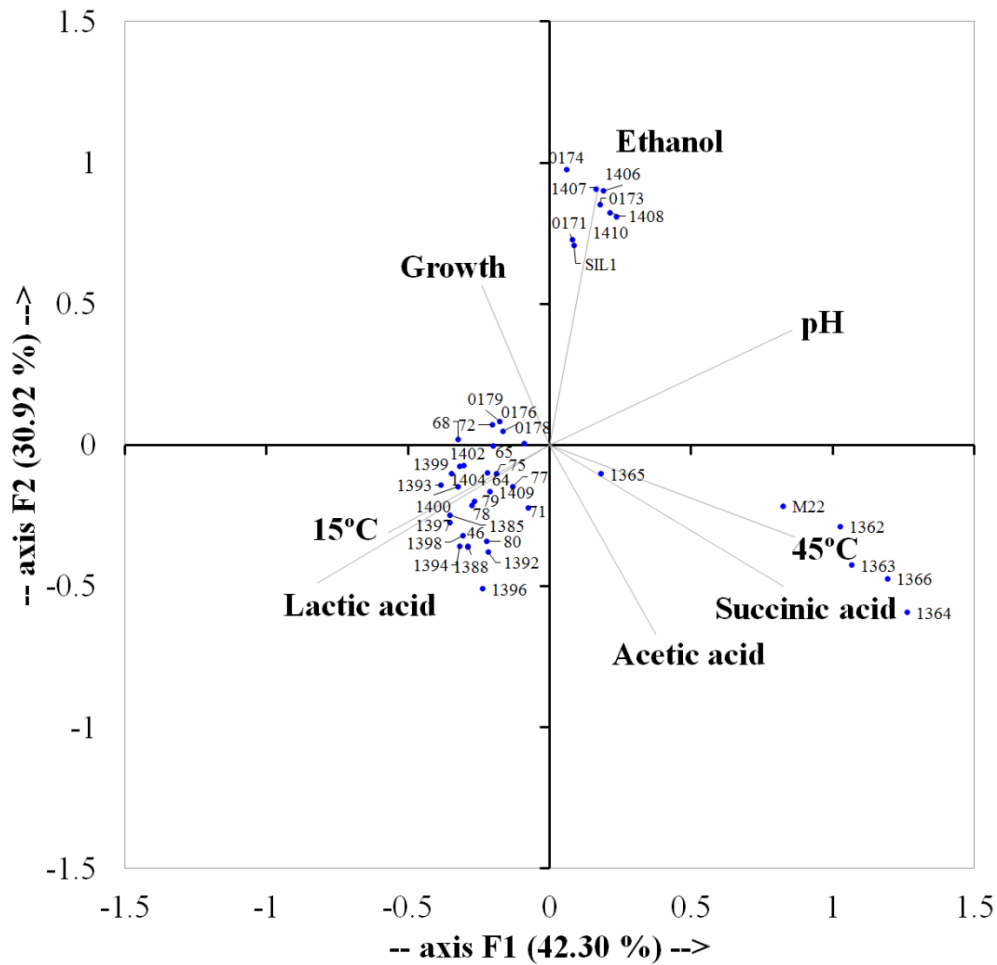


Figure 2: Principal Components Analysis of growth data, pH reduction and metabolite production in elephant grass extract and growth at different temperatures

Biplot (axes F1 and F2: 73.22 %)



*Sugar cane silage strains: 2001 (S1), 2101 (CCMA 0173), 2102 (CCMA 0174), 2113 (CCMA 0176), 2115 (CCMA 0178), 2121 (CCMA 0179) and 2008 (CCMA 0171) **Corn silage strains: 1022 (M22), 1003 (CCMA 1362), 1004 (CCMA 1363), 1040 (CCMA 1364), 1074 (CCMA 1365) and 1076 (CCMA 1366) ***Elephant grass silage strains: 40 (CCMA 1385), 44 (CCMA 1388), 64 (CE64), 65 (CE65), 66 (CCMA 1394), 55 (CCMA 1394), 46 (CCMA 1388), 46 (1397), 67 (CCMA 1398), 68 (CE68), 69 (CCMA 1399), 71 (CE71), 72 (CE72), 75 (CE75), 76 (CCMA 1400), 77 (CE77), 78 (CCMA 1401 (CCMA 1408), 89 (CCMA 1408), 89 (CCMA 1408), 87 (CCMA 1409), 88 (CCMA 1408), 89 (CCMA 1408), 90 (CCMA 1409), CCMA 1410).

Supplementary Table 1 - Population of strains of lactic acid bacteria and pH in elephant grass extract after 24h of fermentation and growth at different temperatures.

LAB strain	Identification (score) ¹	Final population ²	Final pH ³	Temperature		
				15°C	25°C	45°C
CE21	<i>L. sakei</i> (1,806)	6,00	4,78	+	+	-
CCMA 1377	<i>L. sakei</i> (2,05)	7,45	3,65	+	+	-
CE24	<i>L. sakei</i> (1,892)	7,46	3,64	+	+	-
CCMA 1378	<i>L. sakei</i> (1,844)	7,32	3,73	+	+	-
CE26	<i>L. sakei</i> (1,784)	7,59	3,6	+	+	-
CE27	<i>L. sakei</i> (1,76)	7,61	3,64	+	+	-
CCMA 1379	<i>L. sakei</i> (2,121)	7,53	3,61	+	+	-
CE29	<i>L. sakei</i> (1,839)	7,66	3,57	+	+	-
CE30	<i>L. sakei</i> (1,778)	7,59	3,58	+	+	-
CE31	<i>L. sakei</i> (1,788)	7,46	3,67	+	+	-
CCMA 1380	<i>L. sakei</i> (1,864)	7,22	3,67	+	+	-
CCMA 1381	<i>L. sakei</i> (1,973)	7,51	3,62	+	+	-
CE34	<i>L. sakei</i> (1,761)	7,38	3,62	+	+	-
CE35	<i>L. sakei</i> (1,862)	7,46	3,57	+	+	-
CCMA 1382	<i>L. sakei</i> (1,814)	6,60	3,72	+	+	-
CCMA 1383	<i>L. sakei</i> (1,901)	7,70	3,71	+	+	-
CCMA 1384	<i>L. sakei</i> (1,874)	7,45	3,62	+	+	-
CCMA 1385	<i>L. plantarum</i> (2,078)	8,48	3,36	+	+	-
CE41	<i>L. plantarum</i> (1,874)	7,85	3,39	+	+	-
CCMA 1386	<i>P. pentosaceus</i> (1,768)	7,74	3,48	+	+	-
CCMA 1387	<i>P. pentosaceus</i> (1,984)	7,83	3,43	+	+	-
CCMA 1388	<i>L. plantarum</i> (2,085)	6,85	3,37	+	+	-
CCMA 1389	<i>L. plantarum</i> (1,942)	7,95	3,38	+	+	-
CE46	<i>L. plantarum</i> (1,704)	7,34	3,37	+	+	-
CCMA 1390	<i>L. plantarum</i> (2,07)	8,02	3,41	w	+	-
CE48	<i>L. plantarum</i> (1,901)	8,06	3,42	w	+	-
CCMA 1391	<i>L. plantarum</i> (2,107)	7,83	3,4	-	+	-
CCMA 1392	<i>L. plantarum</i> (2,301)	8,23	3,41	+	+	-
CE51	<i>L. plantarum</i> (1,954)	7,48	3,4	+	+	-
CCMA 1393	<i>L. plantarum</i> (2,266)	8,83	3,4	+	+	-
CE53	<i>L. plantarum</i> (2,033)	7,81	3,4	+	+	-
CE54	<i>L. plantarum</i> (1,967)	7,46	3,38	+	+	-
CCMA 1394	<i>L. plantarum</i> (2,266)	8,35	3,37	+	+	-
CE56	<i>L. plantarum</i> (2,182)	7,80	3,38	+	+	-
CE57	<i>L. plantarum</i> (2,121)	8,11	3,41	+	+	-
CCMA 1395	<i>L. plantarum</i> (2,417)	7,72	3,41	+	+	-
CE59	<i>L. plantarum</i> (2,118)	7,88	3,4	+	+	-
CE60	<i>L. plantarum</i> (2,112)	7,75	3,39	+	+	-
CCMA 1396	<i>L. plantarum</i> (2,039)	7,94	3,37	+	+	-
CE63	<i>L. plantarum</i> (1,907)	7,88	3,38	+	+	-
CE64	<i>L. plantarum</i> (1,83)	7,81	3,32	w	+	-
CE65	<i>L. plantarum</i> (1,844)	7,76	3,3	w	+	-
CCMA 1397	<i>L. plantarum</i> (1,939)	7,87	3,3	+	+	-
CCMA 1398	<i>L. plantarum</i> (2,135)	7,45	3,32	+	+	-

CE68	<i>L. plantarum</i> (2,103)	7,80	3,27	+	+	-
CCMA 1399	<i>L. plantarum</i> (2,274)	8,04	3,33	+	+	-
CE71	<i>L. plantarum</i> (1,861)	6,00	3,33	w	+	-
CE72	<i>L. plantarum</i> (1,891)	7,92	3,31	w	+	-
CE75	<i>L. plantarum</i> (1,845)	7,70	3,27	w	+	-
CCMA 1400	<i>L. plantarum</i> (2,268)	7,93	3,33	+	+	-
CE77	<i>L. plantarum</i> (1,973)	7,81	3,35	-	+	-
CCMA 1401	<i>L. plantarum</i> (2,245)	7,98	3,36	+	+	-
CE79	<i>L. plantarum</i> (2,068)	7,66	3,36	+	+	-
CE80	<i>L. plantarum</i> (2,029)	7,64	3,36	+	+	-
CE81	<i>L. plantarum</i> (2,022)	7,81	3,38	w	+	-
CCMA 1402	<i>L. plantarum</i> (1,944)	8,30	3,4	+	+	-
CE83	<i>L. plantarum</i> (1,983)	7,61	3,39	+	+	-
CCMA 1403	<i>L. plantarum</i> (2,105)	8,00	3,37	+	+	-
CCMA 1404	<i>L. plantarum</i> (2,078)	8,35	3,36	+	+	-
CCMA 1405	<i>L. plantarum</i> (1,961)	7,68	3,38	+	+	-
CCMA 1406	<i>L. brevis</i> (2,017)	8,64	3,86	-	+	-
CCMA 1407	<i>L. brevis</i> (2,044)	8,85	3,86	w	+	-
CCMA 1408	<i>L. brevis</i> (2,093)	8,56	3,89	w	+	-
CCMA 1409	<i>L. brevis</i> (1,79)	8,52	3,4	+	+	-
CCMA 1410	<i>L. brevis</i> (2,102)	8,50	3,9	-	+	-
CCMA 1364	<i>L. farraginis</i>	8,47	4,16	-	+	+
CCMA 1363	<i>L. farraginis</i>	8,41	4,02	-	+	+
CCMA 1362	<i>L. farraginis</i>	8,53	4,11	-	+	+
M22	<i>Lactobacillus</i> sp.	8,50	3,87	-	+	+
CCMA 1365	<i>L. plantarum</i>	7,98	3,35	w	+	+
CCMA 1366	<i>L. buchneri</i>	8,49	4,18	-	+	+
CCMA 1367	<i>P.acidilactici</i>	7,81	3,47	-	+	+
S1	<i>Lactobacillus</i> sp.	8,60	3,93	+	+	-
CCMA 0172	<i>L.plantarum</i>	8,06	3,41	+	+	-
CCMA 0171	<i>L.brevis</i>	8,78	4,02	+	+	-
CCMA 0173	<i>L. brevis</i>	8,80	3,98	w	+	-
CCMA 0174	<i>L. brevis</i>	8,71	3,89	w	+	-
CCMA 0176	<i>L. plantarum</i>	8,22	3,75	w	+	-
CCMA 0175	<i>L. brevis</i>	7,56	3,4	w	+	-
CCMA 0177	<i>L. brevis</i>	7,72	3,41	w	+	-
CCMA 0178	<i>L. plantarum</i>	8,29	3,41	w	+	-
CCMA 0179	<i>L. plantarum</i>	8,24	3,35	-	+	-
CCMA 0181	<i>L. plantarum</i>	8,11	3,37	+	+	-
CCMA 0180	<i>L. plantarum</i>	7,64	3,41	w	+	-
CCMA 0182	<i>L. plantarum</i>	7,70	3,41	+	+	-
CCMA 0183	<i>L. hilgardii</i>	7,62	3,96	-	+	-
CCMA 0170	<i>L. hilgardii</i>	7,56	3,95	-	+	-

¹Score identification by MALDI TOF-MS; ²Population in log CFU mL⁻¹ after 24h fermentation; ³pH after 24h fermentation.

Supplementary Table 2 - Inhibition of *Escherichia coli* and *Aspergillus flavus* by LAB strains.

LAB strain	Variable	
	- Inhibition of <i>Escherichia coli</i> ¹	- Inhibition of <i>Aspergillus flavus</i> ²
CCMA 1385	2,92 ^b	20,5 ^d
CCMA 1388	2,50 ^b	13,4 ^e
CCMA 1389	4,33 ^b	23,3 ^c
CCMA 1392	2,75 ^b	22,3 ^c
CCMA 1393	2,08 ^b	22,7 ^c
CCMA 1394	3,17 ^b	19,1 ^d
CCMA 1396	3,17 ^b	21,0 ^d
CE64	5,17 ^a	18,8 ^d
CCMA 1397	7,08 ^a	24,6 ^c
CCMA 1398	5,75 ^a	20,5 ^d
CCMA 1399	6,17 ^a	22,9 ^c
CE72	7,50 ^a	24,3 ^c
CE75	5,50 ^a	21,2 ^d
CCMA 1400	5,75 ^a	21,5 ^d
CE77	7,08 ^a	21,9 ^d
CCMA 1401	5,83 ^a	24,8 ^c
CE79	4,92 ^a	24,1 ^c
CE80	4,67 ^a	23,9 ^c
CCMA 1402	7,50 ^a	21,0 ^d
CCMA 1404	7,17 ^a	23,1 ^c
CCMA 1409	5,17 ^a	22,2 ^c
CCMA 1362	4,33 ^b	26,3 ^b
CCMA 1363	2,50 ^b	23,5 ^c
M22	5,08 ^a	24,3 ^c
CCMA 1364	4,00 ^b	29,8 ^a
CCMA 1366	4,17 ^b	21,5 ^d
CCMA 0173	5,00 ^a	25,6 ^b
CCMA 0176	3,70 ^b	23,9 ^c
CCMA 0178	2,08 ^b	22,9 ^c
CCMA 0179	3,51 ^b	24,6 ^c
SEm	0,83	1,05
P-value	<0.0001	<0.0001

^{a-e}Means in columns with different letters differ (P <0,05) statistically by Scott-Knott test.

¹Length of formed halo (mm); ²Total inhibited biomass (%).

Supplementary Figure 1

