



DAIANE SILVA BONALDI

**INOCULAÇÃO DE *Bacillus subtilis* E SEUS
METABÓLITOS EM SILAGEM DE MILHO**

LAVRAS – MG

2017

DAIANE SILBA BONALDI

**INOCULAÇÃO DE *Bacillus subtilis* E SEUS
METABÓLITOS EM SILAGEM DE MILHO**

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

Orientadora

Profa. Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

Co-orientadora

Profa. Dra. Carla da Silva Ávila

LAVRAS – MG

2017

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

Bonaldi, Daiane Silva.

Inoculação de *Bacillus subtilis* e seus metabólitos em silagem de milho /
Daiane Silva Bonaldi. - Lavras : UFLA, 2017.

47 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Orientador(a): Cristina Ferreira Silva e Batista.

Coorientador(a): Carla Luiza da Silva Ávila.

Bibliografia.

1. Silagem. 2. Inoculante bacteriano. 3. Enzimas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**LAVRAS – MG
2017**

DAIANE SILBA BONALDI

**INOCULAÇÃO DE *Bacillus subtilis* E SEUS
METABÓLITOS EM SILAGEM DE MILHO**

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

APROVADA em 21 de Março de 2017

Profa. Dra. Carla da Silva Ávila

UFLA

Dra. Patrícia Nirlane da Costa Souza

UFVJM

Dra. Beatriz Ferreira Carvalho

Profa. Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista
UFLA
(Orientadora)

**LAVRAS – MG
2017**

Elevo os meus olhos para os montes: de onde me virá o socorro?

O meu socorro vem do Senhor, que fez os céus e a terra.

Salmos 121:1,2

Agradecimentos

A Deus por iluminar o meu caminho, por suas bênçãos, proteção e amor incondicional.

A minha mãe Helena, por todo amor, carinho, proteção e dedicação. Pelas suas inúmeras ligações de todo dia que além de demonstrar preocupação também faziam com que a saudade diminuísse.

Ao meu pai Celso por acreditar em mim, por todo amor, carinho e dedicação.

A minha amiga Ednara Tavares pela sua amizade, carinho, companheirismo e incentivo.

A Amora pela companhia e amor com que me esperava chegar em casa todos os dias.

A Renata Rodarte pela sua imensa ajuda e sábios conselhos em momentos difíceis.

A minha orientadora Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista pela orientação, ensinamentos passados e disponibilidade de ajudar sempre que necessário.

A minha co-orientadora Dra. Carla da Silva Ávila por toda ajuda e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas Cibelli Castro, Gustavo Sales, Rafael Amaral, Daviane Martineli, Gustavo Magno, Kelly Reis e Angélica Cristina por toda ajuda e contribuição para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de ensino.

A Fapemig pela concessão da bolsa de estudos.

Obrigada!

Resumo

A silagem de milho é o volumoso conservado mais utilizado em todo o mundo, devido aos altos índices de produtividade da cultura, do valor nutritivo e da concentração de energia. Porém, tanto a silagem da planta, quanto de grãos úmidos de milho são ricas em carboidratos solúveis e ácido lático, o que as tornam susceptíveis a deterioração aeróbia no pós-abertura dos silos. Assim, para diminuir as perdas decorrentes da ensilagem, otimizar o processo fermentativo, reduzir a deterioração aeróbia e manter o valor nutritivo, tem se estudado o uso de inoculantes microbianos na silagem, adicionados ou não de enzimas como a celulase, hemicelulase e amilase como aditivos. E para diminuir os custos da produção de enzimas, resíduos agroindustriais como palha de arroz e de trigo, farelos de trigo, milho e bagaços de cana de açúcar são utilizados como substrato alternativo e barato para a fermentação, além da redução dos problemas ambientais causados pela sua disposição inadequada no meio ambiente. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi a produção da enzima β -glicosidase e avaliação dos efeitos de inoculantes bacterianos e bacterianos enzimáticos sobre a composição químico-bromatológica, microbiológica e na estabilidade aeróbia das silagens de milho após 30 e 60 dias de ensilagem. A produção da β -glicosidase foi realizada por *Bacillus subtilis* em fermentação submersa utilizando polpa de café como fonte de carbono e indutor enzimático. Os tratamentos inoculados nos silos foram: silagem sem inoculante (SC), silagem com *B. subtilis* $1,0 \times 10^8$ UFC/g forragem (SB1), silagem com *B. subtilis* $1,0 \times 10^9$ UFC/g forragem (SB2) e silagem com *B. subtilis* $7,0 \times 10^9$ UFC/g forragem + enzima β -glicosidase (SBE). Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, dois tempos de abertura e três repetições. O valor de atividade específica para β -glicosidase encontrado no extrato bruto foi de $1,3170 \text{ IU mL}^{-1}$. Independentemente do tipo de tratamento utilizado, todas as silagens avaliadas foram bem preservadas, pois apresentaram pH abaixo de 4.2, demonstrando boa qualidade de fermentação para silagem de milho. No tempo de 60 dias, melhoram significativamente os teores de carboidratos solúveis na silagem: SB1 (0.96%), SB2 (0.96%) e SBE (0.88%) quando comparadas à SC (0.63%). Para bactérias do ácido lático, as maiores populações foram encontradas nos tratamentos SB1 (6.86 log UFC/ml) e SBE (6.84 UFC/ml), seguido pela SC e SB1, que não apresentaram diferenças entre si (6.22 UFC/ml). O tratamento SB2 melhorou significativamente a estabilidade aeróbia (247.75 horas) e o tempo para que o pico de temperatura fosse atingido (297.50 horas), sendo que SC e SB1 apresentaram valores intermediários e SBE apresentou os menores valores.

Palavras chave: β -glicosidase; bactéria; estabilidade aeróbia; inóculo bacteriano.

Abstract

Corn silage is the world most widely used preserved crop because of high crop productivity, nutrient value and energy concentration. However, both plant silage and wet corn grains are rich in soluble carbohydrates and lactic acid, which makes them susceptible to aerobic deterioration in post-opening silos. In order to reduce silage losses, optimize the fermentation process, reduce aerobic deterioration and maintain nutritional value, we have studied the use of microbial inoculants in silage, with or without enzymes such as cellulase, hemicellulase and amylase as additives. And to reduce the costs of producing enzymes, agroindustrial residues such as rice and wheat straw, wheat bran, maize and sugarcane bagasse are used as an alternative and inexpensive substrate for fermentation, in addition to reducing environmental problems caused by inadequate disposal in the environment. In this context, the objective of the work was the production of β -glucosidase enzyme and evaluation of the effects of bacterial and bacterial enzymatic inoculants on the chemical-bromatological, microbiological and aerobic stability of corn silages after 30 and 60 days of silage. The production of β -glucosidase was carried out by *Bacillus subtilis* in submerged fermentation using coffee pulp as carbon source and enzyme inducer. The treatments inoculated in the silos were: silage without inoculant (SC), silage with *B. subtilis* 1.0×10^8 CFU / g forage (SB1), silage with *B. subtilis* 1.0×10^9 CFU / g forage (SB2) and Silage with *B. subtilis* 7.0×10^9 CFU / g forage + β -glucosidase enzyme (SBE). A completely randomized experimental design was used, with four treatments, two opening times and three replications. The specific activity value for β -glycosidase found in the crude extract was $1.3170 \text{ IU mL}^{-1}$. Regardless of the type of treatment used, all evaluated silages were well preserved, as they presented pH below 4.2, showing good fermentation quality for corn silage. In the 60-day period, the levels of soluble carbohydrates in the silage improved significantly: SB1 (0.96%), SB2 (0.96%) and SBE (0.88%) when compared to SC (0.63%). For lactic acid bacteria, the highest populations were found in SB1 (6.86 log CFU / ml) and SBE (6.84 CFU / ml) treatments, followed by SC and SB1, which showed no differences between them (6.22 CFU / ml). The SB2 treatment significantly improved the aerobic stability (247.75 hours) and the time for the peak temperature to be reached (297.50 hours), and SC and SB1 presented intermediate values and SBE presented the lowest values.

Keywords: aerobic stability, β -glucosidase; bacterium; bacterial inoculum.

Lista de tabelas

CAPITULO 2

- Tabela 1. Composição químico-bromatológica e microbiológica do milho utilizado na ensilagem.....27
- Tabela 2. Probabilidade dos efeitos (p) dos fatores tratamento e tempo de fermentação sobre características da silagem de milho.....28
- Tabela 3. Composição químico-bromatológica das silagens de milho em função dos tratamentos inoculados após 30 e 60 dias de ensilagem.....28
- Tabela 4. Composição microbiológica das silagens de milho em função dos tratamentos inoculados após 30 e 60 dias de ensilagem.....30
- Tabela 5. Efeito dos inoculantes sobre a temperatura das silagens de milho nos diferentes tratamentos quando expostas ao ar após 60 dias de ensilagem.....31

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
1	INTRODUÇÃO GERAL.....1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....3
2.1	Silagem de milho.....3
2.2	Inoculantes microbianos.....4
2.3	Enzimas celulolíticas como aditivos de silagem.....6
2.4	Microrganismos produtores de celulases.....7
2.4.1	<i>Bacillus subtilis</i>.....8
2.5	Resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulase.....9
2.6	Resíduos da indústria cafeeira.....11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
CAPÍTULO 2.....	19
1	Introdução.....21
2	Material e métodos.....22
2.1	Preparo dos inoculantes bacterianos e bacteriano-enzimático...22
2.1.1	Atividade enzimática.....23
2.2	Preparo dos silos e inoculação dos aditivos.....24
2.3	Análises bromatológicas da forragem fresca e das silagens após o tratamento com os aditivos.....24
2.4	Análises microbiológicas da forragem fresca e das silagens após o tratamento com os aditivos.....25
2.5	Análises da atividade enzimática e do pH da forragem fresca e das silagens após o tratamento com os aditivos.....26
2.6	Análises estatísticas.....26
3	Resultados e discussão.....27
4	Conclusão.....32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

CAPITULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O processo de ensilagem visa preservar a qualidade da forragem com intuito de ser utilizada durante o período de baixa produção de pastagem, sendo a silagem de milho o volumoso conservado mais utilizado em todo o mundo, devido aos seus altos índices de produtividade da cultura, do valor nutritivo e da concentração de energia. Porém, tanto a silagem da planta, quanto de grãos úmidos de milho são ricas em carboidratos solúveis e ácido lático, o que as tornam susceptíveis a deterioração aeróbia no pós-abertura dos silos.

Assim, para diminuir as perdas de nutrientes na fermentação da silagem, manter o valor nutritivo, otimizar o processo fermentativo, reduzir a deterioração aeróbia e aumentar a estabilidade aeróbia durante o fornecimento no cocho tem se estudado o uso de aditivos biológicos classificados como produtos estimulantes da fermentação da silagem, contendo culturas de bactérias específicas e/ou enzimas, como as celulases, hemicelulases, amilases e pectinases. Desta forma, as enzimas atuam na função de quebrar a parede celular e o amido dos grãos, transformando-os em carboidratos mais simples, que podem ser utilizados pelas bactérias lácticas, aumentando a fermentação da silagem e eficiência de utilização animal. Outra vantagem seria a redução dos teores de fibra em detergente neutro e de fibra em detergente ácido da forragem ensilada, diminuindo assim, os componentes fibrosos indigestíveis do alimento, promovendo uma eficiência na digestão de matéria seca, quando oferecida aos ruminantes.

Diante da possibilidade de se utilizar enzimas como inoculantes biológicos, tem sido proposta a utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono e indutor enzimático em processos fermentativos. Estes resíduos promovem um substrato alternativo e barato para a fermentação, além da redução dos problemas ambientais causados pela sua disposição inadequada no meio ambiente. Muitos subprodutos das atividades agrícolas podem ser utilizados no meio de fermentação, dentre eles a palha de arroz e de trigo, farelos de trigo, milho e arroz; bagaços de cana-de-açúcar e laranja, resíduo de banana e espiga de milho, soro de queijo, melaço e água da maceração de milho e polpa e casca de café.

A estabilidade aeróbia após a abertura dos silos é um dos fatores mais importantes para qualidade da silagem e pode ser afetada negativamente por microrganismos deteriorantes que se desenvolvem nesse substrato rico em nutrientes e carboidratos solúveis residuais do processo fermentativo. Dessa forma, é interessante a utilização da bactéria *Bacillus subtilis* como inoculante nas silagens, pois esta espécie é uma das mais importantes produtoras de metabólitos com atividade antifúngica e antibacteriana do gênero *Bacillus*, o que possibilita sua utilização no controle biológico dos microrganismos indesejáveis, promovendo assim, o aumento da estabilidade aeróbia nas silagens de milho.

Logo, neste trabalho, visou-se a produção da enzima β -glicosidase pela bactéria *Bacillus subtilis*, utilizando como substrato resíduos agrícolas da indústria de café (polpa e casca), com posterior aplicação tanto do extrato bruto enzimático quanto do microrganismo em silagens de milho, na qual pretendeu-se avaliar o efeito do aditivo biológico sobre características microbiológicas, químico-bromatológicas e na estabilidade aeróbia das silagens de milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Silagem de milho

O processo de ensilagem visa preservar a qualidade da forragem com intuito de ser utilizada durante o período de baixa produção de pastagem. Consiste na preservação de forragens úmidas, recém-colhidas, por meio de um processo fermentativo, baseado na produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, a partir de açúcares solúveis, o que promove redução do pH e, conseqüentemente, inibição de micro-organismos deteriorantes indesejáveis (KUNG Jr., 2001)

O processo fermentativo é realizado principalmente pelas bactérias do ácido láctico homofermentativas, sendo o ácido láctico o produto final da fermentação e o responsável pela preservação da energia do alimento. Assim, quanto mais ácido láctico for produzido em relação aos ácidos acético e butírico, menor é a energia dispendida para a produção de calor, menores são as perdas por descarboxilação e formação de gases e mais palatável se torna a silagem (LUIS et al., 1992).

O termo qualidade da silagem deve ser medida pela resposta do animal que está consumindo este volumoso (JOBIM & BRANCO, 2002). São vários os fatores que determinam a qualidade da silagem, desde a escolha do híbrido, estágio de maturação na colheita, tipo de solo e clima (SILVA et al., 1999). Para COSTA et al. (2001), os fatores que determinam o padrão de fermentação durante a ensilagem, intrínsecos à planta forrageira, são representados pelo teor de umidade no momento do corte, teor de carboidratos solúveis e poder tampão. Dessa forma, relata-se que os carboidratos solúveis da planta afetem a qualidade da silagem, influenciando diretamente o processo de fermentação, enquanto que o conjunto de carboidratos estruturais e não estruturais tem marcante influência no processo digestivo do animal. Com relação aos fatores do meio, uma fermentação adequada só é garantida em ambiente de anaerobiose, pela adoção correta das técnicas da ensilagem, tais como o ponto de colheita, tamanho da partícula, rápido carregamento do silo, compactação adequada para expulsão de oxigênio, uso de aditivos, tipo de silo e eficiência de drenagem de efluentes (COSTA et al. 2001). Outro fator determinante na avaliação da qualidade da silagem é a

estabilidade aeróbia, que é definida como o tempo necessário para se verificar mudanças mensuráveis da temperatura, sendo altamente variável de poucas horas a semanas (KUNG Jr. et al., 2001).

A silagem de milho é o volumoso conservado mais utilizado em todo o mundo, devido aos seus altos índices de produtividade da cultura, do valor nutritivo e da concentração de energia (NEUMANN, 2007). Porém, tanto a silagem da planta, quanto de grãos úmidos de milho são ricas em carboidratos solúveis e ácido lático, o que as tornam susceptíveis a deterioração aeróbia no pós-abertura dos silos. Assim, para diminuir as perdas decorrentes da ensilagem, otimizar o processo fermentativo, reduzir a deterioração aeróbia, manter o valor nutritivo e aumentar a estabilidade aeróbia durante o fornecimento no cocho (GIMENES et al., 2006) tem se estudado o uso de inoculantes microbianos na silagem, adicionados ou não de enzimas como as celulases, hemicelulases, amilases e pectinases (ZANETTE et al., 2012) como aditivos de silagens. As enzimas atuam na função de quebrar a parede celular e o amido dos grãos, transformando-os em carboidratos mais simples, que podem ser utilizados pelas bactérias lácticas, aumentando a fermentação da silagem e eficiência de utilização animal (Mc DONALD et al., 1991).

Outra alternativa para otimizar o processo fermentativo no silo está na inclusão de materiais ricos em carboidratos, como açúcar, melão, cereais, polpa de beterraba, polpa cítrica e batata (Mc DONALD, 1981), com a finalidade de aumentar o teor de carboidratos solúveis da massa ensilada, que aumentam a proporção de energia disponível para o crescimento e multiplicação das bactérias ácido lácticas e, com isso, otimizar a produção de ácido lático (CORRÊA & POTT, 2001).

2.2 Inoculantes microbianos

Os inoculantes microbianos são empregados por meio da adição de culturas bacterianas e são classificados como estimulantes da fermentação e não-nutritivos (Vilela 1998). A grande variedade desses aditivos biológicos tem sido recomendada com a finalidade de se garantir melhor qualidade das silagens. Atualmente, os inoculantes bacterianos são compostos, em sua maioria, pelas bactérias: *Lactobacillus*

plantarum, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus spp.*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus sp.*, *Lactobacillus buchneri* e *propionibactérias*, enquanto os complexos enzimáticos são compostos por hemicelulase, celulase, amilase, α -galactosidase, β -mananase e pectinases (JOBIM et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004; BERNARDES et al., 2005; KUNG Jr. et al., 2007; ZANETTE et al., 2012).

O princípio básico da atuação dos inoculantes consiste no aumento da disponibilidade de açúcares simples, via complexo enzimático, para que as bactérias tenham acesso a esses açúcares, incrementando, dessa forma, a produção de ácido láctico e promovendo a queda brusca do pH (LAVEZZO, 1993). Entre os fatores que determinam o sucesso da aplicação de microrganismos nas silagens, destacam-se a compatibilidade entre a planta forrageira e o microrganismo, a habilidade de crescimento da bactéria na massa de forragem e a inoculação de uma população suficiente em relação à epífita da forragem (MUCK 2008; ZOPOLLATO et. al., 2009).

Após a abertura dos silos, o pH tende a aumentar, ocorre acúmulo de amônia e o nível de ácidos orgânicos (lático e acético) tende a declinar (KUNG E RANJIT, 2001). A deterioração aeróbia da silagem está relacionada com o aumento da temperatura e do pH devido ao metabolismo de açúcares e ácidos orgânicos causado por leveduras e bactérias, reduzindo a qualidade do material ensilado. Normalmente, decresce a concentração de ácido láctico e carboidratos não estruturais, pois são usados como substrato pelos microrganismos aeróbios (KUNG Jr., 2001). Portanto, é interessante a utilização de cepas de microrganismos que promovam o aumento da estabilidade aeróbia das silagens. Neste contexto, o uso de *Bacillus subtilis* como inoculante microbiano torna-se promissor, pois esta espécie é uma das mais importantes produtoras de metabólitos com atividade antifúngica e antibacteriana do gênero *Bacillus* (TODOVORA & KOZHUHAROVA 2009), o que possibilita sua utilização no controle biológico dos microrganismos indesejáveis (LANNA FILHO et al., 2010).

2.3 Enzimas celulolíticas como aditivos de silagem

Os tipos de enzima mais utilizados no processo de ensilagem incluem as celulases, hemicelulases, amilases e pectinases (ZANETTE et al., 2012); assim, as enzimas atuam na função de quebrar a parede celular e o amido dos grãos, transformando-os em carboidratos mais simples, que podem ser utilizados pelas bactérias lácticas, aumentando a fermentação da silagem e eficiência de utilização animal (Mc DONALD et al., 1991). Outra vantagem seria a redução dos teores de fibra em detergente neutro e de fibra em detergente ácido da forragem ensilada, diminuindo assim, os componentes fibrosos indigestíveis do alimento, promovendo uma eficiência na digestão de matéria seca, quando oferecida aos ruminantes (CYSNEIROS et al., 2006).

As celulases são um conjunto de enzimas, representadas por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases que hidrolisam de maneira coordenada e eficiente a celulose (LYND et al., 2002). Estas enzimas pertencem à classe das hidrolases e são biocatalizadoras altamente específicas que atuam em sinergia sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise para a liberação de açúcares.

Endoglucanases são responsáveis por iniciar a hidrólise da celulose. Elas hidrolisam aleatoriamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula, liberando açúcares e oligossacarídeos de vários tamanhos e, por consequência, novas cadeias terminais (ZHANG; LYND, 2004).

O grupo das exoglucanases atua nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose produzindo principalmente celobiose e glicose. Participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulases. Atuando sobre a celulose cristalina produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização (ZHANG; LYND, 2004). São enzimas estratégicas na hidrólise da fibra celulósica, pois são capazes de liberar glicose diretamente do polímero (LYND et al 2002).

As enzimas β -glicosidases hidrolisam a celobiose e alguns oligossacarídeos solúveis à glicose (LYND et al., 2002), promovendo um aumento do rendimento total dos açúcares fermentescíveis (WILSON, 2008). Assim, quando estas enzimas atuam em conjunto, fenômeno denominado sinergia, elas apresentam um rendimento muito melhor do que quando atuam isoladamente umas das outras. Todas as três enzimas do complexo enzimático celulolítico sofrem repressão catabólica pelo produto final de hidrólise. Desta forma, por prevenir o acúmulo de celobiose, a β -glicosidase é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise, desempenhando consequentemente, um efeito essencial na hidrólise enzimática da celulose (PARRY et al., 2002).

2.4 Microrganismos produtores de celulases

Os microrganismos celulolíticos são encontrados em grupos taxonômicos variados, sendo a maioria pertencente às eubactérias e aos fungos. Os organismos celulolíticos ocorrem em todas as biotas onde há acúmulo de resíduos de celulose. Usualmente, ocorrem em populações mistas, compreendendo espécies celulolíticas e não celulolíticas que interagem sinergicamente. Estas interações levam à completa hidrólise da celulose que é convertida em glicose, e esta em dióxido de carbono e água, em condições aeróbicas, e em dióxido de carbono, metano e água em condições de anaerobiose (Béguin & Aubert, 1994).

Em bactérias, existe a presença de microrganismos decompositores da celulose tanto aeróbios como anaeróbios. Dentre as bactérias celulolíticas aeróbias, as mais comumente relatadas como produtoras de celulases são as bactérias do gênero *Cellulomonas*, espécies de *Bacillus*, como *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus cereus* (SINGH & HAYASHI, 1995). Entre as bactérias anaeróbias estão os gêneros *Acetivibrio*, *Clostridium* e *Ruminococcus* (LYND et al., 2002; DESVAUX, 2005).

Há uma particular diferença na estratégia celulolítica entre as bactérias aeróbias das anaeróbias. Nas bactérias aeróbias e nos fungos, as várias enzimas que constituem as celulases ocorrem como unidades separadas, cada qual tendo uma ação específica. Já as bactérias anaeróbicas, com algumas exceções, apresentam complexos celulolíticos extracelulares multienzimáticos, denominados celulosomos, que atuam de modo agrupado, podendo tanto ficar aderido à superfície das células, quanto distribuído no meio, quando este for aquoso (RAINEY et al., 1994; ROGERS E GOTTSCHALK, 1993; SCHWARZ, 2001). Estes complexos apresentam-se como protuberâncias na parede bacteriana com uma variedade de enzimas, não somente celulolíticas, mas também xilanases, manases e quitinases estão presentes (BIOSSET ET AL., 1999; SHOHAM ET AL., 1999; SCHWARZ, 2001).

A degradação anaeróbia da celulose pode ocorrer em uma variedade de biotas, incluindo esterco, lagoas de tratamento de resíduos, em sedimentos marinhos, entre outros. Microrganismos como *Fibrobacter spp.*, *Butyvirio fibriosolvens*, *Rumonococcus albus*, *R. flavefaciens*, no rúmen e no trato gastrointestinal desempenham um importante papel na nutrição de animais herbívoros (Bisaria & Ghose, 1981; Weimer et al., 1991).

2.4.1 *Bacillus subtilis*

Bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas por produzir uma variedade de enzimas extracelulares importantes tais como amilases, proteases, pectinases e celulases. Estas bactérias são capazes de crescer sob condições extremas de temperatura e pH e originar produtos estáveis em uma ampla faixa de ambientes adversos (Wang et al., 2007). A maior parte das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. apresenta uma variedade de sistemas de enzimas hidrolíticas e são capazes de utilizar substâncias orgânicas consistindo de misturas complexas típicas de resíduos. Uma característica interessante do gênero é sua capacidade bem caracterizada para degradar substratos amorfos, tais como carboximetilcelulose (Makky, 2000).

A espécie *Bacillus subtilis* têm como habitat natural o solo, podem ocupar nichos ecológicos distintos em associação com plantas, toleram altas temperaturas devido a formação de esporos resistentes, apresentam um rápido crescimento em meio líquido e não são patogênicos (SHODA 2000). Os *B. subtilis* podem utilizar vários sistemas de transporte para assimilação de açúcares, em particular, o transporte de

glicose é realizado através do sistema de fosfotransferase, onde esta é simultaneamente transportada e fosforilada através de um sistema de fosforilação em cadeia, composto por proteínas gerais e proteínas específicas para a glicose (DEUTSCHER et al., 2002).

Os *Bacillus subtilis* tem sido utilizado para o biocontrole de doenças de plantas (LANNA FILHO et al., 2010) devido à sua atividade contra bactérias fitopatogênicas e fungos, atribuída, em grande parte à sua produção de antibióticos peptídicos, entre eles o grupo dos lipopeptídeos, das famílias da surfactina, iturina e fengicina, se destaca como um dos mais eficientes (ONGENA et al., 2005). Devido à sua ação como agente de biocontrole, *B. subtilis* também tem sido utilizado como aditivo inoculante microbiano para silagens, atuando no controle do crescimento de microrganismos deteriorantes indesejáveis, diminuindo a deterioração aeróbia na pós-abertura dos silos. Tal fato foi observado nos trabalhos de PHILLIP & FELLNER (1992) e BASSO et.al (2012), no qual ambos tiveram um efeito positivo sobre a estabilidade aeróbia das silagens de milho quando inoculadas com *B. subtilis*. Assim, a utilização deste microrganismo torna-se mais uma alternativa no controle da estabilidade aeróbia de silagens.

2.5 Resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulasas

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantemente encontradas na natureza (SZENGYEL, 2000), sendo compostas, principalmente, pelos resíduos agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Possuem como principal vantagem o seu baixo custo como matéria- prima para outros processos, além de poderem ser adquiridas em regiões próximas aos locais de processamento do material (THOMSEN, 2005).

Os resíduos agroindustriais, provenientes de diversas atividades econômicas, são gerados em grandes quantidades a cada ano (HECK et al., 2006), sendo comumente utilizados como ração animal, fertilizantes ou condicionadores de solo (FERRER et al., 2001; SCHIEBER et al., 2001; YANG et al., 2001), na produção de energia, matérias de construção e na manufatura do papel, por exemplo (MORAIS et al., 2002). Entretanto, com a tecnologia apropriada de bioconversão, estes resíduos

lignocelulósicos podem ser transformados em produtos com alto valor agregado, como álcool, enzimas, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos de aroma, entre outros (PANDEY et al., 2000; UENOJO e PASTORE, 2007; MEDEIROS et al., 2000; SOCCOL E VANDENBERGHE, 2003).

A conversão biológica dos resíduos agroindustriais em compostos de interesse também se faz importante, uma vez que quando indevidamente descartados, estes podem tornar-se fontes de poluição, pois se acumulam em áreas agroindustriais, não apresentando significativo valor industrial ou comercial (CORREIA et al., 2004).

O acúmulo dos resíduos agroindustriais promove a deterioração do meio ambiente e perda de recursos naturais, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa (PANDEY et al., 2000). Logo, os procedimentos geralmente realizados no manejo destes resíduos são a disposição e a incineração. Estas não são medidas adequadas, pois podem causar problemas ambientais. A disposição dos resíduos no ambiente sem tratamento pode permitir o desenvolvimento de parasitas prejudiciais para futuros cultivos, e a incineração, além da poluição ambiental, pode dar origem a incêndios indesejáveis e incontroláveis (DIBLASI et al., 1997; YANG et al., 2001; SUN & CHENG, 2002). Assim, a biodegradação e a bioconversão de materiais lignocelulósicos presentes nos resíduos agroindustriais em produtos de alto valor agregado, diminuem a poluição ambiental causada por estes materiais (PANAGIOTOU et al., 2003; MTUI & NAKAMURA, 2005).

São muitos os estudos voltados para a triagem de fontes de carbono de baixo custo para a biossíntese das enzimas do complexo celulósico por microrganismos, de maneira a substituir os substratos celulósicos altamente purificados que são normalmente utilizados (YANG et al., 2001). Por exemplo, soro de queijo, melão e bagaço de cana de açúcar e água de maceração de milho são resíduos provenientes da agroindústria que apresentam grande potencial de reuso devido a sua composição e características físico-químicas, além dos benefícios ambientais (LADEIRA et al., 2010). Assim, devido à capacidade dos microrganismos em produzir diferentes enzimas celulolíticas com diversos modos de ação e especificidade, isso permite a exploração de substratos heterogêneos.

Logo, a produção de enzimas celulolíticas microbianas, é altamente

dependente da natureza do substrato, e a eficiência na produção destas enzimas depende também de outros fatores relacionados à composição química da matéria-prima, como a acessibilidade e suscetibilidade de vários componentes, bem como suas associações químicas ou físicas (KANG et al., 2004). Portanto, é importante a escolha do substrato indutor apropriado para a produção das enzimas celulolíticas. O substrato lignocelulósico ideal deve ser barato, facilmente processável, disponível em grandes quantidades e sua composição deve enquadrar-se para a produção de enzimas celulolíticas, assim como para uma possível hidrólise comercial posterior (JUHÁSZ et al., 2005).

2.6 Resíduos da indústria cafeeira

A polpa de café e as águas residuárias da desmucilagem do fruto são os principais resíduos do processamento semi-seco do café. A polpa é geralmente depositada em pilhas para permitir sua secagem para depois ser usada como adubo orgânico na lavoura, mas com o uso contínuo destas áreas como depósito, os lixiviados produzidos por este material são uma fonte de poluição para o solo e águas subterrâneas, provocando alterações químicas e físicas. Devido à sua umidade elevada, a polpa é propensa à decomposição e fermentação, gerando odores desagradáveis e proliferação de mosquitos, o que dificulta a sua manipulação (ASOCIACIÓN NACIONAL DEL CAFÉ, 2005), além dos compostos considerados tóxicos e antinutricionais, como a cafeína, taninos e compostos fenólicos presentes em sua composição (PANDEY et al., 2000) que podem afetar a fauna e a flora (ULLOA et al., 2003).

A polpa representa cerca de 40% do peso seco do grão de café, é composta pela casca (epicarpo) e parte da mucilagem (mesocarpo), sendo essencialmente rica em carboidratos, proteínas e minerais como nitrogênio, fósforo e principalmente potássio. Também contém grandes quantidades de lignina, celulose e hemicelulose, além de compostos considerados tóxicos e antinutricionais, como a cafeína, taninos e compostos fenólicos (PANDEY et al., 2000).

Devido à sua composição, a polpa de café tem um grande potencial para ser utilizada na produção de diferentes compostos de valor agregado, como: compostagem,

alimentação animal, cultivo de cogumelos, produção de enzimas, compostos fenólicos, biogás, ácidos orgânicos, pectina, metabólitos secundários (substâncias de aroma e sabor), proteína unicelular (*single cell protein* SCP), processos de ensilagem e preparação de meios de cultivo (PANDEY et al., 2000). Assim, o aproveitamento dos resíduos do processamento do café minimizam seus efeitos negativos no ambiente, dando-lhes um destino mais rentável. (NAVIA et al., 2011).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASOCIACIÓN NACIONAL DEL CAFÉ. Manual de beneficiado húmedo del café. Guatemala: ANACAFÉ, 2005.

BASSO, F. C.; LARA, E.C.; ASSIS, F. B. ; RABELO, C. H. S.; MORELLI, M.; REIS, R. A. Características da fermentação e estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com *Bacillus subtilis*. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, Salvador, v.13, n.4, p.1009-1019 out./dez., 2012.

Béguin, P.; Aubert, J. P. (1990) The biological degradation of cellulose. FEMS *Microbiology Reviews*, Amsterdam, Netherlands, v. 13, p. 25 - 58, 1994.

BERNADES, T. F.; REIS, R. A.; MOREIRA, A. L. Perfil fermentativo e microbiológico das silagens do capim marandu aditivadas com polpa cítrica peletizada. Scientia Agricola, doi: 10.1590/S0103-90162005000300003. Online, v. 62, n. 3, p. 214-220, 2005.

BIOSET, C. et al. Digestion of crystalline cellulose substrates by the *Clostridium thermocellum* cellulosome: structural and morphological aspects. Biochemical of Journal, Hoboken, v. 340, p. 829 – 35, 1999.

Bisaria, V.S. e Ghose, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: Substrats, microorganisms, enzyme and products. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 3, p. 90-104, 1981.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JR., N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro, RJ: Interciência, p. 241-271. 2008.

CORRÊA LA, POTT EB. Silagem de capim. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 2., 2001, Lavras. Anais... Lavras: Universidade Federal de Lavras. p.255-271, 2001.

CORREIA, R. T. P. et al. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. Process Biochemistry, Oxford, v. 39, p. 2167-2172, 2004

COSTA, C.; MONTEIRO, A.L.G.; BERTO, D.A.; ALMEIDA JR, G.A.; LOPES, A.B.R.C. Impacto do uso de aditivos e/ou inoculantes comerciais na qualidade de conservação e no valor alimentício de silagens. In: Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas. Maringá. Anais... Maringá: UEM, 2001, p. 87-126, 2001.

COUTO, S. R.; DOMÍNGUEZ, A.; SANROMÁN, A. Utilisation of lignocellulosic wastes for lignin peroxidase production by semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Biodegradation, v. 12, n. 5, p. 283-289, 2001.

DESVAUX, M. The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. Enzyme and Microbial Technology, New York, v.37, p. 373-385, 2005.

DEUTSCHER, J.; GALINIER, A.; VERSTRAETE, I. M. Carbohydrate uptake and metabolism. In: SONESHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. *Bacillus subtilis* and its Clostridial Relatives from Genes to Cells. USA, p. 129-150, 2002.

DI BLASI, C.; TANZI, V.; LANZETTA, M. A study on the production of agricultural residues in Italy. *Biomass & Bioenergy*, Oxford, v. 12, p. 321-331, 1997.

FERRER, J. et al. Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. *Bioresource Technology*, Oxford, v. 76, p. 39-44, 2001.

GIMENES ALG, MIZUBUTI IY, MOREIRA FB, PEREIRA ES, RIBEIRO ELA, MORI R M. Chemical composition and aerobic stability of corn silages made with bacterial and/or enzymatic inoculants. *Acta Sci. Anim. Sci.* 2006; v. 28, n. 2, p. 153-158.

HECK, J. X. et al. Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation. *Bioresource Technology*, Oxford, v. 97, p. 1902-1906, 2006.

JOBIM, C. C.; BRANCO, A. B.; SANTOS, G. T. Silagem de grãos úmidos na alimentação de bovinos leiteiros. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS DE CORTES E LEITE, 5., 2003.

JOBIM, C.C.; BRANCO, A.F. Qualidade de forragens conservada versus produção e qualidade do leite de vacas. In: II Sul-Leite - Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. 1, 2002, Maringá. Anais... Maringá: UEM, p. 98-122, 2002.

JUHÁSZ, T. et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, Oxford, v. 40, p. 3519-3525, 2005.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Bioresource Technol.*, v. 86, n. 3, p. 207-13, 2003.

KANG, S. W. et al. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, Oxford, v. 91, p. 153-156, 2004.

KUNG JR., L. Aditivos microbianos e químicos para silagem: Efeitos na fermentação e resposta animal. In: WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM, 2., 2001, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, p.53-74, 2001.

KUNG JR., L.; TAYLOR, C.C.; LYNCH, M.P.; NEYLON, J.M. The effects of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.86, n. 1, p.336-343, 2003.

KUNG, L. JR.; SCHMIDT, R. J.; EBLING, T. E.; HU, W. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of ground and whole high-moisture corn. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 2309-2314, 2007.

KUNG, L.; RANJIT, N. K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of Dairy Science*, v. 84, n. 5, p. 1149-1155, 2001.

LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, M. L. L. Utilização De Resíduos Agroindustriais Para A Produção De Proteases Pelo Termofílico *Bacillus sp* em Fermentação Submersa: Otimização Do Meio De Cultura Usando A Técnica De Planejamento Experimental. Química Nova (online). Vol. 33, No. 2, p. 324-328, 2010.

LANNA FILHO. R.; FERRO, H.M.; PINHO, R.S.C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas, v.4, n.2, p.12-20, 2010.

LAVEZZO, W. Ensilagem de capim-elefante. In: Simpósio Sobre Manejo da Pastagem, 10., 1992, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luis de Queiroz, p.169, 1993.

LUIS, L.; ESPERANCE, M.; OJEDA, F. Fermentacion de ensilajes tropicales com la utilizacion de bacterias ácido lácticas aisladas en Cuba. Pastos Forrajes, v.15, n.1, p.63-69, 1992.

LYND, L.R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.66, p. 506, 2002.

Makky, E. A. Avicelase Production by a Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* Isolated from Soil using Sugarcane Bagasse World Academy of Science, *Engineering and Technology* 57. 2009.

McDONALD, P. The biochemistry of silage. New York: John Wiley & Sons. p.207, 1981.

McDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERON, S. The biochemistry of silage. 2. ed. Marlow: Chalcombe, p. 340, 1991.

MEDEIROS, A. B. P., PANDEY, A., FREITAS, R. J. S., CHRISTEN, P., SOCCOL, C. R. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. Biochemical Engineering Journal, v. 6, 33-39, 2000.

MORAIS, H. Liquid chromatographic and electrophoretic characterization of extracellular β -glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste. Journal of Chromatography B, Amsterdam, v. 770, p. 111-119, 2002.

MTUI, G.; NAKAMURA, Y. Bioconversion of lignocellulosic waste from selected dumping sites in Dar es Salaam, Tanzania. Biodegradation, New York, v. 16, p. 493-499, 2005.

MUCK, R. E. Advances in inoculants for silage. In: Symposium on Strategic Management of Pasture and, 2.; International Symposium on Animal Production under Grazing, 2., Viçosa, MG. Proceedings... Viçosa, MG: UFV, p. 221-232, 2008.

NAVIA, D. P.; VELASCO, R. J.; HOYOS, J. L. Production and evaluation of ethanol from coffee processing by-products. Vitae, Medellín, v. 18, n. 3, p. 287- 294, Sept. 2011.

NEUMANN, M.; MÜHLBACH, P. R. F.; NÖRNBERG, J. L.; RESTLE, J.; OST, P.R. Efeito do tamanho de partícula e da altura de colheita das plantas de milho (*Zea mays* L.) sobre as

perdas durante o processo fermentativo e o período de utilização das silagens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Vicososa, MG, v. 36, n. 5, p. 1395-1405, 2007.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.-L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, v.9, p.1084-1090, 2007.

PANAGIOTOU, G. et al. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, Amsterdam, v. 18, p. 37-45, 2003.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153- 162, Oct. 2000.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, v. 22, p. 189-259, 2004.

PARRY, N. J.; D. E. BEEVER, D. E.; OWEN, E.; NERINCKX, W.; CLAEYSSSENS, M.; BEEUMEN, J. V.; BHAT, M. K., Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 404, p. 243–253, 2002.

PHILLIP, L.E.; FELLNER, V. Effects of bacterial inoculation of high-moisture ear corn on its aerobic stability, digestion, and utilization for growth by beef steers. *Journal of Animal Science*, v.70, p.3178-3187, 1992.

RAINEY, F. A.; DONNISON, A. M.; JANSSEN, P. H.; SAUL, D.; RODRIGO, A.; BERGQUIST, P. L.; DANIEL, R. M.; STACKEBRANDT, E.; MORGAN, H. W. Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, v. 120, p. 263–266, 1994.

RODRIGUES, P. H. M.; ALMEIDA, L. F. S.; LUCCI, C. S.; MELOTTI, L.; LIMA, F.R. Efeitos da adição de inoculantes microbianos sobre o perfil fermentativo da silagem de alfafa adicionada de polpa cítrica. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 6, p. 1646-1653, 2004.

ROGERS, P.; GOTTSCHALK, G. Biochemistry and regulation of acid and solvent production in clostridia. In D. R. Woods (ed.), *The clostridia and biotechnology*. Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass. p. 25–50, 1993.

SCHIEBER, A; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, London, v. 12, p. 401-413, 2001.

SCHWARZ, W. H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, Germany, v. 56, p. 634 –49, 2001.

SILVA, F.F.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUEZ, J.A.S. Qualidade de silagens de híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) de porte baixo, médio e alto com diferentes

proporções de colmo + folhas/panícula. 1. Avaliação do processo fermentativo. Revista Brasileira de Zootecnia. Viçosa, v.28, n.1, p. 14-20, 1999.

SCHWARZ, W. H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology, Heidelberg, Germany, v. 56, p. 634 –49, 2001.

SHODA, M. Review: Bacterial control of plants diseases. Journal of Bioscience, v.89, n. 6, p. 515-521. 2000.

SHOHAM, Y; LAMED, R.; BAYER, E. A. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. Trends in Microbioloy, Cambridge, United Kingdom, v. 7, n. 7, p. 275 – 80, 1999.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Microbial cellulases: Protein architerture, molecular properties, and biosynthesis. Advances in Applied Microbiology, San Diego, v. 40, p. 1-44, 1995.

SOCCOL, C. R. & VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Biochemical Engineering Journal, Amsterdan, v. 13, p. 205–218, 2003.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology, Oxford, v. 83, p. 1-11,2002.

SZENGYEL, Z. Ethanol from wood: Cellulase enzyme production. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Lund University, Suécia, 2000.

TAVARES, V. B.; PINTO, J. C.; EVANGELISTA, A. R.; FIGUEIREDO, H. C. P.; ÁVILA, C. L. S.; LIMA, R. F. Effects of different compaction degrees, inclusion of absorbent additive and wilting on the chemical composition of tanzania grass silages. R. Bras. Zootec., v.38, n.1, p.40-49, 2009.

THOMSEN, M. H. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 68, p. 598–606, 2005.

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.

UENOJO, M; PASTORE, G.M. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. Química Nova, 30:388-394, 2007.

ULLOA, J., VERRETH, J., AMATO, S. HUISMAN, E. Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. Bioresource Technol 89, 267–274. 2003.

VILELA, D. Aditivos para silagem de plantas de clima tropical. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 35. Botucatu. Anais... Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.73. 1998.

WANG, FENG QIN, WANG, EN TAO, LIU, JIE, CHEN, QIANG, SUI, XIN HUA, CHEN, WEN FENG, CHEN, WEN XIN. Mesorhizobium albiziae sp. nov., a novel bacterium that nodulates Albizia kalkora in a subtropical region of China. Int J Syst Evol Microbiol 57: 1192-1199, 2007.

Weimer, P. J.; French, A. D.; Calamari, A. JR. Differential fermentation of cellulose allomorphs by ruminal cellulolytic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, p. 3101 – 6, 1991.

WILSON, D.B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.1125, n. 1, p. 289-297, 2008.

YANG, X. et al. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, Oxford, v. 78, p. 277-280, 2001.

ZANETTE, M.P.; NEUMANN, M.; FARIA, M.V.; UENO, R.K.; MARAFON, F.; DURMAN, T. Valor nutricional e perdas durante a fermentação de silagens de milho (zea mays l.) com açúcar ou inoculante. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v.11, n.2, p. 178-189, 2012.

ZHANG, P.; LYND, R. L. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 88, n. 7, p. 797-824. 2004.

ZOPOLLATO, M.; DANIEL, J. L. P. NUSSIO, L. G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 38, n. 1, p. 170-189, jan. 2009.

CAPÍTULO 2**INOCULAÇÃO DE *Bacillus subtilis* E SEUS METABÓLITOS
EM SILAGEM DE MILHO**

Resumo

O objetivo do trabalho foi a avaliação dos efeitos de inoculantes bacterianos e bacterianos enzimáticos sobre a composição químico-bromatológica, microbiológica e na estabilidade aeróbia das silagens de milho após 30 e 60 dias de ensilagem. A produção da β -glicosidase foi realizada por *Bacillus subtilis* em fermentação submersa utilizando polpa e casca de café como fonte de carbono e indutor enzimático. Os tratamentos inoculados nos silos foram: silagem sem inoculante (SC), silagem com *B. subtilis* $1,0 \times 10^8$ UFC/g forragem (SB1), silagem com *B. subtilis* $1,0 \times 10^9$ UFC/g forragem (SB2) e silagem com *B. subtilis* $7,0 \times 10^9$ UFC/g forragem + enzima β -glicosidase (SBE). Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, dois tempos de abertura e três repetições. O valor de atividade específica para β -glicosidase encontrado no extrato bruto foi de $1,3170 \text{ IU mL}^{-1}$. Independentemente do tipo de tratamento utilizado, todas as silagens avaliadas foram bem preservadas, pois apresentaram pH abaixo de 4.2, demonstrando boa qualidade de fermentação para silagem de milho. No tempo de 60 dias, melhoram significativamente os teores de carboidratos solúveis na silagem: SB1 (0.96%), SB2 (0.96%) e SBE (0.88%) quando comparadas à SC (0.63%). Para bactérias do ácido lático, as maiores populações foram encontradas nos tratamentos SB1 (6.86 log UFC/ml) e SBE (6.84 UFC/ml), seguido pela SC e SB1, que não apresentaram diferenças entre si (6.22 UFC/ml). O tratamento SB2 melhorou significativamente a estabilidade aeróbia (247.75 horas) e o tempo para que o pico de temperatura fosse atingido (297.50 horas), sendo que SC e SB1 apresentaram valores intermediários e SBE apresentou os menores valores.

Palavras chave: β -glicosidase; bactéria; estabilidade aeróbia; inóculo bacteriano.

1 INTRODUÇÃO

O processo de ensilagem visa preservar a qualidade da forragem com intuito de ser utilizada durante o período de baixa produção da pastagem. Consiste na preservação de forragens úmidas, recém-colhidas, por meio de um processo fermentativo, baseado na produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, a partir de açúcares solúveis, o que promove redução do pH e, conseqüentemente, inibição de microorganismos deteriorantes indesejáveis (KUNG Jr., 2003). A silagem de milho é o volumoso conservado mais utilizado em todo o mundo, devido aos seus altos índices de produtividade da cultura, do valor nutritivo e da concentração de energia (NEUMANN et al, 2007).

Porém, tanto a silagem da planta, quanto de grãos úmidos de milho são ricas em carboidratos solúveis e ácido láctico, o que as tornam susceptíveis a deterioração aeróbia no pós-abertura dos silos. Para diminuir as perdas de nutrientes na fermentação da silagem, manter o valor nutritivo (ZANETTE et al., 2012), otimizar o processo fermentativo, reduzir a deterioração aeróbia e aumentar a estabilidade aeróbia durante o fornecimento no cocho (GIMENES et al., 2006) tem se estudado o uso de aditivos biológicos classificados como produtos estimulantes da fermentação da silagem, contendo culturas de bactérias específicas e/ou enzimas (CORRÊA & POTT, 2001).

Os tipos de enzima mais utilizados incluem as celulases, hemicelulases, amilases e pectinases (ZANETTE et al., 2012); assim, as enzimas atuam na função de quebrar a parede celular e o amido dos grãos, transformando-os em carboidratos mais simples, que podem ser utilizados pelas bactérias lácticas, aumentando a fermentação da silagem e eficiência de utilização animal (Mc DONALD et al., 1991). Outra vantagem seria a redução dos teores de fibra em detergente neutro e de fibra em detergente ácido da forragem ensilada, diminuindo assim, os componentes fibrosos indigestíveis do alimento, promovendo uma eficiência na digestão de matéria seca, quando oferecida aos ruminantes (CYSNEIROS et al., 2006).

Diante da possibilidade de se utilizar enzimas como inoculantes biológicos, faz-se necessária a utilização de substratos de baixo custo e facilmente disponíveis para que o processo de produção não seja oneroso. Dessa forma, tem se estudado o uso de

resíduos agroindustriais como fonte de carbono e indutor enzimático em processos fermentativos. Muitos subprodutos das atividades agrícolas podem ser utilizados no meio de fermentação, dentre eles a palha de arroz e de trigo, farelos de trigo, milho e arroz; bagaços de cana-de-açúcar e laranja, resíduo de banana e espiga de milho, (GRAMINHA et al., 2008; MARTINS, 2006), soro de queijo, melão e água da maceração de milho (LADEIRA et al., 2010) e polpa e casca de café (DIAS et al., 2014).

A polpa do café é resíduo do processamento semi-seco do café e geralmente é usada como adubo orgânico na lavoura, mas com o uso contínuo destas áreas como depósito, os lixiviados produzidos por este material são uma fonte de poluição para o solo e águas subterrâneas, provocando alterações químicas e físicas (ASOCIACIÓN NACIONAL DEL CAFÉ, 2005). A polpa é composta pela casca (epicarpo) e parte da mucilagem (mesocarpo), sendo rica em carboidratos, proteínas e minerais (PANDEY et al., 2000). Assim, devido à sua composição, estes resíduos tem um grande potencial para ser utilizado na produção de diferentes compostos de valor agregado, como: compostagem, alimentação animal, cultivo de cogumelos, produção de enzimas, compostos fenólicos, biogás, ácidos orgânicos, pectina, metabólitos secundários e preparação de meios de cultivo (PANDEY et al., 2000).

Logo, neste trabalho, visou-se a produção da enzima β -glicosidase pela bactéria *Bacillus subtilis*, utilizando como substrato resíduos agrícolas da indústria de café (polpa e casca), com posterior aplicação tanto do extrato bruto enzimático quanto do microrganismo em silagens de milho, na qual pretendeu-se avaliar o efeito destes aditivos biológicos sobre características químico-bromatológicas, microbiológicas e na estabilidade aeróbia das silagens.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo dos inoculantes bacterianos e bacterianos enzimáticos

Os inoculantes foram previamente preparados no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial do Departamento de Biologia da UFLA. Para os inoculantes bacterianos, foi utilizada a bactéria *Bacillus subtilis* CCMA 0087 pertencente à Coleção

de Culturas da Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras - UFPA, Brasil. Esta cepa foi isolada da fruta Marolo (*Annona crassiflora*), coletada na região do Cerrado brasileiro, como descrito por Dias et al. (2014). O isolado estava preservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em glicerol a 20% e foi reativado em meio caldo nutriente e através de transferências sucessivas, a população desejada foi obtida, conforme metodologia de ÁVILA (2009).

O outro tratamento foi composto pela bactéria *Bacillus subtilis* CCMA 0087 mais a enzima celulolítica β -glicosidase produzida por fermentação submersa utilizando polpa de café como fonte de carbono e indutor enzimático. Para isto, o microrganismo foi reativado em meio caldo nutriente e crescido até 10^8 UFC ml^{-1} . O meio foi centrifugado e a biomassa inoculada no meio de fermentação. Para o preparo deste meio, primeiramente foram adicionados 36,8g de polpa de café seca e triturada, 0,6g KOH e 1000 ml de água destilada. A mistura foi autoclavada por 15 minutos a 121°C e, posteriormente, filtrada duas vezes em papel filtro. Neste extrato aquoso obtido foram adicionados: (%) 0.2 NaNO_3 , 0.1 K_2HPO_4 , 0.05 MgSO_4 e 0.05 KCl . E o pH foi ajustado para 3,64. A fermentação ocorreu por 24 horas, na temperatura de $36,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 140 rpm (DIAS et al., 2014).

2.1.1 Atividade enzimática

Para quantificação da atividade enzimática de β -glicosidase, a mistura de reação foi composta de 300 μL de p - nitrofenil glucopiranosídeo, como substrato e 200 μL do extrato enzimático bruto. A mistura de reação foi incubada a 50°C por 30 minutos e paralisada pela adição de 1ml de Na_2CO_3 1M. De forma que os resultados da atividade foram obtidos subtraindo-se os valores das absorbâncias das amostras e controle obtidos em leitura a 405nm. Os resultados foram correlacionados com a curva analítica preparada utilizando-se p - nitrofenol como padrão para o cálculo da glicose liberada pela enzima, representando a produção em atividade específica. A atividade enzimática (U/ml) de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μg de p - nitrofenol por minuto por ml de reação.

2.2 Preparo do silos e inoculação dos aditivos

A segunda parte do experimento visou a inoculação da bactéria *Bacillus subtilis* em duas diferentes concentrações e do extrato bruto enzimático obtido através da fermentação mais *Bacillus subtilis* em silagens de milho. O experimento foi conduzido nos Departamentos de Zootecnia e Biologia da Universidade Federal de Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil. A planta de milho utilizada foi colhida em uma fazenda na cidade de Ijaci, Minas Gerais, e picada em máquina estacionária regulada para partículas de 10mm.

A planta fresca picada foi separada sobre um filme plástico e os inoculantes foram aplicados por meio de um borrifador manual, tomando-se o cuidado de ter um filme plástico e um borrifador para cada tratamento. A forragem picada foi compactada manualmente com o auxílio de uma barra de ferro em silos de PVC com diâmetro de 10 cm e altura de 50 cm, adaptados com válvula tipo Bunsen, com capacidade para 2,0 a 2,5 kg de forragem utilizando-se densidade de aproximadamente 600 kg de forragem por m³. Sendo armazenados em temperatura ambiente, sob a proteção de luz solar e chuvas.

Os tratamentos utilizados foram: SC, silagem controle; SB1, silagem com inoculante bacteriano (*Bacillus subtilis*) $1,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia/g forragem; SB2, silagem com inoculante bacteriano (*Bacillus subtilis*) $1,0 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia/g forragem e SBE, silagem com inoculante bacteriano e enzimático (*Bacillus subtilis* $7,0 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia/g forragem + enzima celulolítica). Para o tratamento controle, foram adicionados apenas água destilada estéril, no volume de 80 ml; já para o SB1, foram inoculados 3 ml do caldo nutriente, homogeneizados com 77 ml de água destilada estéril; para SB2, 30 ml de caldo nutriente com 50 de água destilada. E para SBE foi inoculado um volume de 80 ml do extrato bruto.

Para a avaliação da fermentação das silagens, os silos foram abertos com 30 e 60 dias de ensilagem. Após abertura dos silos, foram retiradas duas amostras de cada silo, tomando-se o cuidado de desprezar as silagens das extremidades dos silos (cerca de 10 cm). Destas amostras, uma foi pesada e seca em estufa de ventilação forçada a 55°C para análises bromatológicas e a outra foi encaminhada ao Laboratório de Microbiologia para determinação do pH, contagem da população de microrganismos e da atividade enzimática de β -glicosidase.

2.3 Análises bromatológicas da forragem fresca e das silagens após o tratamento com os aditivos

As análises bromatológicas da forragem fresca e das silagens foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Animal do DZO-UFLA. As amostras secas foram trituradas em moinho do tipo Willey com peneira de 1 mm e armazenadas em sacos plásticos, devidamente identificados. A determinação dos teores de matéria seca (MS) e de proteína bruta (PB) foi realizada conforme os métodos recomendados pela AOAC (1990). A fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), segundo as técnicas descritas SILVA & QUEIROZ (2002). E os teores de carboidratos solúveis pelo método colorimétrico utilizando fenol- ácido sulfúrico, adaptado de DUBOIS (1956).

Após 60 dias de ensilagem, todo o conteúdo da silagem restante (cerca de 1,5 kg) foi acondicionado em baldes plásticos de 5 L, onde permaneceu por 15 dias para avaliação da estabilidade aeróbia das silagens. Essas amostras foram mantidas em sala fechada onde foi monitorada a temperatura de cada amostra diariamente. Para isso, um Data Logger (Impac, model MI-IN-D-2-L; São Paulo, Brazil) foi inserido na massa ensilada, na profundidade 10 cm, permitindo a tomada de temperatura a cada 15 minutos. A temperatura ambiente também foi mensurada com Data Logger localizado próximo aos baldes, de forma que a variação da temperatura da silagem ao longo do tempo foi avaliada com base na temperatura ambiental. A estabilidade aeróbia foi definida pelo número de horas em que a silagem se manteve estável antes de atingir 2°C acima da temperatura ambiente (Kung Jr. et al., 2001).

2.4 Análises microbiológicas da forragem fresca e das silagens após o tratamento com os aditivos

As análises microbiológicas da forragem fresca e das silagens foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Industrial da UFLA considerando contagem de bactérias totais, bactérias esporulantes e do ácido-lático, leveduras e fungos filamentosos em todos os tempos de abertura dos silos.

Para tal, amostras de 25 g da forragem e das silagens nos tempos de abertura 30 e 60 dias foram colocadas, assepticamente, em frascos contendo 225 mL de água peptonada estéril (1%) e agitada durante 20 minutos a 180 rpm. Deste extrato aquoso obtido, foram

realizadas diluições seriadas e plaqueamento em superfície em meios de cultura específicos para contagem dos diferentes microrganismos.

Para contagem das bactérias totais e esporulantes, foi usado o meio ágar nutriente, acrescido de nistatina a 0,4%, com a diferença que para a contagem de bactérias esporulantes, antes do plaqueamento, as diluições sofreram prévia pasteurização em banho-maria a 80 °C por 10 minutos. Para a contagem de bactérias do ácido láctico, foi utilizado o meio MRS (De Man Rogosa Sharpe, Difco) com nistatina a 0,4%. Para leveduras e fungos filamentosos, o meio de cultura utilizado foi o DRBC (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol). A contagem dos microrganismos foi realizada após 48 horas de incubação a 28 °C, exceto para os fungos filamentosos, cuja contagem foi depois de 5 dias de incubação a 30 °C.

2.5 Análises da atividade enzimática e do pH da forragem fresca e das silagens após o tratamento com os aditivos

Para avaliar a atividade enzimática de β -glicosidase e do pH, amostra de 25 g da forragem e das silagens nos tempos de abertura de 30 e 60 dias foram colocadas, assepticamente, em frascos contendo 225 mL de água destilada estéril e agitada durante 20 minutos a 180 rpm. Desde extrato aquoso, 5ml foram coletados e armazenados no freezer a -20°C para posterior quantificação enzimática conforme descrito no item 2.1.1 No restante do extrato aquoso foi avaliado os valores de pH por meio da leitura em potenciômetro digital (Digimed Analítica, modelo 20®), conforme CHERNEY E CHERNEY (2003).

2.6 Análise estatística

Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado. Em um arranjo fatorial do tipo 4x2x3, sendo quatro tratamentos, dois tempos de abertura e três repetições. Os dados foram analisados estatisticamente pelos procedimentos de análise de variância, de acordo com o *software* SISVAR (FERREIRA, 2008). Na comparação de médias entre os tratamentos, foi utilizado o teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade do extrato bruto inoculado no momento da ensilagem (tratamento SBE) foi quantificado, e o valor encontrado de atividade específica foi de 1,3170 IU mL⁻¹. A atividade do extrato aquoso das silagens após 30 e 60 dias dos quatro tratamentos também foram mensuradas: C (8,7216 IU mL⁻¹); SB1 (9,8500 IU mL⁻¹); SB2 (8,6450 IU mL⁻¹) e SBE (9,2816 IU mL⁻¹). Em todos os tratamentos houve aumento da atividade enzimática, entretanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos e nem entre os tempos de abertura.

As três enzimas que compõem as celulases – endoglucanases, exoglucanases e β-glicosidases - atuam em sinergia, sendo que as β-glicosidases representam a última etapa na produção de monossacarídeos a partir da hidrólise enzimática da celulose. As enzimas celulolíticas são enzimas induzíveis, ou seja, sua produção é desencadeada quando o microrganismo é exposto à celulose. Esse fato explica o aumento da atividade enzimática durante a ensilagem, pois houve a interação sinérgica de microrganismos celulolíticos naturalmente encontrados na planta de milho, sendo que estas interações levam à completa hidrólise da celulose que é convertida em glicose.

Tabela 1. Composição químico-bromatológica e microbiológica do milho utilizado na ensilagem.

Variáveis analisadas¹

pH	MS	PB	CHOs	BT	BE	BAL	Lev	FF
6,10	39,98	7,67	1,91	8,51	<2	7,70	7,15	4,53

1 pH: potencial hidrogeniônico; MS: matéria seca total (%); PB: proteína bruta (%); CHOs: carboidratos solúveis em água (%); BT: bactérias totais (log UFC/ml); BE: bactérias esporulantes (log UFC/ml); BAL: bactérias do ácido láctico (log UFC/ml); LEV: leveduras (log UFC/ml); FF: fungos filamentosos (log UFC/ml).

Tabela 2. Probabilidade dos efeitos (p) dos fatores tratamento e tempo de fermentação sobre características da silagem de milho.

Variável	Valor p		
	Trat	Tempo	Trat*Tempo
pH	0,0076	0,5979	0,0233
CHOs	0,0018	0,0000	0,0317
MS	0,5746	0,0886	0,1037
PB	0,0673	0,6206	0,3143
BT	0,8270	0,9604	0,5654
BE	0,0000	0,0001	0,0002
BAL	0,0542	0,0000	0,0303
Lev	0,0000	0,0419	0,0000
Atividade enzimática	0,1989	0,7475	0,8697

1 Variáveis Analisadas: pH: potencial hidrogeniônico; CHOs: carboidratos solúveis em água(%); MS: matéria seca total (%);PB: proteína bruta (%); BT: bactérias totais (log UFC/ml); BE: bactérias esporulantes (log UFC/ml); BAL: bactérias do ácido láticas (log UFC/ml); LEV: leveduras (log UFC/ml); FF: fungos filamentosos (log UFC/ml) e atividade enzimática do extrato aquoso (IU mL⁻¹).

Tabela 3. Composição químico-bromatológica das silagens de milho em função dos tratamentos inoculados após 30 e 60 dias de ensilagem.

VA ¹	pH		CHOs	
	T ² 30	60	30	60
Trat ³				
SC	4,11aA	3,91aB	0,50aA	0,63bA
SB1	3,78bB	3,94aA	0,60aB	0,96aA
SB2	4,04aA	4,04aA	0,56aB	0,96aA
SBE	4,05aA	4,02aA	0,40aB	0,88aA

*Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (P<0,05) entre tratamentos quanto à mesma variável analisada.

*Médias com letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott (P<0,05) entre tratamentos quanto à mesma variável analisada.

1 Variáveis Analisadas: pH: potencial hidrogeniônico e CHOs: carboidratos solúveis em água (%).

2 Tempo de abertura dos silos: 30 e 60 dias de ensilagem

3 Tratamentos inoculados no silo: SC: silagem controle; SB1, silagem com inoculante bacteriano (*Bacillus subtilis*) 1,0x10⁸ UFC/g forragem; SB2: silagem com inoculante bacteriano (*Bacillus subtilis*) 1,0x10⁹ UFC/g forragem; SBE: silagem com inoculante bacteriano e enzimático (*Bacillus subtilis* 7,0x10⁹ UFC/g forragem + enzima celulolítica).

O valor encontrado para MS (39,98%) do milho utilizado ficou entre o recomendado por KUNG Jr. & SHAVER (2001) para que se tenha uma boa qualidade da silagem de milho, visto que, silagens acima de 42% MS são extremamente secas, que

são excessivamente maduras ou foram atingidas pela seca, o que restringe a fermentação e abaixo dos 30% provocam uma fermentação clostridial.

A adição dos inoculantes após 30 e 60 dias de ensilagem, não promoveu efeito significativo ($p > 0,05$) sobre a composição da MS e da PB, apresentando os valores médios de 39,97% e 6,87, respectivamente. Sendo que ambos os resultados encontrados se enquadram nos teores recomendados para uma silagem de boa qualidade (KUNG Jr. & SHAVER 2001).

Os valores de pH variaram pouco em ambos os tempos de abertura avaliados, sendo que independentemente do tipo de tratamento utilizado, todas as silagens avaliadas, nos dois tempos avaliados, foram bem preservadas, pois se enquadram na faixa de pH que representa adequado processo fermentativo em silagem de milho: 3.7 a 4.2, segundo KUNG Jr. & SHAVER (2001), indicando uma boa conservação da massa ensilada.

Elevado pH, acima de 4.2, é indicador de silagem de baixa qualidade, apresentando fermentação indesejável por *Clostridium* (KUNG Jr. & SHAVER 2001), Entretanto, se o pH estiver elevado pelo fato da silagem ter sido confeccionada com uma forragem de alta MS (>45-50%) não é indicativo de que seja de má qualidade, mas é geralmente instável quando exposta ao ar devido à pequenas quantidades de ácidos produzidos durante a ensilagem que inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis (KUNG Jr. & SHAVER 2001). Sendo assim, podemos afirmar que as silagens confeccionadas neste trabalho são de boa qualidade, pois foram produzidas com teor de matéria seca da forragem dentro do recomendado, apresentando também adequado padrão de fermentação, ou seja, pH abaixo de 4.2.

Para carboidratos solúveis em água, todos os tratamentos com inoculantes biológicos levaram a um aumento no teor dos CHOs após a abertura do silo com 60 dias de ensilagem. Porém, não alterou o teor dos CHOs após 30 dias de ensilagem. Os carboidratos solúveis são os principais substratos para que as bactérias do ácido láctico possam produzir os ácidos e reduzir o pH, fazendo com que o processo fermentativo ocorra de maneira eficiente durante o período de ensilagem, permitindo uma boa conservação do material ensilado (BOLSEN, 1995; VILELA, 1997).

Tabela 4. Composição microbiológica das silagens de milho em função dos tratamentos inoculados após 30 e 60 dias de ensilagem.

VA ¹	BE		BAL		LEV	
T ²	30	60	30	60	30	60
Trat ³						
SC	5,27cA	5,31aA	7,68aA	6,22bB	3,07aA	2,84aA
SB1	5,40cA	5,35aA	7,67aA	6,86aB	2,31aB	3,20aA
SB2	5,82bA	5,46aB	7,61aA	6,22bB	2,46aA	< 2bB
SBE	6,46aA	5,51aB	7,55aA	6,84aB	2,76aA	2,97aA

*Médias com letras minúsculas diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) entre tratamentos quanto à mesma variável analisada.

*Médias com letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) entre tratamentos quanto à mesma variável analisada.

1 Variáveis Analisadas: BE: bactérias esporulantes (log UFC/ml); BAL: bactérias do ácido láticas (log UFC/ml); LEV: leveduras (log UFC/ml).

2 Tempo de abertura dos silos: após 30 e 60 dias de ensilagem.

3 Tratamentos inoculados no silo: SC: silagem controle; SB1, silagem com inoculante bacteriano (*Bacillus subtilis*) 10^8 UFC/g forragem; SB2: silagem com inoculante bacteriano (*Bacillus subtilis*) 10^9 UFC/g forragem; SBE: silagem com inoculante bacteriano e enzimático (*Bacillus subtilis* $7,0 \times 10^9$ UFC/g forragem + enzima celulolítica).

Na avaliação da composição microbiológica das silagens, observou-se que não houve efeito ($p > 0,05$) dos inoculantes sobre a composição das bactérias totais em nenhum dos tempos de abertura dos silos; apresentando média de contagem de 5.8 log UFC/ml.

A contagem de bactérias esporulantes foi maior no tratamento SBE no tempo de 30 dias após a ensilagem. Entretanto, não houve diferença entre os tratamentos após 60 dias de ensilagem. A presença destas bactérias ocorre naturalmente nos solos, fato este que explica a contagem também no tratamento controle.

Para os dados referentes às bactérias do ácido lático, o maior número foi encontrado com 30 dias de ensilagem, porém não houve diferença entre os tratamentos. No tempo de 60 dias, os maiores valores encontrados foram nos tratamentos SB1 (6.86 log UFC/ml) e SBE (6.84 log UFC/ml). As BAL fazem parte do principal grupo de microrganismos que atua na fermentação do material ensilado, promovem rápida e eficiente produção de ácido lático e redução do pH da silagem (RODRIGUES et al.,

2004), menor crescimento de fungos, diminuindo a deterioração aeróbia quando as silagens são expostas ao ar (FILYA et al., 2003).

Em relação à contagem de leveduras, com 30 dias não houve diferença significativa entre os tratamentos. E após 60 dias de ensilagem, o melhor tratamento foi o SB2, na qual a contagem do microrganismo foi abaixo de 2 log UFC/ ml. De maneira geral, a presença de leveduras encontrada nesse trabalho foi baixa (< 3 log UFC/ ml). As leveduras são os principais microrganismos envolvidos na deterioração das silagens após abertura dos silos, sendo que para WOOLFORD (1990), silagens com contagem de leveduras superiores a 5.0 log UFC/ml são altamente susceptíveis à deterioração.

A contagem de fungos filamentosos só foi possível no tratamento SBE após 60 dias de ensilagem, apresentando média de contagem de 2.97 log ufc/g, nos demais tratamentos não houve crescimento. No tempo de 30 dias após a ensilagem, também não houve crescimento de fungos filamentosos, não havendo diferença significativa entre os tratamentos e o controle. Os fungos mais comuns encontrados na silagem pertencem aos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, estes microrganismos são indesejáveis nas silagens, pois sua presença altera a concentração de nutrientes, principalmente em relação à concentração de carboidratos solúveis e vitaminas (SILVA et. al., 2010), além de produzirem micotoxinas que causam muitas doenças e vários efeitos tóxicos aos animais (GIMENES et. al., 2006).

Tabela 5. Efeito dos inoculantes sobre a temperatura das silagens de milho nos diferentes tratamentos quando expostas ao ar após 60 dias de ensilagem.

	Tratamentos ¹			
	SC	SB1	SB2	SBE
Pico de temperatura (°C)	26.5b	26.33b	25.50b	28.83a
Tempo para alcançar o pico de temperatura (h)	149.00b	163.25b	297.50a	47.75c
Estabilidade aeróbia (h) ²	160.83b	161.25b	247.75a	48.83c

*Médias com letras diferentes nas linhas diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott

(1) SC: silagem controle; SB1, silagem com inoculante bacteriano (*Bacillus subtilis*) 10⁸ UFC/g forragem; SB2: silagem com inoculante bacteriano (*Bacillus subtilis*) 10⁹ UFC/g forragem; SBE: silagem com inoculante bacteriano e enzimático (*Bacillus subtilis* 7,0x10⁹ UFC/g forragem + enzima celulolítica).

(2) tempo em horas que a silagem se manteve estável antes de atingir 2 °C acima da temperatura ambiente.

O aumento da temperatura do material ensilado está relacionado com a proliferação de microrganismos indesejáveis, causando a deterioração aeróbia das silagens de milho após abertura dos silos, reduzindo a qualidade do material ensilado (KUNG E STOKES, 2002). Desta forma, pode-se assegurar que o tratamento SB2 conservou melhor o material após a exposição ao ar, uma vez que, o material apresentou menor pico de temperatura (25,5°C) e também demorou mais tempo para que esse pico fosse atingido (297,50 horas); além de não apresentar a proliferação de leveduras e fungos filamentosos.

Da mesma forma, as silagens tratadas com este inoculante apresentaram a maior estabilidade aeróbia, mantendo-se estável por 247,75 horas antes de atingir 2 °C acima da temperatura ambiente. De modo prático, esses resultados permitem afirmar que as silagens que apresentam maior estabilidade aeróbia associada à menor ocorrência de leveduras e fungos filamentosos, mantem por mais tempo os valores nutricionais e boas qualidades sanitárias observadas na fase de pós abertura dos silos. (BASSO et al., 2012).

Os tratamentos SC (149,0 h) e SB1 (163,25 h) apresentaram valores intermediários para que o pico de temperatura fosse alcançado. Sendo também intermediários em relação à estabilidade aeróbia, mantendo-se estável por 160,83 e 161,25 horas, respectivamente. Em contrapartida, o tratamento SBE apresentou o maior pico de temperatura do material ensilado (28,83°C), o menor tempo para que tal pico de temperatura fosse atingido (47,75 horas) e baixa estabilidade aeróbia (48,83 horas). Esses resultados podem estar relacionados com a presença de leveduras e fungos filamentosos, os quais utilizam ácido lático para se desenvolverem aerobicamente, elevando o pH da silagem e permitindo o crescimento de outros microrganismos indesejáveis (REIS et al., 2008; MUCK, 2010), resultando assim, em silagens menos estáveis à deterioração aeróbia quando expostas ao ar.

4 Conclusão

Os melhores resultados foram encontrados nas silagens tratadas com o inoculante bacteriano *Bcillus subtilis* (CCMA 0087) $1,0 \times 10^9$ UFC/ g forragem. Sendo que estas silagens apresentaram uma maior estabilidade aeróbia quando expostas ar e as

que demoraram mais tempo para que o pico de temperatura fosse atingido, uma vez que neste tratamento não houve a proliferação de leveduras e fungos filamentosos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASOCIACIÓN NACIONAL DEL CAFÉ. Manual de beneficiado húmedo del café. Guatemala: ANACAFÉ, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS -AOAC. *Official methods of analyses*. 1990; v.1, p. 648.

ÁVILA CLS, PINTO JC, FIGUEIREDO HCP, SCHWAN RF. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugarcane silage. *Grass and Forage Science*. 2009; 64:384-394.

BASSO FC, LARA EC, ASSIS FB, RABELO CHS, MORELLI M, REIS RA. Fermentation characteristics and aerobic stability of corn silages inoculated with “*Bacillus subtilis*”. *Revista Brasileira Saúde e Produção Animal*. 2012; 13:1009-1019.

CHERNEY JH, CHERNEY DJR. Assessing silage quality. In: BUXTON DR, MUCK R, HARRISON J. (Eds.). *Silage science and technology*. Madison: American Society of Agronomy. 2003; 141-198.

CORRÊA LA, POTT EB. Silagem de capim. In: *SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS*. Lavras. Anais... Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2001; 255-271.

CYSNEIROS, C. dos S. S.; FRANCO, G. L.; ULHOA, C. J.; DIOGO, J. M. da S. D.; RAMOS, A. K. B. Efeito de enzimas fibrolíticas sobre a composição bromatológica de silagens de capins tropicais. *Ciência Animal Brasileira. Goiânia*. 2006; 7:1-10.

DIAS M, MELO, MM, SCHWAN RF, SILVA CF. A new alternative use for coffee pulp from semi-dry process to β -glucosidase production by *Bacillus subtilis*. *Letters in applied microbiology*. 2015; 61:588-595.

DUBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS PA, SMITH F. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 1956; 28:350-356.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Científica Symposium*. 2008; 6:36-41.

FILYA I. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. *Journal of Applied Microbiology*. 2003; 95:1080-1086.

GIMENES ALG, MIZUBUTI IY, MOREIRA FB, PEREIRA ES, RIBEIRO ELA, MORI R M. Chemical composition and aerobic stability of corn silages made with bacterial and/or enzymatic inoculants. *Acta Science Animal*. 2006; 28:153-158.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; Da SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science Technology*. 2008; 144:1 – 22.

KUNG Jr. L. Aditivos microbianos e químicos para silagem: Efeitos na fermentação e resposta animal. In: *WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM*. Piracicaba. Anais... Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. 2001; 53-74.

KUNG Jr. L & SHAVER R. Interpretation and Use of Silage Fermentation Analysis Reports. *Focus on Forage*. 2001; 3: 13.

KUNG Jr. L, TAYLOR CC, LYNCH MP, NEYLON JM. The effects of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2003; 86:336–343.

LADEIRA AS, ANDRADE MVV, DELATORRE AB, PEREZ VH, MARTINS MLL. Utilização De Resíduos Agroindustriais Para A Produção De Proteases Pelo Termofílico *Bacillus sp* em Fermentação Submersa: Otimização Do Meio De Cultura Usando A Técnica De Planejamento Experimental. *Química Nova (online)*. 2010; 33:324-328.

MARTINS AS, VIEIRA PF, BERCHIELLI TT, PRADO IN, MOLETTA JL. Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2006; 35: 2118-2124.

McDONALD P, HENDERSON N, HERON S. The biochemistry of silage. 2. ed. Marlow: Chalcombe. 1991; 340.

MUCK, RE. Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2010; 39:183-191.

NEUMANN M, MÜHLBACH PRF, NÖRNBERG JL, RESTLE J, OST PR. Efeito do tamanho de partícula e da altura de colheita das plantas de milho (*Zea mays* L.) sobre as perdas durante o processo fermentativo e o período de utilização das silagens. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2007; 36:1395-1405.

PANDEY A. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 2000; 6:153- 162.

ROCHA KD, PEREIRA OG, FILHO SCV, OLIVEIRA AP, PACHECO LBB, CHIZZOTTI FHM. Nutritive value of corn silage (*Zea mays* L.) produced with enzymatic-bacterial inoculants. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2006; 35:389-395.

REIS RA, SCHOCKEN-ITURRINO RP, ALMEIDA EO, JANUSCKIEWICZ ER, BERNARDES TF, ROTH APTP. Efeito de doses de *Lactobacillus buchneri* “CEPA NCIMB 40788” sobre as perdas nos períodos de fermentação e pós-abertura da silagem de grãos úmidos de milho. *Ciência Animal Brasileira*. 2008; 9:923-934.

RODRIGUES PHM, ALMEIDA L F S, LUCCI CS, MELOTTI L, LIMA FR. Efeitos da adição de inoculantes microbianos sobre o perfil fermentativo da silagem de alfafa adicionada de polpa cítrica. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2004; 33:1646-1653.

SILVA JM, CARNAÚBA J P, SILVA IO, ANDRADE DEGTA.; MIRANDA EC, AMORIM EPR. Influence of bacterial-enzymatic inoculant on microbiota and nutritional quality of humid maize grain silages. *Ciência Animal Brasileira*. 2010; 11:62-72.

SILVA D J, QUEIROZ AC. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa: UFV. 2002; 235.

WOOLFORD MK. The detrimental effects of air on silage. *Journal of Applied Bacteriology*. 1990; 68:101-116.

ZANETTE MP, NEUMANN M, FARIA MV, UENO R K, MARAFON F, DURMAN T. Valor nutricional e perdas durante a fermentação de silagens de milho (zea mays l.) com açúcar ou inoculante. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 2012; 11:178-189.