



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DINÂMICA DA COMUNIDADE BACTERIANA EM VOLUMOSOS A BASE DE  
PALMA FORRAGEIRA E FENO DE CAPIM-BUFFEL**

**DAIANE GONÇALVES DOS SANTOS**

**AREIA  
2021**

**DAIANE GONÇALVES DOS SANTOS**

**DINÂMICA DA COMUNIDADE BACTERIANA EM VOLUMOSOS A BASE DE  
PALMA FORRAGEIRA E FENO DE CAPIM-BUFFEL**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia da Universidade  
Federal da Paraíba como requisito  
parcial para obtenção do título de  
Mestre em Zootecnia.

Linha de pesquisa: Produção de Ruminantes

**Comitê de orientação:**

Prof. Dr. Gherman Garcia Leal de Araújo - Orientador Principal- (CCA/UFPB)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Juliana Silva de Oliveira (CCA/UFPB)

Prof. Dr. Edson Mauro Santos (CCA/UFPB)

**AREIA**

**2021**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

S237d Santos, Daiane Gonçalves Dos.

Dinâmica da comunidade bacteriana em volumosos a base de palma forrageira e feno de capim-buffel / Daiane Gonçalves Dos Santos. - Areia:UFPB/CCA, 2021.

61 f. : il.

Orientação: Gherman Garcia Leal Araújo.

Coorientação: Juliana Silva Oliveira, Edson Mauro Santos.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Zootecnia. 2. Aerobiose. 3. Cenchrus ciliaris. 4. Escherichia coli. 5. Metataxonomia. 6. Nopalea cochinilifera Salm Dyck. 7. Qualidade nutricional. I. Araújo, Gherman Garcia Leal. II. Oliveira, Juliana Silva. III. Santos, Edson Mauro. IV. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636(043.3)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO**

**TÍTULO:** “DINÂMICA DA COMUNIDADE BACTERIANA EM VOLUMOSOS A BASE DE PALMA FORRAGEIRA E FENO DE CAPIM-BUFFEL”

**AUTORA:** Daiane Gonçalves dos Santos,

**ORIENTADOR:** Gherman Garcia Leal de Araújo

**J U L G A M E N T O**

**CONCEITO: APROVADO**

**EXAMINADORES:**

Prof. Dr. Gherman Garcia Leal de Araújo  
Presidente  
Universidade Federal da Paraíba/Embrapa Semiárido

Prof. Dr. George Rodrigues Lambais  
Examinador  
Instituto Nacional do Semiárido

Prof. Dr. Fleming Sena Campos  
Examinador  
Universidade Federal Rural do Pernambuco

Areia, 29 de julho de 2021.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer, primeiramente a Deus, aos meus pais, Josafá Gonçalves e Sandra Maria, e ao meu esposo, Rodrigo de Lima, pela força, ajuda, carinho, amor e pelas palavras de acalento e conforto. E também aos meus amigos e colegas que contribuíram de forma direta e indireta na realização deste estudo.

Quero agradecer também ao meu orientador, Dr. Gherman Garcia Leal de Araújo, pela oportunidade e confiança. Aos meus coorientadores, Dra. Juliana Silva de Oliveira e Dr. Edson Mauro Santos por todos os ensinamentos, contribuição e crescimento profissional, meus sinceros agradecimentos.

A Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade e hospitalidade dada, e a CAPES pela bolsa concedida.

A todos do grupo de estudos em Forragicultura da UFPB (GEF), em nome de Rafael Lopes, quero agradecer a cada um que compõe esse grupo, vocês todos são especiais e contribuíram significativamente na conclusão desse estudo.

Ao Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA/UFPB), em nome de Mateus, ao laboratório de Microbiologia Ambiental (INSA-Campina Grande/PB), em nome de George Lambais e Erica que contribuíram muito para os resultados. A Empresa Paraibana de Pesquisa, Extensão Rural e Regularização Fundiária (EMPAER-Alagoinha/PB), em nome de Valdemir.

**Meus sinceros, obrigada!**

“A Deus, a minha família, aos meus amigos e a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a conclusão desse estudo”.

**Dedico!**

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou  
sobre aquilo que todo mundo vê.”  
(Arthur Schopenhauer)

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”  
(George Bernard Shaw)

## RESUMO

Objetivou-se com o estudo avaliar a dinâmica da comunidade bacteriana de diferentes proporções de palma forrageira e feno de capim-buffel em função do período de exposição ao ar. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5 x 5 (cinco níveis de palma e feno de capim-buffel x cinco tempos de exposição ao ar), com cinco repetições. Os tratamentos consistiram em níveis de palma forrageira, variando de 20 a 100% na matéria natural, avaliados nos tempos 0, 3, 6, 12 e 24 horas. As variáveis analisadas foram: temperatura interna e superficial; composição química; população de *Escherichia coli* e comunidade bacteriana por metataxonomia do gene rRNA ribossomal 16S. Houve interação entre os níveis de palma na dieta e o tempo de exposição ao ar ( $P < 0,001$ ) para temperatura interna e superficial, pH e população de *Escherichia coli*. Verificou-se que quanto menor é o nível de palma mais elevada foi a temperatura interna e superficial dos volumosos, atingindo o pico de temperatura após 12,19 e 11,87 horas de exposição ao ar, respectivamente. Em todos os tratamentos o pH foi considerado de baixa acidez, entre 5,70 a 7,38. O pico de crescimento da população de *E. coli* foi após 16,06 horas de exposição ao ar. Para composição química, houve interação ( $P < 0,001$ ) dos níveis de palma e tempo de exposição ao ar para matéria seca, proteína bruta, capacidade tampão, carboidratos solúveis e nitrogênio amoniacal. O tempo de exposição ao ar influenciou significativamente ( $P < 0,001$ ) nos valores de matéria orgânica, matéria mineral e extrato etéreo, para os valores de fibra em detergente neutro observou efeito significativo ( $P < 0,001$ ) para os níveis de palma. Notou-se aumento na riqueza e na uniformidade microbiana de todos os tratamentos após seis horas. Os gêneros mais abundantes foram *Weissella*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium* e *Sphingomonas*. Observou-se uma maior qualidade microbiana na dieta com 100% de palma, com predominância de *Weissella*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Com 80% de feno de capim-buffel verificou-se maior abundância aparente de *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Sphingobacterium*. Com isso, conclui-se que a exposição aeróbica palma forrageira em combinação com o feno de capim-buffel aumenta a proliferação de microrganismos com potencial patogênico, em períodos superiores a 6 horas, influenciando negativamente na qualidade microbiológica e composição química dos volumosos. Essas mudanças são mais expressivas com maiores participações de feno na mistura.

**Palavras-chave:** aerobiose; *Cenchrus ciliaries*; *Escherichia coli*; metataxonomia; *Nopalea cochinilifera* Salm Dyck; qualidade nutricional.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the bacterial community dynamics of different proportions of forage cactus and buffel grass hay as a function of the period of exposure to air. The experimental design used was completely randomized, in a 5 x 5 factorial arrangement (five levels of palm and buffel grass hay x five times of exposure to air), with five replications. The treatments consisted of forage cactus levels, ranging from 20 to 100% in natural matter, evaluated at times 0, 3, 6, 12 and 24 hours. The variables analyzed were: internal and surface temperature; chemical composition; *Escherichia coli* population and bacterial community by 16S ribosomal rRNA gene metataxonomy. There was an interaction between the levels of palm in the diet and the time of exposure to air ( $P < 0.001$ ) for internal and surface temperature, pH and population of *Escherichia coli*. It was found that the lower the level of palm, the higher the internal and surface temperature of forages, reaching the peak temperature after 12.19 and 11.87 hours of exposure to air, respectively. In all treatments, the pH was considered as having low acidity, between 5.70 and 7.38. The peak of *E. coli* population growth was after 16.06 hours of exposure to air. For chemical composition, there was interaction ( $P < 0.001$ ) of palm levels and time of exposure to air for dry matter, crude protein, buffer capacity, soluble carbohydrates and ammonia nitrogen. The time of exposure to air significantly influenced ( $P < 0.001$ ) the values of organic matter, mineral matter and ether extract, for the values of neutral detergent fiber it observed a significant effect ( $P < 0.001$ ) for the levels of palm. An increase in microbial richness and uniformity of all treatments was noted after six hours. The most abundant genera were *Weissella*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium* and *Sphingomonas*. A higher microbial quality was observed in the diet with 100% palm, with a predominance of *Weissella*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc*. With 80% of buffel grass hay there was an apparent abundance of *Pseudomonas*, *Sphingomonas* and *Sphingobacterium*. Thus, it is concluded that forage cactus in combination with buffel grass hay increases the proliferation of microorganisms with pathogenic potential, when exposed to air for periods longer than 6 hours, negatively influencing the microbiological quality and chemical composition of forage.

**Keywords:** aerobic condition; *Cenchrus ciliaris*; *Escherichia coli*; metataxonomy; *Nopalea cochinilifera* Salm Dyck; nutritional quality.

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1-</b> Composição bromatológica da palma forrageira e feno de capim-buffel.   | 27 |
| <b>Tabela 2-</b> Valores médios da temperatura interna (TI), temperatura superficial (TS), potencial hidrogeniônico (pH) e população de <i>E. coli</i> em função dos níveis de palma forrageira e tempo de exposição ao ar. | 30 |
| <b>Tabela 3-</b> Composição química em função dos níveis de palma forrageira e tempo de exposição ao ar.  | 35 |
| <b>Tabela 4-</b> Valores de matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e fibra em detergente neutro (FDN) dos níveis de palma forrageira e tempo de exposição ao ar.                                  | 38 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Temperatura interna (A) e temperatura superficial (B) em função dos níveis de palma e tempo de exposição ao ar. 31
- Figura 2** - Potencial hidrogeniônico em função dos níveis de palma e tempo de exposição ao ar. 32
- Figura 3** - População de *E. coli* em função dos níveis de palma e tempo de exposição ao ar. 33
- Figura 4** - Diversidade beta representada por meio gráfico do tipo PCoA 3D evidenciando o grau de dissimilaridade com base na matriz de distância do tipo Unweighted Unifrac. T1= 100% de palma; T4 = 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; T5= 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel; 0= 0 horas; 6= 6 horas e 24 = 24 horas em exposição ao ar. 40
- Figura 5** - Gráfico de caixas e bigodes a representar a diversidade alfa por meio do índice de uniformidade de Chao1 (A) e Simpson (B). T1= 100% de palma; T4 = 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; T5= 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel. 41
- Figura 6** - Figura 6 - Abundância relativa dos principais filos bacterianos de níveis de palma e feno de capim-buffel em diferentes tempos de exposição ao ar. T1= 100% de palma; T4 = 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; T5= 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel. 42
- Figura 7** - Abundância relativa das principais famílias bacterianas de níveis de feno de capim-buffel e palma em diferentes tempos de exposição ao ar. T1= 100% de palma; T4 = 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; T5= 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel. 43
- Figura 8** - Figura 8 - Abundância relativa dos principais gêneros bacterianos de níveis de feno de capim-buffel e palma em diferentes tempos de exposição ao ar. T1= 100% de palma; T4 = 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; T5= 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel. 44
- Figura 9** - Mapa de calor de comunidades bacterianas de níveis de feno de capim-buffel e palma em diferentes tempos de exposição ao ar. A= tempo 0h; B= tempo 6h; C= tempo 24h. T1= 100% de palma; T4= 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; T5= 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel. 45

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....   | 13 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO.....  | 14 |
| 2.1 Palma forrageira na alimentação de ruminantes .....                              | 14 |
| 2.2 Crescimento de microrganismos indesejáveis nos alimentos <i>in natura</i> .....  | 17 |
| 2.3 Contaminação dos alimentos <i>in natura</i> por microrganismos patogênicos ..... | 20 |
| 2.4 Principais microrganismos encontrados em volumosos para ruminantes.....          | 22 |
| 2.5 Alterações ocasionadas por microrganismos em volumosos.....                      | 24 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 27 |
| 3.1 Local do Experimento.....  | 27 |
| 3.2 Tratamentos e período experimental.....  | 27 |
| 3.3 Composição química.....  | 28 |
| 3.4 Determinação da temperatura interna e superficial do material .....              | 29 |
| 3.5 População de <i>Escherichia coli</i> .....                                       | 29 |
| 3.6 Análise da comunidade bacteriana por metataxonomia do gene rRNA ribossomal 16S   | 30 |
| 3.7 Processamento de dados de sequenciamento .....                                   | 31 |
| 3.8 Análise estatística.....   | 31 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 32 |
| 5. CONCLUSÕES .....  | 50 |
| 6. REFERÊNCIAS .....   | 50 |

## 1. INTRODUÇÃO

A palma forrageira é uma cactácea de extrema importância para a alimentação animal nas regiões áridas e semiáridas. Em período de escassez de alimento, elevadas proporções de palma são fornecidas aos ruminantes. Alguns estudos apontam que grandes quantidades de palma na dieta podem acarretar distúrbios digestivos, os quais têm sido atribuídos ao seu baixo teor de matéria seca, elevado teor de carboidratos não fibrosos e a presença do ácido oxálico (oxalato) (MELO et al., 2006; MARQUES et al., 2017). Sendo não recomendado o seu fornecimento aos ruminantes exclusivamente como fonte de volumoso.

Entretanto, outros estudos demonstraram que a palma forrageira pode ser utilizada como base na alimentação de ruminantes sem efeitos negativos ao animal (PINHO et al., 2018). Costa et al. (2012) e Barros et al. (2017) ofertaram a palma como única fonte de volumoso aos caprinos e ovinos, respectivamente, e não observaram distúrbios digestivos e nem perda no desempenho dos animais. Por isso, estudos são necessários para entender o que de fato está ocasionando esses distúrbios nutricionais em alguns ruminantes.

Esses distúrbios possivelmente possam estar relacionados ao manejo de pós-colheita da palma, como por exemplo, a qualidade sanitária do alimento antes de ser ofertada aos animais, e ao tempo de exposição ao ar após seu processamento (PAULINO et al., 2021). Existe uma grande abundância de microrganismos nas plantas *in natura*, seja epífita e/ou adquirido no processo de colheita e pós-colheita, visto que a contaminação do alimento pode ocorrer em qualquer ponto da cadeia de produção (VIMALKUMAR et al., 2016).

Zárate-Castrejón et al. (2016) observaram que há risco latente para o crescimento de patógenos de origem alimentar em cladódios de palma, particularmente quando são transportados ou mantidos em condições sanitárias precárias e sem refrigeração após colheita. Esses mesmos autores observaram a proliferação e sobrevivência da *Escherichia coli* (*E. coli*) por 16 dias em cladódios de palma. Além disso, a composição química da palma (rica em água e carboidratos não fibrosos) pode favorecer a proliferação de enterobactérias, que tem potencial para causar diarreia em animais (CORBO et al., 2005; SATO et al., 2016).

Dentre as enterobactérias, sabe-se que a composição nutricional da dieta e tempo de exposição dos alimentos *in natura* tem influência significativa sobre a incidência de *E. coli* no alimento e no trato gastrointestinal de ruminantes (GILBERT et al., 2005; PAULINO et al., 2021). Visto que a infestação animal por microrganismos patógenos pode ocorrer através da ingestão de alimentos contaminados (GUASTALLI et al., 2010). A contaminação pode ocorrer durante o processamento do alimento como no próprio cocho dos animais, ocorrendo a

multiplicação quando a exposição do material por horas ao oxigênio nos comedouros. Foi observado que a palma após processada e exposta por horas ao ar facilitou a proliferação de enterobactérias e *E. coli* (PAULINO et al., 2021).

O estudo da presença de bactérias enteropatogênicas em alimentos *in natura* é de extrema importância, pois pode estar relacionado a surtos de distúrbios nutricionais nos humanos e animais (LUNA-GUEVARA et al., 2019). Algumas estirpes de *E. coli* pode produzir potentes citotoxinas que apresentam a capacidade de inibir a síntese proteica das células, causar diarreias hemorrágicas, colítes e várias síndromes hemolíticas urêmicas em animais e até mesmo em humanos, estando relacionadas as doenças veiculadas aos alimentos (ORDEN et al., 2007; FRIAS e KOZUSNY-ANDREANI, 2013; GUASTALLI et al., 2010).

Dessa forma, torna-se necessário pesquisas para avaliação das condições microbiológicas dos volumosos *in natura*, pois pode ser a origem de várias infecções e problemas pós digestório em animais e humanos. Com isso, objetivou-se com esse estudo avaliar a dinâmica da comunidade bacteriana de diferentes proporções de palma forrageira e feno de capim-buffel em função do período de exposição ao ar.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Palma forrageira na alimentação de ruminantes

A palma forrageira é um volumoso de grande importância para alimentação animal nas regiões áridas e semiáridas. Características como adaptabilidade as condições edafoclimáticas, elevada produção de forragem, grande capacidade de rebrota, elevado teor de umidade, boa palatabilidade e alto coeficiente de digestibilidade, fazem da palma um valioso recurso alimentar para os rebanhos (ANDRADE-MONTEMAYOR et al., 2011; CARDOSO et al., 2019).

A capacidade de produção e adaptação dessa planta nessas regiões está relacionado ao processo fotossintético denominado Metabolismo Ácido das Crassuláceas - CAM, onde os estômatos mantêm-se fechados durante o dia e a noite abrem-se para fixação de CO<sub>2</sub>, acarretando menos perdas de água por transpiração para o meio (TAIZ et al., 2017). Dentro da família das cactáceas as espécies mais cultivadas e ofertadas aos ruminantes são a *Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopallea cochenillifera* Salm Dyck, as quais se caracterizam pela alta produtividade por hectare e elevado valor nutricional (OLIVEIRA et al., 2010).

A composição químico-bromatológica da palma forrageira é bastante variável, depende da espécie, variedade, idade, condições edafoclimáticas e entre outros fatores que influênciam no

seu valor nutricional (FROTA, 2015). Independentemente do gênero, a palma apresenta baixos teores de matéria seca (6,1% a 17,1%), proteína bruta (2,9% a 7,23%), fibra em detergente neutro (19,87% a 38,52%) e fibra em detergente ácido (9,5% a 22,5%). Por outro lado, apresenta teores consideráveis de carboidratos não fibrosos (64 - 71%), nutrientes digestíveis totais (46 - 62%), matéria mineral (12,04 - 25,01%) e umidade (85 - 90%) (MCITEKA, 2008; NEVES et al., 2010; SILVA et al., 2011; ANDRADE-MONTEMAYOR et al., 2011; FROTA, 2015).

Esses aspectos nutricionais vêm sendo apontados por alguns estudos como limitantes para o fornecimento aos ruminantes, pois é fonte de energia prontamente disponível para fermentação microbiana e apresenta baixos teores de fibra (MELO, 2006; SOUZA et al., 2010; MARQUES et al., 2017). Sendo não recomendado o seu fornecimento aos ruminantes exclusivamente como fonte de volumoso.

Quando elevadas proporções de palma forrageira são fornecidas na dieta alimentar de ruminantes, tem sido observados problemas como perda de peso, ocorrência de distúrbios digestivos, resultando em diarreia (TEGEGNE et al., 2005; MELO et al., 2006), redução no teor de gordura do leite (COSTA et al., 2010) e diminuição do consumo e digestibilidade dos nutrientes (ANDRADE et al., 2002). Além de timpanismo espumoso observado por Amorim et al. (2008).

Estes problemas estão sendo associado à rápida fermentação de carboidratos não fibrosos (CNF), da natureza hidrofílica e do reduzido teor de matéria seca (MS) dos mucopolissacarídeos que formam a mucilagem, que favorecem a diminuição do pH ruminal. O pH atua como moderador do desenvolvimento de classes de microrganismos que, na maioria das vezes, promovem alterações não favoráveis ao correto funcionamento do rúmen (PINHO, 2016).

Bispo et al. (2007) observaram que a substituição de até 56% da MS de feno de capim elefante por palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) proporcionou redução linear no pH e amônia (NH<sub>3</sub>) ruminal, com média acima de pH 6,2. Essa redução do pH, segundo os autores, pode estar relacionada a rápida digestão dos carboidratos da palma, que aumenta a atividade microbiana e eleva a concentração de ácidos graxos voláteis (AGV), resultando em queda do pH.

A palma forrageira, assim como outros tipos de cactáceas, contém quantidades significativas de mucilagem. Esta mucilagem é considerada um complexo de carboidratos e a sua composição tem sido objeto de diversos estudos (YAHIA et al., 2009). A presença da mucilagem na palma aumenta a viscosidade do fluído ruminal, impedindo aglutinação de bolhas de gás durante a fermentação, causando a distensão ruminal e timpanismo espumoso (SÁENZ

et al., 2004), tal distúrbio reduz a absorção dos ácidos graxos de cadeia curta (propionato, butirato e acetato) e promove redução no pH ruminal.

A substituição do feno de capim Tifton pela palma proporcionou baixos valores de consumo de matéria seca para dietas contendo 74% de palma fresca (607 g/dia) ofertada aos ovinos, situação explicada pela possível distensão ruminal, em decorrência da elevada produção de gases, advindos da fermentação da palma (ANDRADE et al., 2016). A característica hidrofílica da mucilagem resulta em maior retenção de água e, uma vez consumida em elevadas quantidades por parte dos animais, pode resultar na ocorrência de diarreia (WAAL, ZEEMAN e COMBRINCK, 2006).

Já Andrade et al. (2016) observaram que não é a presença de água contida na palma que provoca fezes aquosas nos animais, mas a presença de ácidos e minerais orgânicos da palma, especialmente ácido oxálico, que aumenta a osmolalidade da digestão intestinal e por consequência aumenta a excreção de água pelas fezes (WAAL; ZEEMAN; COMBRINCK, 2006; BATISTA et al., 2009).

Quando há ingestão em excesso do oxalato pode ocorrer irritação da mucosa intestinal dos animais, o que pode afetar negativamente a consistência das fezes, pendente da gravidade da irritação (TADELE, 2015). No entanto, a palma, segundo Batista et al. (2009) possui em média 1,69 g de oxalato por quilograma de matéria seca, que correspondendo 0,16% da matéria seca e está bem abaixo dos 2% máximo indicado por Rahman et al., (2013) para ocasionar intoxicação nos animais ruminantes. E vale ressaltar que os ruminantes toleram maiores níveis de oxalatos quando comparado aos não ruminantes, devido a presença dos microrganismos ruminais que promove a metabolização desse composto (ASLANI et al., 2011).

Já outros estudos demonstram que dietas com alto teor de CNF elevam o número de microrganismos patógenos no trato gastrointestinal e nas fezes de animais ruminantes (VANBAALE et al., 2004; VIMALKUMAR et al., 2016). E que a composição nutricional da ração tem uma significativa influência sobre a incidência de *E. coli* no alimento e intestino de ruminantes (GILBERT et. al., 2005).

Porém, outros estudos vêm mostrando que palma forrageira pode ser utilizada como base na alimentação de ruminantes sem efeitos negativos ao animal. Costa et al. (2012) não reportaram nenhum distúrbio digestivo em ovinos em dietas com 25, 50, 75 e 100% de palma forrageira. Da mesma forma, não houve fezes líquidas ou aumento da distensão abdominal nos animais. Segundo os autores, supõe-se que o pH ruminal não tenha sido alterado pela inclusão da palma na dieta. Ben Salem e Smith (2008) também relataram que o alto teor CNF da palma não afetou a fermentação ruminal em ovelhas.

Cordova-Torres et al. (2017), substituindo 70% do feno de Tifton pela palma (*Nopalea cochenillifera*) na dieta de ovinos Santa Inês, observaram que os animais desse tratamento apresentaram ganhos de peso considerados bons, onde nesse grupo não evidenciaram o aparecimento de problemas como diarreia ou outro distúrbio digestivo. Barros et al. (2017) substituíram 100% do feno de Tifton pela Palma orelha de elefante mexicana numa dieta com relação volumoso: concentrado de 50:50 para novilhos, e os animais mantiveram o peso final semelhante aos animais alimentados sem palma e não apresentaram casos de diarreia.

Devido aos grandes números de estudos que mostram que a palma forrageira ocasiona problemas digestivos em animais e outros que mostram ao contrário, pesquisas devem ser desenvolvidas para entender o que de fato está ocasionando esses distúrbios digestivos em ruminantes alimentados com proporções elevadas de palma. Pois esses distúrbios de fato podem não só estar ligados às características nutricionais da planta, mas também ao manejo de oferta da palma aos animais, qualidade higiênica do alimento e tempo de exposição da palma ao ar após seu processamento, necessitando assim de mais estudos para investigar esses efeitos.

## **2.2 Crescimento de microrganismos indesejáveis nos alimentos *in natura***

A avaliação da microbiota patogênica presente em forragens *in natura* muitas vezes é negligenciada, pois a atenção quase sempre é voltada exclusivamente para os microrganismos fermentadores. O estudo de microrganismos patogênicos em forragens é essencial, pois muitas vezes distúrbios pós-alimentares sofridos pelos animais podem estarem associados a qualidade da forragem que é ofertada.

A sobrevivência e desenvolvimento de microrganismos patógenos nos vegetais depende da interação de fatores extrínsecos e intrínsecos a planta, tais como, desenvolvimento da planta, resistência bacteriana aos processos metabólicos do vegetal, características específicas do microrganismo, condições ambientais, processos de colheita, pós-colheita e armazenamento (CORBO et al., 2005; MATTHEWS et al., 2014). Como também a composição química do alimento, altos teores de carboidratos (CHOs), elevada umidade, altas concentrações de minerais e proteína facilitam o surgimento e proliferação desses microrganismos (AMARAL et al., 2009; PEDROSO et al., 2007).

Existem alguns fatores que afetam diretamente a microbiota presente nos vegetais após a colheita, estes fatores são físicos, químicos e biológicos. Os fatores físicos, como pH, temperatura e umidade, afetam o crescimento e algumas atividades metabólicas da microbiota. Os fatores químicos incluem a disponibilidade de nutrientes da planta que podem ser usados

por microrganismos. Já os fatores biológicos incluem a competição da microbiota epífita e as interações planta-bactéria (SELA, 2009).

Zárete-Castrejón et al. (2016) inocularam nos cladódios de *Opuntia ficus-indica* Var. Atlixco as bactérias *Salmonella Enteritidis* e *Escherichia coli* em cladódios com espinhos e sem espinhos, submetidos as temperaturas de 4 e 18°C e avaliaram a sobrevivência dessas bactérias por 16 dias. Observaram que a temperatura de armazenamento e forma de processamento da *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill var. foi determinante na sobrevivência de *S. Enteritidis* e *E. coli* que foram capazes de crescer e sobreviver por 16 dias a 4 e 18 °C em cladódios de palma com espinhos. Em cladódios de palma sem espinhos, *S. Enteritidis* sobreviveu por 16 dias a 4 e 18 °C, enquanto *E. coli* sobreviveu durante este período a 18 °C (ZÁRATE-CASTREJÓN et al., 2016).

O manuseio de vegetais pré-cortados ou minimamente processados, como é feito no corte da *Opuntia ficus-indica* pode aumentar o risco de contaminação (ANGELES-NÚÑEZ et al., 2014). Badosa et al. (2008) relataram que o processamento de vegetais pode aumentar a carga de bactérias mesófilas aeróbias e coliformes em uma magnitude de um logaritmo após o processamento. Além de que, alguns microrganismos patogênicos podem internalizar e aderir à superfície da planta permanecendo na mesma até o consumo humano ou animal (LIU et al., 2013).

Segundo Zárate-Castrejón et al. (2016) algumas bactérias podem produzir biofilmes que lhes permitem aderir e sobreviver na superfície da epiderme de alguns alimentos, como por exemplo nos cladódios de palma. Isso ocorre porque as bactérias têm a capacidade de formar biofilmes na superfície da epiderme de frutos, folhas, caules e órgãos florais, como mecanismo de adesão e proteção, e também para absorver nutrientes para seu desenvolvimento (ÁVILA-QUEZADA et al., 2010).

Hernandez et al. (2009) documentaram a formação de biofilme por *Salmonella Typhimurium* e *S. Javanica* 24 h após inoculação. E já se sabe que as bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) são estruturas bacterianas de ótima aderência a superfícies vivas e inertes, para posterior formação de biofilme. A *E. coli* O157:H7 e *Salmonella spp.* foram relatadas como tendo potencial de sobreviver em superfícies inertes através da formação de biofilmes (NOBILE e MITCHELL, 2007; ÁVILA-QUEZADA et al., 2010).

Os Biofilmes ou agregados nas superfícies das plantas são colônias de células em uma matriz de exopolímero que podem proteger os microrganismos da dessecação ou de agentes bactericidas, atuando também como pools para troca de material genético (MORRIS e

MONIER, 2003). As microestruturas dos biofilmes são altamente complexas e consistem em muitos organismos simbióticos e entre eles estão os patogênicos. A motilidade parece ajudar as bactérias a atingir superfícies estáveis e a neutralizar as repulsões hidrofóbicas da planta (ÁVILA-QUEZADA et al., 2010).

Se algumas bactérias patogênicas são capazes de exsudar exopolissacarídeos para formar biofilmes, e com isso aderir às superfícies dos alimentos, há o risco de internalização desses microrganismos no tecido dos alimentos e permanecer lá até o consumo humano e/ou animal (ZÁRATE-CASTREJÓN et al., 2016). A internalização de bactérias aos tecidos vegetais pode ocorrer através da penetração das raízes, sementes, frutos, e também através do manejo, irrigação e adubação, que são veículos para esses microrganismos, que podem transcolar e sobreviver nos tecidos aéreos comestíveis das plantas (SOLOMON et al., 2002; ISLAM et al., 2004; TANG et al., 2012).

Uma das principais vias para penetração dos microrganismos na cutícula de uma folha é através de aberturas estomáticas naturais e feridas resultantes de enzimas líticas e pressão osmótica (FRANK et al., 2017), onde usam estômatos como pontos de entrada para o interior da folha. Algumas bactérias e fungos fitopatogênicos exploram os estômatos como uma porta de entrada para a invasão (MELOTTO et al., 2006; XIN et al., 2018). Outra via é através dos espaços apoplásticos dentro das folhas, que são grandes espaços intercelulares que medeiam as trocas gasosas entre as células e são essenciais para que a maioria das espécies de plantas atinja uma fotossíntese eficiente (CHEN et al., 2020), a umidade controla a ocupação de patógenos em espaços apoplásticos e é um importante determinante inicial da colonização foliar (XIN et al., 2018).

A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) tem a capacidade de aderir difusamente à epiderme, com agregação ao redor dos estômatos e penetração a uma profundidade de 20 a 100 µm nos estômatos e zonas de junção (mesofilo esponjoso) de folhas cortadas de alface (BERGER et al., 2010, SEO e FRANK, 1999).

Tem-se observado que vários mecanismos envolvendo adesinas, fímbrias, flagelos e os efetores codificados por LEE (região cromossômica chamada locus de apagamento de enterócitos) são normalmente usados por algumas bactérias como a *E. coli* toxigênica verotoxigênica (VTEC) para colonização e fixação nos vegetais (CROXEN et al., 2013). Foi demonstrado que *E. coli* O157: H7 pode mover-se para dentro da planta através do sistema radicular para alcançar a porção comestível da alface (SOLOMON et al., 2002).

Cada microrganismo patogênico tem seus próprios mecanismos moleculares de adesão e adequação à biosfera da planta, muitos são semelhantes aos mecanismos usados para colonizar

o hospedeiro primário. Todos os microrganismos sobrevivem em produtos frescos por períodos comercialmente relevantes, podendo contaminar humanos e animais após o consumo (LUNA-GUEVARA et al., 2019).

### **2.3 Contaminação dos alimentos *in natura* por microrganismos patogênicos**

A contaminação dos alimentos *in natura* por microrganismos patogênicos no ambiente agrícola está cada vez mais sendo associado a surtos infecciosos em humanos e em animais (LYNCH, 2009). A contaminação dos vegetais frescos pode ocorrer por bactérias patogênicas, vírus, fungos e protozoários (ALAM et al., 2015; BILEK e TURANTAS, 2013).

Moreira-Machado et al. (2019) realizou uma revisão de literatura e identificaram que a *E. coli* O157, vários sorovares de *Salmonella*, *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri*, *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes* são as bactérias patogênicas apontadas como de maior risco de surtos de doenças em humanos. Os principais vírus de contaminação são o NoV e HAV, enquanto *Cyclospora* e *Cryptosporidium* foi identificado como o protozoário mais relevante em termos de risco de doença.

A contaminação do alimento pode ocorrer em qualquer ponto da cadeia de produção, pode ser proveniente do esterco, solo, esgoto, águas superficiais, animais selvagens ou humanos (LIU et al., 2013), além de ocorrer no processo de colheita e pós-colheita (CASTRO-ROSAS et al., 2012; TANG et al., 2012). Segundo Luna-Guevara et al. (2019) é possível dividir os fatores de contaminação dos alimentos em pré-colheita e pós-colheita.

A contaminação antes da colheita dos vegetais pode ocorrer através da excreção de animais, solo, água e aplicação de esterco mal compostado como fertilizante (FRANZ e VAN BRUGGEN, 2008). Durante o cultivo, a contaminação dos vegetais pode ocorrer por solo contaminado. O solo destinado à produção agrícola tem sua microbiota frequentemente alterada com adição de esterco animal/biossólido humano tratado ou não tratado, aplicado como fertilizante, sendo um potencial vetor capaz de abrigar microrganismos patogênicos (GUTIERREZ-RODRIGUEZ e ADHIKARI, 2018; JULIEN-JAVAUX et al., 2019).

O transporte de microrganismos do solo contaminado para a planta pode ser mediado por respingos provenientes de gotículas de água de chuva e/ou irrigação (ALLENDE et al., 2017). Além de contato direto do esterco com a superfície da planta (ALEGBELEYE et al., 2018). Para diminuir o risco de patógenos serem transmitidos do esterco para os vegetais, a National Organic Program recomenda-se de no mínimo 120 dias entre a aplicação do esterco e a colheita

da planta (AMS, 2000). Porém alguns estudos têm mostrados que esse período mínimo não é suficiente para ocorrer a morte desses patógenos (NATVIG et al., 2002).

Foi observado a presença de *E. coli* O157 em cenouras após 168 dias da aplicação de esterco contaminado (ISLAM et al., 2005). Foi relatado que a *Salmonella* pode sobreviver até 405 dias em esterco e/ou solo fertilizado com esterco (YOU et al., 2006; HUTCHISON et al., 2004).

Lau e Ingham (2001) avaliaram a sobrevivência de *E. coli* e *enterococos* em esterco bovino incorporado em dois tipos de solos, o solo Franco argiloso siltoso (SCL) e areia argilosa (LS), e observaram que esses microrganismos podem sobreviver pelo menos 19 semanas a 9–21 °C em esterco/solo bovino, sendo a *E. coli* com melhor desenvolvimento. Por isso a importância de aplicar no solo esterco devidamente “estabilizado”, um método para isso é por meio da compostagem, que reduz a presença de microrganismos patogênicos e estabiliza o composto.

A sobrevivência da *E. coli* O157 melhora em temperaturas baixas, em solos argilosos e em associação próxima com raízes (GAGLIARDI e KARNNS, 2002; INGHAM et al. 2004). Um fato interessante é que a *Salmonella* e *E. coli* podem persistir por mais tempo no esterco obtido de bovinos alimentados com dietas ricas em energia, com baixo teor de fibras (ALEGBELEYE et al., 2018).

A persistência da bactéria introduzida no solo é determinada por diversas características, incluindo resistência à falta de alimento, capacidade de utilizar e competir por nutrientes, tolerância a temperatura ou pH desfavoráveis, resistência à dessecação ou congelamento, resistência a antibióticos ou outras substâncias inibidoras (ALEXANDRE, 1999). Devido à alta persistência de algumas bactérias no solo ou esterco pode contaminar o alimento através do manejo. Foi verificado a transmissão de *E.coli* O157 do solo contaminado com esterco e água de irrigação para plantas de alface, onde essas bactérias estavam presentes nos tecidos internos da planta (SOLOMON et al., 2002 ).

A água de irrigação é outro potencial vetor de contaminação. Fontes de água com péssima qualidade microbiológica (águas superficiais e águas residuais reutilizadas) podem ser fontes de contaminação microbiana (MOREIRA-MACHADO et al., 2019).

Em alguns casos, a presença dos microrganismos patogênicos nos vegetais é significativamente maior nos processos finais de pós-colheita em comparação com os processos iniciais de manejo (FRANK, 2011). Segundo Luna-Guevara et al. (2019) isso pode ser devido à contaminação direta subsequente ou pela multiplicação do patógeno durante os procedimentos de pós-colheita em vegetais *in natura*.

As mãos dos trabalhadores e os instrumentos de trabalho, como espátula, enxada, faca, pá e entre outros, podem ser um fator adicional de contaminação durante o plantio, colheita e pós-colheita. Esses podem se tornar um potencial veículo de contaminação, que muitas vezes são negligenciados (LYNCH et al., 2009). Foi observado a sobrevivência de patógenos microbianos, como *E. coli* O157 e *Salmonella* em luvas de nitrila e látex após a transferência de produtos contaminados (ERICKSON et al., 2018), o que aumentar consideravelmente a probabilidade de uma maior contaminação dos alimentos.

Na produção animal, práticas como cortar a planta com faca, a mistura do alimento com a pá, a superfície em que esse alimento está sendo manuseado permiti a transferência de microrganismos patogênicos para o alimento (YANG et al., 2012; MOREIRA-MACHADO et al., 2019). E por consequência pode contaminar o animal, e desencadear problemas pós-alimentares.

Evitar possíveis contaminações durante a produção e oferta de alimentos é essencial, pois pode ser origem de várias infecções e problemas pós digestório em humanos e animais. É necessário condições higiênicas satisfatórias em todas as etapas de processamento dos alimentos. Com isso, devido à grande diversidade de possíveis fontes de contaminação em vegetais *in natura*, porém mais estudos são necessários para aprender como prevenir e corrigir a contaminação durante o processamento pré e pós-colheita, visto que os microrganismos podem ocasionar alterações no alimento (LUNA-GUEVARA et al., 2019).

#### **2.4 Principais microrganismos encontrados em volumosos para ruminantes**

Existe uma grande abundância e diversidade de microrganismos epifíticos encontrados em volumosos que são fornecidos aos ruminantes. A parte aérea das plantas é habitada por microrganismos comensais, benéficos e patogênicos, essa diversidade é devido a exposição direta da planta com a atmosfera e à vegetação circundante, sendo um sistema aberto o que aumenta a probabilidade de ocorrência de imigração e de emigração de microrganismos da filosfera (LINDOW e BRANDL, 2003; CHAUDHRY et al., 2020).

A microbiota na folha é composta por intraespécies, interespécies e conjuntos microrganismos de reino cruzado de bactérias, leveduras, fungos e protistas (HARDOIM et al., 2015). O estabelecimento e a abundância de diversas comunidades microbianas foliares e seus efeitos na planta hospedeira são o resultado de vários processos interativos, tais como multiplicação, dispersão e declínio em um nicho específico de um determinado microrganismo (LAFOREST-LAPOINTE e WHITAKER, 2019; CHAUDHRY et al., 2020).

A população epifítica encontradas nos volumosos, são microrganismos aeróbios e anaeróbios, que são Bactérias ácido lácticas (BAL), enterobactérias, clostrídios, fungos filamentosos e leveduras. A população epifítica de forragens frescas varia de  $10^6$  a  $10^9$  ufc/g MV, sendo a grande maioria aeróbia estrita (PAHLOW et al., 2003; MUCK et al., 2010).

As BAL estão presente na forragem mil vezes menor que seus competidores, fungos e enterobactérias, mas se multiplicam rapidamente após o corte e picagem da forragem (LIN et al., 1992). Pahlow (1986) realizou uma revisão de literatura e observou que a população de bactérias lácticas epifíticas nas forragens varia de 4 a 5 ufc/g MV em amostra fresca. Assim, a população dessas bactérias é muito variável, pois oscila milhões de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de forragem (SATTEr et al., 1988).

As BAL são gram-positivas, catalase negativas, anaeróbias aero tolerantes e incapazes de sintetizar ATP pela via respiratória (LIMA et al., 1975). Essas bactérias se desenvolvem em temperaturas entre 5 e 50 °C, sendo o ideal entre 25 e 40 °C, com isso são denominadas de mesófilas (McDONALD et al., 1991). Dividem-se em sete gêneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (PAHLOW et al., 2002). Dentre estes, o *Lactobacillus* é o gênero predominante em culturas forrageiras e silagens (KOC et al., 2017).

Toledo Filho (2010) avaliou a microbiota epifítica da cana-de-açúcar com 18 meses após o plantio e obteve população de 6 log ufc/g MV de BAL. Pereira (2019) isolou estripes de bactérias ácido-lácticas da planta e da silagem da palma forrageira, e foram identificados a *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa* e *Weissella paramesenteroides*. As espécies BAL mais prevalentes de palma forrageira in natura e silagens foram *Lactobacillus plantarum* (65%).

Outro grupo de bactérias que está presente nas forragens são as enterobactérias. Essas são gram-negativas, não formadoras de esporos, aeróbias facultativas (McDONALD et al., 1991). De acordo com Al-Mutairi (2011), a multiplicação de enterobactérias no alimento é indesejável, visto que este grupo compreende gêneros com potencial patogênico, como *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *E. coli*, que podem levar a casos de infecções gastrointestinais e urinárias, pneumonia e, em casos mais sérios podendo levar a morte do animal. Paulino et al. (2021) observou população elevadas de *E. coli* na palma in natura após colhida e processada, onde a população inicial foi de 5,04 Log UFC/g para Palma Ipa Sertânia e Gigante processadas em 2 cm<sup>2</sup>.

Os clostrídeos são bactérias gram-positivas, esporulantes, normalmente móveis, e estritamente anaeróbios, sua presença nas plantas verdes em forma de esporos é geralmente

muito baixo, em função da pressão osmótica, a colheita da forragem com 30 a 35 % de MS garante a ausência dessas bactérias, mas iniciam sua multiplicação em condições anaeróbicas (PEREIRA et al., 2014). O crescimento de clostrídeos é estimulado pela alta temperatura de estocagem ( $>30^{\circ}\text{C}$ ), baixo teor de matéria seca ( $<30\%$ ), baixo teor de carboidratos solúveis e alta capacidade de tamponamento (PITT et al., 1990; McDONALD et al., 1991). Os clostrídeos podem ser divididos em dois grandes grupos, de acordo com os componentes que utilizam como substrato: Clostrídeos sacarolíticos (*Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum*) que fermentam principalmente glucose, frutose e ácidos orgânicos e Clostrídeos proteolíticos – *Clostridium sporogenes* e *Clostridium bifermentans* – fermentam principalmente aminoácidos (McDONALD et al., 1991).

Além de bactérias pode-se encontrar nas forragens fungos filamentosos e leveduras que são considerados microrganismos indesejáveis. Os vegetais são o habitat mais comum das leveduras, já que apresentam boas condições para sua multiplicação, podendo ser encontrada na forragem fresca em quantidade de  $5,5 \log \text{UFC g}^{-1}$ . Os fungos, principalmente espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, crescem em aerobiose, levando a formação de toxinas, que quando ingeridas podem prejudicar os animais (LAZZARI, 1997; PEREIRA et al., 2014).

## **2.5 Alterações ocasionadas por microrganismos em volumosos**

A atividade microbiana pode ser benéfica ou maléfica. Benéfica, quando há desenvolvimento de microrganismos desejáveis que são benéficos na conservação das características nutricionais da forragem, e maléfica, quando a presença de microrganismos indesejáveis, como os clostrídios, enterobactérias, mofos e leveduras, que prejudica o valor nutricional do alimento (MUCK, 2010).

A interação dos microrganismos com o alimento determina a atividade microbiana na massa ensilada ou in natura. Muitas forragens são excelentes meios para o desenvolvimento de diferentes microrganismos e, se as condições forem favoráveis para o crescimento, promoverá alterações químicas e sensoriais nos alimentos (ROBAZZA et al., 2010). Por exemplo, alimentos úmidos tem condições de crescimento ideal para uma gama de microrganismos, e a maioria poderá degradar o valor nutricional da forragem (MUCK, 2010).

As características inerentes ao próprio alimento (fatores intrínsecos) e os relacionados ao ambiente onde está a forragem, conhecido como fatores extrínsecos, têm grande influência no tipo e diversidade microbiana que irá se desenvolver no alimento. Essas características são:

atividade de água (aw); acidez; pH; teor de MS; umidade; o potencial de oxirredução (Eh); composição química (presença de nutrientes); temperatura; umidade; manejo; colheita, pós colheita e entre outros (DRIEHUIS e VAN WIKSELLAR, 2000; MACÊDO et al., 2017; MATTHEWS et al., 2014).

As plantas geralmente possuem microbiota autóctone equilibrada. Mas, durante os procedimentos de colheita e pós colheita, pode haver contaminações e, ou variações nessa microbiota. Durante a colheita ocorre alterações na composição química das forragens, devido a respiração das plantas e/ou da oxidação por microrganismos aeróbios. Na colheita, em função do corte da forragem, ocorre as rupturas das células que permitem o extravasamento de líquido celular que contém enzimas proteases, hemicelulases e amilases da própria planta que podem hidrolisar proteínas em aminoácidos livre e carboidratos em monossacarídeos, a liberação desses substratos permitem o desenvolvimento de microrganismos (WEINBERG e MUCK, 1996).

O crescimento de determinados microrganismos pode promover alterações químicas e sensoriais diferentes. As bactérias fermentam carboidratos, proteína, e conseqüentemente ocasiona perda de MS e energia do alimento, promove o surgimento de odores desagradáveis devido à produção de compostos voláteis, alterações de textura devido à quebra de pectina nos vegetais, o acúmulo de exsudatos pela hidrólise de substratos, liberação de água e entre outras alterações (VALSECHI et al., 2006).

A presença elevada de bactérias dos gêneros *Clostridium* produz fermentações secundárias que são prejudiciais à qualidade nutricional da silagem e do alimento. Essas bactérias podem fermentar carboidratos, ácido lático e aminoácidos produzindo ácido butírico, amônia, hidrogênio e dióxido de carbono, resultando em perda de MS, depreciando o valor nutricional do alimento, e os produtos resultante de sua fermentação reduzem a aceitação pelo animal, além de diminuir a estabilidade da silagem (MAHANNA, 1994; ROTZ e MUCK, 1994).

Adicionalmente, outro grupo de microrganismos que apresenta efeito negativo sobre a qualidade do alimento, seja conservado ou in natura, são enterobactérias, pertencentes a família *Enterobacteriaceae* que inclui patógenos capazes de afetar animais, plantas e humanos. Essas bactérias são segundo maior grupo de bactérias presentes na microflora epifítica no silo (PAHLOW et al., 2003). A proliferação destes microrganismos ocasiona perdas de MS e pequenas perdas de energia (ROTZ e MUCK, 1994), além de redução das proteínas, pois, algumas cepas são capazes de desaminar e descarboxilar aminoácidos, produzem toxinas e grande quantidade de amônia, e competem por substrato com as BAL.

As leveduras apresentam características fisiológicas similares aos bolores e por isso podem deteriorar produtos ricos em carboidratos, principalmente se o alimento apresente baixo pH e atividade de água inferior a 0,94. As leveduras (aeróbias facultativas), utilizam carboidratos solúveis e posteriormente ácidos orgânicos no seu metabolismo, causando aumento da temperatura e pH. Tais alterações, proporcionam condições ideais para o crescimento de outros microrganismos deterioradores. Deste modo, contagens de levedura acima de  $10^6$  UFC/grama de massa fresca pode representar perdas de até 40% de matéria seca, diminuindo a qualidade da silagem (BORREANI et al., 2018; STOŠKUS et al., 2018).

As maiores alterações ocasionados pelo desenvolvimento fúngico no alimento são perda de matéria seca, alteração do valor nutricional e contaminação por micotoxinas (TIBOLA et al., 2009). Os fungos filamentosos são indesejáveis nos alimentos, devido à produção de compostos extremamente tóxicos, conhecidos como micotoxinas, que causam perdas imensuráveis (NOVINSKI, 2013). As micotoxinas são agentes químicos produzidas durante o metabolismo secundário de fungos filamentosos, que contaminam alimentos e rações animais, produzindo efeitos agudos (micotoxicoses) ou crônicos (OLDONI et al., 2012).

Essas alterações químicas e sensoriais nos alimentos prejudica a qualidade do material e quando esse volumoso é ofertado aos animais, os mesmos tem certa rejeição, principalmente nas primeiras horas após o fornecimento. As alterações químicas e sensoriais provocada por determinados microrganismos nos alimentos pode prejudicar o consumo animal e consequentemente seu desempenho produtivo (SILVA et al., 2015).

Além dos microrganismos indesejáveis, temos as bactérias do ácido láctico que são consideradas microrganismos desejáveis, pois provoca alterações benéficas nos alimentos. A BAL é o principal grupo de microrganismo que atua no processo fermentativo para a conservação da forragem, pois as bactérias lácticas podem produzir ácido láctico, ou mesmo bacteriocinas, que inibem ou eliminam certos microrganismos patógenos do alimento tanto conservado quanto em in natura (HOFFMANN; MOUSQUER et al., 2013). A produção de ácidos orgânicos reduz o pH e consequentemente impede o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis que deterioram o material seja ensilado ou in natura (MACHADO et al., 2012).

As BAL utilizam duas rotas metabólicas (homoláticas e heteroláticas), ambas, podem ocorrer simultaneamente durante a ensilagem, por exemplo. A primeira rota metabólica é a homofermentativa, como produto final tem-se o lactato, responsável por conservar os teores de MS e energia da silagem. As BAL heterofermentativas, devido, converter ácido láctico em ácido acético em condições de anaerobiose e pH baixo, acarreta em redução na recuperação de matéria seca. Por outro lado, o ácido acético controla o aparecimento de fungos

filamentosos (mofos) e unicelulares (leveduras) aumentando a estabilidade aeróbia da silagem (CARVALHO et al., 2014; LI et al., 2015; BORREANI et al., 2018).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local do Experimento

O experimento foi conduzido no mês de setembro de 2020, no laboratório de Forragicultura do Centro de Ciências Agrárias (CCA) pertencente à Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus II, localizado no município de Areia- Paraíba (PB), microrregião do Brejo Paraibano (6 ° 57'46 " S, 35 ° 41'31 "W) e no laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto Nacional do Semiárido (INSA), localizado em Campina Grande – PB (7 ° 16'36.6 " S, 35 ° 57'58.6 " W).

#### 3.2 Tratamentos e período experimental

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 5 x 5 (cinco níveis de palma forrageira x cinco tempos de exposição), com cinco repetições. Assim os tratamentos foram: 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel, 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; 80% de palma e 20% de feno de capim-buffel; 90% de palma e 10% de feno de capim-buffel; e 100% de palma com base na matéria natural. E cinco tempos 0, 3, 6, 12 e 24 horas de exposição ao ar.

Foi utilizada a palma da variedade Palmepa-PB1 (*Nopalea cochinilifera* Salm Dyck) *in natura* que foi triturada em máquina forrageira estacionária regulada para cortar em partículas de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>. Após a pesagem da palma e do feno foi realizado a homogeneização manual das forragens, e colocadas em bandejas de alumínio (marmitex) de acordo com o tratamento e repetição, posteriormente foram acondicionadas em BOD com temperatura controlada de 30° C por um período de exposição ao ar de 24 horas. A temperatura de 30° C foi escolhida por representar a temperatura média na região Semiárida da Paraíba.

A palma foi proveniente da área experimental da Empresa Paraibana de Pesquisa, Extensão Rural e Regularização Fundiária – EMPAER em Alagoinha (latitude Sul 6° 57' 00" e longitude 35° 32' 42", a Oeste de Greenwich e com altitude em torno de 133 m), PB, Brasil. O plantio da palma foi realizado em agosto de 2018 com adubação de fundação com as respectivas fontes: esterco (30 toneladas/hectare) e cinza (16 toneladas/hectare). A densidade era de 100 mil plantas ha<sup>-1</sup> espaçadas em fileira simples com 1,5 m entre linhas e 15 plantas por metro

linear. No início do período chuvoso do ano de 2020, no mês de março, o palmar foi adubado com 10 toneladas de esterco bovino por hectare.

O feno de capim-buffel foi proveniente de uma propriedade privada situada no município de São José dos Cordeiros (latitude: 07° 38' 88" S; longitude: 36° 79' 13"). O município faz parte da microrregião do Cariri Ocidental e possui clima Semiárido. A composição bromatológica da palma forrageira e feno de capim-buffel podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Composição bromatológica da palma forrageira e feno de capim-buffel.

| Composição bromatológica (g/kg) | Palma | Feno de capim-buffel |
|---------------------------------|-------|----------------------|
| Matéria seca <sup>1</sup>       | 66,4  | 867,4                |
| (g/Kg MS)                       |       |                      |
| Matéria orgânica                | 742,2 | 920,8                |
| Proteína bruta                  | 78,3  | 49,4                 |
| Extrato etéreo                  | 15,7  | 10,8                 |
| Matéria mineral                 | 257,8 | 79,2                 |
| FDN <sup>2</sup>                | 382,8 | 821,2                |
| FDA <sup>3</sup>                | 184,2 | 486,0                |
| Lignina                         | 42,1  | 79,7                 |

<sup>1</sup>MS= Matéria Seca; <sup>2</sup>PB= Proteína Bruta; <sup>3</sup>EE= Extrato etéreo; <sup>4</sup>MO= Matéria orgânica; <sup>5</sup>MM= Matéria mineral, <sup>6</sup>FDN= Fibra em detergente Neutro; <sup>7</sup>FDA= Fibra em detergente ácido

### 3.3 Composição química

A avaliação químico-bromatológica foi realizada no laboratório de Alimentos do INSA – Campina Grande e no laboratório de Forragicultura, pertencente ao CCA-UFPB, Areia.

As amostras para avaliação químico-bromatológica da palma e do feno foram coletadas e acondicionadas em embalagens plásticas devidamente identificadas e armazenadas em freezer a -20°C para posteriores análises. As amostras foram colocadas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas para secagem (Método INCT-CA G-001/1), e posteriormente, moídas em moinho de facas tipo Willey (moinho Willey, Arthur H. Thomas, PA, EUA) com peneira de malha de 1 mm.

As análises de composição para matéria seca (MS; método 934.01), matéria mineral (MM; método 942.05), proteína bruta (PB; método 954.01), extrato etéreo (EE; método 920.39) e lignina (método 973.18), foram realizadas de acordo com a Association of Official Analytical Chemists – AOAC (2016).

A fibra em detergente neutro (FDN) e a fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas segundo metodologia proposta por Van Soest et al. (1991), utilizando o analisador de fibra da ANKOM (ANKOM200 Fibre Analyzer – ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EUA).

A capacidade tampão da forragem foi determinada segundo metodologia proposta por Playne e Mc Donald (1966). Para a determinação dos carboidratos solúveis totais (CST) foi utilizado o método do ácido sulfúrico concentrado, descrito por Dubois et al. (1956), com adaptação de Corsato et al. (2008).

Para a determinação do N-NH<sub>3</sub> das amostras, utilizou-se a metodologia descrita por Bolsen et al. (1992) e para estimativa do nitrogênio total da amostra foi de acordo com Detmann et al. (2012). O pH foi determinado segundo Bolsen et al. (1992).

### **3.4 Determinação da temperatura interna e superficial do material**

Nos tempos de avaliação foram medidas as temperaturas interna e superficial de cada unidade experimental. Para a mensuração da temperatura interna e temperatura superficial foram utilizados dois termômetros digitais de imersão (Termômetro Digital PLUS Tipo Espeto a Prova D'Água com Alarme -50 +300 °C Divisão 1 °C Incoterm 9791.16.2.01). Para a temperatura superficial o termômetro foi posicionado de forma horizontal e superficial na massa das forragens, esperando por alguns segundos para estabilização da temperatura. Na averiguação da temperatura interna o termômetro foi posicionado de forma vertical sobre a massa da amostra, esperando por alguns segundos para estabilização da temperatura.

### **3.5 População de *Escherichia coli***

Foram quantificadas as populações de *Escherichia coli* em amostras do material vegetal, coletando-se 25 g de amostras nos tempos 0, 3, 6, 12 e 24 horas de todos os tratamentos. Foram adicionados 225 mL de água peptonada na amostra do material vegetal e colocado no homogeneizador de amostras digital tipo stomacher (SL-299) por um minuto. Após essa etapa, o material foi acondicionado no isopor com gelo e encaminhado para o laboratório de Microbiologia Ambiental do INSA, onde foram realizadas as demais etapas.

Em seguida, coletou-se 1 mL da mistura e adicionou-se 9 mL de solução salina (0,9%), seguindo a técnica de diluição seriada até 10<sup>-7</sup>, em duplicata. Para cada diluição foi utilizada a técnica de plaqueamento por espalhamento em superfície (*spread plate*), onde alíquotas de 100 µL foram depositadas na superfície do meio de cultura, contido em placas de Petri, e espalhadas

com auxílio da alça de Drigalski. Utilizou-se o Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB Levine), do qual favorece a inibição do crescimento de bactérias gram positivas e avaliação se a bactéria é fermentadora ou não de lactose, onde as colônias de *E. coli* são facilmente identificáveis por apresentarem coloração verde metálico.

Após etapa, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35° C ( $\pm 0,5$ ) durante 24 horas. As placas consideradas susceptíveis à população foram aquelas com valores entre 30 e 300 UFC (unidade formadora de colônia) em placa de Petri.

### **3.6 Análise da comunidade bacteriana por metataxonomia do gene rRNA ribossomal 16S**

As análises da comunidade bacteriana por metataxonomia foi realizada no Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA), pertencente ao Departamento de Zootecnia do CCA/UFPB. As análises foram realizadas em três dos cinco tratamentos, foram escolhidos o menor nível (0% de feno de capim-buffel e 100% de palma), nível intermediário (40% de feno de capim-buffel e 60% de palma) e o mais alto (80% de feno de capim-buffel e 20% de palma) avaliados em três tempos dos cinco, 0 (tempo inicial), 6 (tempo intermediário) e 24 horas (tempo final) .

A extração do DNA das amostras foi realizada utilizando-se o kit comercial (Power Soil DNA Isolation kit, MoBio, Carlsbad, CA), conforme recomendação do fabricante. A região V3-V4 do gene RNAr 16S foi amplificada por PCR (95 ° C por 3 min, seguido por 25 ciclos a 95 ° C por 30 s, 55 ° C por 30 s e 72 ° C por 30 s e uma extensão final a 72 durante 5 min) utilizando os iniciadores 16S Amplicon PCR Forward Primer = 3' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG 'e 16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC 3'. As reações de PCR foram realizadas em triplicada, em volume final de 25µL contendo 12.5 µL de 2x kapa hifi hotstart readmix, 5 µL de cada primer e 2.5 ng de DNA molde. Os produtos de PCR purificados foram quantificados por fluorometria utilizando Qubit 3.0 (Life Invitrogen).

A biblioteca foi preparada usando os adaptadores do “Nextera XT sample Prep Kit” (Illumina). Posteriormente, os fragmentos de DNA foram purificados com Agencourt AMPure XP reagent (Beckman). Após a purificação, a biblioteca foi validada no Fragment Analyser (Agilent Technologies). Foi realizado o sequenciamento *paired-end* em Miseq utilizando o kit V2 para 2 x 250 pb (Illumina), de acordo com recomendações do fabricante.

### 3.7 Processamento de dados de sequenciamento

As seqüências brutas, demultiplexadas e em pares, foram submetidas ao processamento pela plataforma QIIME 2 v.19.7 (BOLYEN et al., 2018), onde foram unidas, selecionadas pelos tamanhos máximo e mínimo (200-500 pb), Phred score mínimo de 20 e derreplicadas, por meio do VSEARCH (ROGNES et al., 2016). Sequências quiméricas foram removidas utilizando o UCHIME (EDGAR et al., 2011). O agrupamento (clusterization) foi realizado pelo método De Novo, com 99% de similaridade entre os grupos centroides, no qual foi possível obter as OTUs (Operational Taxonomic Unit).

O número de seqüências por amostra foi normalizado em 14900 reads, a fim de efetuar as análises de diversidade ecológica alfa (riqueza uniformidade) e beta (análise de componentes principais); alinhadas pelo mafft (KATOHO et al., 2002) e, então, utilizadas para a construção da árvore filogenética pelo fasttree2 (PRICE et al., 2010). As visualizações da composição taxonômica, mormente à abundância relativa e à alfa diversidade, foram realizadas pelo pacote phyloseq v.1.8.2 (MCMURDIE e HOLMES, 2013) do programa R v.3.5.7. A classificação taxonômica foi atribuída utilizando o método Naïve Bayes sobre o banco de dados treinados do SILVA v. 132 com 99% para região V3-V4 (QUAST et al., 2013).

A avaliação da diversidade alfa foi feita por meio da estimativa dos índices ecológicos de riqueza e de uniformidade das comunidades, respectivamente, Chao1 e Shannon. Já para a diversidade beta, procedeu-se através da visualização gráfica da Análise Componentes Principais (PcoA – Principal Coordinate Analysis), sendo a métrica qualitativa não-ponderada (unweighted) de eleição para a montagem da matriz de distância base para a análise, gerada do Unifrac (LOZUPONE e KNIGHT, 2005).

### 3.8 Análise estatística

A população de *E. coli* foi transformada em unidades de log e apresentada com unidades formadoras de colônias/g de matéria natural. Os valores obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e os graus de liberdade foram desdobrados a partir de regressão linear e polinomial para os níveis de palma e tempo de exposição ao ar, ao nível de significância de 5% através do programa estatístico SAS®.

Os índices de diversidade alfa foram avaliados por meio do teste Kruskal-Wallis pareado, enquanto a dissimilaridade entre os tratamentos foi averiguada pelo método permutacional multivariado (PERMANOVA).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

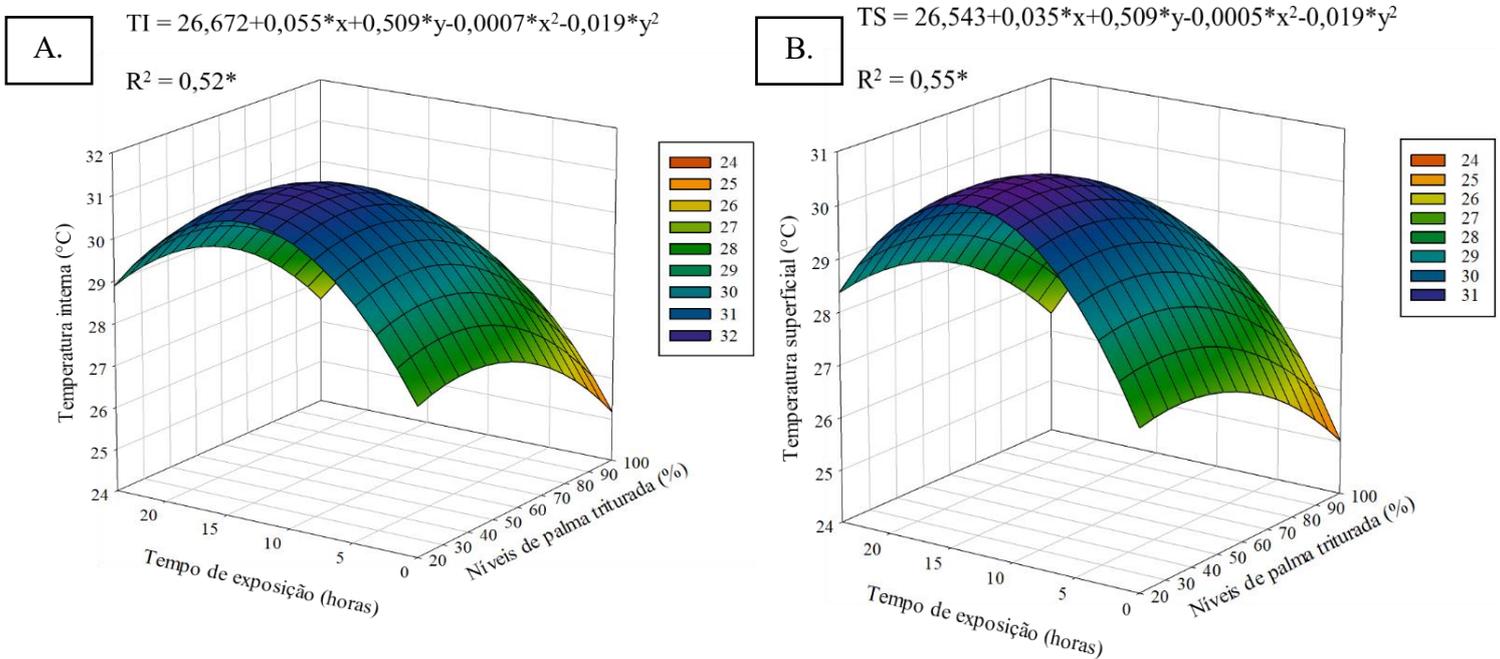
Houve interação entre os níveis de palma forrageira e o tempo de exposição ao ar ( $P < 0,001$ ) para variáveis temperatura interna, superficial e potencial hidrogeniônico (pH) (Tabela 2). Também foi observado interação ( $P < 0,001$ ) para a população de *Escherichia coli*.

**Tabela 2-** Valores médios da temperatura interna (TI), temperatura superficial (TS), potencial hidrogeniônico (pH) e população de *E. coli* em função dos níveis de palma forrageira e tempo de exposição ao ar.

| Variáveis   | Níveis de Palma% | Tempo, horas |       |       |       |       | Média Geral (P) | P-valor <sup>1</sup> |        |                   | P-valor <sup>2</sup> |        |
|---|------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-----------------|----------------------|--------|-------------------|----------------------|--------|
|   |                  | 0            | 3     | 6     | 12    | 24    |                 | P                    | T      | Interação (P x T) | T                    |        |
|   |                  |              |       |       |       |       |                 |                      |        |                   | L                    | Q      |
| TI, °C  | 20               | 28,60        | 30,98 | 26,68 | 28,88 | 27,22 | 30,47           | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | 0,397  |
|   | 60               | 26,58        | 29,28 | 31,82 | 28,64 | 28,84 | 29,03           | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | 0,044  |
|   | 80               | 25,00        | 30,50 | 29,44 | 32,64 | 29,04 | 29,32           | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | <0,001 |
|   | 90               | 25,02        | 27,96 | 27,00 | 29,44 | 28,84 | 27,65           | <0,001               | <0,001 | <0,001            | 0,036                | 0,001  |
|   | 100              | 24,76        | 27,54 | 27,40 | 28,74 | 27,22 | 27,13           | <0,001               | <0,001 | <0,001            | 0,679                | 0,163  |
|   | Média Geral (T)  |              | 25,99 | 29,25 | 28,47 | 31,67 | 28,23           |                      |        |                   |                      |        |
| TS, °C  | 20               | 28,16        | 30,60 | 29,46 | 27,76 | 27,98 | 28,79           | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | 0,682  |
|   | 60               | 26,38        | 27,52 | 31,04 | 28,32 | 27,56 | 28,16           | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | 0,848  |
|   | 80               | 24,52        | 29,52 | 28,88 | 31,76 | 27,54 | 28,44           | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | <0,001 |
|   | 90               | 24,58        | 27,28 | 26,88 | 29,12 | 28,08 | 27,19           | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | 0,001  |
|   | 100              | 24,30        | 26,60 | 27,00 | 28,56 | 26,76 | 26,64           | <0,001               | <0,001 | <0,001            | 0,121                | 0,493  |
|   | Média Geral (T)  |              | 25,59 | 28,30 | 28,65 | 29,10 | 27,58           |                      |        |                   |                      |        |
| pH  | 20               | 7,17         | 7,38  | 6,94  | 6,31  | 6,39  | 6,84            | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | 0,923  |
|   | 60               | 6,35         | 6,94  | 7,03  | 7,06  | 6,41  | 6,76            | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | <0,001 |
|   | 80               | 6,28         | 6,92  | 6,96  | 6,43  | 6,16  | 6,55            | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | <0,001 |
|   | 90               | 6,35         | 6,41  | 6,78  | 6,49  | 6,47  | 6,50            | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | <0,001 |
|   | 100              | 5,70         | 5,94  | 5,99  | 5,92  | 5,90  | 5,89            | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | <0,001 |
|   | Média Geral (T)  |              | 6,37  | 6,72  | 6,74  | 6,44  | 6,27            | 6,51                 |        |                   |                      |        |
| População de <i>Escherichia coli</i> (Log UFC6/g) |                  |              |       |       |       |       |                 |                      |        |                   |                      |        |
|   | 20               | 0,00         | 0,00  | 9,72  | 8,77  | 8,64  | 5,43            | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | <0,001 |
|   | 60               | 7,47         | 9,28  | 9,65  | 8,91  | 8,99  | 8,86            | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | <0,001 |
|   | 80               | 7,04         | 9,06  | 9,51  | 8,61  | 8,19  | 8,48            | <0,001               | <0,001 | <0,001            | <0,001               | 0,026  |
|   | 90               | 6,79         | 8,69  | 9,30  | 9,13  | 8,83  | 8,55            | <0,001               | <0,001 | <0,001            | 0,029                | 0,170  |
|   | 100              | 6,47         | 8,34  | 9,16  | 9,05  | 9,02  | 8,41            | <0,001               | <0,001 | <0,001            | 0,203                | 0,144  |
|   | Média Geral (T)  | 5,55         | 7,07  | 9,47  | 8,89  | 8,73  |                 |                      |        |                   |                      |        |

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>Nível de significância de 5; <sup>3</sup>NP= Níveis de palma; <sup>4</sup>T= Tempo; <sup>5</sup>NP x T=Níveis de palma x Tempo; <sup>6</sup>UFC= Unidades formadoras de colônia;

A temperatura interna (Figura 1A) atingiu o seu pico máximo de 32°C as 12 horas de exposição aeróbia. De acordo com a inclinação da curva pode-se observar que o tempo de exposição aeróbia proporcionou maior influência na temperatura interna que os níveis de palma.



**Figura 1-** Temperatura interna (A) e temperatura superficial (B) em função dos níveis de palma e tempo de exposição ao ar.

Após 12 horas de exposição aeróbia os volumosos atingiram a temperatura interna máxima de 32°C, onde os microrganismos predominantes no material, estão em intensa atividade, metabolizando nutrientes, quebrando ligações carbônicas e consequentemente gerando calor. O tamanho de partícula utilizada foi de 2 cm<sup>2</sup>, o qual favorece o crescimento de microrganismos, pois facilita o acesso aos nutrientes necessário para sua proliferação (PAULINO et al., 2021).

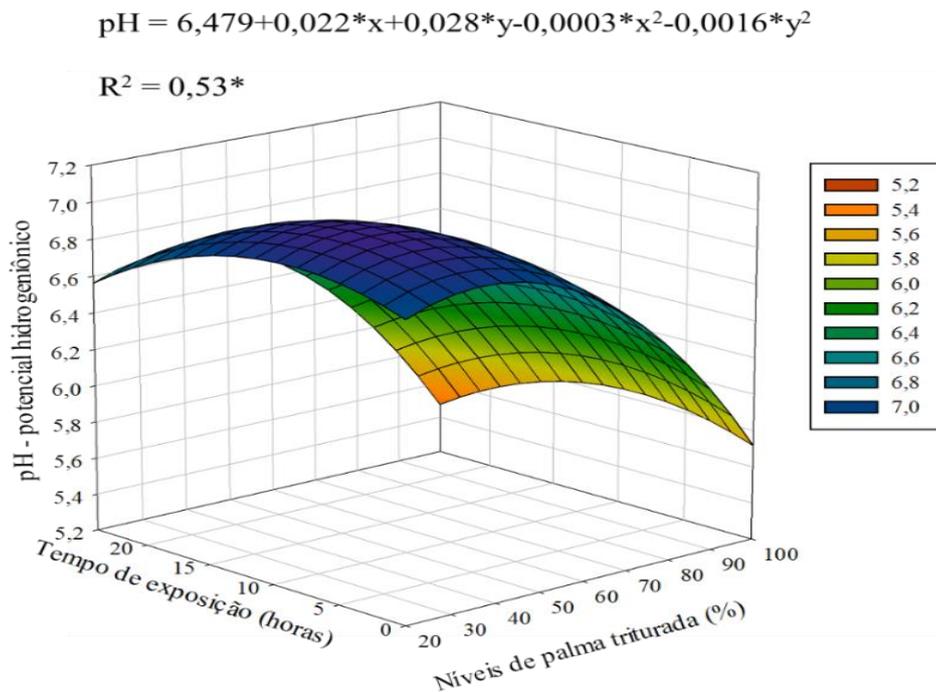
Segundo Paulino et al. (2021) o processo de produção de calor interno na palma picada se assemelha ao processo que ocorre em silagens com alta disponibilidade de açúcares residuais, onde a exposição do material ao ar e a presença de grande quantidade de substrato e umidade constituem condições ideais para a proliferação de microrganismos, que geram calor, aumentando assim a temperatura interna. Isso explica o aumento de temperatura interna em quase todos os níveis de palma nesse período.

Na figura 1A, observa-se maior temperatura para a volumosos com 46,66% de palma. Nos maiores níveis de palma (100 e 80%) verifica-se menores temperaturas. A provável explicação para esse aumento de temperatura nos menores níveis de palma deve-se ao fato de

que a incorporação do feno, material mais seco, pode evitar o adensamento das partículas da palma, permitindo assim a entrada de ar na massa da forragem, favorecendo o crescimento de microrganismos que geram calor durante a metabolização dos nutrientes.

Para temperatura superficial (Figura 1B) houve uma maior influência do tempo de exposição ao ar, atingindo seu pico máximo de 31°C as 11 horas, esse pico foi observado no nível 41,21% de palma. Paulino et al. (2021) avaliaram a temperatura superficial da palma triturada a 2 cm<sup>2</sup> e exposta ao ar por 24 horas, com temperatura ambiente de 25 °C, observaram o pico de temperatura de 27° C as 7,30 horas de exposição ao ar, inferior aos encontrados neste estudo. Pode-se inferir que em situações de temperatura mais elevada, em que a temperatura ambiente utilizada foi de 30 °C, comuns no ambiente semiárido, o crescimento microbiano no cocho pode ser mais acentuado e os distúrbios causados por microrganismos patógenos oportunistas podem ser mais significativos.

Houve efeito quadrático tanto dos níveis de palma quanto do tempo de exposição ao ar nos valores de pH, com uma maior influência do tempo de exposição ao ar sobre essa variável (Figura 2). O ponto máximo de 6,95 foi no nível 35,72% de palma e para o tempo de exposição ao ar de 3,14 horas.



**Figura 2-** Potencial hidrogeniônico (pH) em função dos níveis de palma e tempo de exposição ao ar.

Com aumento das proporções de feno, a quantidade de matéria seca também aumentou, e conseqüentemente, diminuiu a concentração de íons de hidrogênio, tornando o meio mais

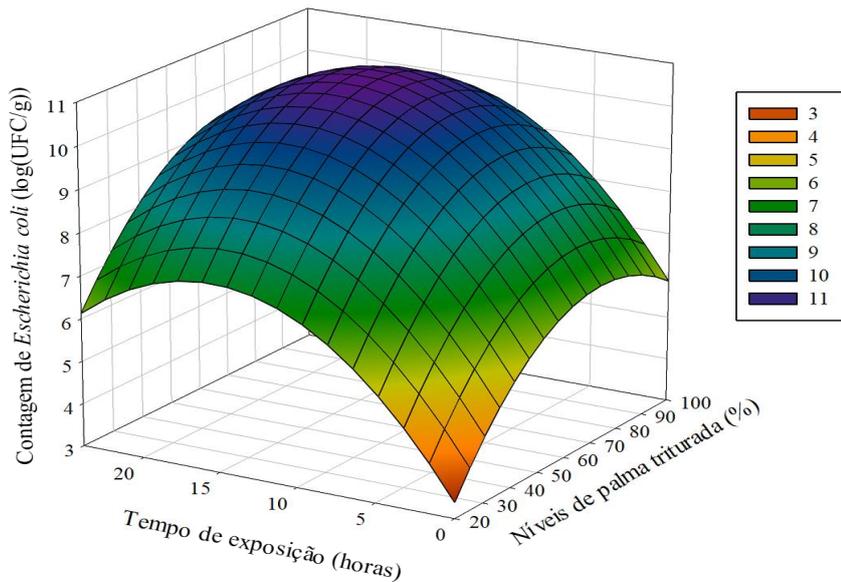
alcalino com pH entre 6,31 e 7,38. Em todos os tratamentos o pH é considerado de baixa acidez (pH > 4,5) (HOFFMANN, 2001). Esse aumento do pH, associado com a maior penetração de oxigênio na massa podem explicar a maior atividade microbiana nos menores níveis de palma.

O pH é um fator inerente ao alimento que pode ser ótimo ou limitante no crescimento e multiplicação de microrganismos, inclusive os patogênicos. A microbiota de alimentos pouco ácidos (pH > 4,5) é muito variada, havendo condições para o desenvolvimento da maioria das bactérias, inclusive as patogênicas, bolores e leveduras (HOFFMANN, 2001).

Para a população de *E. coli* houve efeito de interação entre níveis de palma e o tempo de exposição ao ar (P<0,001). O pool de crescimento dessa bactéria foi após 16,06 horas de exposição ao ar (Figura 3). Quanto mais tempo o alimento fica exposto ao ar, maior é o crescimento de *E. coli*, e com até 24h a população dessa bactéria continua elevada.

$$E. Coli = 0,549 + 0,163*x + 0,518*y - 0,0011*x^2 - 0,0168*y^2$$

$$R^2 = 0,47^*$$



**Figura 3-** População de *E. coli* em função dos níveis de palma e tempo de exposição ao ar.

A *E. coli* é uma bactéria gram-negativa e bastante versátil, se multiplica muito rápido em diversos substratos e ambientes, podendo se multiplicar rapidamente em temperatura entre 10 °C a 45° C e pH entre 4,4 a 9,5 (HOFFMANN, 2001). A temperatura ambiente utilizada foi de 30 °C, e o pH observado nos tratamentos foram considerados de baixa acidez, o que favorece seu crescimento, principalmente nos níveis menores e intermediários de palma.

No nível com 20% de palma não teve população de *E. coli* nos tempos 0 e 3h após exposição ao ar, o contrário observa-se para os demais níveis. Essa ausência de população possa

estar relacionada com a menor umidade do feno, material seco, o que torna o meio inicialmente menos favorável ao crescimento bacteriano. No entanto, a partir das 6 h de exposição houve um maior crescimento da população de *E. coli* nos níveis menores de palma, fato que já foi explicado anteriormente pelo elevado pH e presença de ar no meio.

Com exceção do nível de 20% de palma, a população de *E. coli* no tempo inicial dos demais níveis foram elevadas, porém todo processo de manuseio da palma e feno de capim-buffel foi realizado de forma higiênica. Alguns microrganismos patogênicos podem estar na epiderme do vegetal e internalizar na planta após o processamento (LIU et al., 2013). Segundo Zárte-Castrejón et al. (2016) algumas bactérias podem produzir biofilmes que lhes permitem aderir e sobreviver na cera dos cladódios de palma e permanecer até a colheita e oferta aos animais.

A internalização de bactérias aos tecidos vegetais pode ocorrer através da penetração das raízes, sementes, frutos, e também através do manejo, irrigação e adubação, que são veículos para esses microrganismos, que podem transcolar e sobreviver nos tecidos aéreos comestíveis das plantas (SOLOMON et al. 2002; ISLAM et al. 2004; TANG et al., 2012). A adubação com esterco é uma prática comum nos sistemas de produção de palma no Semiárido Brasileiro (FRANZ e VAN BRUGGEN, 2008; ISLAM et al., 2005) e pode ser um dos veículos de contaminação.

Para composição química, houve interação dos níveis de palma e tempo de exposição ao ar para matéria seca ( $P < 0,001$ ), proteína bruta ( $P < 0,001$ ), capacidade tampão ( $P < 0,001$ ), carboidratos solúveis ( $P < 0,001$ ) e nitrogênio amoniacal ( $P < 0,001$ ) (Tabela 3). Observa-se para os valores de MS efeito linear decrescente ao longo do tempo de exposição ao ar. As bactérias, por exemplo as enterobactérias, utilizam a MS como substrato para seu crescimento (McDONALD et al., 1991; NASCIMENTO et al., 2016).

**Tabela 3-** Composição química em função dos níveis de palma forrageira e tempo de exposição ao ar.

| Variáveis                          | Níveis de Palma, % | Tempo, horas |       |       |       |       | Média Geral (P) | P-valor <sup>1</sup> |        |                      | P-valor <sup>2</sup> |        |
|------------------------------------|--------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-----------------|----------------------|--------|----------------------|----------------------|--------|
|                                    |                    | 0            | 3     | 6     | 12    | 24    |                 | P                    | T      | Interação<br>(P x T) | T                    |        |
|                                    |                    | L            | Q     |       |       |       |                 |                      |        |                      |                      |        |
| MS <sup>3</sup> , g/kg             | 20                 | 828,9        | 810,4 | 777,7 | 727,6 | 590,4 | 747,0           | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,000                | 0,359  |
|                                    | 60                 | 432,1        | 431,4 | 431,1 | 397,8 | 388,1 | 416,1           | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,012                | 0,754  |
|                                    | 80                 | 280,7        | 262,2 | 239,1 | 237,4 | 226,9 | 249,3           | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,019                | 0,202  |
|                                    | 90                 | 148,0        | 148,2 | 148,3 | 138,5 | 136,1 | 143,8           | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,000                | 0,773  |
|                                    | 100                | 66,4         | 65,8  | 64,6  | 63,4  | 63,2  | 64,7            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,000                | 0,002  |
|                                    | Média Geral (T)    | 231,8        | 227,0 | 272,8 | 312,9 | 280,9 |                 |                      |        |                      |                      |        |
| PB <sup>4</sup> , g/kg             | 20                 | 50,3         | 49,3  | 48,9  | 49,3  | 57,5  | 51,1            | <0,001               | <0,001 | 0,000                | <0,001               | <0,001 |
|                                    | 60                 | 57,4         | 55,3  | 53,3  | 53,9  | 54,5  | 54,9            | <0,001               | <0,001 | 0,000                | <0,001               | <0,001 |
|                                    | 80                 | 61,1         | 60,6  | 59    | 64,2  | 64,3  | 61,8            | <0,001               | <0,001 | 0,000                | <0,001               | <0,001 |
|                                    | 90                 | 65,1         | 64,2  | 63,9  | 67,2  | 72,5  | 66,6            | <0,001               | <0,001 | 0,000                | <0,001               | <0,001 |
|                                    | 100                | 78,3         | 76,4  | 75,8  | 77,7  | 79    | 77,3            | <0,001               | <0,001 | 0,000                | <0,001               | <0,001 |
|                                    | Média Geral (T)    | 62,4         | 61,2  | 60,2  | 62,3  | 65,6  |                 |                      |        |                      |                      |        |
| CHO <sup>5</sup> , mg/100mg        | 20                 | 1,75         | 1,04  | 1,00  | 0,92  | 0,84  | 1,11            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,029                | 0,090  |
|                                    | 60                 | 1,78         | 1,63  | 1,13  | 0,91  | 0,84  | 1,26            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,002                | 0,084  |
|                                    | 80                 | 2,54         | 1,76  | 0,75  | 0,73  | 0,66  | 1,29            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | <0,001               | <0,001 |
|                                    | 90                 | 3,16         | 2,55  | 0,57  | 0,48  | 0,38  | 1,43            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | <0,001               | <0,001 |
|                                    | 100                | 6,05         | 3,74  | 0,76  | 0,66  | 0,54  | 2,35            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | <0,001               | <0,001 |
|                                    | Média Geral (T)    | 3,06         | 2,14  | 0,84  | 0,74  | 0,65  |                 |                      |        |                      |                      |        |
| N-NH <sub>3</sub> <sup>6</sup> , % | 20                 | 0,01         | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,01            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,381                | 0,267  |
|                                    | 60                 | 0,01         | 0,01  | 0,02  | 0,02  | 0,01  | 0,01            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,725                | 0,000  |
|                                    | 80                 | 0,02         | 0,01  | 0,01  | 0,02  | 0,02  | 0,02            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,057                | 0,891  |
|                                    | 90                 | 0,02         | 0,01  | 0,01  | 0,05  | 0,02  | 0,02            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,039                | 0,000  |
|                                    | 100                | 0,06         | 0,02  | 0,02  | 0,01  | 0,01  | 0,02            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | <0,001               | <0,001 |
|                                    | Média Geral (T)    | 0,02         | 0,01  | 0,01  | 0,02  | 0,01  |                 |                      |        |                      |                      |        |
| CT <sup>7</sup> , e.mg/100g MS     | 20                 | 0,01         | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,01            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,997                | 0,997  |
|                                    | 60                 | 0,01         | 0,02  | 0,01  | 0,01  | 0,01  | 0,01            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,997                | 0,825  |
|                                    | 80                 | 0,02         | 0,03  | 0,02  | 0,02  | 0,02  | 0,02            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | 0,086                | 0,719  |
|                                    | 90                 | 0,03         | 0,04  | 0,04  | 0,06  | 0,06  | 0,05            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | <0,001               | <0,001 |
|                                    | 100                | 0,09         | 0,11  | 0,12  | 0,14  | 0,17  | 0,13            | <0,001               | <0,001 | <0,001               | <0,001               | <0,001 |
|                                    | Média Geral (T)    | 0,03         | 0,04  | 0,04  | 0,05  | 0,05  |                 |                      |        |                      |                      |        |

<sup>1</sup>P= palma; T= Tempo; PxT= interação Palma x Tempo; <sup>2</sup>L= Linear, e Q= quadrático; Nível de significância de 5%; <sup>3</sup>MS= Matéria Seca; <sup>4</sup>PB= Proteína Bruta; <sup>5</sup>CHO= Carboidratos solúveis; <sup>6</sup>N-NH<sub>3</sub>= Nitrogênio Amoniacal; <sup>7</sup>CT= Capacidade Tampão

Para os valores de proteína bruta verifica-se efeito quadrático (Tabela 3), observa-se que com até 6 horas de exposição ao ar ocorreu uma redução da PB, mas a partir das 12 horas constatar-se um aumento nos valores. O alimento exposto ao ar proporciona um ambiente favorável para o crescimento microbiano elevado, dinâmico e diverso, que utilizam os nutrientes disponíveis para sua proliferação, algumas bactérias são capazes de degradar as proteínas, promovendo a sua redução no alimento, o que justifica a diminuição da PB nas primeiras 6 h de exposição ao ar (VALSECHI et al., 2006; McDONALD et al., 1991).

Após 12 horas de exposição ao ar houve um aumento nos valores de PB, supostamente esse incremento é devido a própria proteína dos microrganismos, visto que a membrana plasmática bacteriana é composta por proteínas (60%) e lipídeos (40%) (PRESCOTT et al., 2002). Além de que existe uma grande abundância e diversidade de microrganismos epifíticos nesses volumosos, e quando o alimento fica exposto ao ar e tem condições favoráveis para o seu desenvolvimento, favorece a multiplicação dos mesmos e desenvolvimentos de outros microrganismos oportunistas ao longo tempo (ROBAZZA et al., 2010).

Observa-se para os valores de CHO solúveis que alguns níveis de palma houve efeito linear e para outros efeito quadrático (Tabela 3). Constatar-se uma redução nos valores CHO em todos níveis de palma ao longo do tempo de exposição ao ar. Os CHO são utilizados como substrato por bactérias aeróbias em função da liberação de substratos e da manutenção de um pH elevado, como já discutido anteriormente, o que explica uma redução mais acentuada dos carboidratos nas dietas com maiores proporções de palma (MACÊDO et al., 2017).

Em relação ao N-NH<sub>3</sub> identificar-se um aumento após 12 horas de exposição ao ar para os níveis 80 e 90% de palma e posterior redução (Tabela 3). O teor de N-NH<sub>3</sub> está relacionado à proteólise que ocorre durante o processo de fermentação, resultante do crescimento de microrganismos indesejáveis, como enterobactérias, por exemplo (MUCK, 2010). Estes microrganismos indesejáveis degradam glicose, ácido láctico, proteínas e aminoácidos livres, gerando nitrogênio amoniacal (NASCIMENTO et al., 2016)

Para capacidade tampão verifica-se efeito linear para os níveis 90 e 100% de palma em função do tempo de exposição ao ar (Tabela 3). Pelo comportamento dos dados, observa-se um aumento da capacidade tampão ao longo dos tempos para as maiores proporções de palma. Esse aumento está relacionado com presença de substâncias tamponantes (ácidos oxálico, málico, cítrico, malônico, succínico e tartáricos) nessa cactácea que podem inibir a ação de microrganismos deterioradores, por meio do tamponamento da massa, direcionando a fermentação para a produção de bactérias lácticas heterofermentativas, que influencia

diretamente nos valores de pH, que permaneceram mais ácidos ao longo tempo (MCITEKAH, 2008; ABIDI et al., 2009; PETERA et al., 2015; CARVALHO et al., 2018).

Houve efeito significativo dos níveis de palma ( $P < 0,001$ ) e tempo de exposição aeróbia para matéria orgânica, matéria mineral e extrato etéreo (Tabela 4). Para fibra em detergente neutro só foi observado efeito significativo para os níveis de palma ( $P < 0,001$ ), resultado esperado, visto que à medida que foi adicionado palma houve a diminuição do FDN, pois essa cactácea tem valores inferiores ao do feno de capim-buffel. A palma tem valores de FDN entre 19,87% a 38,52% e o feno de capim-buffel de 71,82 a 87,41% com base na matéria seca (MCITEKA, 2008; ANDRADE-MONTEMAYOR et al., 2011; PINHO et al., 2013; MORAES, 2013).

**Tabela 4-** Valores de matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e fibra em detergente neutro (FDN) dos níveis de palma forrageira e tempo de exposição ao ar

| Variáveis,<br>g/kg | Níveis de Palma (%) |       |       |       |       | EPM  | Tempo (horas) |       |       |       |       | EPM  | Valor- P <sup>1</sup> |        |       | P-valor <sup>2</sup> |       |
|--------------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|------|---------------|-------|-------|-------|-------|------|-----------------------|--------|-------|----------------------|-------|
|                    | 20                  | 60    | 80    | 90    | 100   |      | 0             | 3     | 6     | 12    | 24    |      | P                     | T      | P x T | T                    |       |
|                    |                     |       |       |       |       |      |               |       |       |       |       |      |                       |        |       | L                    | Q     |
| MO                 | 902,8               | 878,5 | 856,3 | 828,3 | 742,2 | 0,21 | 843,4         | 846,3 | 842,5 | 840,6 | 835,1 | 0,21 | <0,001                | 0,007  | 0,229 | 0,001                | 0,598 |
| MM                 | 97,2                | 121,5 | 143,7 | 171,7 | 257,8 | 0,20 | 156,6         | 153,7 | 157,5 | 159,4 | 164,9 | 0,20 | <0,001                | 0,007  | 0,229 | 0,001                | 0,598 |
| EE                 | 16,6                | 21,8  | 16,5  | 11,5  | 15,7  | 0,11 | 20,6          | 19,9  | 17,4  | 14,1  | 10,1  | 0,11 | <0,001                | <0,001 | 0,762 | <0,001               | 0,372 |
| FDN                | 788,5               | 768,5 | 713,5 | 647,0 | 382,8 | 1,95 | 667,6         | 686,0 | 655,8 | 635,6 | 651,9 | 1,95 | 0,000                 | 0,458  | 0,427 | 0,278                | 0,335 |

<sup>1</sup>P= palma; T= Tempo; PxT= interação Palma x Tempo; <sup>2</sup>L= Linear, e Q= quadrático; Nível de significância de 5%.

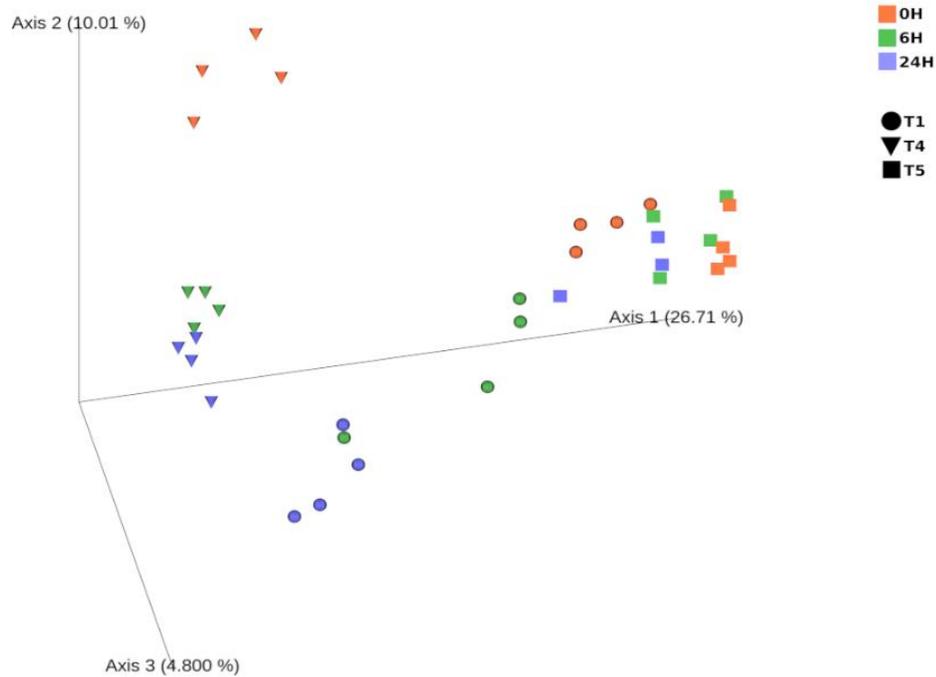
Para matéria orgânica, observa-se efeito linear ( $P=0,001$ ) decrescente em relação ao tempo de exposição ao ar. Essa redução nos valores de MO provavelmente possa está relacionada com a respiração das forragens e a oxidação por microrganismos aeróbios, visto que durante a colheita ocorre as rupturas das células que permitem o extravasamento de líquido celular que contém enzimas proteases, hemicelulases, amilases da própria planta que podem hidrolisar proteínas em aminoácidos livre e carboidratos em monossacarídeos, a liberação desses substratos permitem o desenvolvimento de microrganismos (WEINBERG e MUCK, 1996). Esses microrganismos aeróbicos utilizam os nutrientes disponível para seu crescimento, degradando proteínas, carboidratos e entre outros, ocasionando perdas de MS e energia (Valsechi et al., 2006; Rotz; Muck, 1994).

Observa-se efeito linear crescente ( $P<0,001$ ) para MM em relação ao tempo de exposição ao ar (Tabela 4). A matéria mineral é diretamente proporcional aos valores de matéria orgânica, e esse possível incremento nos valores, está relacionado com diminuição da MO na dieta.

Verifica-se efeito linear decrescente ( $P<0,001$ ) para os valores de extrato etéreo (Tabela 4) em relação ao tempo de exposição ao ar. As gorduras podem ser degradadas por microrganismos lipolíticos representados por muitos bolores, leveduras e bactérias (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Alcaligenes* e outros), que através da liberação da enzima lipase, pode romper a membrana artificial da gordura e executar uma lipólise eficiente (GUPTA e GUPTA, 2004; TEMBHURKAR et al., 2012). Um estudo realizado por Danthine e Blecker (2014) mostrou que a lipase microbiana apresenta maior eficácia na quebra de gordura do que a do próprio organismo do animal (lipase endógena).

Outro fator que pode provocar a diminuição dos valores de EE, é a reação espontânea do oxigênio com os lipídios, conhecida como auto-oxidação, é o processo mais comum que leva à deterioração oxidativa. A rancificação oxidativa dos lipídeos é um fenômeno espontâneo e inevitável, que provoca alterações químicas complexas, resultantes da interação do lipídeo com o oxigênio, onde os ácidos graxos insaturados podem sofrer oxidação, degradação e polimerização, resultando em radicais livres (DAMODARAN, 2010; SCHWERT, 2014; HAMILTON, 2003).

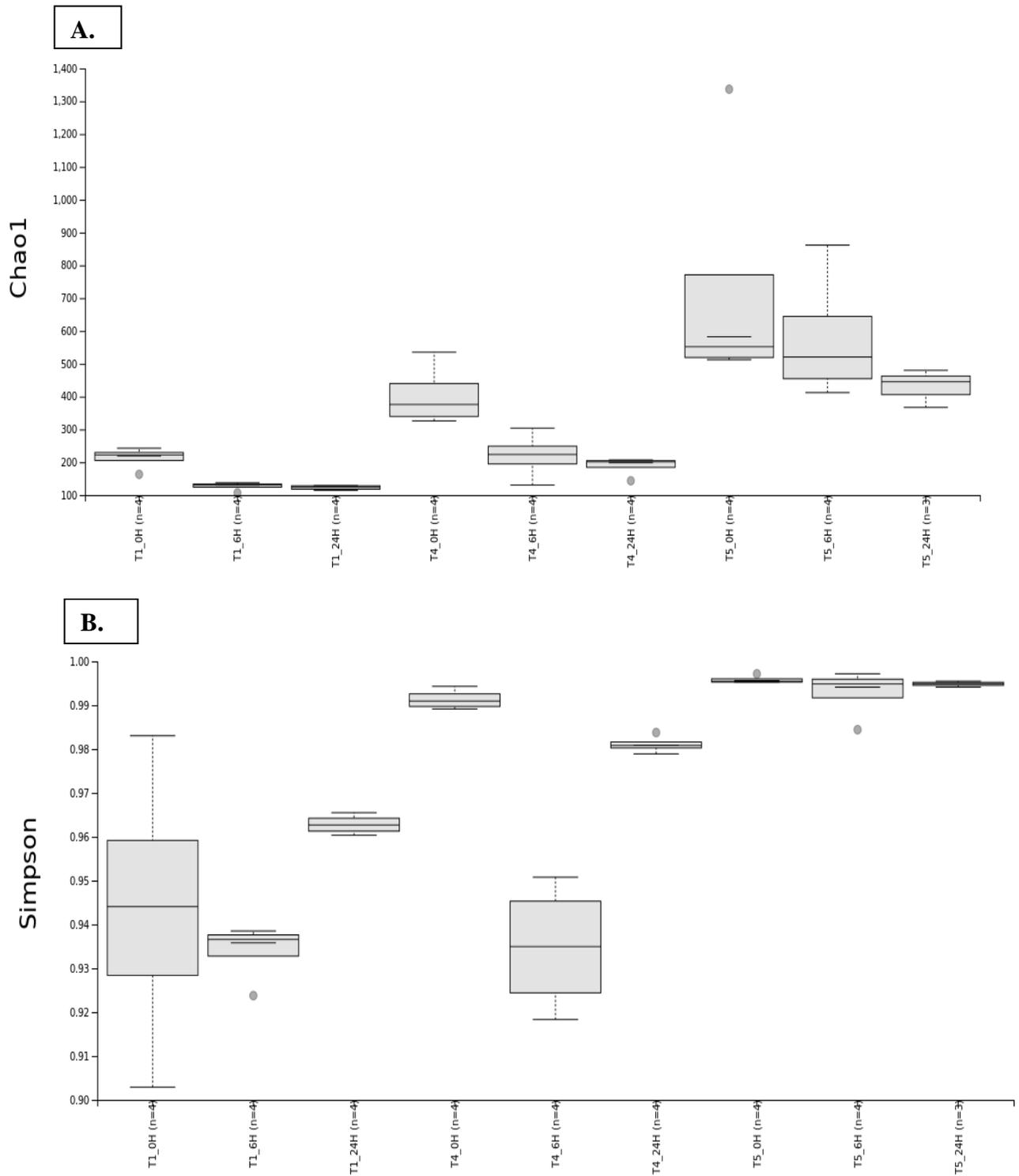
A distribuição espacial dos tratamentos pela análise de componentes principais (PCoA), mostrou o nível de dissimilaridade entre os níveis de palma de acordo com o tempo de exposição ao ar (Figura 4). Formaram-se grupos distintos e bem segregados, 100% de palma se mostrou mais dissimilar em todos os tempos. Observa-se que, ao adiciona palma forrageira na dieta, muda-se a microbiota, assim como também com o tempo de exposição ao ar promoveu grandes modificações.



**Figura 4** - Diversidade beta representada por meio gráfico do tipo PCoA 3D evidenciando o grau de dissimilaridade com base na matriz de distância do tipo Unweighted Unifrac. T1= 100% de palma; T4 = 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; T5= 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel; 0= 0 horas; 6= 6 horas e 24 = 24 horas em exposição ao ar.

Provavelmente, estas mudanças ocorram em razão do pH e presença de oxigênio, os quais possibilitaram o crescimento de vários microrganismos ao longo do tempo. As características inerentes aos próprios alimentos têm grande influência no tipo e diversidade microbiana capaz de se desenvolver no meio, por exemplo, um pH próximo da neutralidade, e alta concentração de carboidratos, que foi o caso dos níveis intermediários de palma, favorece o crescimento de uma grande diversidade de bactérias, e dentre elas a *E. coli* (HUI, 2006).

Após seis horas, notou-se aumento na riqueza e na uniformidade microbiana de todos os níveis (Figura 5), pois quando exposto ao ar, há o favorecimento do crescimento de diferentes microrganismos. No tempo inicial, a dieta com maior nível de palma tem baixos valores dos índices de diversidade alfa (Simpson, Chao1), ao contrário das misturas com 20% e 80% de feno de capim- buffel, onde mostrou grande diversidade microbiana desde os tempos iniciais de exposição ao ar.



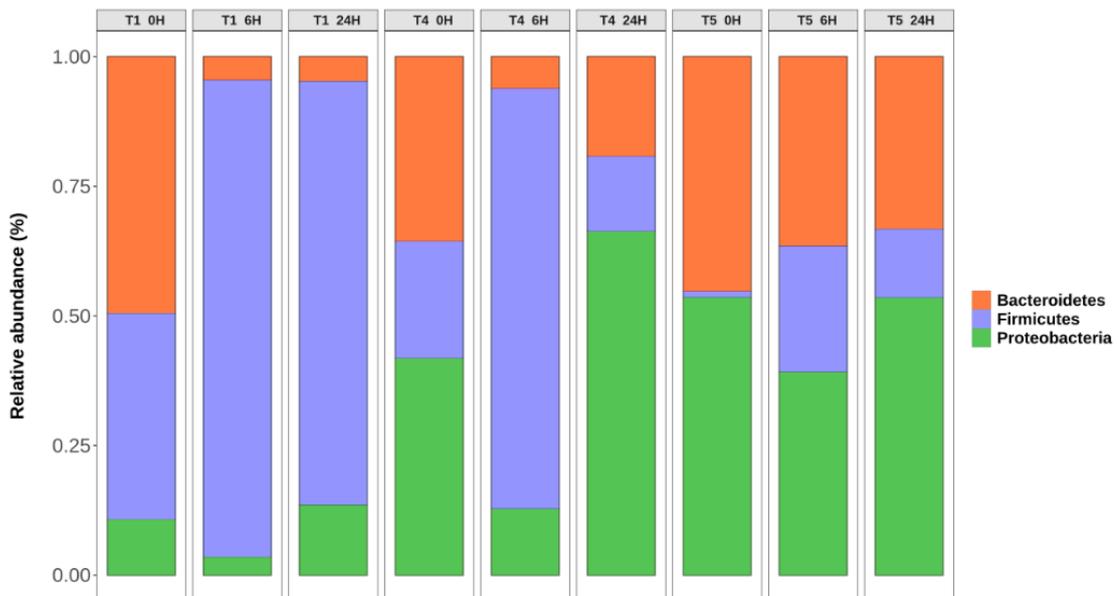
**Figura 5** - Gráfico de caixas e bigodes a representar a diversidade alfa por meio do índice de uniformidade de Chao1 (A) e Simpson (B). T1= 100% de palma; T4= 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; T5= 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel.

Avaliando a dinâmica bacteriana de rações a base de palma, Santos et al. (2020) verificaram que à medida que aumentou o nível de palma forrageira nas dietas, o índice de

diversidade diminuiu, no momento da ensilagem, corroborando com os resultados obtidos nesse estudo, visto que foi observado baixa riqueza para a dieta com 100% de palma.

De acordo com Gobetti et al. (2013) quando a silagem apresenta condições como anaerobiose, tem-se predominância de bactérias produtoras de ácido lático que conseguem controlar o crescimento de outros microrganismos no meio, diminuindo assim a diversidade bacteriana. É provável que a presença de mucilagem da palma que tem o efeito agregador das partículas tenha favorecido o crescimento de bactérias anaeróbias fermentadoras nos níveis com maior proporção de palma, explicando assim a diminuição da diversidade microbiana.

A diversidade taxonômica das comunidades bacterianas foi caracterizada pela abundância de três filos, os mais abundantes foram *Bacteroidota* e *Firmicutes* (Figura 6). Houve uma diminuição na proporção de *Bacteroidota* e aumento de *Firmicutes* na dieta com 100% de palma após 6 horas de exposição ao ar, mantendo-se abundante até as 24 horas.



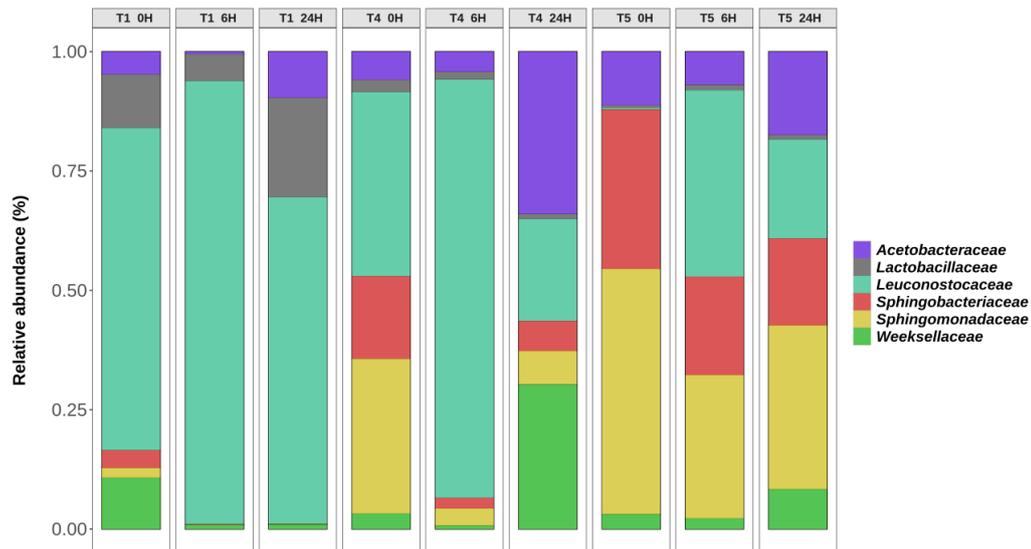
**Figura 6** - Abundância relativa dos principais filos bacterianos de níveis de palma e feno de capim-buffel em diferentes tempos de exposição ao ar. T1= 100% de palma; T4 = 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; T5= 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel.

Nas menores proporções de palma, observa-se uma maior predominância de *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, com exceção para dieta com 60% de palma após 6h de exposição aeróbica, que teve uma maior abundância de *Firmicutes*. Observa-se ainda nesse nível uma instabilidade na abundância dos filos após o tempo de exposição aeróbica, quando comparado os demais níveis.

Em 0h, a predominância era de *Bacteroidota* e *Proteobacterias*, após 6h observa-se uma maior abundância de *Firmicutes* e com 24h de *Proteobacterias*, essa mudança na comunidade bacteriana no alimento não é interessante que ocorra, pois pode comprometer a qualidade nutricional da ração e conseqüentemente o desempenho e saúde do animal.

As *Proteobacterias* são um filo formado por bactérias gram – negativas, e nele está incluso uma grande variedade de agentes patogênicos, tais como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio* e *Helicobacter* (TRABULSI et al., 2002). A *E. coli*, espécie que faz parte desse filo, pode ser dividida em dois grandes grupos: comensal e patogênica. As patogênicas, possuem mecanismos de virulência e patogenicidade específicos, sendo capazes de causar sérias infecções e doenças, em que essas infecções podem ser extra-intestinais e intestinais, sendo indesejável a presença desse microrganismo na dieta (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

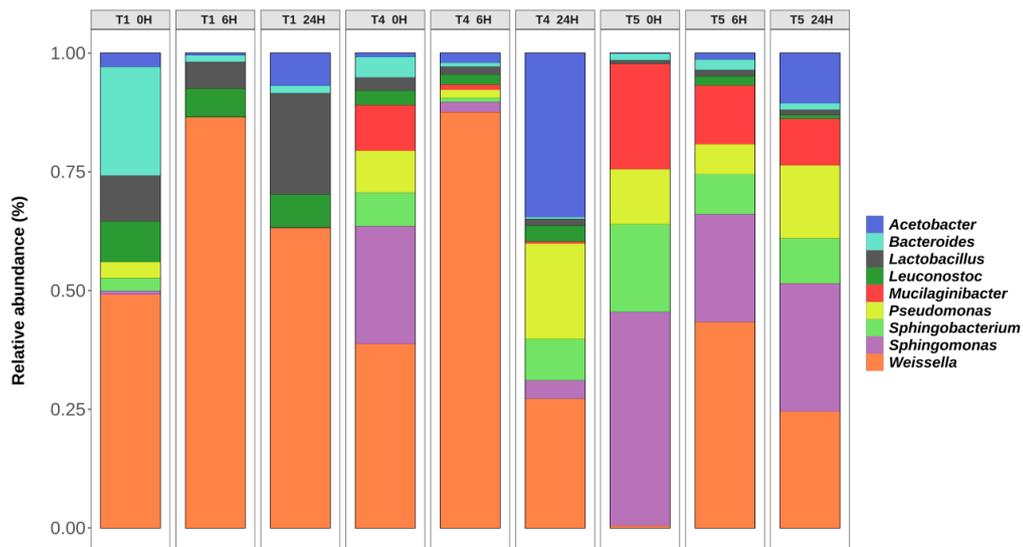
Quanto à nível de família, sete famílias foram identificadas, sendo *Leuconostocaceae*, *Sphingomonadaceae* e *Sphingobacteriaceae* as mais abundantes (Figura 7). No nível 100% de palma observa-se maiores proporções de *Leuconostocaceae* e *Lactobacillaceae*, principalmente após 6h, onde houve redução de *Acetobacteraceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Weeksellaceae* e *Sphingomonadaceae*. Quando se tem uma menor proporção de palma, observa-se maior abundância de *Sphingomonadaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Spirosomaceae* e *Leuconostocaceae*.



**Figura 7** - Abundância relativa das principais famílias bacterianas de níveis de feno de capim-buffel e palma em diferentes tempos de exposição ao ar. T1= 100% de palma; T4 = 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; T5= 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel.

Essa abundância de microrganismos ao longo do tempo em condição aeróbia, está relacionado a vários fatores que afetam o desenvolvimento microbiano, os microrganismos apresentam alta capacidade de adaptação, havendo grupos especializados para crescimento, de acordo com a disponibilidade de água, pH, composição química, potencial de oxirredução e temperatura. Além disso, eles são capazes de interagir uns com os outros de forma positiva ou antagônica, por meio da produção de metabólicos e moléculas sinalizadoras, influenciando assim na diversidade microbiológica dos volumosos (GRAM et al., 2002; REMENANT et al., 2015).

Os gêneros mais abundantes foram *Weissella*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium* e *Sphingomonas* (Figura 8). A dieta com 100% de palma após 6h, verifica-se uma maior qualidade microbiana, pois a maior predominância é de *Weissella*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Com 20% de palma observa-se a abundância aparente de *Pseudomonas*, *Sphingomonas* e *Sphingobacterium*.

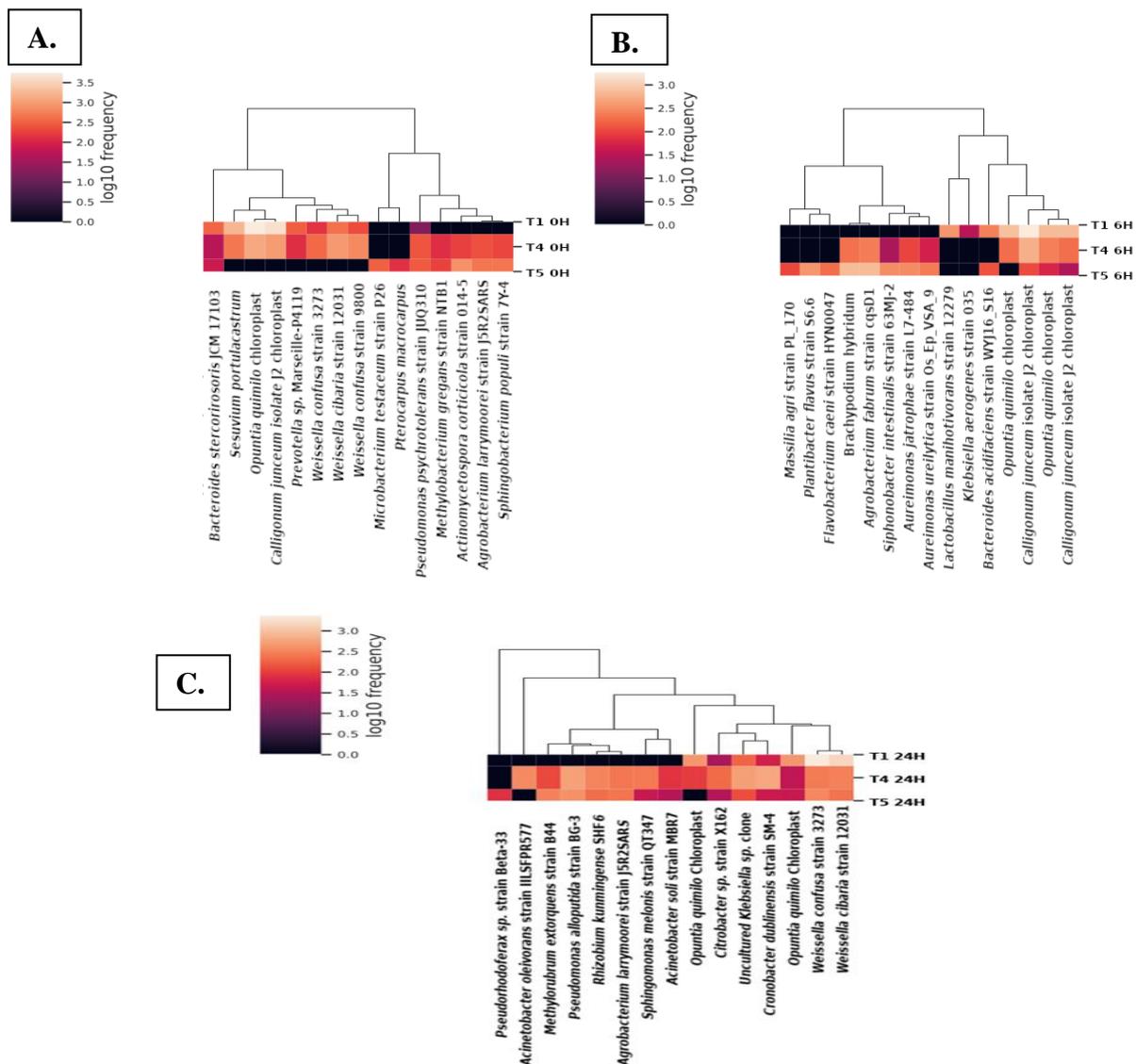


**Figura 8** - Abundância relativa dos principais gêneros bacterianos de níveis de feno de capim-buffel e palma em diferentes tempos de exposição ao ar. T1= 100% de palma; T4 = 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; T5= 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel.

A competição de diferentes microrganismos por nutrientes pode favorecer ou inibir algumas espécies ou grupos de microrganismos. As bactérias lácticas podem produzir ácido láctico, ou mesmo bacteriocinas, que inibem ou eliminam certos microrganismos patogênicos do alimento (HOFFMANN, 2001), o que possivelmente tenha ocorrido neste estudo, visto que com 6h após a exposição da palma ao ar houve predominância de *Weissella*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, microrganismos importantes para a conservação do alimento.

Além disso, a palma forrageira apresenta elevadas concentrações de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, glicose e galactose) (HABIBI et al., 2004), que é substrato das bactérias do ácido láctico (CARVALHO et al., 2014). Além disso, a palma apresenta substâncias tamponantes que podem inibir a ação de microrganismos deterioradores, por meio do tamponamento da massa (ISAAC, 2016; CARVALHO et al., 2018).

Segundo a classificação do método de aprendizagem de máquina (machine learning) do tipo Random Forest, houve presença de *Weissella confusa* e *Weissella cibaria* nos níveis com maiores proporções de palma. Em relação aos níveis com menores proporções de palma, houve maior abundância de *Pseudomonas psychrotolerans* (Figura 9). A bactéria *W. cibaria* é classificada entre as espécies com atividades antimicrobiana e antifúngica (NDAGANO et al., 2011).



**Figura 9-** Mapa de calor de comunidades bacterianas de níveis de feno de capim-buffel e palma em diferentes tempos de exposição ao ar. A= tempo 0h; B= tempo 6h; C= tempo 24h.

T1= 100% de palma; T4= 60% de palma e 40% de feno de capim-buffel; T5= 20% de palma e 80% de feno de capim-buffel.

Após 6h de exposição aeróbia, observa-se a presença de *Flavobacterium* apenas nos níveis com 20% de palma. Após a exposição dos volumosos ao ar, as bactérias ácido lácticas deixaram de prevalecer nos níveis com maiores proporções de feno de capim-buffel, isso pode ter ocorrido devido ao aumento do pH, o que favoreceu o crescimento de outros microrganismos. Como por exemplo, a *Flavobacterium* que é uma bactéria Gram-negativa, que se desenvolve em diversos ambientes. Algumas espécies desse gênero são patógenas oportunistas, podendo inclusive, infectar seres humanos (BERNADET e BOWMAN, 2006).

Com 24h, a dieta com 100% de palma é a mais estável, onde há presença considerável de *Weissella confusa* e *Weissella cibaria*, enquanto nos níveis contendo feno de capim-buffel percebe-se a presença de *Pseudomonas alloputida* e *Sphingomonas melonis*. Pereira et al., (2020) observou a diversidade microbiana da palma *in natura* e constatou que há uma maior predominância de bactérias do gênero *Weissella* na planta.

Algumas espécies de *Weissella* têm apresentado alto potencial tecnológico e probiótico, além disso, algumas cepas são capazes de prevenir e controlar patógenos bacterianos por meio da produção de compostos antimicrobianos que incluem ácido láctico, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas. São capazes de adapta-se a inúmeros ambientes distintos e desempenham um papel importante no processo de fermentação e conservação do alimento (FUSCO et al., 2015; FESSARD e REMIZE, 2017).

Por outro lado, as *Pseudomonas* são bacilos gram-negativos, que apresentam grande diversidade metabólica, o que as tornam capazes de colonizar uma ampla variedade de nichos. São relatadas como agentes deterioradores de alguns alimentos, enquanto outras espécies são consideradas como patogênica oportunista ou fitopatogênicas, associado infecção em humanos, não sendo desejável sua presença na ração (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009).

Esperava-se antes da realização dessa pesquisa que a inclusão de feno de capim-buffel controlasse o crescimento de bactérias gram-negativas, promovendo maior preservação da palma processada, simulando uma situação de cocho. No entanto, as alterações no pH do meio, bem como a presença de maior aerobiose, aumentou a diversidade microbiana e tornou o ambiente susceptível ao crescimento de bactérias gram-negativas, bem como aumento da população de *E. coli*.

Esse fato é muito relevante, pois em condições de fazenda a palma forrageira sempre é fornecida acompanhada de outra forragem, muitas vezes se utilizando fenos e alimentos concentrados secos. Com base nos resultados dessa pesquisa, pode se recomendar ainda uma

maior atenção na higiene de cocho, bem como na forma de processamento e fracionamento da alimentação em pelo menos duas vezes ao dia, para evitar o pool de microrganismos indesejáveis, ou mesmo patogênicos, o que contaminaria os animais e causaria distúrbios, comprometendo a saúde e o desempenho dos animais.

## 5. CONCLUSÕES

A palma forrageira em combinação com o feno de capim-buffel aumenta a proliferação de microrganismos com potencial patogênico na dieta, quando exposto ao ar em períodos superiores a 6 horas, influenciando negativamente na qualidade microbiológica e composição química dos volumosos. Essas mudanças são mais expressivas com maiores participações de feno na mistura.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABIDI, S.; BEN SALEM, H.; MARTÍN-GARCÍA, A. I.; MOLINA-ALCAIDE, E. Ruminal fermentation of spiny (*Opuntia amyclae*) and spineless (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) cactus cladodes and diets including cactus. **Animal Feed Science and Technology**, v.149, p. 333–340, 2009.
- ALAM, M.S.; FERROZ, F.; RAHMAN, H.; DAS, K.K.; NOOR, R. Microbiological contamination sources of freshly cultivated vegetables, **Nutrition & Food Science**, v. 45, n. 4, p. 646–658, 2015.
- ALEGBELEYE, O. O.; SINGLETON, I.; SANT'ANA, A. S. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. **Food Microbiology**, v. 73, p. 177–208, 2018.
- ALEXANDRE, M. **Biodegradação e Biorremediação**, 2ª Ed. Academic Press, San Diego, CA, 1999.
- ALLENDE, A.; CASTRO-IBÁÑEZ, I.; LINDQVIST, R.; GIL, M. I.; UYTENDAELE, M.; JACXSENS, L. Quantitative contamination assessment of *Escherichia coli* in baby spinach primary production in Spain: Effects of weather conditions and agricultural practices. **International Journal of Food Microbiology**, v.257, p.238–246, 2017.
- AMARAL, R. C. D.; PIRES, A.V.; SUSIN, I.; NUSSIO, L.G.; FERREIRA, E.M.; GENTIL, R.S. Cana-de-açúcar in natura ou ensilada com e sem aditivos químicos: estabilidade aeróbia dos volumosos e das rações. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 10, p. 1857-1864, 2009.
- AMORIM, G.L.; BATISTA, A.M.V.; CARVALHO, F.F.R. Substituição do milho por casca de soja: consumo, rendimento e características de carcaça e rendimento da buchada de caprinos. **Acta Scientiarum. Animal Science**, v.30, n.1, p.41-49, 2008.
- AMS (2000) **National Organic Program**. Soil fertility and crop nutrient management practice standard. GPO.
- ANDRADE, D.K.B.; FERREIRA, M.A.; VÉRAS, A.S.C.; WANDERLEY, W.L.; SILVA, L.E.; CARVALHO, F.F.R.; ALVES, K.S.; MELO, W.S. Digestibilidade e absorção aparentes

em vacas da raça Holandesa alimentadas com palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.5, p.2088- 2097, 2002.

ANDRADE, S.F.J.; BATISTA, Â.M.V.; CARVALHO, F.F.R.; LUCENA, R.B.; ANDRADE, R.P.X.; LIMA JÚNIOR, D.M. Fresh or dehydrated spineless cactus in diets for lambs. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 38, n. 2, p. 155-161, 2016.

ANDRADE-MONTEMAYOR, H.M.; CORDOVA-TORRES, A.V.; CASCA, T.G.; KAWAS, J.R. Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and Nopal (*Opuntia* spp.). **Small Ruminant Research**, v.98, p.83-92, 2011.

ANGELES-NÚÑEZ, J.G.; ANAYA-LÓPEZ, J.L.; ARÉVALO-GALARZA, M.L.; LEYVA-RUELAS, G.; ROSALES, S.A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, T.O. Análisis de la calidad sanitaria de nopal verdura en Otumba, Estado de México, **Revista mexicana de ciencias agrícolas**, v. 5, n. 1, p. 129-141, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. 2016. **Official methods of analysis**. 19th.ed., Gaithersburg, MD, USA, p.2610.

ASLANI, M. R.; MOVASSAGHI, A. R.; NAJARNEZHAD, V.; PIROUZ, H. J.; BAMI, M. H. Acute oxalate intoxication associated to ingestion of eshnan (*Seidlitzia rosmarinus*) in sheep, **Tropical animal health and production**, v. 43, n. 6, p. 1065-1068, 2011.

ÁVILA, C.L.S.; PINTO, J.C.; FIGUEIREDO, H.C.P.; MORAIS, A.R.; PEREIRA, O.G.; SCHWAN, R.F. Estabilidade aeróbia de silagens de capim-mombaça tratadas com *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 5, p. 779-787, 2009.

ÁVILA-QUEZADA, G.; SÁNCHEZ, E.; GARDEA-BÉJAR, A.A.; ACEDO-FÉLIX, E.E. *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*: sobrevivência e crescimento em tecido vegetal, **Journal of Crop and Horticultural Science**, v.38, n. 2, p. 47-55, 2010.

BADOSA, E.; TRIAS, R.; PARE' S.D.; PLA, M.; MONTESINOS, E. Microbiological quality of fresh fruit and vegetable products in Catalonia (Spain) using normalized plate-counting methods and real time polymerase chain reaction (QPCR). **J. Sci. Food Agric.**, v.88, p.605-611, 2008.

BARROS, L.J.A.; FERREIRA, M.A.; OLIVEIRA, J.C.V.; SANTOS, D.C.; CHAGAS, J.C.C.; ALVES, A.M.S.V.; SILVA, A.E.M.; FREITAS, W.R. Replacement of Tifton hay by spineless cactus in Girolando post-weaned heifers' diets. **Tropical animal health and production**, v. 50, n. 1, p. 149-154, 2017.

BATISTA, Â. M.; RIBEIRO NETO, A. C.; LUCENA, R. B.; SANTOS, D. C.; DUBEUX JR, J.; MUSTAFA, A, F, Chemical composition and ruminal degradability of spineless cactus grown in Northeastern Brazil, **Rangeland Ecology & Management**, v. 62, n. 3, p. 297-301, 2009.

SALEM, H.B.; SMITH, T. Feeding strategies to increase small ruminant production in dry environments. **Small Ruminant Research**, v. 77, p. 174–194, 2008.

BERGER, C.N.; SODHA, S.V.; SHAW, R.K. et al., Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens, **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 2385–2397, 2010.

- BERNARDET, J.; BOWMAN, J. The Genus *Flavobacterium*. **Prokaryotes**, v.7, p. 481-531, 2006.
- BILEK, S.E.; TURANTAS, F. Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 155–162, 2013.
- BISPO, S.V.; FERREIRA, M.A.; VÉRAS, A.S.C.; BATISTA, A.M.V.; PESSOA, R.A.S.; BLEUEL, M.P. Palma forrageira em substituição ao feno de capim-elefante. Efeito sobre consumo, digestibilidade e características de fermentação ruminal em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1902-1909, 2007.
- BOLSEN, K.K.; LIN, C.; BRENT, C.R.; FEYERHERM, A.M.; URBAN, J.E.; AIMUTIS, W.R. Effects of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfafa and corn silages. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3066-3083, 1992.
- BOLYEN, E.; RIDEOUT, J.R.; DILLON, M.R. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 852–857, 2019.
- BORREANI, G.; TABACCO, E.; SCHMIDT, R. J.; HOLMES, B. J.; MUCK, R. E. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 3952–3979, 2018.
- CARDOSO, D. B., CARVALHO, F. F. R., MEDEIROS, G. R., GUIM, A., CABRAL, A. M. D., VÉRAS, R. M. L., NASCIMENTO, A. G. O. Levels of inclusion of spineless cactus (*Nopalea cochenillifera* Salm Dyck) in the diet of lambs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 247, p. 23-31, 2019.
- CARVALHO, B.F., ÁVILA, C.L.S.; PINTO, J.C., NERI, J., SCHWAN, R.F. Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.195, p. 1-13, 2014.
- CARVALHO, C.B.M.; EDVAN, R.L.; CARVALHO, M.L.A.M.; REIS, A.L.A.; NASCIMENTO, R.R. Uso de cactáceas na alimentação animal e seu armazenamento após colheita. **Archivos de Zootecnia**, v.67, n.259, p. 440-446, 2018.
- CARVALHO, C.B.M.; EDVAN, R.L.; CARVALHO, M.L.A.M.; REIS, A.L.A.; Nascimento, R.R. Uso de cactáceas na alimentação animal e seu armazenamento após colheita. **Archivos de Zootecnia**, v. 67, n. 259, p.440-446, 2018.
- CASTRO-ROSAS, J.; CERNA-CORTES, J.F.; ENDEZ-REYES, E.M.; LOPEZ-HERNANDEZ, D.; GOMEZ-ALDAPA, C.A.; ESTRADA- GARCIA, T. Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 176–180, 2012.
- CHAUDHRY, V.; RUNGE, P.; SENGUPTA, P.; DOEHLEMANN, G.; PARKER, J.E.; KEMEN, E. Shaping the leaf microbiota: plant–microbe–microbe interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, p.36–56, 2020.
- CORBO, M.R.; CAMPANIELLO, D.; D’AMATO, D.; BEVILACQUA, A.; SINIGAGLIA, M. Behavior of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-sliced cactus-pear fruit. **J. Food Saf.**, v.25, p. 157-172, 2005.

CORDOVA-TORRES, A.V.; COSTA, R.G.; MEDEIROS, A.N.; ARAÚJO FILHO, J.T.; RAMOS, A.O.; ALVES, N.L. Performance of sheep fed forage cactus with total water restriction. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 18, n. 2, p. 369-377, 2017.

CORSATO, C. E.; SCARPARE FILHO, J. A.; SALES, E. C. J. Teores de carboidratos em órgãos lenhosos do caqui em clima tropical. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n.2, p. 414–418, 2008.

COSTA, R.C.; BELTRÃO FILHO, E.M.; QUEIROGA, R.C.R.E.; MADRUGA, M.S.; MEDEIROS, A.N.; OLIVEIRA, C.J.B. Chemical composition of milk from goats fed with cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Miller) in substitution to corn meal. **Small Ruminant Research**, v.94, p.214-217, 2010.

COSTA, R.G.; TREVIÑO, I.H.; MEDEIROS, G.R.; MEDEIROS, A.N.; PINTO, T.F.; OLIVEIRA, R.L. Effects of replacing corn with cactus pear (*Opuntia ficus indica* Mill) on the performance of Santa Inês lambs. **Small Ruminant Research**, v.102, p.13-17, 2012.

CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2010.

DANTHINE, S.; BLECKER, C. Interactions of lipases with milk fat globule membrane monolayers using a Langmuir film balance. **International Dairy Journal**, v. 35, p. 81-87, 2014.

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Métodos para análise de alimentos. **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2012. 214p.

DINU, L.D.; BACH, S. Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8295–8302, 2011.

DRIEHUIS, F.; WIKSELAAR, P. G. V. 1996. **The occurrence of alcoholic fermentation in high dry matter grass silages**, p. 254–255. In D. I. H. Jones, R. Jones, R. Dewhurst, R. J. Merry, and P. M. Haigh (ed.), Proceedings of the 11th International Silage Conference. University of Wales, Aberystwyth, United Kingdom.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Biochemistry**, v.28, n.3, p. 350–356, 1956.

EDGAR, R.C.; HAAS, B.J.; CLEMENTE, J.C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME Improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v.27, p. 2194–2200, 2011.

ERICKSON, M. C.; LIAO, J. Y.; WEBB, C. C.; HABTESELASSIE, M. Y.; CANNON, J. L. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* deposited on gloves in a liquid state and subjected to drying conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.266, p.200–206, 2018.

- FESSARD, A.; REMIZE, F. Why are *Weissella* spp. not used as commercial starter cultures for food fermentation? **Fermentation**, v. 3, p. 1–31, 2017.
- FRANK, A.C.; SALDIERNA-GUZMÁN, J.P.; SHAY, J.E. Transmission of bacterial endophytes. **Microorganisms**, v.5, p.70, 2017.
- FRANK, C. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany, 7e **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 19, p. 1771–1780, 2011.
- FRANZ, E.; VAN BRUGGEN, A.H. Ecology of *E. coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in the primary vegetable production chain, **Critical Review Microbiology**, v.34, p. 143-161, 2008.
- FRIAS, D.F.R.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Microbiota Intestinal de Ovinos Hígidos e com Diarreia, **Ars Veterinaria**, v. 29, n. 4, 2013.
- FROTA, M.N.L.; SOUZA CARNEIRO, M.S.; CARVALHO, G.M.C.; ARAÚJO NETO, R.B. Palma Forrageira na Alimentação Animal. **Embrapa Meio-Norte-Documentos (INFOTECA-E)**, 2015.
- FUSCO, V., QUERO, G.M., CHO, G.S., KABISCH, J., MESKE, D., NEVE, H., BOCKELMANN, W.; FRANZ, C. M. The genus *Weissella*: Taxonomy, ecology and biotechnological potential. **Front. Microbiol.** v. 6, p. 1–22, 2015.
- GAGLIARDI, J.V.; KARNS, J.S. Persistence of *Escherichia coli* O157: H7 in soil and on plant roots. **Environ. Microbiol.**, v.4, n.2, p.89-96, 2002.
- GAVA, A.J.; SILVA, C.A.B.; FRIAS, J.R.G. **Tecnologia de Alimentos – Princípios e Aplicações**. São Paulo (SP): Nobel, 2009. 512p.
- GILBERT, R.A.; TOMKINS, N.; PADMANABHA, J.; GOUGH, J.M.; KRAUSE, D.O.; MCSWEENEY, C.S. Effect of finishing diets on *Escherichia coli* populations and prevalence of enterohaemorrhagic *E. coli* virulence genes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.885–894, 2005.
- GOBETTI, S. T. C.; NEUMANN, M.; OLIBONI, R.; OLIVEIRA, M. R. Utilização de silagem de grão úmido na dieta de animais ruminantes. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, n. 1, p. 225-239, 2013
- GRAM, L., RAVN, L., RASCH, M., BRUHN, J.B., CHRISTENSEN, A.B., GIVSKOV, M. Food Spoilage – Interactions between food spoilage bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, v.78, p.79-97, 2002.
- GUASTALLI, E.A.L.; GAMA, N.M.S.Q.; BUIM, M.R.; OLIVEIRA, R.A.; FERREIRA, A.J.P.; LEITE, D.S. Índice de patogenicidade, produção de hemolisina e sorogrupo de amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves de postura comercial. **Arquivo do instituto Biológico**, v.77, n.1, p.153-157, 2010.
- GUPTA, R.N.; GUPTA, P.R. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 64, n.6, p. 763-781, 2004.
- GUTIERREZ-RODRIGUEZ, E.; ADHIKARI, A. Preharvest farming practices impacting fresh produce safety. **Microbiology Spectrum**, v.6, n.2, 2018.

- HABIBI, Y.; HEYRAUD, A.; MAHROUZ, M.; VIGNON, M. Características estruturais de polissacarídeos pécnicos da pele de frutos de pêra espinhosa *Opuntia ficusindica*. **Carbohydrate Research**, v.339, n.6, p.1119–1127, 2004.
- HAMILTON, R. J. Oxidative rancidity as a source of off-flavours. **Taints And Off-flavours In Foods**, Elsevier, p. 140-161, 2003.
- HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. 2015. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.79, p. 293–320, 2015.
- HERNANDEZ, A.M.; LANDA, P.; MORA-AG; ESLAVA, A.; CALL, J.E.; PORTO-FETT, A.C.; LUCHANSKY, J.B. Characterization of *Salmonella* spp. from nopal leaves and associated soil and water samples in Morelos, Mexico. **Int. Assoc. Food Protect**, 2009.
- HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, v. 9, n. 1, p.23-30, 2001.
- HUI, Y. 2Handbook of Food Science Techhnology, and Engineering. **Taylor & Francis. Boca Raton**. v. 8, n. 1, p. 8-17, 2006.
- HUTCHISON, M.L.; WALTERS, L.D.; MOORE, A.; CROOKES, K.M.; AVERY, S.M. Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria presente in livestock wastes applied to agricultural soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, n.9, p.5111-5118, 2004.
- INGHAM, S.C.; LOSINSKI, J.A.; ANDREWS, M.P.; BREUER, J.E.; BREUER, J.R.; WOOD, T.M.; WRIGHT, T.H. *Escherichia coli* contamination of vegetables grown in soils fertilized with noncomposted bovine manure: garden-scale studies. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, n.11, p. 6420-6427, 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO E GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estados**. 2012 Disponível em: [www.ibge.gov.br/estadosat](http://www.ibge.gov.br/estadosat).
- ISAAC, A. A. Overview of Cactus (*Opuntia Ficus-Indica* (L): A Myriad of Alternatives. **Studies on Ethno-Medicine**, v. 10, p.195-205, 2016.
- ISAAC, A.A. Overview of Cactus (*Opuntia Ficus-Indica* (L): A Myriad of Alternatives. **Stud Ethno-Med.**, v.10, p.195-205, 2016.
- ISLAM, M.; MORGAN, J.; DOYLE, M.P.; PHATAK, S.C.; MILLNER, P.; JIANG, X. Fate of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.4, p.2497–2502, 2004.
- JULIEN-JAVAUUX, F.; GÉRARD, C.; CAMPAGNOLI, M.; ZUBER, S. Strategies for the safety management of fresh produce from farm to fork. **Current Opinion in Food Science**, 2019.
- KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-38, 2004.
- KATOH, K.; MISAWA, K.; KUMA, K.; MIYATA, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research** v. 30, p. 3059-3066, 2002.

KOC, F.; AKSOY, S.O.; OKUR, A.A.; CELIKYURT, G.; KORUCU, D.; OZDUVEN, M.L. Effect of prefermented juice, lactobacillus plantarum and lactobacillus buchneri on the fermentation characteristics and aerobic stability of high dry matter alfalfa bale silage. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 27, n. 6, p. 1766-1773, 2017.

KUNG, J.R.L. Aerobic stability of silage, In: Proc. California **Alfalfa and Forage Symposium and Crop/cereal Conference**, p. 82–102, 2010.

LAFORÉST-LAPOINTE, I.; WHITAKER, B.K. Decrypting the phyllosphere microbiota: progress and challenges. **American Journal of Botany**, v. 106, p. 171–173, 2019.

LARA, A.R. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v.10, n. 2, p 209 – 223, 2011.

LAU, M. M.; INGHAM, S.C. Survival of faecal indicator bacteria in bovine manure incorporated in soil. **Lett. Appl. Microbiol.** v.33, p.1–6, 2001.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Paranaset, 1997. 134 p.

LI, D.; NI, K.; PANG, H.; WANG, Y.; CAI, Y.; JIN, Q. Identification and Antimicrobial Activity Detection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Corn Stover Silage. **Journal of Animal Science**, v. 28, p. 620-63, 2015.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgar Blucher, 1975. v. 1, 286 p.

LIN, C.; BOLSEN, K.K.; BRENT, B.E.; HART, R.A.; DICKERSON, J.T. Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2484-2493, 1992.

LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 1875–1883, 2003.

LIU, C.; HOFSTRA, N.; FRANZ, E. Impacts of climate change on the microbial safety of pre-harvest leafy green vegetables as indicated by *Escherichia coli* O157 and *Salmonella spp*, **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 2-3, p. 119–128, 2013.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. Unifrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied Environment Microbiology**, v.71, p. 8228–8235, 2005.

LUNA-GUEVARA, J.J.; ARENAS-HERNANDEZ, M.M.P.; MARTÍNEZ DE LA PEÑA, C.; LUNA-GUEVARA, M.L. The Role of Pathogenic *E. coli* in Fresh Vegetables: Behavior, Contamination Factors, and Preventive Measures, **International Journal of Microbiology**, p. 1-10, 2019.

LYNCH, M.F.; TAUXE, R.V.; HEDBERG, C.W. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities, **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 3, p. 307–315, 2009.

MACÊDO, A.J.S.; SANTOS, E.M.; ARAÚJO, G.G.L.; EDVAN, R.L.; OLIVEIRA, J. S.; PERAZZO, A.F.; SÁ, W.C.C.S.; PEREIRA, D.M. Silages in the form of diet based on spineless cactus and buffelgrass. **African Journal of Range & Forage Science**, p. 1–9, 2018.

- MACÊDO, A. J. S.; SANTOS, E. M.; OLIVEIRA, J. S.; PERAZZO, A. F. Microbiologia de silagens: Revisão de Literatura. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 18, n. 9, p. 1-11, 2017.
- MACHADO, F.S.; RODRIGUEZ, N.M.; RODRIGUES, J.A.S.; RIBAS, M.N.; TEIXEIRA, A.M.; RIBEIRO JÚNIOR, G.O.; VELASCO, F.O.; GONSALVES, F.C.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; PEREIRA, L.G.R. Qualidade da silagem de híbridos de sorgo em diferentes estádios de maturação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 3, p. 711-720, 2012
- MAHANNA, B. Proper management assures high-quality silage, grains. **Feedstuffs**, v. 66, n. 10, p. 12-56, 1994.
- MARQUES, O. F. C.; GOMES, L.S.P.; MOURTHÉ, M.H.F.; BRAZ, T.G.S.; PIRES NETO, O.S. Palma forrageira: cultivo e utilização na alimentação de bovinos. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p. 75-93, 2017.
- MATTHEWS, K. R. “Leafy vegetables,” em *The Produce Contamination Problem. Causes and Solutions*, Matthews, K.R.; Sapers, G.M. e Gerba, C.P. Eds., **Elsevier**, 2014.
- McDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERON, S. **The biochemistry of silage**. Manchester: John Wiley & Sons, p.81-151, 1991.
- MCITEKA, H. Fermentation Characteristics and Nutritional Value of *Opuntia ficus-indica* var. *Fusicaulis* Cladode Silage. University of the Free State, Blomfontein, **South Africa**, p.113, 2008.
- MCMURDIE, P.J.; HOLMES, S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS One**, v.8, p1-11, 2013.
- MELO, A.A.S.; FERREIRA, M.A.; VÉRAS, A.S.C.; LIRA, M.A.; LIMA, L.E.; PESSOA, R.A.S.; BISPO, S.V.; CABRAL, A.M.D.; AZEVEDO, M. Desempenho leiteiro de vacas alimentadas com caroço de algodão em dieta à base de palma forrageira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.7, p.1165-1171, 2006.
- MELOTTO, M; UNDERWOOD, C.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; ELE, S.Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, v. 126, p. 969-980, 2006.
- MISRA, A.K.; MISHRA, A.S.; TRIPATHI, M.K. et al. Ingestão, digestão e síntese de proteínas microbianas em ovelhas em feno suplementadas com cacto de pera espinhosa [*Opuntia ficus - indica* (L.) Mill.] com ou sem farinha de amendoim. **Rumin pequeno. Res.**, v.63, p. 125–134, 2006.
- MORAES, N.A.P. **Valor nutricional de fenos de capim-buffel e capim elefante e diferentes idades de corte**. Mestrado (Dissertação) – programa de pós graduação em zootecnia – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, p. 48, 2013.
- MOREIRA-MACHADO, B.; RICHARDS, K.; BRENNAN, F.; ABRAM, F.; BURGESS, C.M. Microbial Contamination of Fresh Produce: What, Where, and How?, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.18, n.18, p. 1727-1750, 2019.
- MORRIS, C.E.; MONIER, J. The ecological significance of biofilm formation by plant associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, n.1, p.429–453, 2003.
- MUCK, R.E. Factors influencing silage quality and their implications for management. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.11, p.2992-3002, 1988.

- MUCK, R.E. Microbiologia silagem e seu controle por meio de aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 183-191, 2010.
- NASCIMENTO, T.V.C.; CARVALHO, G.G.P.; FREITAS JÚNIOR, J.E.1.; SOUZA, W.F. Volumosos tratados com aditivos químicos: valor nutritivo e desempenho de Ruminantes. **Archivos de Zootecnia**, v. 65, n. 252, p. 593-604, 2016.
- NATVIG, E.E.; INGHAM, S.C.; INGHAM, B.H.; COOPERBAND, L.R.; ROPER, T.R. Salmonella enterica Serovar Typhimurium and *Escherichia coli* Contamination of Root and Leaf Vegetables Grown in Soils with Incorporated Bovine Manure, **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2737–2744, 2002.
- NDAGANO, D., LAMOUREUX, T., DORTU, C., VANDERMOTEN, S., THONART, P. Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the Weissella genus isolated from food. **J. Food Sci.** v.76, p. 305–311, 2011.
- NEVES, A.L.A.; PEREIRA, L.G.R.; NEVES, A.L.A.; VOLTOLINI, T.V.; ARAUJO, G.G.L.; MORAES, S.A.; ARAGÃO, A.S.L.; COSTA, C.T.F. Plantio e uso da Palma forrageira na alimentação de bovinos no semiárido brasileiro. **Embrapa Gado de Leite-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, p. 7, 2010.
- NOBILE, C.J.; MITCHELL, A.P. Microbial biofilms: e pluribus unum. **Current Biology**, v.17, n.10, p.349–353, 2007.
- NOVINSKI, C.O. **Composição de micotoxinas e bromatologia de silagens de milho em silos de grande porte utilizando imagens em infravermelho**. Dissertação (Mestrado) - Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p. 85, 2013.
- OLDONI, M.L., ROSA, A.D., TEIXEIRA, M.L. Análises micotoxicológicas em rações comercializadas no oeste de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, n.4, 878 p.373-379, 2012.
- OLIVEIRA, F.T.; SOUTO, J.S.; SILVA, R.P.; ANDRADE FILHO, F.C.; PEREIRA JÚNIOR, E.B.P. Palma forrageira: adaptação e importância para os ecossistemas áridos e semiáridos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, n. 4, p. 27-37, 2010.
- ORDEN, J.A.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; MARTINEZ-PULGARIN, S.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; BLANCO, J.; FUENTE, L. R. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. **Int. Microbiol.**, v.10, p. 47-55, 2007.
- PAHLOW, G. Verbesserung der aeroben Stabilität von Silage durch Impfpräparate. **Das wirtschaftseigene Futter**, v. 28, n. 2, p. 107-122, 1986.
- PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H (Eds). **Silage Science and Technology**. Madison: American Society of Agronomy; Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, p. 31-94, 2003.
- PAULINO, R.S.; OLIVEIRA, J.S.; SANTOS, E.M.; PEREIRA, G.A.; RAMOS, J.P.F.; CÉSAR NETO, J.M.; CRUZ, G.F.L.; LEITE, G.M.; SATAKE, F.; SILVA, A.L.; OLIVEIRA, C.J.B. Spineless cactus use management on microbiological quality, performance, and

nutritional disorders in sheep. **Tropical Animal Health and Production**, v.53, n. 168 p. 1-14, 2021.

PEDROSO, A. F.; NUSSIO, L.G.; LOURES, D.R.S.; PAZIANI, S.F.; IGARASI, M.S.; COELHO, R.M.; HORII, J; RODRIGUES, A.A. Efeito do tratamento com aditivos químicos e inoculantes bacterianos nas perdas e na qualidade de silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 558-564, 2007.

PELL, A.N. Manure and microbes: public and animal health problem? **J. Dairy Sci.**, v.80, p.2673–2681, 1997.

PEREIRA, G.A.; SANTOS, E.M.; ARAÚJO, G.G.L.; OLIVEIRA, J.S.; PINHO, R.M.A.; ZANINE, A.M.; SOUZA, A.F.N.; MACEDO, A.J.S.; NETO, J.M.C.; NASCIMENTO, T.V.C. Isolation and identification of lactic acid bacteria in fresh plants and in silage from *Opuntia* and their effects on the fermentation and aerobic stability of silage. **The Journal of Agricultural Science**, v.10, p.684–692, 2020.

PEREIRA, G.A. **Prospecção e uso de culturas lácticas como inoculante na ensilagem de palma forrageira**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba- Centro de Ciências agrárias, Areia, p. 94, 2019.

PEREIRA, O.G.; SILVA, T.C.; LEANDRO, E.S.; RIBEIRO, K.G. Práticas na ensilagem versus qualidade higiênica da silagem. p. 157-210. In: Anais do V Simpósio: Produção e utilização de forragens conservadas. Maringá, Brasil, 2014.

PETERA, B.; DELATTRE, C.; PIERRE, G.; WADOUACHI, A.; ELBOUTACHFAITI, R.; ENGEL, E.; POUGHON, L.; MICHAUD, P.; FENORADOSOA, T.A. Characterization of arabinogalactan-rich mucilage from *Cereus triangularis* cladodes. **Carbohydr Polym**, v.127, p. 372-380, 2015.

PINHO, R. M. A.; SANTOS, E.; BEZERRA, H. F. C.; OLIVEIRA, J. S.; CARVALHO, G. G. P.; CAMPOS, F. S.; PEREIRA, G. A.; CORREIA, R. M. Avaliação de fenos de capim-buffel colhido em diferentes alturas de corte. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 14, nº 3, p. 437-447, 2013.

PINHO, R.M.A. **Adição de fibra em detergente neutro em dietas à base de palma forrageira para caprinos**. Tese (Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia), Universidade Federal da Paraíba, p. 104, 2016.

PINHO, R. M. A. et al. Does the level of forage neutral detergent fiber affect the ruminal fermentation, digestibility and feeding behavior of goats fed cactus pear? **Animal Science Journal**, v. 89, n. 10, p.1424-1431, 23 jul. 2018.

PITT, R.E. Silage and hay preservation. Ithaca: **Northeast Regional Agricultural Engineering Service**, 1990. 53p.

PLAYNE, M.J.; McDONALD, P. The buffering constituents of herbage and of silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.17, n. 2, p.264-268, 1966.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, P. J.; DONALD, A. K. **Microbiology**. 5<sup>a</sup> ed. The MacGraw-Hill Companies, 2002.

PRICE, M.N.; DEHAL, P.S.; ARKIN, A.P. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PLoS One**, v. 5: e 9490, 2010.

- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, 590-596, 2013.
- RAHMAN, M. M.; ABDULLAH, R. B.; WAN KHADIJAH, W. E. A review of oxalate poisoning in domestic animals: tolerance and performance aspects. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. 4, p. 605-614, 2013.
- REMENANT, B.; JAFFRES, E.; DOUSSET, X.; PILET, M.F.; ZAGOREC, M. Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. **Food Microbiology**, n. 45, p. 45-53, 2015.
- ROBAZZA, W.S.; TELEKEN, J.T.; GOMES, G.A. Modelagem Matemática do Crescimento de Microrganismos em Alimentos. **Tend. Mat. Apl. Comput.**, v. 11, n. 1, p.101-110, 2010.
- ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. The detergent system of analysis and its application to human foods. In: JAMES, W.P.T.; THEANDER, O. (Eds.). **The analysis of dietary fiber in food**. New York: Marcel Dekker, 1981. p123-158.
- ROGNES, T.; FLOURI, T.; NICHOLS, B.; QUINCE, C.; MAHÉ, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4:e2584, 2016.
- ROTZ, C.A.; MUCK, R.E. **Changes in forage quality during harvest and storage**. In: FAHEY Jr., G.C.; MOSER, L.E.; MERTENS, D.R. et al. (Eds.) National conference on forage quality, evaluation, and utilization Madison: University of Nebraska, p.828-868, 1994.
- SÁENZ, C.; SEPÚLVEDA, E.; MATSUHIRO, B. *Opuntia* spp mucilage's: A functional component with industrial perspectives. **J. Arid Environ.**, v.57, p.275-290, 2004.
- SANTOS, F.N.S; SANTOS, E.M.; OLIVEIRA, J.S.; MEDEIROS, G.R.; ZANINE, A.M.; ARAÚJO, G.G.L.; PERAZZO, A.F.; LEMOS, M.L.P.; PEREIRA, D.M.; CRUZ, G.F.L.; PAULINO, R.S.; OLIVEIRA, C.J.B. Fermentation profile, microbial populations, taxonomic diversity and aerobic stability of total mixed ration silages based on Cactus and Gliricidia, **The Journal of Agricultural Science**, p. 1-10, 2020.
- SATO, J. P. H.; TAKEUTI, K. L.; ANDRADE, M. R.; KOERICH, P. K.; TAGLIARI, V.; BERNARDI, M. L.; BARCELLOS, D. E. Perfis de virulência de *Escherichia coli* enterotoxigênica isoladas de leitões desmamados com diarreia do Sul do Brasil e classificação das amostras de acordo com a consistência fecal, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, p. 253–257, 2016.
- SATTER, L.D.; MUCK, R.E.; WOODFORD, J.A. et al. **Inoculant research: what has it shown us**. In: FORAGE PRODUCTION AND USE SYMPOSIUM, 12., 1988, Wisconsin Dells. *Proceedings...* Wisconsin Dells: Wisconsin Forage Council, 1988. p.108-119.
- SCHWERT, R. **Avaliação do uso de fumaça líquida em língua tipo calabresa cozida e defumada**. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, p. 125, 2014.
- SELA, S. "Microbial quality and safety of fresh produce," in Postharvest Handling: A Systems Approach, **Academic Press**, 2009.

- SEO, K.H.; FRANK, J.F. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy, **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 1, p. 3–9, 1999.
- SILVA, G.M.; SILVA, F.F.; SCHIO, A.R.; MENESES, M.A.; BALISA, D.L.; SOUZA, D.D.; SILVA, L.G.; SOARES, M.S. Fatores anti-qualitativos em silagens: Conservação, fermentação, microrganismos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 12, n.06, 2015.
- SILVA, V.L.; COSTA, L.S; BASTOS, M.P.V. et al. Caracterização físico-química e bioquímica do farelo de palma forrageira redonda (*Opuntia ficus*) utilizado na alimentação de ruminantes. **Medicina Veterinária e Zootecnia - PUBVET**, v.5, n.2, 2011.
- SOLOMON, E.B.; YARON, S.; MATTHEWS, K.R. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.1, p. 397–400, 2002.
- SOUZA, C.M.S.; MEDEIROS, A.N.; FURTADO, D.A. et al. Desempenho de ovelhas nativas em confinamento recebendo palma-forrageira na dieta na região do Semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.5, p.1146-1156, 2010.
- STOŠKUS, R.; JATKAUSKAS, J.; VROTNIAKIENĖ, V.; JUOZAITIENĖ, V. The effect of the bacterial inoculant on the ensiled lucerne fermentation characteristics, microbial population and the aerobic stability in the mini-silos. **Veterinarija ir zootechnika**, v. 76, n. 98, 2018.
- TADELE, Y. Important anti-nutritional substances and inherent toxicants of feeds. **Food Science and Quality Management**, v. 36, p. 40-47, 2015.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6. ed. **Porto Alegre: Artmed**, 858 p, 2017.
- TANG, P.L.; PUI, C.F.; WONG, W.C.; NOORLIS, A.; SON, R. Biofilm forming ability and time course study of growth of *Salmonella Typhi* on fresh produce surfaces. **International Food Research Journal**, v.19, n.1, p.71-76, 2012.
- TEGEGNE, F.; PETERS, K. J.; KIJORA, C. Cactus pear (*Opuntia ficus-indica*): a strategic crop in combating food and feed insecurity and desertification in Tigray, northern Ethiopia. **Proceedings of the Society of Nutrition Physiology**, v.15, p.60, 2005.
- TEMBHURKAR, V.R.; KULKARNI, M.B.; PESHWE, S.A. Optimization of Lipase Production by *Pseudomonas* spp. in submerged batch process in shake flask culture. **Sci. Res. Repot.**, v. 2, n. 1, p. 46-50, 2012.
- TIBOLA, C. S.; LORINI, I.; MIRANDA, M. Z. **Boas práticas e sistema APPCC na pós-colheita de trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2009. 949 20 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 105).
- TOLEDO FILHO, S.G. **Avaliação da dinâmica da população de microrganismos em plantas de cana-de-açúcar IAC (93-3046)**, Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, p. 95, 2010.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; MARTINEZ, M. B; CAMPOS, L. C.; GOMPERTZ, O. F.; RÁCZ, M. L. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

- VALSECH, O. A. **Microbiologia dos Alimentos**. Araras: Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, 2006.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.
- VANBAALE, M.J.; SARGEANT, J.M.; GNAD, D.P.; DEBEY, B.M.; LECHTENBERG, K.F.; NAGARAJA, T.G. Effect of Forage or Grain Diets with or without Monensin on Ruminal Persistence and Fecal *Escherichia coli* O157:H7 in Cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.9, p.5336-5342, 2004.
- VIMALKUMAR, S.P.; PUROHIT, H.J.; RAJE, D.V.; PARMAR, N.; PATEL, A.B.; JONES, O.A.H.J.; JOSHI, C.G. The effect of a high-roughage diet on the metabolism of aromatic compounds by rumen microbes: a metagenomic study using Mehsani buffalo (*Bubalus bubalis*). **Applied Microbiol Biotechnology**, v.100, n.3, p.1319-1331, 2016.
- WAAL, H.O.; ZEEMAN, D.C.; COMBRINCK, W.J. Fezes úmidas produzidas por ovelhas alimentadas com cladódios de pêra-cacto sem espinafre em dietas equilibradas. **Revista Sul-Africana de Ciência Animal**, v.36, v.5, p.10-13, 2006.
- 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. 3, p. 53-68, 1996.
- WINFIELD, M.D.; GROISMAN, E.A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 3687–3694, 2003.
- XIN, X.F.; KVITKO, B.; HE, S.Y. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v.16, p.316–328, 2018.
- YAHIA, E.M.; ORNELAS, J.J.; ANAYA, A. Extraction and chemical characteristics of mucilage from Mesquite, *Aloe Vera*, Maguey and Prickly pear cactus cladodes (Nopal) and evaluation of its prebiotic effect on the growth of 2 probiotic bacteria. **Acta Horticulturae**, v.841, p.625-628, 2009.
- YANG, Y.; LUO, Y.; MILLNER, P.; TURNER, E.; FENG, H. Assessment of *Escherichia coli* O157:H7 transference from soil to iceberg lettuce via a contaminated field coring harvesting knife. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, n.3, 345–350, 2012.
- YOU, Y.; RANKIN, S.C.; ACETO, H.W.; BENSON, C.E.; TOTH, J.D.; DOU, Z. Survival of *Salmonella enterica* serovar Newport in manure and manure-amended soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, n.9, p.5777-5783, 2006.
- ZÁRATE-CASTREJÓN, J.L.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, T.O.; ANGELES-NÚÑEZ, J.G.; CONCHA-VALDEZ, F.G.; VERDE-CALVO, J.R.; GUZMÁN, M.E.R. Survival of *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* in cactus cladodes under domestic marketing conditions in Mexico, **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 47, 1999-2006, 2016.