



**ANDRÉIA DE OLIVEIRA DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE SILAGENS DE MILHO  
PRODUZIDAS EM MINAS GERAIS E  
CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA E  
GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO  
LÁTICO ISOLADAS DESSAS SILAGENS**

**LAVRAS – MG**

**2016**

**ANDRÉIA DE OLIVEIRA DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE SILAGENS DE MILHO PRODUZIDAS EM  
MINAS GERAIS E CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA E  
GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO ISOLADAS  
DESSAS SILAGENS**

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

Orientadora

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila

Coorientadores

Dra. Rosane Freitas Schwan

Dr. Nelson Manuel Viana da Silva Lima

**LAVRAS – MG**

**2016**

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

Santos, Andréia de Oliveira dos.

Caracterização de silagens de milho produzidas em minas gerais e  
caracterização metabólica e genotípica de bactérias do ácido lático  
isoladas dessas silagens / Andréia de Oliveira dos Santos. – Lavras:  
UFLA, 2016.

136 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Carla Luiza da Silva Ávila.

Bibliografia.

1. Silagem de milho. 2. DGGE. 3. Bactéria do ácido lático. 4.  
RAPD-PCR. 5. REP-PCR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**ANDRÉIA DE OLIVEIRA DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE SILAGENS DE MILHO PRODUZIDAS EM  
MINAS GERAIS E CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA E  
GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO ISOLADAS  
DESSAS SILAGENS**

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

APROVADA em 29 de fevereiro de 2016.

Dra. Rosane Freitas Schwan	UFLA
Dr. Thiago Fernandes Bernardes	UFLA
Dr. Nelson Manuel Viana da Silva Lima	UMINHO
Dra. Cíntia Lacerda Ramos	UFLA

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2016**

*A Deus e a Nossa Senhora, pela proteção  
em todos os momentos e por iluminarem e  
conduzirem meus passos na direção  
certa.*

**OFEREÇO**

*Aos meus pais, Elenice e Rafael, pelo  
exemplo de vida, incentivo e por  
acreditarem em meus sonhos.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora, por minha saúde, família, amigos e pelas belas oportunidades que tenho em minha vida; pela força e proteção que tive em todos os momentos desta caminhada, as quais foram fundamentais para superar as dificuldades enfrentadas e as saudades das pessoas amadas.

A Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, que me acolheu e forneceu os aportes necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A Universidade do Minho, de modo especial ao Departamento de Engenharia Biológica e à Micoteca, pela receptividade, carinho e apoio no desenvolvimento de parte deste trabalho.

À professora Dra. Carla Luiza da Silva Ávila, pela orientação, apoio incondicional e, principalmente, por acreditar e confiar em minha capacidade de conduzir este trabalho.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pelo apoio e por acreditar na importância deste trabalho.

Ao professor Dr. Nelson Lima, pelo exemplo de profissionalismo e pela grandiosa oportunidade de ter integrado sua equipe na Universidade do Minho. Muitíssimo obrigada por ter confiado na proposta do meu trabalho.

À Dra. Célia Soares, pela supervisão e apoio no desenvolvimento do trabalho na UMINHO, mas, principalmente, pelo carinho e pela amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos que foram fundamentais para a minha formação.

A Rose, secretária do PPGMA, por toda atenção, cuidado e carinho durante esse período acadêmico.

A Juliana e Ivani, técnicas do laboratório de Microbiologia, pelo carinho, amizade e por estarem prontas a ajudar.

Aos bolsistas de iniciação científica, Eric Schwan, Iara Cunha e Willian Henschell, que foram de grande ajuda na execução deste trabalho. Espero que eu possa ter contribuído positivamente na formação de vocês.

Aos técnicos da Emater pelo auxílio na seleção das propriedades leiteiras avaliadas e aos proprietários das fazendas que se prontificaram a participar e gentilmente cederam as amostras para a condução deste trabalho.

Aos meus pais, Elenice e Rafael, por terem me ensinado os maiores valores que alguém pode ter, como o caráter, dignidade, respeito, amor e educação, e por terem sido os que mais acreditaram e batalharam, mesmo que a distância, para a concretização deste sonho. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Anderson e Anselmo, pelo carinho e pela torcida constante para a minha vitória. Obrigada pelas palavras de conforto, ânimo e alegria nos dias difíceis, mas, principalmente, pelas boas risadas. Aos meus lindos sobrinhos, Lucas, Matheus, Raphael e Valentina, pelos sorrisos e abraços carinhosos nos poucos momentos que passamos juntos neste período.

À minha tia Terezinha (Tia Tuca), pelas orações e torcida de sempre.

Às grandes e verdadeiras amigadas que foram construídas desde que iniciei minhas atividades acadêmicas, em especial Luciana, Monique, Mariana, Igor, Angélica, Ana Luiza, Roberta e Kelly, entre tantos outros amigos especiais. Vocês foram essenciais para deixar meus dias mais tranquilos, especialmente aqueles mais difíceis.

Aos meus afilhados de coração, Luciana e Diego que, mesmo a distância, me deixaram participar de um momento tão especial na vida de vocês

e que, agora, nesta reta final do doutorado me receberam tão carinhosamente em seu novo lar.

Às amigas que a Universidade do Minho me presenteou, Zlatina Genisheva, Cristina Quintela, Ana Guimarães, Sofia Costa, Fernando Pardo, Simone Decontardi, Nicole Dias, Rita Martins, Clarisse Nobre, Sara Silvério Talita Calado e Lina Giraldo, pela acolhida e carinho de sempre! Saudade imensa de todos vocês e dessa cidade maravilhosa!

Às amigas brasileiras que tive oportunidade de conhecer do outro lado do oceano, de modo muito especial, a Rutelene Pinheiro, Meirielly Santos, Tatiana Maciel, Helena Oliveira, Bárbara Barbosa, Taciana Soares, Karoline Caetano, Priscilla Sales, Andréa Santos e Maria Helena Menezes. Meus dias longe de casa foram mais especiais na presença de vocês!

A Cíntia Ramos, Thaíse Souza e Michelle Terra, companheiras de casa, pelo carinho, conselhos e, principalmente, pela amizade que construímos.

E a todos que contribuíram para a realização desta conquista, seja diretamente ou simplesmente por pensamentos positivos e orações. Muito obrigada!

## RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de compreender as práticas de ensilagem, bem como suas correlações com as características bromatológicas, microbiológicas e o perfil fermentativo de silagens de milho produzidas em fazendas leiteiras localizadas nas mesorregiões Campo das Vertentes, Sul e Sudoeste do estado de Minas Gerais. Objetivou-se também identificar e caracterizar, metabólica e genotipicamente, as bactérias do ácido láctico (BAL) isoladas dessas silagens. No primeiro experimento, realizaram-se um levantamento sobre as práticas de produção e uso de silagem de milho, das características de produção de leite, e análises bromatológicas e microbiológicas, além do perfil de metabólitos das silagens produzidas nas regiões. Apesar da predominância de pequenos produtores com participação proporcionalmente menor no volume total de leite produzido, grandes propriedades especializadas foram observadas na região, e a qualidade da silagem foi associada ao grau de especialização. Grande diversidade entre as práticas de ensilagem foi observada e isso refletiu tanto na qualidade nutricional quanto no perfil fermentativo e microbiológico das silagens avaliadas e, conseqüentemente, na produtividade animal. A composição bromatológica e a população de microrganismos das silagens avaliadas apresentaram, em média, valores dentro do recomendado para silagens de milho de boa qualidade. No segundo experimento, foi realizado um agrupamento das BAL isoladas das silagens avaliadas, com base no perfil de produção de metabólitos e no perfil genético por meio das técnicas de RAPD-PCR e REP-PCR. Os perfis obtidos por meio da técnica de RAPD-PCR utilizando-se o *primer* M13 foram mais discriminatórios do que aqueles obtidos com a técnica de REP-PCR com o *primer* (GACA)<sub>4</sub>. Todas as cepas foram agrupadas de acordo com suas respectivas designações taxonômicas por RAPD-PCR e foram identificados como *Lactobacillus acidophilus*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. diolivorans*, *L. hilgardii*, *L. paracasei*, *L. parafarraginis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. zae* e *Pediococcus acidilactici*. *Lactobacillus rhamnosus* e *L. buchneri* apresentaram grande amplitude de distribuição entre as regiões. A caracterização metabólica das cepas permitiu o agrupamento de acordo com o perfil de produção dos metabólitos avaliados e apresentou correlação com os resultados obtidos pela caracterização genotípica.

Palavras-chave: Silagem de milho. Minas Gerais. DGGE. Bactéria do ácido láctico. RAPD-PCR. REP-PCR.

## ABSTRACT

The present study was conducted with the objective to understand the silage practices, as well as their correlation with bromatological, microbiological and fermentation characteristics of corn silage produced in dairy farms located in Campo das Vertentes, South and Southwest of Minas Gerais State mesoregions. Also, the objective was to identify and characterize metabolic and genotypically the lactic acid bacteria (LAB) isolated in these silages. In the first experiment, we made a survey about the corn silage production and use practices, milk production characteristics, bromatological and microbiological analysis and metabolite profile of silages produced in the regions. Despite the predominance of small producers, proportionally, with smaller participation on the total volume of milk produced, large specialized properties were observed in the region and the silage quality was associated with the degree of specialization of the farm. Great diversity between the ensiling practices was observed and this reflected both the nutritional quality, and the fermentative and microbiological profile of the evaluated silages and consequently in animal productivity. The chemical composition and the microorganisms population in evaluated silages showed average values within the recommended for good quality corn silage. In the second experiment, there was a group of BAL isolated from silages evaluated based on metabolite production profile and the genetic profile through the techniques of RAPD-PCR and REP-PCR. The profiles obtained by the RAPD-PCR using the primer M13 were more discriminatory than those obtained with REP-PCR using the primer (GACA)<sub>4</sub>. All strains were grouped according to their respective designations taxonomical by RAPD-PCR and were identified as *Lactobacillus acidophilus*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. diolivorans*, *L. hilgardii*, *L. paracasei*, *L. parafarraginis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. zeae*, and *Pediococcus acidilactici*. *Lactobacillus rhamnosus* and *L. buchneri* showed great amplitude distribution across regions. Metabolic characteristics of strains allowed the grouping in accordance with the production of metabolites profile evaluated and correlated with results obtained for genotypic characterisation.

Keywords: Maize silage. Minas Gerais. DGGE. Lactic acid bacteria. RAPD-PCR. REP-PCR.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

- Figura 1 Mapa representativo das mesorregiões Sul, Sudoeste e Campo das Vertentes .....60
- Figura 2 Formulário de coleta das amostras de silagem de milho .....61
- Figura 3 Comunidade bacteriana nas silagens de milho .....92

### CAPÍTULO 3

- Figure 1 Dendrogram generated after cluster analysis of fingerprints using M13 primer of the UFLA SLM LAB isolates. Stars indicate isolates selected to sequence analysis .....119
- Figure 2 Dendrogram generated after cluster analysis of REP-PCR fingerprints using (GACA)<sub>4</sub> primer of the UFLA SLM LAB isolates. Stars indicate isolates selected to sequence analysis .....120
- Figure 3 Principal component analysis of the products of metabolism (lactic acid, acetic acid and ethanol) of UFLA SLM LAB isolates evaluated .....130

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Características associadas com a produção de leite.....	67
Tabela 2	Características associadas com as práticas de ensilagem.....	69
Tabela 3	Composição bromatológica das silagens de milho avaliadas nas diferentes propriedades rurais.....	77
Tabela 4	Características fermentativas das silagens de milho avaliadas nas diferentes propriedades rurais.....	81
Tabela 5	População dos microrganismos presentes nas silagens de milho avaliadas nas diferentes propriedades rurais.....	84
Tabela 6	Análises de correlações de Pearson entre as variáveis sobre as práticas de ensilagem, composição bromatológica, produção de metabólitos e população de microrganismos nas silagens avaliadas.....	87
Tabela 7	Modelos de regressão linear multivariada para o conteúdo de matéria seca (MS), estimativa de produção de leite (EPL), ácido acético (ACE) e pH.....	89

### CAPÍTULO 3

Table 1	Molecular identification of LAB isolates.....	122
Table 2	Distribution of LAB according to the collection regions of maize silage samples.....	123
Table 3	Contents of lactic, acetic, and ethanol by UFLA SLM LAB isolated from maize silage.....	126

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução Geral .....	14
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Silagem</b> .....	17
<b>2.1.1</b>	<b>Silagem de milho</b> .....	18
<b>2.2</b>	<b>Práticas de ensilagem</b> .....	20
<b>2.2.1</b>	<b>Cultivares para produção de silagem</b> .....	20
<b>2.2.2</b>	<b>Estádio de maturidade para colheita</b> .....	21
<b>2.2.3</b>	<b>Tamanho de partícula</b> .....	23
<b>2.2.4</b>	<b>Enchimento, compactação e vedação do silo</b> .....	24
<b>2.2.5</b>	<b>Abertura do silo e taxa de retirada</b> .....	25
<b>2.2.6</b>	<b>Inoculantes microbianos</b> .....	26
<b>2.3</b>	<b>Microbiota da silagem</b> .....	27
<b>2.3.1</b>	<b>Bactérias do ácido lático (BAL)</b> .....	27
<b>2.3.2</b>	<b>Microorganismos indesejáveis presentes na silagem</b> .....	29
<b>2.3.2.1</b>	<b>Microorganismos da família <i>Enterobacteriaceae</i></b> .....	29
<b>2.3.2.2</b>	<b><i>Listeria</i> spp</b> .....	30
<b>2.3.2.3</b>	<b>Bactérias formadoras de esporos</b> .....	31
<b>2.3.2.4</b>	<b>Levedura</b> .....	33
<b>2.3.2.5</b>	<b>Fungo filamentoso</b> .....	35
<b>2.4</b>	<b>Avaliação e identificação da diversidade microbiana em silagens</b> .....	37
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	40
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41
	<b>CAPÍTULO 2</b> Caracterização de silagens de milho produzidas em Minas Gerais e associação com práticas de ensilagem .....	54
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	56
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	59
<b>2.1</b>	<b>Perfil das propriedades e das práticas de ensilagem</b> .....	59
<b>2.2</b>	<b>Análises físico-químicas e bromatológicas</b> .....	62
<b>2.3</b>	<b>Análises microbiológicas</b> .....	63
<b>2.4</b>	<b>Avaliação da diversidade bacteriana</b> .....	63
<b>2.5</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	65
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	66
<b>3.1</b>	<b>Perfil das propriedades</b> .....	66
<b>3.2</b>	<b>Práticas de ensilagem</b> .....	67
<b>3.3</b>	<b>Características bromatológicas</b> .....	74
<b>3.4</b>	<b>Características fermentativas</b> .....	79
<b>3.5</b>	<b>População dos microrganismos</b> .....	82
<b>3.6</b>	<b>Avaliação da diversidade bacteriana</b> .....	92

<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	95
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96
	<b>CAPÍTULO 3 Metabolic and genotypic characterisation of lactic acid bacteria isolated from Brazilian maize silage</b> .....	108
<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	110
<b>2</b>	<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	112
<b>2.1</b>	<b>Bacterial strains and growth conditions</b> .....	112
<b>2.2</b>	<b>Genomic DNA extraction</b> .....	112
<b>2.3</b>	<b>PCR fingerprinting amplification</b> .....	113
<b>2.4</b>	<b>Identification to species level by 16S rRNA gene sequencing</b> .....	114
<b>2.5</b>	<b>Characterisation of target metabolites</b> .....	115
<b>2.6</b>	<b>Data analysis</b> .....	116
<b>3</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	117
<b>3.1</b>	<b>Genotypic characterisation</b> .....	117
<b>3.2</b>	<b>Metabolic characterisation</b> .....	125
<b>4</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	131
	<b>REFERENCES</b> .....	132

## CAPÍTULO 1

### Introdução Geral

#### 1 INTRODUÇÃO

A ensilagem é um método de conservação de plantas forrageiras baseado no metabolismo de microrganismos, principalmente bactérias do ácido láctico (BAL), que fazem a conversão dos carboidratos em ácidos orgânicos. Como resultado do processo, ocorre diminuição do pH do material ensilado, o que contribui para a preservação da forragem, pois inibe a atividade de microrganismos deterioradores (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Tradicionalmente, a forragem mais utilizada para a ensilagem é a planta de milho, cultivado com este propósito em grandes áreas ao redor do mundo (KHAN et al., 2015). Este fato deve-se, além de sua qualidade nutricional, às suas características desejáveis para ensilagem, como produção elevada de massa por unidade de área, alto rendimento de massa verde por hectare, facilidade de fermentação no silo, além de boa aceitação por parte dos bovinos e ganhos de pesos satisfatórios em confinamentos (RESTLE et al., 2002). No entanto, grandes perdas de nutrientes durante a exposição ao ar são verificadas devido à maior instabilidade aeróbia das silagens de milho, que ocorre em virtude da maior concentração de substratos potencialmente oxidáveis por microrganismos oportunistas (SIQUEIRA; BERNARDES; REIS, 2005).

O valor nutritivo da silagem de milho pode variar de acordo com o teor de matéria seca (SHINNERS et al., 2000), o tipo de híbrido (FERRARETTO; SHAVER, 2015), o tamanho médio de partículas (JOHNSON et al., 2003), o grau de processamento dos grãos (BAL et al., 2000), o tempo de armazenamento (DER BEDROSIAN; KUNG JUNIOR; NESTOR JUNIOR, 2012), as práticas

de ensilagem (WEINBERG; ASHBELL, 2003), o perfil fermentativo e o uso de aditivos (ARRIOLA et al., 2011). Boas práticas de ensilagem desempenham fator importante para o sucesso do processo, no entanto, a microbiota da silagem exerce grande influência sobre a qualidade do processo de conservação da forragem (SENGER et al., 2005). Os microrganismos presentes podem ser divididos em dois grupos, os desejáveis, representados pelas bactérias do ácido láctico (BAL) e aqueles indesejáveis, que estão associados a perdas durante a ensilagem, ocasionadas pela deterioração anaeróbia (*Clostridium* spp. e enterobactérias) ou deterioração aeróbia (*Bacillus* sp., *Listeria* sp., leveduras e fungos filamentosos).

Devido à crescente utilização desta forrageira como principal alimento fornecido a animais de alto desempenho, é importante quantificar a variação do seu valor nutritivo (KHAN et al., 2015), uma vez que, se a silagem apresentar restrições qualitativas, as consequências imediata são a redução de consumo da mesma e a consequente queda na produção de leite. Nesse sentido, o conhecimento das práticas de ensilagem empregadas, bem como a identificação dos microrganismos envolvidos no processo de ensilagem, é de fundamental importância para avaliar a qualidade das silagens produzidas em Minas Gerais e, dessa forma, propor melhorias para a cadeia de produção de leite da região.

Para organizar a distribuição dos trabalhos desenvolvidos nesta tese, ela foi dividida em forma de capítulos, sendo o capítulo 1 uma revisão de literatura abordando os temas silagem, silagem de milho, práticas de ensilagem, microbiota da silagem, bactérias do ácido láctico, microrganismos indesejáveis presentes na silagem, avaliação e identificação da diversidade microbiana em silagens. No capítulo 2, objetivou-se compreender as práticas de ensilagem, bem como suas correlações com as características bromatológicas, microbiológicas e perfil fermentativo em fazendas leiteiras localizadas nas mesorregiões Campo das Vertentes, Sul e Sudoeste do estado de Minas Gerais. Os objetivos do

trabalho que compõe o capítulo 3 foram identificar e caracterizar metabólica e genotipicamente bactérias do ácido láctico isoladas a partir de silagens de milho produzidas no estado de Minas Gerais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Silagem

A conservação de culturas forrageiras por meio da técnica de ensilagem é um processo muito antigo, conforme documentam pinturas encontradas no Egito, entre 1000 e 1500 anos a.C. Entretanto, o interesse pela técnica de conservação difundiu-se pela Europa apenas no século XIX, o que estimulou os pesquisadores a realizarem estudos mais aprofundados, ainda naquele período (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Ensilagem é um método de produção da silagem que se baseia na conservação de forragem para alimentação animal, baseado na fermentação dos carboidratos presentes na forragem, com produção, sobretudo, de ácidos orgânicos. Devido à produção desses ácidos, ocorre redução do pH do meio, inibindo, assim, o crescimento dos principais microrganismos associados com a deterioração (ELFERINK et al., 2000; WOOLFORD, 1984).

A silagem é produzida pelo processo da ensilagem, uma técnica de conservação da forragem que consiste em corte, picagem, compactação e a devida alocação do material dentro de um recipiente ou estrutura denominada silo. Durante o processo de ensilagem, a combinação entre um ambiente anaeróbico e um pH baixo é fundamental para evitar uma atividade microbiana indesejável (PAHLOW et al., 2003).

Segundo Merry, Lowes e Winters (1997) e Weinberg e Muck (1996), o processo de ensilagem pode ser dividido em quatro fases, conforme descrito a seguir. A **fase aeróbica**, em geral, tem duração de poucas horas. É quando ocorre a redução do oxigênio atmosférico, devido à respiração do material ensilado, juntamente com a ação de microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos, como as leveduras e as enterobactérias.

A **fase de fermentação** inicia-se quando há o esgotamento da maior parte do oxigênio presente. O ambiente com concentração reduzida de oxigênio cessa a respiração pela planta, inibe o crescimento dos microrganismos aeróbios e cria condições favoráveis para as bactérias lácticas epífitas ou adicionadas como inoculante produzirem ácido láctico. Durante a fase anaeróbica da ensilagem, as bactérias do ácido láctico epífitas levam à queda do pH pela conversão de carboidratos presentes nas plantas em ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Na **fase de estabilidade**, caso não ocorra a entrada de ar no silo, o material ensilado não sofrerá mudanças significativas. Os baixos valores de pH fazem com que a atividade das bactérias anaeróbias sejam reduzidas e, além disso, alguns microrganismos ácido tolerantes sobrevivem a esta fase em estado de inatividade ou na forma de esporos (ELFERINK et al., 2000).

A **fase de desabastecimento**, ou **remoção**, inicia-se logo que o silo é aberto e o material ensilado fica exposto ao ar. A deterioração do material começa com a degradação dos ácidos orgânicos por leveduras e, ocasionalmente, por bactérias acéticas. A silagem, quando exposta ao ar, pode sofrer aumento de temperatura e de pH, podendo, ainda, ocorrer perdas de carboidratos residuais e dos produtos finais da fermentação, o que contribui para reduzir a qualidade da silagem e a sua digestibilidade para o animal (WOOLFORD, 1990). O último estágio desta fase inclui a atividade de outros microrganismos aeróbios deterioradores, como fungos filamentosos e enterobactérias (ELFERINK et al., 2000).

### **2.1.1 Silagem de milho**

A silagem de milho é o principal volumoso empregado nos sistemas intensivos de produção de carne e, principalmente, de leite, tanto no Brasil

quanto em países da Europa e na América do Norte (ALI et al., 2014; BERNARDES; RÊGO, 2014).

Comparada a outros volumosos, a cultura do milho possibilita grandes produtividades de forragem por área em menor tempo, permitindo o plantio sucessivo de outras culturas. É o volumoso de maior qualidade nutricional, dependendo de menor suplementação concentrada para que os animais tenham maiores produtividades (GOMES et al., 2002).

Conforme Khan et al. (2015), o milho apresenta os requisitos básicos para a confecção de uma boa silagem e tem sido cada vez mais recomendado devido às suas características de alto rendimento de massa verde por hectare, boa qualidade, relativa facilidade de fermentação no silo, além da boa aceitação por parte dos bovinos e ganhos de peso satisfatórios de animais em confinamento (GOMES et al., 2002).

Na alimentação de bovinos leiteiros, o milho é utilizado como fonte de amido, geralmente o principal componente energético dos concentrados. A presença de amido é fundamental na exploração de animais de alta produção, que exigem níveis elevados de energia na dieta (PEREIRA et al., 2009).

As fases iniciais de fermentação da silagem de milho, normalmente, acontecem de forma satisfatória uma vez que, no momento adequado de colheita, ela contém quantidade adequada de matéria seca, baixa capacidade tampão e níveis adequados de carboidratos solúveis para fermentação (ALLEN; COORS; ROTH, 2003). O maior problema está na fase de abertura dos silos devido à maior instabilidade aeróbia que ocorre em virtude da maior concentração de substratos potencialmente oxidáveis por microrganismos oportunistas (SIQUEIRA; BERNARDES; REIS, 2005).

## **2.2 Práticas de ensilagem**

A qualidade da silagem de milho sofre influência de aspectos como o híbrido utilizado e o estágio de maturação na colheita, além de aspectos relativos ao solo e ao clima (NEUMANN et al., 2007). Na confecção das silagens, aspectos ligados ao tamanho das partículas e à altura de colheita das plantas afetam o grau de compactação e, por consequência, a condição alcançada de anaerobiose, que é decisiva no processo de fermentação e conservação (NUSSIO; CAMPOS; DIAS, 2001).

### **2.2.1 Cultivares para produção de silagem**

A crescente demanda por cultivares de milho de melhor qualidade tem favorecido o surgimento de inúmeros genótipos com características específicas de porte, ciclo, textura do grão e aptidão, as quais exercem grande influência sobre o valor nutritivo e a qualidade da silagem produzida (PIMENTEL; SILVA; VALADARES FILHO, 1998; ROSA et al., 2004).

A utilização de cultivares de milho com maior produção e mais bem adaptadas às condições locais tem resultado em maiores ganhos em produtividade, seja na produção de leite ou no ganho de peso para bovinos em confinamento (JAREMTCHUK et al., 2005). Para a escolha de um híbrido ideal para a produção de silagem, alguns critérios devem ser considerados, como o ciclo, a produtividade de biomassa, a participação de grãos e a qualidade da fração fibrosa (MELLO; NORNBORG; ROCHA, 2005).

Os genótipos de milho podem ser diferenciados de acordo com a textura do grão. Os genótipos de milho que têm grãos classificados como macios se diferenciam por apresentar os grãos de amido mais concentrados nas laterais dos grãos, envolvendo parcialmente o embrião. Grãos duros apresentam reduzida

proporção de endosperma amiláceo em seu interior e a textura dura é devido ao denso arranjo dos grãos de amido com proteína. Existem, ainda, os grãos semiduros e os semidentados, que apresentam características intermediárias. Os grãos mais duros apresentam vantagem no armazenamento e maior qualidade de germinação, sendo utilizados pelas indústrias alimentícias, enquanto os grãos dentados são recomendados para a produção de silagem (CRUZ; PEREIRA FILHO, 2009).

Em um estudo no qual avaliaram dois tipos de textura de grão, duro e dentado, na alimentação de vacas de alta produção, Corrêa, Pereira e Oliveira (2003) não observaram diferença significativa entre a textura dos híbridos de milho na produção de leite (34,2 e 34,6 kg.dia<sup>-1</sup>, respectivamente), no consumo de matéria seca (23,0 e 23,2 kg.dia<sup>-1</sup>, respectivamente) e na digestibilidade de nutrientes.

A escolha da cultivar para silagem tem gerado controvérsia, devido à falta de informações quanto ao comportamento agrônomico produtivo e qualitativo de diferentes híbridos ofertados pelas empresas de melhoramento (MELLO; NORBERG; ROCHA, 2005). Além dos parâmetros agrônomicos, as proporções das frações da planta também influenciam a qualidade final da silagem (ALMEIDA FILHO et al., 1999).

### **2.2.2 Estádio de maturidade para colheita**

O estágio de desenvolvimento em que a planta de milho é colhida afeta a qualidade das silagens produzidas, principalmente em relação à percentagem de matéria seca (MS) e à proporção de grãos no volume total produzido. Muitos autores recomendam que a planta de milho seja colhida em intervalos de 30% a 35% de MS, para a confecção de silagens (NUSSIO et al., 2001).

De acordo com observações feitas por Sulc, Thomison e Weiss (1996), a posição da linha de leite no grão tem sido recomendada como o ponto de colheita do milho para ensilagem. A linha do leite é uma camada externamente visível na face oposta do grão, que limita as matrizes sólida e líquida do endosperma e se desloca da região da coroa para a base, durante o processo da maturação (AFUAKWA; CROOKSTON, 1984). Devido ao acúmulo de amido, acima da linha do leite o grão apresenta consistência dura e abaixo, consistência leitosa.

Filya (2004), avaliando o valor nutritivo de silagens de planta inteira de milho colhidas em diferentes estágios de maturidade, relatou que o ponto ideal para a colheita corresponde ao momento em que a linha do leite está a dois terços do grão. Neste estágio, foram observados os teores adequados de matéria seca e maior degradabilidade da matéria orgânica. Além disso, o rendimento máximo de fibra em detergente neutro (FDN) degradável ocorreu neste estágio de maturidade, sendo, portanto, recomendado com o objetivo de maximizar o rendimento de nutrientes fermentáveis por hectare.

O teor de MS está relacionado com o estabelecimento de condições apropriadas para fermentação láctica e redução das perdas. Plantas de milho colhidas com teores elevados de MS (40% a 45%) apresentam maiores níveis de perdas, dificuldade de compactação, diminuição da densidade, menor taxa de fermentação, retenção de oxigênio, aquecimento da massa ensilada e desenvolvimento de microrganismos deterioradores, resultando, assim, em silagens de qualidade inferior, conforme reportado por Ferreira (2001). Além disso, o teor de carboidratos solúveis em água é menor em plantas com alto teor de MS, o que pode comprometer o processo de ensilagem devido à restrição desse substrato (ZOPOLLATTO et al., 2009).

Por outro lado, a colheita de plantas com baixo conteúdo de MS propicia perdas durante a fermentação, em decorrência de fermentação secundária, bem

como a produção de efluentes. O material colhido com baixos teores de MS favorece o crescimento de bactérias do gênero *Clostridium*, as quais promovem a proteólise e, conseqüentemente, produção de nitrogênio amoniacal. Com isso, a silagem perde valor nutritivo e palatabilidade. Segundo Rotz e Muck (1994), a produção de efluentes em silagens de milho tende a aumentar com o teor de umidade, provocando perdas por lixiviação de compostos solúveis como mono e dissacarídeos, peptídeos e minerais.

### **2.2.3 Tamanho de partícula**

O tamanho da partícula ensilada consiste em outro fator que influencia a qualidade final da silagem, visto que está diretamente relacionado com a facilidade de compactação e com a densidade do silo (RESTLE et al., 2002). Para a silagem de milho, o tamanho ideal das partículas varia entre 5 a 10 mm (GRIFFITHS et al., 2004). Partículas muito grandes (acima de 19 mm) dificultam o processo de compactação do silo, além de reduzir consideravelmente a quebra dos grãos de milho, acarretando, assim, em menor taxa de ingestão de amido. Por outro lado, partículas muito pequenas (menores que 1,18mm) podem afetar negativamente a fermentação ruminal, uma vez que menores tamanhos de partícula podem resultar em menor tempo de ruminação. Portanto, é importante que se faça uma distribuição do tamanho de partículas para que existam partículas de folhas e colmo maiores que 19 mm, que garantem o funcionamento ruminal, e partículas entre 8 mm a 1,8 mm, que garantem a quebra dos grãos e a boa compactação do silo (KONONOFF; HEINRICHS; LEHMAN, 2003).

#### **2.2.4 Enchimento, compactação e vedação do silo**

O estabelecimento da condição de anaerobiose na silagem ocorre pela expulsão do ar existente entre as partículas de forragem pelo processo de compactação do material ensilado e pela subsequente vedação do silo (SENGER et al., 2005). O rápido estabelecimento desta condição é desejável, pois a presença de ar permite a respiração de células da planta e de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos facultativos presentes na forragem. O processo de respiração é prejudicial à qualidade da silagem, por causar perdas de matéria seca e de energia e reduzir a quantidade de carboidratos solúveis disponíveis para a fermentação das bactérias produtoras de ácido lático (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

No Brasil, provavelmente, os dois fatores que mais influenciam a densidade de compactação das silagens de milho são a maturidade da planta e o tamanho de partícula, pois as ensiladoras nacionais, geralmente, não são equipadas para a realização do processo de rompimento ou quebra dos grãos após a picagem, como ocorre em países da América do Norte e da Europa. Esse tipo de processamento, além de aumentar a densidade de compactação, segundo Johnson et al. (2003), melhora a digestibilidade.

O fechamento do silo é finalizado com a vedação, utilizando-se material plástico, tanto para silos do tipo superfície como trincheira. A qualidade dos filmes utilizados na vedação de silos é importante para reduzir as perdas sua na camada superior, evitando a ocorrência de fermentações indesejáveis. A permeabilidade ao oxigênio pelas lonas correlaciona-se positivamente com perdas de matéria seca da silagem (BERNARDES; NUSSIO; AMARAL, 2011; NEUMANN et al., 2011).

Quando se compara lona dupla face com lona preta, observa-se que a permeabilidade ao oxigênio se eleva nesta última em função de sua cor, a qual

absorve maior quantidade de calor em relação à lona dupla face. Dessa forma, os poros na lona dilatam e maior quantidade de oxigênio tem possibilidade de adentrar no silo. A lona dupla face, por apresentar uma camada de plástico de coloração branca, reflete parte da luz solar incidente, permitindo menor aquecimento e menor entrada de oxigênio na massa (AMARAL; BERNARDES; NUSSIO, 2011).

Bernardes et al. (2013), avaliando a produção e o uso de silagens em fazendas leiteiras em Minas Gerais, observaram que filmes plásticos de dupla face foram os mais utilizados (84.6%) pelos produtores como ferramenta para vedação dos silos, seguidos da lona preta (10.3%).

#### **2.2.5 Abertura do silo e taxa de retirada**

A forma de retirada da silagem exerce grande influência no aquecimento e, conseqüentemente, na deterioração da silagem exposta. Segundo Novaes, Lopes e Carneiro (2004), a silagem deve ser retirada em corte transversal, de cima para baixo, sendo recomendada a utilização de uma fatia superior a 20 cm de espessura ao dia para reduzir as perdas, pois o painel do silo fica exposto ao ar por um período reduzido de tempo (BOLSEN, 2003; NEUMANN et al., 2007). Contudo, em condições climáticas quentes ou úmidas, pode ser necessário retirar uma fatia de espessura de 45 cm ou mais, com a finalidade de prevenir perdas decorrentes da aerobiose, em especial em silagens de alta umidade, como as de milho de planta inteira, de sorgo e de cereais de inverno. Este corte pode ser feito manualmente ou com a utilização de máquinas específicas e o corte correto da fatia diária evita o desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras.

### **2.2.6 Inoculantes microbianos**

Desde a década de 1990, têm sido realizadas pesquisas buscando novas alternativas, com o objetivo de minimizar as perdas decorrentes do processo de ensilagem, otimizar o processo fermentativo, reduzir a deterioração aeróbia e preservar o valor nutritivo das forrageiras ensiladas (HARRISON; BLAUWIEKEL, 1994). Nesse sentido, a utilização de inoculantes microbianos tem sido uma técnica extensamente difundida em países desenvolvidos. Entretanto, os resultados obtidos com a sua utilização são contraditórios, já que as melhorias no perfil fermentativo das silagens nem sempre são acompanhadas de ganhos no valor nutritivo e, portanto, no desempenho animal (KUNG; STOKES; LIN, 2003).

O princípio básico de atuação desses produtos é o incremento na população de bactérias do ácido lático homo ou heterofermentativas e/ou bactérias do ácido propiônico, capazes de competir com a microbiota epifítica, de maneira a aumentar a produção de ácido lático e de outros ácidos orgânicos envolvidos na preservação das silagens. Alguns inoculantes têm, ainda, a capacidade de diminuir a proteólise e inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, promovendo a utilização mais adequada dos carboidratos solúveis e, conseqüentemente, maior retenção de nutrientes na silagem (KUNG; STOKES; LIN, 2003; PAHLOW et al., 2003).

Segundo Muck (2008), um dos fatores importantes para o sucesso da aplicação de inoculantes microbianos em silagens é a compatibilidade entre a planta e os microrganismos utilizados. Segundo o autor, as culturas forrageiras apresentam composições químicas diferentes e podem armazenar diferentes tipos e concentrações de carboidratos. Esses fatores associados ao ambiente onde uma planta cresce podem interferir na adaptação do microrganismo a uma determinada cultura. Entretanto, cepas selecionadas de outros ambientes ou

linhagens selecionadas a partir de culturas forrageiras diferentes também podem apresentar resultados positivos no processo de ensilagem.

É importante ressaltar que o efeito da inoculação não depende somente da espécie, pois, embora os microrganismos da mesma espécie apresentem características semelhantes, existem variações entre as estirpes. Saarisalo et al. (2007) e Santos, Ávila e Schwan (2013a) verificaram que a inoculação com diferentes estirpes, embora pertencentes à mesma espécie, resultou em silagens com características diferentes, o que mostra que os estudos devem considerar as estirpes e não apenas as espécies.

### **2.3 Microbiota da silagem**

A microbiota da silagem desempenha papel fundamental na qualidade do processo de conservação da forragem e pode ser dividida, basicamente, em dois grupos, os microrganismos desejáveis, representados pelas bactérias do ácido lático (BAL) e aqueles indesejáveis, que estão associados às perdas durante a ensilagem, ocasionadas pela deterioração anaeróbia (*Clostridium* spp. e enterobactérias) ou deterioração aeróbia (*Bacillus* spp., *Listeria* spp., leveduras e fungos filamentosos).

#### **2.3.1 Bactérias do ácido lático (BAL)**

Segundo Pahlow et al. (2003), as BAL correspondem ao principal grupo de microrganismos que atuam no processo fermentativo da silagem. Dentre as espécies frequentemente encontradas em silagens, citam-se as dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (TOHNO et al., 2012). São classificadas como bactérias gram-

positivas, anaeróbias aerotolerantes, usualmente não móveis e não esporulantes (HAMMES; HERTEL, 2003).

As duas vias principais de utilização de açúcares pelas BAL são a glicólise ou via de Embden-Meyerhof Parnas (EMP) e a via das pentoses fosfato. De acordo com as vias utilizadas, as BAL são classificadas em homofermentativas, heterofermentativas obrigatórias e heterofermentativas facultativas (MADIGAN et al., 2010).

As BAL homofermentativas produzem quase que exclusivamente ácido láctico na fermentação de hexoses pela via EMP e não fermentam pentoses, pois têm apenas a enzima aldolase, como, por exemplo, *Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus ruminis*. As heterofermentativas facultativas, representadas pelas espécies *L. plantarum*, *L. pentosus* e *Enterococcus faecium*, são semelhantes às anteriores, contudo, também são capazes de fermentar pentoses em ácido láctico e acético, pois têm a enzima aldolase constitutiva e a fosfoquetolase. As BAL heterofermentativas obrigatórias fermentam hexoses e pentoses, pela via fosfogluconato, em ácidos láctico e acético, etanol e dióxido de carbono, e podem ser representadas pelas espécies *L. brevis* e *L. buchneri* (AXELSSON, 2004; HAMMES; HERTEL, 2003).

Segundo Lin et al. (1992) e Santos et al. (2013), no decorrer do processo de fermentação da silagem ocorre sucessão de gêneros de bactérias do ácido láctico. No estágio inicial, as bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* dominam o processo, sendo substituídas por *Leuconostoc*, depois por *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que são mais resistentes às condições ácidas (ELFERINK et al., 2000). Parvin et al. (2010) compararam as comunidades bacterianas em silagens de milho em diferentes tempos de fermentação e observaram uma evolução da comunidade bacteriana, de *Enterobacter* spp. para *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* e *Lactococcus lactis*, após 30 dias de ensilagem.

### 2.3.2 Microrganismos indesejáveis presentes na silagem

Microrganismos indesejáveis são aqueles associados a perdas durante todas as fases do processo de ensilagem, estando relacionados à deterioração anaeróbia, apresentando elevado consumo de nutrientes, como as enterobactérias e *Clostridium* spp. ou deterioração aeróbia, como leveduras, fungos filamentosos, *Bacillus* spp. e *Listeria* spp. Esses microrganismos podem estar presentes na cultura ou ser oriundos de contaminação, principalmente do solo, competindo com as BAL por carboidratos solúveis e os produtos finais da fermentação (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Muitos desses microrganismos deterioradores não somente diminuem o valor nutritivo da silagem, como também têm efeito prejudicial na saúde animal, além de interferirem na qualidade do leite produzido pelos animais alimentados com essas silagens (JULIEN et al., 2008; VISSERS et al., 2007).

#### 2.3.2.1 Microrganismos da família *Enterobacteriaceae*

Os principais gêneros de enterobactérias relatados em silagens são *Escherichia*, *Klebsiela*, *Erwinia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Hafnia*, *Proteus* e *Enterobacter*. São bactérias gram-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, imóveis ou móveis por flagelação peritríquia. Segundo Heron, Wilkinson e Duffus (1993), as espécies *Erwinia herbicola* e *Rahnella aquitilis* frequentemente dominam a forragem fresca e, após a ensilagem, são rapidamente substituídas por outras espécies, como *Hafnia* spp., *Escherichia coli* e *Serratia* spp. Embora a maioria das enterobactérias detectadas nas silagens seja considerada não patogênica, seu desenvolvimento é indesejável, visto que competem com as BAL pelos carboidratos no início do

processo fermentativo, produzindo, principalmente, ácido acético (HENDERSON, 1993; MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

As enterobactérias também são capazes de degradar proteínas que, além de provocarem redução do valor nutricional da silagem, conduzem à produção de aminas e ácidos graxos ramificados, apresentando efeito negativo na aceitabilidade da silagem. Além disso, a amônia formada por proteólise aumenta a capacidade tampão do material ensilado, retardando a redução rápida do pH da silagem (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). No processo de ensilagem, a presença dessas bactérias pode ser minimizada por fermentações aceleradas, em que há uma queda rápida no pH. No entanto, a presença de oxigênio prolonga sua sobrevivência na silagem (DRIEHUIS; ELFERINK, 2000).

### **2.3.2.2 *Listeria* spp**

Os membros do gênero *Listeria* são gram-positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos e sua ocorrência em silagens tem sido associada à deterioração aeróbia (DRIEHUIS; ELFERINK, 2000).

As principais espécies reconhecidas são *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi* (HIRSH; ZEE, 2004), sendo *L. monocytogenes* a espécie de maior importância em função de sua patogenicidade e capacidade de sobrevivência sob condições adversas (VILAR et al., 2007). *Listeria* está associada a surtos de septicemia, abortos, doenças do sistema nervoso central e mastite, afetando, assim, muitos animais ruminantes e também o homem (HIRSH; ZEE, 2004).

O crescimento e a sobrevivência de *Listeria* spp. na silagem são determinados pelo grau de anaerobiose e o pH da mesma. Essas bactérias podem tolerar valores de pH de 3,8 a 4,2 por longos períodos, se o oxigênio estiver

presente, mesmo que em baixos níveis. No entanto, sob condições estritamente anaeróbicas e a baixos valores de pH, essas bactérias perdem rapidamente a viabilidade. Assim, esses microrganismos estão envolvidos com a deterioração aeróbia das silagens, não se desenvolvendo em silagens bem preservadas (ELFERINK et al., 2000).

Taşçi, Türütoglu e Ögütçü (2010), pesquisando a incidência de *Listeria* spp. em silagens, na Turquia, observaram a presença de *L. monocytogenes* em 6,66% das amostras de silagens avaliadas e em 1,17% das amostras de leite obtidas dos animais que se alimentaram com as silagens contaminadas.

### **2.3.2.3 Bactérias formadoras de esporos**

Os gêneros *Clostridium* e *Bacillus* são representados por bactérias formadoras de esporos, o que as torna indesejáveis nos sistemas de conservação de alimentos (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002). A passagem dessas bactérias de um ambiente para o outro ocorre, geralmente, através dos esporos, forma de sobrevivência resistente ao oxigênio, ao calor, aos ácidos orgânicos, à radiação e às enzimas digestivas (PAHLOW et al., 2003).

As espécies do gênero *Clostridium* são bactérias estritamente anaeróbias e o seu desenvolvimento na silagem, durante a fase de fermentação, está ligada a uma lenta e insuficiente acidificação ( $\text{pH} > 4,2$ ), que é atribuída a uma excessiva umidade da forragem, à insuficiência de açúcares fermentescíveis e a uma considerável concentração de nitrogênio na planta (PAHLOW et al., 2003).

Esses microrganismos fermentam carboidratos, ácido lático e aminoácidos, produzindo ácido butírico e aminas biogênicas. Esse tipo de fermentação resulta em perdas significativas de MS e os produtos da fermentação clostridiana reduzem a palatabilidade, além de diminuir a

estabilidade da silagem (MAHANNA, 1994; MUCK, 2010; ROTZ; MUCK, 1994).

A espécie de *Clostridium* mais conhecida que se desenvolve, principalmente, durante a fase de fermentação na silagem é *Clostridium tyrobutyricum*. No entanto, em silagens com concentrações de MS acima de 30% e pH reduzido, como na silagem de milho, por exemplo, geralmente não se verificam condições que favoreçam seu crescimento durante a fermentação, ficando o desenvolvimento de clostrídios restrito às áreas sujeitas à deterioração aeróbia. A silagem exposta ao ambiente atmosférico permite a entrada de oxigênio na massa e, então, os microrganismos aeróbios consomem os ácidos que foram produzidos durante a fermentação. O consumo destes ácidos e a presença de oxigênio levam à formação de micronichos, nos quais os fatores que inibiam a crescimento dos clostrídios são reduzidos ou ausentes e, nestas condições, estes microrganismos podem se multiplicar (BORREANI; TABACCO; COLOMBARI, 2002; DRIEHUIS; GIFFEL, 2005; JOHNSON et al., 2002).

Rossi e Dellaglio (2007), analisando a qualidade de silagens na Itália, observaram maiores contagens de células viáveis de *Clostridium* spp. em silagens de milho do que em silagem de alfafa. As principais espécies encontradas foram *C. beijerinckii*, *C. baratii*, *C. saccharolyticum*, *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* e *C. perfringens*, sendo esta última identificada somente em silagem de alfafa.

A presença de *Clostridium* spp. em silagens está associada à qualidade do leite. Isto se deve ao fato de os esporos de clostrídios serem capazes de sobreviver à passagem através do trato digestivo de uma vaca leiteira, podendo ser transferidos para o leite, via contaminação fecal do úbere (ELFERINK et al., 2000).

Outro grupo isolado em silagens são as bactérias do gênero *Bacillus*, que são aeróbias ou anaeróbias facultativas. As principais espécies isoladas de silagem incluem *B. cereus*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis* e *B. polymyxa*. A maioria das espécies tem enzimas sacarolíticas e proteolíticas e, por isso, são capazes de fermentar uma grande variedade de carboidratos a ácidos orgânicos, etanol, 2,3-butanodiol e glicerol. Além do fato de esses compostos não terem efeito na preservação da silagem, essas bactérias competem com as BAL por substratos fermentescíveis e ainda estão envolvidas na deterioração inicial da silagem (GIFFEL et al., 2002).

De acordo com Pahlow et al. (2003), em silagens de milho, a presença de *Bacillus* spp. pode variar de  $10^2$  a  $10^9$  esporos  $g^{-1}$  de silagem. Altos níveis de esporos frequentemente são observados nas camadas superficiais do silo e em áreas com crescimento de fungos filamentosos e leveduras, evidenciando, assim, o envolvimento deste microrganismo na deterioração de silagens (DRIEHUIS; RADEMAKER; WELLS-BENNIK, 2009).

Algumas espécies, tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis*, juntamente com *B. cereus*, têm sido associadas às doenças transmitidas por alimentos e à deterioração de diversos produtos lácteos (VAEREWIJCK et al., 2001).

Assim como os clostrídios, os esporos de bacilos sobrevivem à passagem pelo trato digestivo dos ruminantes e sua ocorrência no leite cru tem sido associada com alto número de esporos nas fezes (PAHLOW et al., 2003).

#### **2.3.2.4 Levedura**

As leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares, anaeróbios facultativos e heterotróficos. Sua importância no processo fermentativo da silagem está relacionada com perdas durante a fermentação e a deterioração aeróbia durante a fase de abertura, pois esse grupo de microrganismo é capaz de

exercer sua atividade metabólica tanto na presença quanto na ausência de oxigênio (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Assim, o crescimento desses microrganismos durante todas as fases do processo de ensilagem implica em perdas de MS.

Sob condições anaeróbias, as leveduras fermentam os carboidratos disponíveis produzindo etanol e CO<sub>2</sub> (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Esta produção de etanol na silagem não só diminui a quantidade de carboidratos disponíveis para as BAL, como também pode apresentar efeito negativo no sabor do leite produzido pelos animais alimentados com essas silagens (RANDBY; SELMER-OLSEN; BAEVRE, 1999). Sob condições aeróbias, muitas espécies de leveduras degradam o ácido láctico em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. A degradação do ácido láctico provoca um aumento no pH da massa ensilada, permitindo, desse modo, o crescimento de outros organismos deterioradores (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Algumas espécies de leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, são capazes de produzir etanol, mesmo em condições de aerobiose. No entanto, elevadas concentrações de açúcares são necessárias. Nessa condição, as enzimas necessárias à via respiratória são inibidas e ocorre somente o processo de fermentação alcoólica, sendo definido como “efeito Cabtree” (CRABTREE, 1929; DE DEKEN, 1966).

As leveduras são os microrganismos responsáveis pelo início da deterioração aeróbia em silagens (PAHLOW et al., 2003; WOOLFORD, 1990), embora as bactérias acéticas (SPOELSTRA; COURTAINE; BEERS, 1988) e outros microrganismos possam determinar a deterioração inicial (LINDGREN; PETERSSON; KASPERSON, 1985).

As leveduras envolvidas na deterioração aeróbia podem ser classificadas em dois grupos: as espécies que utilizam ácidos orgânicos (*Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula* e *Pichia*) e as que consomem açúcares, como as espécies que pertencem ao gênero *Torulopsis* (JONSSON; PAHLOW, 1984).

Segundo McDonald, Henderson e Heron (1991), as leveduras são capazes de desenvolverem-se em baixas concentrações de oxigênio e em ambientes com pH muito ácido (pH<4,0), ocorrendo a sucessão de populações ao longo das etapas de ensilagem.

Avaliando a ocorrência de leveduras em silagens de milho produzidas em ambientes de clima tropical, Carvalho et al. (2016) identificaram *Candida diversa*, *C. ethanolica*, *C. rugosa*, *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia manshurica*, *P. membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon asahii*, *T. japonicum* e *Rhodotorula* spp.

Durante as primeiras semanas de ensilagem, a população de leveduras pode chegar a  $10^7$  UFC g<sup>-1</sup>, ocorrendo um decréscimo gradual durante as etapas subsequentes de armazenagem (JONSSON; PAHLOW, 1984), e sua sobrevivência neste período depende do grau de anaerobiose, do pH e da concentração de ácidos orgânicos. As áreas do silo mais próximas à superfície são, por natureza, mais susceptíveis à infiltração de ar, devido à maior porosidade da massa e aos materiais utilizados na cobertura. Desse modo, a multiplicação das leveduras pode continuar lentamente durante todo o período de estocagem (BORREANI; TABACCO; COLOMBARI, 2002). Em silagens de milho, quando a massa entra em contato com o ar durante o desabastecimento do silo, populações de leveduras superiores a  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup> podem quebrar a estabilidade em poucas horas, conforme relatado por Muck (2008).

#### **2.3.2.5 Fungo filamentososo**

Os principais gêneros de fungos filamentosos que têm sido isolados de silagens são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Absidea*, *Monoascus*, *Scopulariopsis* e *Trichoderma*. Seu crescimento em silagens está associado a locais onde há penetração de ar durante a fase de armazenamento, mas,

principalmente, durante a fase de abertura do silo, na qual há maior difusão do oxigênio no material ensilado (EL-SHANAWAN; MOSTAFA; BARAKAT, 2005). Em silagens de milho produzidas em regiões de clima tropical foram observados *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus* e *Cladosporium* sp. (CARVALHO et al., 2016).

A presença de fungos filamentosos não só causa uma redução do valor nutritivo e na palatabilidade da silagem em função da degradação de proteínas, mas também pode ter efeitos negativos na saúde animal e humana, em função da produção de micotoxinas (ARCURI; CARNEIRO; LOPES, 2003; MAY, 1993). Alguns gêneros, como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, produzem micotoxinas que são produtos orgânicos do metabolismo secundário e podem, quando ingeridas, acarretar danos à saúde e à produtividade dos animais (FINK-GREMMELS, 2008; KOROSTELEVA; SMITH; BOERMANS, 2009; MAHANNA, 1994). A formação de micotoxinas na forragem é determinada por uma série de fatores, podendo-se destacar a presença de O<sub>2</sub>, o estresse da planta, o estágio de desenvolvimento em que a cultura foi cortada, o tipo de solo e as atividades sinérgicas ou antagônicas entre espécies de fungos (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008; WOOLFORD, 1990).

As principais micotoxinas relatadas em silagens de milho incluem aquelas produzidas por fungos dos gêneros: *Fusarium*, fumonisinas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, nivalenol, desoxinivalenol, zearalenona, 15-acetil-desoxinivalenol e eniatina B e B<sub>1</sub> (DRIEHUIS et al., 2008; ECKARD et al., 2011); *Alternaria*, alternariol e éter monometil alternariol (RICHARD et al., 2007); *Aspergillus*, aflatoxina B<sub>1</sub> (GARON et al., 2006) e *Penicillium* - andrastina A, toxina-PR, roquefortina A e C, ácido micofenólico e patulina (MANSFIELD; JONES; KULDAU, 2008; MÜLLER; AMEND, 1997).

Os principais sintomas de contaminação por micotoxinas nos animais incluem recusa alimentar, danos ao fígado, rins e pulmão, malformação em

fetos, aborto e morte do animal (SCUDAMORE; LIVESEY, 1998). Pesquisas têm sido realizadas no intuito de verificar a presença de BAL e identificar compostos antifúngicos produzidos por elas em silagens (MAGNUSSON; SCHNÜRER, 2001; STRÖM et al., 2002).

#### **2.4 Avaliação e identificação da diversidade microbiana em silagens**

Tradicionalmente, a identificação de microrganismos tem sido feita de acordo com suas propriedades fenotípicas e bioquímicas, como morfologia, tipo de fermentação, crescimento a diferentes temperaturas, assimilação de carboidratos e perfil de proteínas na membrana celular, entre outras características (RUIZ; SESEÑA; PALOP, 2014). No entanto, esses métodos de identificação apresentam limitações, tais como dispêndio de maior tempo e materiais para a realização das análises, além de seu baixo poder discriminatório (MORELLI, 2001). Nesse sentido, a identificação de microrganismos por meio de técnicas moleculares tem ganhado destaque em função de apresentarem resultados mais sensíveis e precisos, como relatado por vários autores (CALLON; MILLET; MONTEL, 2004; LICK, 2003; PROSSER et al., 2007).

Muitas técnicas de genotipagem podem ser aplicadas tanto como ferramentas para a identificação de espécies como para diferenciar as estirpes ao seu nível clonal. As principais vantagens destes métodos de tipagem consistem em seu poder discriminatório e na sua aplicabilidade universal (FARBER, 1996; RUIZ; SESEÑA; PALOP, 2014).

As técnicas moleculares, principalmente aquelas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), como *repetitive extragenic palindromic* (PCR) (REP-PCR) (TYNKKYNEN et al., 1999), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) (VENTURA; ZINK, 2002) e *randomly amplified polymorphic DNA-PCR* (RAPD-PCR) (GIRAFFA et al., 2000), entre outras

técnicas, tais como *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) (ZHONG et al., 1998), têm sido amplamente empregadas para a identificação intraespecífica e genotipagem de BAL. Estes métodos são baseados, principalmente, na detecção de polimorfismos de DNA entre as espécies ou estirpes clonais (AMOR; VAUGHAN; DE VOS, 2007).

A técnica de RAPD-PCR envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos do genoma, utilizando um único *primer* de sequência arbitrária (WELSH; MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS; RAFALSKI; TINGEY, 1990, 1993). Muitos fatores que influenciam a reprodutibilidade e o poder discriminatório da técnica de RAPD têm sido reportados. Dentre eles, os principais são a temperatura de anelamento, a concentração e a pureza do DNA e a combinação dos *primers* utilizados (AMOR; VAUGHAN; DE VOS, 2007).

A técnica de rep-PCR faz uso de *primers* complementares de sequências de DNA repetitivas altamente conservadas e presentes em múltiplas cópias no genoma da maioria das bactérias gram-negativas e várias gram-positivas (LUPSKI; WEINSTOCK, 1992).

Em geral, mais de um método é normalmente necessário para obter tanto a identificação como a tipagem de isolados desconhecidos (ROSSETTI; GIRAFFA, 2005). Em vários estudos tem sido relatado sucesso no uso da técnica RAPD-PCR para a diferenciação de isolados BAL (MANCINI et al., 2012; PARENTE et al., 2010; ROSSETTI; GIRAFFA, 2005). A técnica REP-PCR (VERSALOVIC et al., 1994; WOODS et al., 1993) também tem apresentado bons resultados em estudos de diversidade de BAL (ANTONIO; HILLIER, 2003; GEVERS; HUYS; SWINGS, 2001).

A análise da diversidade microbiana utilizando métodos independentes de cultivo tem sido amplamente utilizada, sendo empregada em pesquisas com diversos alimentos fermentados (ERCOLINI, 2004). Devido ao fato de muitos microrganismos apresentarem limitações de crescimento utilizando as técnicas

convencionais de cultivo, esse método pode fornecer uma visão incompleta da comunidade microbiana. Assim, análises da comunidade microbiana utilizando a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) têm se mostrado um método rápido e confiável para avaliar a dinâmica da diversidade e da população de comunidades microbianas presentes em diversas amostras, incluindo silagens (LI; NISHINO, 2011a, 2011c; PARVIN; NISHINO, 2009; WANG; NISHINO, 2008).

Santos et al. (2016), avaliando a diversidade de microrganismos presentes em silagens inoculadas com diferentes cepas de BAL em ambiente de clima tropical, relataram que, por meio da técnica de PCR-DGGE, foi possível observar microrganismos da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Clostridium*, além de identificar as BAL que foram inoculadas ao longo do processo fermentativo.

Li e Nishino (2011b), avaliando os efeitos da inoculação de *L. rhamnosus* e *L. buchneri* em silagens de milho utilizando a técnica de DGGE, observaram que a inoculação não alterou a comunidade indígena bacteriana e também apresentou pouco efeito sobre a comunidade de fungos durante o processo de fermentação.

Os mesmos autores, avaliando a comunidade bacteriana em silagens de milho colhidas em diferentes safras e armazenadas em diferentes silos do tipo bunker, relataram que a análise de DGGE pode indicar uma relação diferente entre os silos, e as diferenças dentro de um mesmo silo são indicadas pela determinação dos produtos da fermentação. Nesse sentido, a análise da comunidade bacteriana neste estudo provou que, além das BAL inoculadas, uma comunidade bacteriana diversificada esteve presente na silagem de milho (LI; NISHINO, 2011c).

### **3 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

O milho é a forrageira de maior expressão para ensilagem no mundo todo, no entanto, a qualidade da silagem é determinada, em grande parte, pelo tipo de atividade microbiológica durante o processo fermentativo e pelas práticas de ensilagem utilizadas.

No Brasil, são raros os trabalhos nos quais se avaliam a qualidade microbiológica das silagens produzidas, bem como as práticas de ensilagem e, principalmente, o efeito destas sobre o valor nutricional das silagens e, conseqüentemente, na produtividade animal.

Nesse sentido, o conhecimento das práticas de ensilagem em associação com a caracterização dos microrganismos encontrados nas silagens de milho produzidas nessas regiões se faz necessário. Dessa forma, é possível intervir durante as etapas de produção destas silagens, diagnosticando falhas que conduzem a maiores perdas em função da presença de microrganismos indesejáveis ao processo. Assim, será possível propor melhorias em toda a cadeia produtiva do leite, aumentando, conseqüentemente, a produtividade animal e a produção regional.

## REFERÊNCIAS

AFUAKWA, J. J.; CROOKSTON, R. K. Using the kernel milk line to visually monitor grain maturity in maize. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 4, p. 687-691, 1984.

ALI, M. et al. Relationship between chemical composition and in situ rumen degradation characteristics of maize silages in dairy cows. **Animal**, Cambridge, v. 8, n. 11, p. 1832-1838, 2014.

ALLEN, M. S.; COORS, J. G.; ROTH, G. W. Corn silage. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society Agronomy Crop Science, 2003. p. 547-608. (Agronomy Monograph, 42).

ALMEIDA FILHO, S. L. et al. Características agronômicas de cultivares de milho (*Zea mays* L.) e qualidade dos componentes da silagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 28, n. 1, p. 7-13, 1999.

AMARAL, R. C.; BERNARDES, T. F.; NUSSIO, L. G. **Estratégias de vedação de silos**: efeitos sobre o desempenho animal. 2011. Disponível em: <<http://www.atividaderural.com.br/artigos/4e189e73b8d4d.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2015.

AMOR, K. B.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, n. 3, p. 741-747, 2007.

ANTONIO, M. A.; HILLIER, S. L. D. N. A fingerprinting of *Lactobacillus crispatus* strain CTV-05 by repetitive element sequence-based PCR analysis in a pilot study of vaginal colonization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 5, p. 1881-1887, 2003.

ARCURI, P. B.; CARNEIRO, J. C.; LOPES, F. C. F. Microrganismos indesejáveis em forragens conservadas: efeito sobre o metabolismo de ruminantes. In: REIS, R. A.; BERNARDES, T. F.; SIQUEIRA, G. R. (Org.). **Volúmosos na produção de ruminantes**: valor alimentício de forragens. Jaboticabal: EMBRAPA, 2003. p. 51-69.

ARRIOLA, K. J. et al. Effect of applying bacterial inoculants containing different types of bacteria to corn silage on the performance of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 8, p. 3979-3979, Aug. 2011.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von (Ed.). **Lactic acid bacteria**. New York: M. Dekker, 2004. p. 1-63.

BAL, M. A. et al. Crop processing and chop length of corn silage: effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 6, p. 1264-1273, June 2000.

BERNARDES, T. F. et al. Produção e uso de silagens em fazendas leiteiras em três mesorregiões do Estado de Minas Gerais. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 56, n. 2, p. 133-138, abr./jun. 2013.

BERNARDES, T. F.; NUSSIO, L. G.; AMARAL, R. C. Top spoilage losses in maize silage sealed with plastic films with different permeabilities to oxygen. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 67, n. 1, p. 34-42, 2011.

BERNARDES, T. F.; RÊGO, A. C. do. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 3, p. 1852-1861, Mar. 2014.

BOLSEN, K. K. Managing bunker, trench, and drive-over pile silages for optimum nutritive value: four important practices. WESTERN DAIRY MANAGEMENT CONFERENCE, 6., 2003, Reno. **Proceedings...** Reno, 2003. p. 12-14.

BORREANI, G.; TABACCO, E.; COLOMBARI, G. Influenza del deterioramento aeróbico degli insilati sulla qualità dei prodotti caseari. **L'informatore Agrario**, Verona, v. 58, n. 11, p. 57-61, 2002.

CALLON, C.; MILLET, L.; MONTEL, M. C. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 71, n. 2, p. 231-244, May 2004.

CARVALHO, B. F. et al. Occurrence of mycotoxins and yeasts and moulds identification in corn silages in tropical climate. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, 2016. In press.

CORRÊA, C. E. S.; PEREIRA, M. N.; OLIVEIRA, S. G. Performance of holstein cows fed sugarcane or corn silages of different grain textures. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 621-629, 2003.

CRABTREE, H. G. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. **Biochemical Journal**, London, v. 23, p. 536-545, 1929.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A. **Cultivo do milho**. 5. ed. Brasília: EMBRAPA, 2009. 10 p.

DE DEKEN, R. H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. **Microbiology**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 149-156, 1966.

DER BEDROSIAN, M. C.; KUNG JUNIOR, L.; NESTOR JUNIOR, K. E. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 9, p. 5115-5126, Sept. 2012.

DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S. J. W. H. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **The Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 22, n. 1, p. 212-217, Jan./Mar. 2000.

DRIEHUIS, F. et al. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in The Netherlands. **Food Additives & Contaminants: part B: Surveillance**, London, v. 1, n. 1, p. 41-50, July 2008.

DRIEHUIS, F.; GIFFEL, M. C. Butyric acid bacteria spores in whole crop maize silage. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 14., 2005, Belfast. **Proceedings...** Belfast, 2005. p. 271.

DRIEHUIS, F.; RADEMAKER, J. L. W.; WELLS-BENNIK, M. H. J. The occurrence of spores of *Bacillus* and *Paenibacillus* in silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: US Dairy Forage Research Center; USDA - Agricultural Research Service, 2009. p. 377-378.

ECKARD, S. et al. Incidence of *Fusarium* species and mycotoxins in silage maize. **Toxins**, Basel, v. 3, n. 8, p. 949-967, Aug. 2011.

ELFERINK, S. J. W. H. et al. Silage fermentation process and their manipulation. In: FAO ELETRONIC CONFERENCE OF TROPICAL SILAGES, 1999, Rome. **Proceedings...** Rome: FAO, 2000. p. 17-30.

- EL-SHANAWANY, A. A.; MOSTAFA, M. E.; BARAKAT, A. Fungal populations and Mycotoxins in silage in Assuit and Sohag governorates in Egypt, with special reference to characteristic Asperigilli toxins. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 159, n. 2, p. 281-289, Feb. 2005.
- ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 297-314, Mar. 2004.
- FARBER, J. M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, p. 1091-1101, 1996.
- FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D. Impact of whole-plant corn silage hybrid type on intake, digestion, ruminal fermentation and lactation performance by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 4, p. 2662-2675, Apr. 2015.
- FERREIRA, J. J. Estágio de maturação ideal para ensilagem do milho e do sorgo. In: CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; RODRIGUES, J. A. S. (Ed.). **Produção e utilização de silagem de milho e sorgo**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2001. p. 405-428.
- FILYA, I. Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 116, n. 1/2, p. 141-150, Sept. 2004.
- FINK-GREMMELS, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. **The Veterinary Journal**, London, v. 176, n. 1, p. 84-92, 2008.
- FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, n. 2, p. 231-240, Feb. 2008.
- GARON, D. et al. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 9, p. 3479-3484, May 2006.
- GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 205, n. 1, p. 31-36, Nov. 2001.

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

GIRAFFA, G. et al. Molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* as revealed by genotypic characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1259-1265, Apr. 2000.

GOMES, M. S. et al. Avaliação de cultivares de milho para a produção de silagem: parâmetros genéticos e interação genótipos por ambientes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2002, Goiânia. **Anais...** Goiânia: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2002. 1 CD-ROM.

GRIFFITHS, N. W. et al. Crops and by-products for silage. In: KAISER, A. G. et al. (Ed.). **Successful silage**. 2<sup>nd</sup> ed. Melbourne: Department of Primary Industries and Dairy Australia, 2004. p. 110-141.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: DWORKIN, M. et al. (Ed.). **The Prokaryotes, an evolving electronic resource for the microbiological community**. New York: Springer-Verlag, 2003. p. 320-403.

HARRISON, J. H.; BLAUWIEKEL, R. Fermentation and utilization of grass silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 10, p. 3209-3235, Oct. 1994.

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

HERON, S. J. E.; WILKINSON, J. F.; DUFFUS, C. M. Enterobacteria associated with grass and silages. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, p. 13-17, 1993.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Veterinary microbiology**. Massachusetts: Blackwell Science, 2004. 536 p.

JAREMTCHUK, A. R. et al. Características agronômicas e bromatológicas de vinte genótipos de milho (*Zea mays* L.) para silagem na região leste paranaense. **Acta Scientiarum Animal Science**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 181-188, 2005.

JOHNSON, L. M. et al. Corn silage management: effects of hybrid, chop length, and mechanical processing on digestion and energy content. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 1, p. 208-231, 2003.

JOHNSON, L. M. et al. Corn silage management: effects of maturity, inoculation, and mechanical processing on pack density and aerobic stability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 2, p. 434-444, Feb. 2002.

JONSSON, A.; PAHLOW, G. Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures. **Animal Research and Development**, Tubingen, v. 20, n. 3, p. 7-22, 1984.

JULIEN, M. C. et al. Sources of clostridia in raw milk on farms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 20, p. 6348-6357, Oct. 2008.

KHAN, N. A. et al. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 95, n. 2, p. 238-252, Jan. 2015.

KONONOFF, P. J.; HEINRICHS, A. J.; LEHMAN, H. A. The effect of corn silage particle size on eating behavior, chewing activities, and rumen fermentation in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 10, p. 3343-3353, Oct. 2003.

KOROSTELEVA, S. N.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J. Effects of feed naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on metabolism and immunity of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 4, p. 1585-1593, Apr. 2009.

KUNG, L.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 305-360.

LI, Y.; NISHINO, N. Bacterial and fungal communities of wilted Italian ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 314-321, Sept. 2011a.

LI, Y.; NISHINO, N. Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. **Journal of Japanese Grassland Science**, Tokyo, v. 57, n. 2, p. 184-191, Feb. 2011b.

LI, Y.; NISHINO, N. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 110, n. 6, p. 1561-1570, Dec. 2011c.

LICK, S. Typing systems for lactobacilli. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 58, n. 5/6, p. 256-260, 2003.

LIN, C. et al. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 73, p. 375-387, 1992.

LINDGREN, S.; OLDENBURG, E.; PAHLOW, G. Influence of microbes and their metabolites on feed and food quality. In: GENERAL MEETING OF THE EUROPEAN GRASSLAND FEDERATION, 19., 2002, La Rochelle. **Proceedings...** La Rochelle, 2002. p. 503-511.

LINDGREN, S.; PETTERSSON, K.; KASPERSON, A. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 36, n. 9, p. 765-774, Sept. 1985.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in procaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, p. 4525-4529, 1992.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MAGNUSSON, J.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 1-5, Jan. 2001.

MAHANNA, B. Proper management assures high-quality silage, grains. **Feedstuffs**, Minnetonka, v. 10, p. 12-56, Jan. 1994.

MANCINI, A. et al. Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNA Ala-23S rDNA-RFLP. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 380-390, 2012.

MANSFIELD, M. A.; JONES, A. D.; KULDAU, G. A. Contamination of fresh and ensiled maize by multiple *Penicillium* mycotoxins. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, p. 330-336, Mar. 2008.

MAY, J. J. Respiratory problems associated with work in silos. In: NATIONAL SILAGE PRODUCTION CONFERENCE, 1993, Syracuse. **Proceedings...** Syracuse, 1993. p. 283-290.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **Biochemistry of silage**. 2<sup>nd</sup> ed. Marlow: Chalcombe, 1991. 340 p.

MELLO, R.; NORBERG, J. L.; ROCHA, M. G. Características produtivas e qualitativas de híbridos de milho para produção de silagem. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 4, n. 1, p. 79-94, 2005.

MERRY, R. J.; LOWES, K. F.; WINTERS, A. Current and future approaches to biocontrol. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM FORAGE CONSERVATION, 8., 1997, Brno. **Proceedings...** Brno, 1997. p. 17-27.

MORELLI, L. **Taxonomy and physiology of lactic acid bacteria, effects and function on nutrition**: report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation on health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with lactic acid bacteria. New York: Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2001. Disponível em: <<ftp://fao.org/es/esn/food/Morelli.pdf>>. Acesso em: 3 jan. 2016.

MUCK, R. E. Improving alfalfa silage quality with inoculants and silo management. In: ANNUAL CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 70., 2008, Syracuse. **Proceedings...** Syracuse: Cornell University, 2008. p. 137-146.

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, p. 183-191, jul. 2010. Número especial.

MÜLLER, H. M.; AMEND, R. Formation and disappearance of mycophenolic acid, patulin, penicillic acid and PR toxin in maize silage inoculated with *Penicillium roqueforti*. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v. 50, n. 3, p. 213-225, 1997.

NEUMANN, M. et al. Aplicação de procedimentos técnicos na ensilagem do milho visando maior desempenho animal. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 4., 2011, Maringá. **Anais...** Maringá: Sthampa, 2011. p. 95-130.

NEUMANN, M. et al. Características da fermentação da silagem obtida em diferentes tipos de silos sob efeito do tamanho de partícula e da altura de colheita das plantas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 847-854, maio/jun. 2007.

NOVAES, L. P.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. **Silagens: oportunidades e pontos críticos**. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 2004. 10 p. (Comunicado Técnico, 43).

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; DIAS, F. N. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2001. p. 127-145.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-94.

PARENTE, E. et al. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 2, p. 270-279, 2010.

PARVIN, S. et al. Effects of inoculation with lactic acid bacteria on the bacterial communities of Italian ryegrass, whole crop maize, guinea grass and rhodes grass silages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 160, n. 3/4, p. 160-166, Sept. 2010.

PARVIN, S.; NISHINO, N. Bacterial community associated with ensilage process of wilted guinea grass. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, n. 6, p. 2029-2036, Dec. 2009.

PEREIRA, L. G. R. et al. **Alimentos para gado de leite**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2009. 568 p.

PIMENTEL, J. O.; SILVA, J. F. C.; VALADARES FILHO, S. Efeito da suplementação proteica no valor nutritivo de silagens de milho e sorgo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 27, n. 5, p. 1042-1049, set./out. 1998.

PROSSER, J. I. et al. The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, May 2007.

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

RESTLE, J. et al. Manipulação do corte do sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench) para confecção de silagem, visando a produção do novilho superprecoce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 31, n. 3, p. 1481-1490, maio/jun. 2002.

RICHARD, E. et al. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 12, p. 2420-2425, Dec. 2007.

ROSA, J. R. P. et al. Avaliação do comportamento agrônomo da planta e valor nutritivo da silagem de diferentes híbridos de milho (*Zea mays*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, p. 302-312, mar./abr. 2004.

ROSSETTI, L.; GIRAFFA, G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 63, n. 2, p. 135-144, Nov. 2005.

ROSSI, F.; DELLAGLIO, F. Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 5, p. 1707-1715, Nov. 2007.

ROTZ, C. A.; MUCK, R. E. Changes in forages quality during harvest and storage. In: NATIONAL CONFERENCE ON FORAGE QUALITY, EVALUATION, AND UTILIZATION HELD AT THE UNIVERSITY OF NEBRASKA, 1994, Lincoln. **Proceedings...** Lincoln, 1994. p. 828-868.

RUIZ, P.; SESEÑA, S.; PALOP, M. L. A. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of lactic acid bacteria. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 239, n. 1, p. 87-98, 2014.

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

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

SANTOS, A. O. et al. Fermentative profile and bacterial diversity of corn silages inoculated with new tropical lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 120, n. 2, p. 266-279, 2016.

SANTOS, E. M. et al. Lactic acid bacteria in tropical grass silages. In: KONGO, M. (Ed.). **Lactic acid bacteria: R&D for food, health and livestock purposes**. Rijeka: InTech, 2013. p. 335-362.

SCUDAMORE, K. A.; LIVESEY, C. A. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 77, n. 1, p. 1-7, 1998.

SENGER, C. C. D. et al. Composição e digestibilidade 'in vitro' de silagens de milho com distintos teores de umidade e níveis de compactação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1393-1399, 2005.

SHINNERS, K. J. et al. Processing whole-plant corn silage with crop processing rolls on a pull-type forage harvester. **Applied Engineering in Agriculture**, Saint Joseph, v. 16, n. 4, p. 323-331, 2000.

SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F.; REIS, R. A. Instabilidade aeróbia de silagens: efeitos e possibilidades de prevenção. In: REIS, R. A.; SIQUEIRA, G. R.; BERTIPAGLIA, L. M. A. (Ed.). **Volúmosos na produção de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2005. p. 25-60.

SPOELSTRA, S. F.; COURTAINE, M. G.; BEERS, J. A. C. van. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v. 111, n. 2, p. 127-132, Mar. 1988.

STROM, K. et al. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 9, p. 4322-4327, Sept. 2002.

SULC, R. M.; THOMISON, P. R.; WEISS, W. P. Reliability of the kernel milkline method for timing corn silage harvest in Ohio. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v. 9, n. 3, p. 376-381, July/Sept. 1996.

TAŞCI, F.; TÜRÜTOĞLU, H.; ÖGÜTÇÜ, H. Investigations of *Listeria* species in milk and silage produced in Burdur province. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, Kafkas, v. 16, n. 1, p. 93-97, 2010.

TOHNO, M. et al. Genotypic and phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian ryegrass silage. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 83, p. 111-120, Feb. 2012.

TYNKKYNNEN, S. et al. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA Analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 3908-3914, 1999.

VAEREWIJK, M. J. M. et al. Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 6, p. 1074-1084, Dec. 2001.

VENTURA, M.; ZINK, R. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 217, n. 2, p. 141-154, Dec. 2002.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). Using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). **Methods in Molecular and Cellular Biology**, Heidelberg, v. 5, p. 25-40, 1994.

VILAR, M. J. et al. Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 11, p. 5083-5088, Nov. 2007.

VISSERS, M. M. M. et al. Concentrations of butyric acid bacteria spores in silage and relationships with aerobic deterioration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 2, p. 928-936, 2007.

WANG, F.; NISHINO, N. Ensiling of soybean curd residue and wet brewers grains with or without other feeds as a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 6, p. 2380-2387, June 2008.

WEINBERG, Z. G.; ASHBELL, G. Engineering aspects of ensiling. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 181-188, Mar. 2003.

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

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, New York, v. 218, n. 1, p. 704-740, 1993.

WOODS, C. R. et al. Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 7, p. 1927-1931, 1993.

WOOLFORD, M. K. The detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 68, n. 2, p. 101-116, Mar. 1990.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York: M. Dekker, 1984. 350 p.

ZHONG, W. et al. Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2418-2423, 1998.

ZOPOLLATTO, M. et al. Biometric relations between maturity stage and productivity of corn cultivars for silage production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 38, n. 2, p. 256-264, Feb. 2009.

## CAPÍTULO 2

### Caracterização de silagens de milho produzidas em Minas Gerais e associação com práticas de ensilagem

#### RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de compreender as práticas de ensilagem, bem como suas correlações com as características bromatológicas, microbiológicas e o perfil fermentativo de silagens de milho produzidas em fazendas leiteiras localizadas nas mesorregiões Campo das Vertentes, Sul e Sudoeste do estado de Minas Gerais. Foi feito um levantamento sobre as práticas de produção e uso de silagem de milho, das características de produção de leite, e análises bromatológicas e microbiológicas, bem como do perfil de metabólitos das silagens produzidas nas regiões. Entre as propriedades avaliadas, 51,9% apresentaram número inferior a 50 animais com produção diária abaixo de 500 litros de leite. O elevado volume de leite produzido nas regiões avaliadas ocorreu em resposta à maior quantidade de animais e não à produtividade animal. Grande diversidade de híbridos de milho foi observada para a produção de silagem e as cultivares de grãos com textura semidura foram as mais relatadas, sendo utilizadas por 38,9% dos produtores. A maioria dos produtores (87,0%) faz uso de colhedoras tracionadas por trator e 66,7% têm os próprios equipamentos para a ensilagem. O uso de lonas do tipo dupla face para a vedação dos silos foi a mais citada (55,6%) pelos produtores. A utilização de aditivos microbianos é uma prática pouco comum nas propriedades avaliadas, sendo observada em apenas 27,8% delas. Aproximadamente 54,0% das amostras apresentaram temperaturas superiores a 2 °C, além da temperatura observada no ambiente, indicando quebra da estabilidade aeróbia; 61,1% apresentaram população de BAL superior a  $6,01 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ . A população média de enterobactérias e *Bacillus* spp. foi de, respectivamente, 4,23 e  $4,09 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ . A composição bromatológica e a população de microrganismos das silagens avaliadas apresentaram valores dentro do esperado para silagens de milho. Maior diversidade de bactérias do ácido lático foi observada nas silagens que apresentaram melhor qualidade bromatológica. No entanto, melhorias nas práticas de ensilagem podem ser empregadas, visando, assim, inibir o crescimento de microrganismos deterioradores e melhorar o valor nutritivo das silagens e, conseqüentemente, a produção leiteira regional.

Palavras-chave: Silagem de milho. DGGE. Bactéria do ácido lático. Propriedades leiteiras. Minas Gerais.

## ABSTRACT

This study aimed to understand silage practices, as well as their correlation with bromatological and microbiological characteristics and fermentation profile of corn silage produced in dairy farms located in Campo das Vertentes, South and Southwest of the State of Minas Gerais mesoregions. A survey was made on the production and use practices of corn silage, milk production traits, bromatological and microbiological analysis as well as the metabolites profile. The 51.9% of the evaluated properties had fewer than 50 animals with daily production below 500 liters of milk. The high volume of milk produced in the evaluated regions occurred in response to higher amount of animals and not related to animal productivity. Great diversity of corn hybrids for silage was observed and grain varieties with semi-flint texture were the most reported, being used by 38.9% of the producers. Most producers (87.0%) make use of harvesters pulled by tractor and 66.7% have their own equipment for silage. Double-sided plastic film was the most cited (55.6%) by producers as a tool for sealing the silos. The use of microbial additives is an uncommon practice in the evaluated properties, being observed in only 27.8% of the properties. Approximately 54.0% of the samples had temperatures higher than 2°C beyond the ambient temperature observed, indicating breakdown of aerobic stability. The 61.1% of the samples showed a LAB population greater than 6.01 log CFU g<sup>-1</sup>, the average population between bacteria and *Bacillus* spp were respectively 4.23 and 4.09 log CFU.g<sup>-1</sup>. The bromatological composition and the microorganism population in the silages evaluated showed values within the expected range for corn silage. Greater diversity of lactic acid bacteria was observed in silages that showed better quality. However, improvements in silage practices may be introduced in order to inhibit the growth of spoilage microorganisms, and improve the nutritional value of the silage and consequently regional milk production.

Keywords: Maize silage. DGGE. Lactic acid bacteria. Dairy properties. Minas Gerais.

## 1 INTRODUÇÃO

A forragem mais utilizada para a ensilagem é a planta de milho, cultivada com este propósito em grandes áreas ao redor do mundo (KHAN et al., 2015). A alta elegibilidade dessa forrageira para a confecção de silagem deve-se ao fato de apresentar teor de matéria seca propício ao processo fermentativo, baixo poder tampão e alto teor de açúcares solúveis (RESTLE et al., 2006). Além disso, apresenta alta produção de matéria seca por hectare de alto conteúdo energético. A fração grãos representa mais de 45% da matéria seca total da planta (PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1998) e apresenta em torno de 72% de amido (HUNTINGTON, 1997). O amido é um nutriente de alta digestibilidade (FERRARETTO; SHAVER, 2015), importante em dietas para animais de alta produção de leite.

Entretanto, o valor nutritivo da silagem de milho pode variar de acordo com o teor de matéria seca (SHINNERS et al., 2000), o tipo de híbrido (FERRARETTO; SHAVER, 2015), o tamanho médio de partículas (JOHNSON et al., 2002), o grau de processamento dos grãos (BAL et al., 2000), o tempo de armazenamento (DER BEDROSIAN; KUNG JUNIOR; NESTOR JUNIOR, 2012), as práticas de ensilagem (WEINBERG; ASHBELL, 2003), o perfil fermentativo e o uso de aditivos (ARRIOLA et al., 2011). Devido à crescente utilização desta forrageira como principal alimento fornecido a animais de alto desempenho, é importante quantificar a variação do seu valor nutritivo (KHAN et al., 2015).

Em termos de volume de produção de leite, o Brasil é considerado a quarta maior potência mundial e o estado de Minas Gerais responde por mais de um quarto da produção nacional (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - FOREIGN AGRICULTURE SERVICE - USDA-FAS, 2015). Uma característica notória da produção leiteira no Brasil, e que se repete

no estado de Minas Gerais, é a heterogeneidade entre os produtores. Apesar da predominância de pequenos produtores com participação proporcionalmente menor no volume total de leite produzido, grandes empreendimentos especializados são observados no estado (HOTT et al., 2009).

O processo de ensilagem envolve aspectos agronômicos, físicos, químicos e microbiológicos, que estão integrados e influenciam diretamente a qualidade da silagem produzida. Entretanto, poucos trabalhos foram realizados correlacionando a qualidade químico-microbiológica das silagens produzidas com as práticas de ensilagem. Bernardes e Rêgo (2014) realizaram um estudo avaliando as práticas de produção de silagem em fazendas produtoras de leite distribuídas nas principais bacias leiteiras do país e constataram inúmeras limitações que precisam ser superadas para melhorar a produção e utilização de silagem em fazendas leiteiras no Brasil. Porém, a qualidade bromatológica e microbiológica dessas silagens não foi avaliada.

No estado de Minas Gerais, as mesorregiões Campo das Vertentes, Sul e Sudoeste foram caracterizadas pela grande importância para a pecuária leiteira mineira e constituíram, por muitos anos, as principais bacias leiteiras do estado. Contudo, nos últimos anos, tem sido observada uma migração da pecuária para a região do cerrado brasileiro e, dessa maneira, nota-se um maior crescimento da produção nas mesorregiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, em detrimento da produção nas bacias leiteiras mais tradicionais (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014).

Sendo assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de compreender as práticas de ensilagem, bem como suas correlações com as características bromatológicas, microbiológicas e perfil fermentativo, em fazendas leiteiras localizadas nas mesorregiões Campo das Vertentes, Sul e Sudoeste do estado de Minas Gerais. Este é o primeiro estudo a associar as práticas de produção com a qualidade química e microbiológica de silagens de

milho produzidas nas regiões avaliadas. A partir deste estudo será possível propor práticas de melhoria na qualidade da silagem produzida e, conseqüentemente, contribuir para a produção leiteira regional.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Perfil das propriedades e das práticas de ensilagem**

As amostras para o estudo foram coletadas nas mesorregiões Sul, Sudoeste e Campo das Vertentes do estado de Minas Gerais (Figura 1). Essas mesorregiões foram subdivididas e as amostragens foram feitas nas microrregiões de Lavras (1), Elói Mendes (2), Silvianópolis (3), São Sebastião do Paraíso (4), Passos (5), Muzambinho (6), Piranguinho (7), Itumirim (8) e Nepomuceno (9), que correspondem às cidades mais representativas no atual cenário de produção de leite da região. Foram selecionadas seis fazendas em cada microrregião, totalizando 54 unidades experimentais. A partir da seleção das fazendas, foi realizada uma visita para fazer o levantamento, por meio de questionário aplicado aos produtores (Figura 2), das características de produção e uso de silagem de milho, bem como das características de produção de leite.



Figura 1 Mapa representativo das mesorregiões Sul, Sudoeste e Campo das Vertentes

Fonte: Adaptado de IBGE (2016)

DADOS DA FAZENDA						
Nome:					Código UFLA:	
Localização:					Região:	
Proprietário:					Contato:	
Área aproximada:						
Número de animais:						
Produção diária de leite:						
Responsável técnico Emater:					Contato:	
Participante do projeto Minas Leite:	Não		Sim			
CARACTERÍSTICAS DO PROCESSO DE ENSILAGEM						
Híbrido plantado:						
Idade da cultura na colheita:						
Data da colheita:						
Procedimento de corte:						
Capacidade do silo (m <sup>3</sup> ):						
Altura (m):						
Comprimento (m):						
Base inferior (m):						
Base superior (m):						
Área da face (m <sup>2</sup> ):						
Tipo de cobertura (lona):						
Utilização de aditivo:	Não		Sim		Qual?	
Forma de compactação:						
Tempo de enchimento dos silos:						
Tempo de fermentação:						
Taxa diária de retirada aproximada:						
CARACTERÍSTICAS DA SILAGEM						
Temperatura ambiente (C°):					Temperatura silagem (C°):	
				1-	4-	7-
				2-	5-	8-
				3-	6-	9-
pH:						
Aspecto:						
Odor:						
Cor:						
MÁQUINAS UTILIZADAS NO PROCESSO DE ENSILAGEM						
Possui trator e ensiladora própria ou são alugados?			Próprio	Alugado	Cooperativa	
Ensiladora utilizada (empresa fabricante e modelo)						
Trator utilizado (empresa fabricante e modelo)						
A ensiladora possui quebrador de grãos?	Não		Sim			
Qual a frequência com que são afiadas as facas e contra-facas da ensiladora?						
Não é feito						
Apenas no início da ensilagem						
Várias vezes durante a ensilagem					vezes aproximadamente	
<b>OBSERVAÇÕES:</b>						

Figura 2 Formulário de coleta das amostras de silagem de milho

## 2.2 Análises físico-químicas e bromatológicas

A temperatura da silagem foi avaliada em nove pontos equidistantes, para representar o painel do silo avaliado, com auxílio de termômetro analógico inserido a uma profundidade de 20 cm.

As amostras de silagem foram retiradas em toda a face do silo e homogeneizadas. Parte das amostras foi pesada e seca em estufa de ventilação forçada (Modelo 320 E, Fanem, São Paulo, Brasil), a 55 °C, por 72 horas. Outra parte foi utilizada para preparar um extrato aquoso para determinar o valor do pH, avaliar a população de microrganismos e detectar os produtos finais da fermentação. As amostras secas foram moídas em moinho do tipo Willey (MA-340, SP Labor, São Paulo, Brasil), utilizando peneira de 30 mesh, e armazenadas em recipientes plásticos. As amostras foram analisadas quanto ao conteúdo de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) pelo método de Kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC, 1990). A análise de fibra em detergente neutro foi realizada de acordo com Soest, Robertson e Lewis (1991), com uso de sódio sulfito e os carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados pela diferença aritmética das variáveis bromatológicas convencionais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2001). O tamanho médio de partículas foi avaliado pelo sistema de separação de partículas Penn State, segundo Kononoff, Heinrichs e Lehman (2003). A estimativa da produção de leite por tonelada de MS foi simulada com o auxílio da planilha MILK 2006, desenvolvida por Shaver e Lauer (2006).

Amostras de 25 g foram colocadas assepticamente em 225 mL de água peptonada estéril (0,1%) e agitadas, durante 20 minutos, a 120 rpm, em agitador orbital (Modelo 430, Nova Ética, São Paulo, Brasil) por 20 minutos. O pH foi determinado nos extratos obtidos, por meio de um potenciômetro digital (Digimed Analítica, modelo DM 20®) e uma porção de 2 mL deste extrato foi

acidificada com 10 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, na concentração de 50% (v/v) (CANALE; VALENTE; CIOTTI, 1984), tendo sido utilizada, posteriormente, para a mensuração dos teores de etanol, ácido lático e ácidos graxos voláteis, por cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu modelo LC-10Ai; Shimadzu Corp., Tóquio, Japão) (CARVALHO et al., 2012).

### **2.3 Análises microbiológicas**

O extrato aquoso obtido foi utilizado para a enumeração dos microrganismos. Diluições decimais foram preparadas para quantificar os grupos microbianos. A contagem de BAL foi realizada em meio de Man Rogosa-Sharpe (MRS) (M641I, HiMedia; Mumbai, Índia), acrescido de nistatina (0,4%). As placas foram incubadas, a 37 °C, durante 48 horas. Microrganismos da família *Enterobacteriaceae* foram enumerados por plaqueamento no meio Eosin Methylene Blue Agar (EMB, Difco; Sparks, USA), após 24 horas de incubação, a 37 °C. As amostras para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos esporulantes foram previamente pasteurizadas, a 80 °C, por 10 minutos para induzir a esporulação e o meio ágar nutriente (M001, HiMedia; Mumbai, Índia) foi utilizado para a contagem desses microrganismos. As placas foram incubadas, a 37 °C, por 24 horas, sob condições aeróbicas. Leveduras e fungos filamentosos foram enumerados em meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC, Difco; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA), após incubação, a 28 °C, por 72 horas.

### **2.4 Avaliação da diversidade bacteriana**

A partir dos resultados obtidos das contagens dos microrganismos, dos valores de pH e de temperatura das silagens avaliadas e relacionando com as

práticas de ensilagem adotadas nas diferentes fazendas, foram escolhidas duas propriedades de cada região que apresentaram os melhores e os piores resultados para avaliação da diversidade bacteriana por meio da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

Para a extração do DNA, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 3 minutos. A purificação do DNA total foi realizada utilizando-se o kit comercial QiAamp DNA Mini Kit - Qiagen (Chatsworth, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA, depois de terem sido purificadas e verificada a eficiência da extração em gel de agarose 1%, foram amplificadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

A PCR foi utilizada para amplificar uma região variável (V3) do gene RNAr 16S bacteriano (MUYZER; SMALLA, 1998), utilizando-se os *primers* 968f GC (5'- CGGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGACGCGAAGAACCTTAC-3') e 1401r (5'- GCGTGTGTACAAGACCC-3'). As reações de PCR foram realizadas conforme procedimento estabelecido por Ramos et al. (2010). Os produtos da PCR foram separados em gel de poliacrilamida [8% (w/v) acrilamida:bisacrilamida (37.5:1)] em tampão TAE 1x em sistema DCode (BioRad Universal DCode Mutation Detection System, Richmond, CA, USA). Soluções contendo entre 20% a 50% de gradiente desnaturante (100% de desnaturante corresponde a 7 M ureia e 40% (v/v) de formamida) foram utilizadas para avaliação da comunidade bacteriana. A eletroforese foi realizada, a 60 °C, por um período de 4.5 h a uma voltagem constante de 150 V. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de SYBR-Green I (Molecular Probes, Eugene, UK) (1:10.000 v/v) por 30 minutos e a imagem do gel visualizada e fotografada em transiluminador (LPIX®, Loccus Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil).

As bandas foram excisadas do gel e reamplificadas com os *primers* 968f e 1401r, nas condições descritas anteriormente e os produtos da PCR foram

enviados para sequenciamento no GATC Biotech. As sequências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis na base de dados GenBank, utilizando-se o algoritmo BLAST (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA).

## **2.5 Análises estatísticas**

Os dados relacionados às características das fazendas e os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas foram agrupados e analisados por meio de testes de correlação linear de Pearson, utilizando-se o software XLSTAT, versão 2014.1.

Análise de regressão múltipla foi realizada utilizando-se o procedimento de seleção stepwise no software SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE - SAS INSTITUTE, 2012), para selecionar o melhor modelo de regressão ( $P < 0,05$ ). A melhor equação para cada parâmetro foi selecionada utilizando-se o coeficiente de determinação e o erro quadrático médio. Os modelos foram selecionados com base no maior valor de  $R^2$  ajustado com o menor número de variáveis. A seleção do modelo também foi baseada na avaliação visual dos lotes residuais. Todos os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) relatados foram ajustados para graus de liberdade.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Perfil das propriedades**

O número de animais em lactação, nas propriedades avaliadas, variou entre 8 a 1.000 animais. Do total de propriedades avaliadas, 51,9% apresentaram menos de 50 animais constituindo o rebanho leiteiro; 25,9%, entre 51 e 100 animais; 18,5%, entre 101 e 500 animais e apenas 3,7% das propriedades apresentaram rebanho leiteiro com tamanho acima de 501 animais (Tabela 1).

Embora a produção de leite nas regiões avaliadas tenha apresentado variação de 90 a 15.000 L/dia, foi verificada predominância de fazendas com menores produções diárias. Os estabelecimentos com produção inferior a 500 L/dia representaram 42,6% do total e respondem por 9,2% do total de leite produzido nas regiões avaliadas. Cerca de 26% das propriedades apresentam produção diária entre 501 e 1.000 L/dia, sendo responsáveis por 13,5% da produção regional e, em 24,1% delas, a produção varia entre 1.001 e 5000 L/dia e respondem por 33,5% da produção. Um percentual menor das propriedades (7,4%) apresentou produção diária de leite acima de 5.000 L, no entanto, foi responsável pela maior parte da produção regional (43,8%). O perfil de produção verificado nas fazendas corroborou as observações feitas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), segundo as quais os pequenos produtores representam a maioria (58%) na cadeia de produção de leite, nas diferentes regiões do país.

Tabela 1 Características associadas com a produção de leite

Variável	% respostas	Mínimo	Máximo	Média
Número de animais				
< 50	51,9			
51 - 100	25,9	8	1000	99
101 - 500	18,5			
> 500	3,7			
Produção de leite (L/dia)				
< 500	42,6			
501 - 1000	25,9	90	15000	1401
1001 - 5000	24,1			
> 5001	7,4			
Produtividade animal (L/dia)				
< 10	29,6			
11 - 20	37,0	3	28	16
> 21	33,3			

A produção de leite por animal variou entre 3 e 28 L/dia. Do total de fazendas estudadas, 29,6% tinham animais com produção inferior a 10 L/dia; 37,0% entre 11 e 20 L/dia e 33,3%, animais com produção diária acima de 21 L de leite (Tabela 1). Embora o Brasil esteja entre os dez principais países produtores no mundo, ainda apresenta o rebanho menos produtivo, e a elevada produção nacional ocorre devido ao elevado número de animais (IBGE, 2014).

### 3.2 Práticas de ensilagem

Do total de produtores entrevistados, 22,2% relataram desconhecer o tipo de milho que foi cultivado e se o mesmo atendia à especificação para produção de silagem. Das propriedades avaliadas, em 38,9% foram utilizadas cultivares de milho de grãos semiduros (entre 40% e 70% do endosperma vítreo); 25,9% utilizaram os grupos de baixa dureza ou farináceos (<40% do endosperma vítreo) e 13,0% utilizaram híbridos duros (>70% do endosperma vítreo) (Tabela 2). A dureza é uma característica física que influencia a

qualidade e o processamento dos grãos de milho, e a vitreosidade é uma medida indireta da dureza, sendo esta última uma variável que afeta negativamente a digestibilidade do amido presente no grão de milho (CORREA et al., 2002).

Dentre 477 híbridos de milho disponibilizados no mercado brasileiro de sementes na safra 2015/2016, 8,9% eram farináceos, 66,6% semiduros e 24,1% de endosperma caracterizado como duro (CRUZ et al., 2015). Os grãos mais duros têm vantagem no armazenamento e maior qualidade de germinação, sendo utilizados pelas indústrias alimentícias, enquanto os grãos dentados são recomendados para a produção de silagem (CRUZ; PEREIRA FILHO, 2009). A menor utilização de híbridos mais farináceos pode ser parcialmente explicada pela baixa disponibilidade desses híbridos no mercado, aliada à menor ênfase dada a essa característica por parte dos produtores.

Quando questionados sobre o ponto de corte do milho para a confecção da silagem, a grande maioria dos produtores relatou utilizar a posição da linha do leite no grão e teor de matéria seca da planta como indicativos do momento ideal da colheita, sendo realizada quando a linha do leite é visualizada na metade do grão e o teor de matéria seca atinge, aproximadamente, 33%. O teor de matéria seca observado nas amostras avaliadas variou entre 28,4% a 40,5%. Esta variação considerável pode estar relacionada ao baixo rendimento das colhedoras utilizadas, a diferenças fenotípicas dos híbridos plantados, assim como à imprecisão na definição correta do ponto de metade da linha do leite.

Tabela 2 Características associadas com as práticas de ensilagem

Variável	% de respostas	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
<i>Textura do híbrido plantado</i>					
Farináceo	25,9				
Duro	13,0	--	--	--	--
Semiduro	38,9				
Desconhecido	22,2				
<i>Origem do maquinário utilizado</i>					
Próprio	66,7				
Alugado	24,1	--	--	--	--
Cooperativa	9,3				
<i>Características da colhedora</i>					
Tracionada por trator	87,0	--	--	--	--
Autopropelida	13,0				
<i>Colhedora com quebrador de grãos</i>					
Sim	20,4	--	--	--	--
Não	79,6				
<i>Afiamento das facas da colhedora</i>					
Início da ensilagem	9,3				
Diariamente	38,9	--	--	--	--
Mais de uma vez ao dia	33,3				
<i>Tamanho médio de partícula (mm)</i>					
Até 7,5	24,1	6,4	11,9	8,6	1,3
7,6-9,5	53,7				
Acima 9.6	22,2				
<i>Capacidade do silo (m<sup>3</sup>)</i>					
Até 100	13,0				
101-250	44,4	72,0	1375,0	299,0	250,6
251-500	25,9				
501-750	9,3				
Acima 751	7,4				
<i>Uso de aditivo</i>					
Sim	27,8	--	--	--	--
Não	72,2				
<i>Tipo de cobertura</i>					
Lona preta	29,6				
Lona dupla face	55,6	--	--	--	--
Lona branca	3,7				
Lona dupla face + cobertura	9,3				
Lona barreira oxigênio	1,9				
<i>Tempo de fermentação (dias)</i>					
Até 30	14,8				
31-90	40,7	20	380	116	87,3
91-150	20,4				
Acima 151	24,1				
<i>Taxa de retirada (cm/dia)</i>					
Até 15	40,7				
16-30	48,1	3	60	21	12,7
Acima 31	11,1				

Tabela 2, conclusão

<b>Variável</b>	<b>% de respostas</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>
<i>Temperatura da silagem</i>					
Abaixo da temperatura ambiente	27,8				
Até 2 °C acima da temperatura ambiente	18,5	19	37	27	3,76
Mais 2 °C acima da temperatura ambiente	53,7				
<i>Temperatura do ambiente</i>		20	29	25	2,42

Com relação à modalidade dos serviços na ensilagem, 66,7% dos produtores responderam que possuem os próprios equipamentos, 24,1% utilizam maquinário alugado e 9,3% utilizam equipamentos emprestados de cooperativas da região (Tabela 2). Quanto ao tipo de colhedora, a maioria das propriedades faz uso das que são tracionadas por trator (87,0%) e apenas 13,0% utilizam colhedora autopropelida. O uso de colhedoras tracionadas por trator ainda é muito comum no Brasil, em função do menor custo desse tipo de equipamento, da escala de produção e também da topografia, muitas vezes de relevo acidentado. Entretanto, colhedoras tracionadas podem proporcionar baixo rendimento de colheita, silagens com baixo processamento da fração grãos e baixa uniformidade de tamanho de partícula. Desse modo, a fim de minimizar tais problemas, ao utilizar colhedoras tracionadas, a atenção com os cuidados de ajuste do maquinário deve ser aumentada (BERNARDES et al., 2013; RAMOS, 2005).

A maioria dos produtores entrevistados (38,9%) relatou afiar as facas das colhedoras diariamente; 33,3% responderam que a afiação é feita mais de uma vez ao dia e apenas 9,3% dos produtores relataram que a afiação é feita apenas no início da ensilagem (Tabela 2). O uso de colhedoras equipadas com processadores de grãos é pouco comum nas regiões analisadas, tendo sido observado em apenas 20,4% das propriedades. A prática de afiação das facas e contrafacas contribui, em parte, para a obtenção de tamanho de partículas mais

uniformes, que favorecem a compactação e, conseqüentemente, o processo de fermentação, pela retirada do oxigênio (VIEIRA et al., 2011).

O tamanho médio de partículas (TMP) das amostras variou consideravelmente, de 6,4 a 11,9 mm. Essa variação no padrão do tamanho médio de partículas pode ser parcialmente explicada pela variação no teor de matéria seca da planta e pelas diferentes formas de regulagem (facas e contrafacas) das máquinas. A prática de diminuir o tamanho de corte, relatada por alguns produtores, é realizada no intuito de melhorar o processamento da fração grãos da planta. Entretanto, o menor tamanho de partículas predispõe os animais à ocorrência de distúrbios metabólicos, como o timpanismo e a acidose ruminal.

Kononoff, Heinrichs e Lehman (2003) trabalharam com quatro tamanhos de partículas da silagem de milho em dietas de vacas em lactação e observaram diminuição linear no consumo de matéria seca com o aumento do tamanho de partículas. O tamanho de partículas elevado reduz a taxa de passagem ruminal de sólidos, reduzindo o consumo voluntário de matéria seca (COLLAO SAENS, 2005; HEINRICHS, 1996). Além dos fatores relacionados aos animais, o tamanho médio de partículas pode afetar a porosidade, a densidade, a produção de efluentes, a fermentação e, indiretamente, a deterioração aeróbia da silagem (MUCK; MOSER; PITT, 2003).

Aproximadamente 44% das propriedades avaliadas apresentaram silos com volumes variando entre 101 e 250 m<sup>3</sup>; 25,9%, entre 251 e 500 m<sup>3</sup>; 9,3%, entre 501 e 750 m<sup>3</sup> e 7,4% apresentaram silos com volume superior à 751 m<sup>3</sup>. As propriedades que apresentaram silos com volume inferior a 100 m<sup>3</sup> representaram 13,0% do total (Tabela 2). O correto dimensionamento do silo é uma estratégia eficaz para reduzir as perdas associadas com a ensilagem, pois afeta diretamente o tempo gasto no processo e a compactação da forragem ensilada e também a sua abertura, visto que quanto maior o painel do silo, maior

a exposição aeróbia, o que favorece o metabolismo dos microrganismos deterioradores, contribuindo para a elevação da temperatura da silagem.

A utilização de aditivos microbianos é uma prática pouco comum entre as propriedades avaliadas, pois foi observada em apenas 27,8% (Tabela 2) dos estabelecimentos. Os produtores relataram que a aplicação do inoculante foi feita com o objetivo de melhorar a fermentação e ou reduzir o tempo de armazenamento da silagem.

A utilização de filmes plásticos de maior qualidade contribui para a manutenção do ambiente anaeróbico e afeta positivamente a qualidade nutricional da silagem de milho. Filmes plásticos do tipo dupla face foram os mais citados (55,6%) pelos produtores como ferramenta utilizada para a vedação dos silos, seguidos de lona preta (29,6%). Uma cobertura adicional à lona dupla face foi relatada por 9,3% dos produtores. Do total de propriedades avaliadas, 3,7% utilizaram lona branca como ferramenta para a vedação dos silos (Tabela 2).

A qualidade dos filmes utilizados na vedação de silos é importante para limitar as perdas na camada superior deles, sendo que a permeabilidade ao oxigênio pelas lonas correlaciona-se positivamente com perdas de matéria seca da silagem (BERNARDES; NUSSIO; AMARAL, 2012). Esses resultados corroboram os obtidos por Bernardes et al. (2013) que, avaliando a produção de silagens em fazendas leiteiras em Minas Gerais, observaram que filmes plásticos de dupla face foram os mais utilizados (84,6%) pelos produtores, seguidos pela lona preta (10,3%). Essa característica se repete no cenário nacional, em que é possível observar que 77,7% das propriedades utilizam lona dupla face para fazer a vedação dos silos (BERNARDES; RÊGO, 2014). A adição de uma cobertura sobre a lona plástica contribui para reduzir as perdas e melhor preservar a qualidade nutricional da silagem (BERNARDES; ADESOGAN, 2012). Segundo estes autores, essa estratégia protege o filme de plástico da

radiação solar e das condições climáticas, o que permite menor degradação da cobertura, especialmente em ambientes tropicais.

Analisando-se o tempo de fermentação do material ensilado, uma grande variação foi observada entre as propriedades, apresentando, no mínimo, 20 e, no máximo, 380 dias de fermentação, uma vez que as amostras foram coletadas ao longo do ano. Do total de silagens avaliadas, 14,8% apresentaram período inferior a 30 dias de fermentação; 40,7%, entre 31 e 90 dias; 20,4%, entre 91 e 150 dias, enquanto o restante apresentava um período de fermentação superior a 151 dias (Tabela 2). Para a silagem de milho, cujo alto nível de carboidratos solúveis favorece uma fermentação mais rápida, 30 dias consiste no período mínimo recomendado para que o processo esteja completo. Antes disso, o material ensilado pode não ter sido totalmente fermentado e pode não estar estabilizado, o que provoca perda na qualidade da silagem. Com o aumento no tempo de fermentação de silagens, ocorre redução no conteúdo de carboidratos solúveis e, conseqüentemente, aumento na concentração de ácidos láctico e acético, que são responsáveis por reduzir o pH do meio e conservar o material ensilado. Além disso, é comum observar, ainda, reduções no conteúdo de MS (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

A taxa de retirada diária da silagem, na ocasião do descarregamento do silo, variou entre 3 a 60 cm/dia (Tabela 2). A maioria dos produtores (48,1%) relatou retirar uma camada entre 16 e 30 cm ao longo do painel do silo; 11,1% relataram camadas retiradas superiores a 31 cm e 40,7% dos produtores relataram retiradas diárias de até 15 cm do painel. O maior determinante da camada diária a ser retirada é o número de animais a serem alimentados. De acordo com Martin, Kaiser e Piltz (2004), a retirada de camadas com, pelo menos, 15 cm de silagem do painel minimiza as perdas decorrentes da deterioração aeróbica. Entretanto, para silagens mais instáveis, como no caso da silagem de milho, ou em condições de alta umidade e/ou temperatura elevada,

uma camada de pelo menos 30 cm/dia deve ser removida, garantindo, assim, menores perdas ao processo. Embora a maioria dos silos com maior capacidade de armazenamento tenha sido verificada nas propriedades com maior número de animais, falhas no dimensionamento ocorrem frequentemente, demonstrando que grande potencial de incremento na qualidade das silagens pode ser alcançado com melhorias no dimensionamento dos silos.

Com relação à temperatura das silagens avaliadas, a média observada foi de 27,0 °C, variando entre 19,0 °C a 37,0 °C (Tabela 2). Essa variação pode ocorrer em resposta ao período do dia em que as amostragens foram realizadas. Segundo Kung Junior, Stokes e Lin (2003), quando a temperatura da massa ensilada atinge 2 °C acima da temperatura ambiente, é um indicativo do início do processo deterioração em função do metabolismo de microrganismos aeróbios indesejáveis. Comparando-se os resultados das temperaturas observadas nas silagens com os dados de temperatura ambiente no momento da coleta, foi possível observar que 53,7% apresentam temperaturas superiores a 2 °C, além da temperatura observada no ambiente.

### **3.3 Características bromatológicas**

O conteúdo médio de matéria seca (MS), bem como as concentrações de proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não fibrosos (CNF), amido, digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DigINVITRO MS) e a estimativa da produção de leite (EPL) com base nas características das silagens avaliadas apresentaram valores compatíveis com os encontrados na literatura (ALI et al., 2014; FILYA; SUCU, 2010; LI; NISHINO, 2011) (Tabela 3; Anexo A).

O conteúdo de MS das silagens avaliadas variou de 284,0 g kg<sup>-1</sup> a 405,0 g kg<sup>-1</sup>, tendo 16,7% das amostras apresentado até 300,0 g kg<sup>-1</sup>; 55,6%

apresentaram teor de MS variando entre 301,0 g kg<sup>-1</sup> e 350,0 g kg<sup>-1</sup> e 27,7% apresentaram conteúdo de MS acima de 351,0 g kg<sup>-1</sup>. O teor de matéria seca da planta exerce grande impacto na qualidade nutricional da silagem de milho. Silagens com conteúdo de MS acima de 350 g kg<sup>-1</sup> podem apresentar menor digestibilidade da matéria seca no trato digestivo total dos animais. Silagens que apresentam conteúdo de MS inferior 250 g kg<sup>-1</sup> apresentam baixa relação entre o conteúdo de amido e de FDN, resultando, assim, em menor ingestão de energia e, conseqüentemente, menor produção de leite (KHAN et al., 2015). Teores de matéria seca entre 300 e 350 g kg permitem maior acúmulo de amido na fração grãos da planta, sem, no entanto, ocorrerem perdas significativas na digestibilidade total de nutrientes.

O conteúdo de PB nas silagens avaliadas foi, em média, de 70,7 g.kg<sup>-1</sup> MS, apresentando variação entre 55,0 a 98,0 g.kg<sup>-1</sup> MS (Tabela 3). Do total de amostras avaliadas, 57,4% apresentaram conteúdo de PB acima de 70,1 g.kg<sup>-1</sup> MS. Segundo Keplin (1992), silagens de milho, oriundas de plantas cultivadas sob boas condições, normalmente apresentam teores de proteína entre 70 a 80 g.kg<sup>-1</sup> MS. Entretanto, fatores como o grau de maturidade da planta por ocasião da colheita, a proporção de grãos na planta e o perfil fermentativo podem influenciar tanto a concentração quanto a proporção das frações proteicas presentes na planta. O alto teor de proteína na silagem de milho pode advir de colheita precoce da planta ou excesso de adubação nitrogenada. Por outro lado, o baixo teor de proteína pode ser resultado da sua degradação por microrganismos indesejáveis, como *Clostridium* spp. ou por enzimas vegetais, com conseqüente produção de aminas e amônia (BOLSEN, 1995).

O conteúdo de FDN variou de 444,0 a 703,0 g.kg<sup>-1</sup> MS, com média de 568,7 g.kg<sup>-1</sup> MS. Apenas 14,8% das propriedades avaliadas apresentaram silagens com teor de FDN inferiores a 500,0 g.kg<sup>-1</sup> MS, que correspondem a valores ótimos para silagens de boa qualidade. Do total, 55,6% das amostras

apresentaram conteúdo de FDN variando entre 501,0 e 600,0 g.kg<sup>-1</sup> MS e o restante apresentou teores superiores a 601,0 g.kg<sup>-1</sup> da MS. A maioria das amostras avaliadas apresentou conteúdo de FDN acima do recomendado, que corresponde a 50% da MS. Esse resultado pode ter contribuído para uma menor produtividade animal, uma vez que o teor de FDN representa a fração fibrosa da forragem, sendo inversamente proporcional ao consumo de matéria seca. Silagens com elevadas concentrações de FDN resultam em baixo potencial de consumo pelos animais e, conseqüentemente, menor produção de leite (SOEST, 1994). Uma alternativa para reduzir o teor de FDN das silagens avaliadas consiste na manipulação do processo de colheita das plantas de milho para ensilagem.

Tabela 3 Composição bromatológica das silagens de milho avaliadas nas diferentes propriedades rurais

Variável	% de resultados	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão
Matéria seca (g.kg <sup>-1</sup> )					
Até 300,0	16,7				
301,0 - 350,0	55,6	284,0	405,0	332,4	28,6
Acima 351,0	27,8				
DIVMS (%)					
Até 55,0	35,2				
55,1 - 65,0	20,4	34,7	76,2	60,7	10,7
Acima 65,1	44,4				
Processamento da fração grãos (%)					
Até 50,0	22,2				
50,1 - 70,0	48,1	39,1	84,9	62,4	12,1
Acima 70,1	29,6				
Digestibilidade FDN (%)					
Até 30,0	27,8				
30,1 - 40,0	28,1	14,9	66,7	35,1	10,5
Acima 40,1	24,1				
Concentração (g.kg <sup>-1</sup> MS):					
Proteína bruta					
Até 60,0	13				
60,1 - 70,0	29,6	55,0	98,0	70,7	8,8
Acima 70,1	57,4				
Fibra em detergente neutro					
Até 500,0	14,8				
501,0 - 600,0	55,6	444,0	703,0	568,7	65,8
Acima 601,0	29,6				
Carboidratos não fibrosos					
Até 250,0	35,2				
251,0 - 350,0	48,1	115,0	410,0	283,1	72,2
Acima 351,0	16,7				
Amido					
Até 250,0	31,5				
251,0 - 350,0	40,7	170,0	428,0	294,9	65,2
Acima 351,0	27,8				
Estimativa produção de leite (kg de leite /ton MS)		556,6	1510,2	997,7	220,1

O conteúdo médio de carboidratos não fibrosos (CNF) nas silagens amostradas foi de 283,11 g.kg<sup>-1</sup> MS, variando de 115,0 a 410,0 g.kg<sup>-1</sup> MS

(Tabela 3). Variações no conteúdo de CNF e de MS são decorrentes do processo fermentativo, pela respiração das células vegetais e metabolismo dos microrganismos durante a ensilagem. Esses microrganismos, principalmente as BAL, são responsáveis pelo consumo dos carboidratos com produção, sobretudo, de ácido lático (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). A grande variação encontrada no conteúdo de CNF das silagens ocorreu em função da falta de homogeneidade das amostras quanto ao tempo de fermentação, em que o conteúdo de CNF é inversamente proporcional ao tempo de fermentação.

As silagens avaliadas apresentaram, em média, 294,89 g.kg<sup>-1</sup> MS de amido, com concentrações variando de 170,0 a 428,0 g.kg<sup>-1</sup> MS. O conteúdo de amido nas silagens reflete a quantidade de grãos presentes na massa ensilada e, assim, quanto maior o percentual de grãos, maior será a concentração de amido e, conseqüentemente, o valor nutritivo da silagem. Variações no conteúdo de amido das silagens também ocorrem em resposta ao tipo de híbrido de milho utilizado e ao estágio de maturidade no momento do corte (JONES et al., 2004). Avaliando a composição química de silagens de milho de diferentes propriedades na Holanda, Ali et al. (2014) observaram que o teor médio de amido foi de 344 g.kg<sup>-1</sup> MS, variando entre 247 e 427 g.kg<sup>-1</sup> MS. Khan et al. (2015), avaliando silagens de milho que foram colhidas em diferentes estádios de maturidade, observaram um aumento gradual no conteúdo de amido à medida que aumentava o conteúdo de matéria seca da forragem.

Com relação à digestibilidade *in vitro* da MS, o conteúdo médio observado foi de 60,7 % MS, variando entre 34,7% a 76,2% da MS (Tabela 3). As silagens que apresentaram percentual de DigINVITRO MS inferior a 55% da MS correspondem a 35,2% do total de amostras, enquanto 20,4% apresentaram percentual de digestibilidade entre 55,1% e 65% MS e 44,4% apresentaram DigINVITRO MS acima de 65% da MS. Rodrigues et al. (2004) não observaram

diferenças no percentual de DigINVITRO entre silagens com diferentes concentrações de matéria seca, apresentando, em média, 47% DigINVITRO MS.

A estimativa de produção de leite por tonelada de matéria seca de silagem entre as propriedades avaliadas apresentou média de 997,7 kg t<sup>-1</sup> MS, variando de 556,6 a 1.510,2 kg t<sup>-1</sup> MS (Tabela 3). Esse índice considera as concentrações de nutrientes de forma conjunta. Os resultados obtidos demonstram que a variação na composição nutricional das silagens foi relativamente alta, o que pode, conseqüentemente, afetar a capacidade de produção de leite.

### **3.4 Características fermentativas**

O pH das silagens avaliadas variou de 3,6 a 6,1, apresentando valor médio de 4,1 (Tabela 4). Do total das amostras, 56% apresentaram valores de pH inferiores a 4,0, estando dentro dos padrões recomendados, entre 3,7 e 4,2 (KUNG JUNIOR; SHAVER, 2001). As silagens que apresentaram pH variando entre 4,01 e 4,50 corresponderam a 38,9% do total de amostras, enquanto aquelas com valores acima de 4,51 correspondem a 5,6%.

O conteúdo médio de ácido láctico nas silagens foi de 51,3 g.kg<sup>-1</sup> MS, variando de 11,0 a 113,4 g.kg<sup>-1</sup> MS entre as silagens amostradas (Tabela 4). Um total de 16,7% das amostras apresentou teor de ácido láctico inferior a 30,0 g.kg<sup>-1</sup> MS, enquanto 46,3% apresentaram conteúdo entre 30,0 e 60,0 g.kg<sup>-1</sup> MS. Conteúdo de ácido láctico acima de 60,0 g.kg<sup>-1</sup> MS foi observado em 37,0% das amostras, sendo estes valores considerados ideais para silagens bem preservadas (KUNG JUNIOR; SHAVER, 2001). Aumentos no conteúdo de ácido láctico em silagens estão relacionados ao metabolismo das BAL envolvidas no processo, que convertem os carboidratos disponíveis na forragem em ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Esse metabolismo é mais intenso nos tempos iniciais de fermentação, quando a concentração de carboidratos solúveis é mais alta. No entanto, a concentração desse metabólito pode ser reduzida em função do metabolismo de *L. buchneri*, que converte o ácido láctico em ácido acético e 1,2-propanodiol (ELFERINK; KROONEMAN; GOTTSCHAL, 2001), contribuindo para o aumento no conteúdo destes metabólitos.

A maioria das silagens avaliadas (94,4%) apresentou concentrações de ácido acético inferiores a 20,0 g.kg<sup>-1</sup> MS, estando este valor dentro do recomendado para silagens de boa qualidade, que varia entre 10 e 30 g.kg<sup>-1</sup> MS. O conteúdo deste metabólito variou entre 0,00 e 24,9 g.kg<sup>-1</sup> MS (Tabela 4). A produção de ácido acético ocorre em função do metabolismo heterolático das BAL presentes na massa ensilada. Além disso, este metabólito também pode ser produzido no início do processo fermentativo por enterobactérias que competem com as BAL pelos carboidratos disponíveis, reduzindo, assim, a produção de ácido láctico (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Driehuis, Spoelstra e Cole (1996) relataram que o ácido acético apresenta efeito inibidor sobre o crescimento de leveduras e fungos filamentosos. Assim, pequenas concentrações deste metabólito são desejáveis durante o processo fermentativo, pois confere maior estabilidade aeróbia às silagens.

A concentração média de ácido propiônico foi de 15,2 g.kg<sup>-1</sup> MS, variando entre 1,5 e 40,4 g.kg<sup>-1</sup> MS. Do total de amostras avaliadas, apenas 37% apresentaram conteúdo de ácido propiônico inferior a 10,0 g.kg<sup>-1</sup> MS. Piltz e Kaiser (2004) relataram que alimentos conservados na forma de silagens, com fermentação adequada, devem apresentar teor de ácido propiônico até 1 g.kg<sup>-1</sup> MS. A concentração média de ácido propiônico nas silagens avaliadas foi superior àquelas relatadas por Wang et al. (2014), que observaram concentração média de 9,9 g.kg<sup>-1</sup>MS. Alguns microrganismos, tais como *Propionibacterium*

sp. e *Clostridium propionicum*, são responsáveis pela produção de ácido propiônico em silagens (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Tabela 4 Características fermentativas das silagens de milho avaliadas nas diferentes propriedades rurais

Variável	% de resultados	Mínimo	Máximo	Média
pH				
Até 4,00	55,6			
4,01 - 4,50	38,9	3,6	6,1	4,1
Acima 4,51	5,6			
Concentração (g.kg <sup>-1</sup> MS):				
Lático				
Até 30,0	16,7			
30,1 - 60,0	46,3	11,0	113,4	52,0
Acima 60,0	37,0			
Acético				
Até 10,0	37,0			
10,1 - 20,0	57,4	ND	24,9	12,0
Acima 20,1	5,6			
Propiônico				
Até 5,0	14,8			
5,1 - 10,0	22,2	1,5	40,4	15,2
Acima 10,1	63,0			
Butírico				
Até 0,5	64,8			
0,6 - 1,0	13,0	ND	3,8	0,7
Acima 1,1	22,2			
Etanol				
Até 10,0	40,7			
10,1 - 20,0	37,0	3,5	36,1	14,3
Acima 20,1	22,2			

ND – Não detectável

O conteúdo de ácido butírico variou de 0,0 a 3,8 g.kg<sup>-1</sup> MS, apresentando média de 0,7 g.kg<sup>-1</sup> MS, semelhante ao relatado por Santos et al. (2016) e Wang et al. (2014). A maioria das amostras (77,8%) apresentou conteúdo de ácido butírico inferior a 1,0 g.kg<sup>-1</sup> MS, que corresponde aos valores ótimos

recomendados por Kung Junior e Shaver (2001) (Tabela 4). De acordo com Nkosi et al. (2009), concentrações de ácido butírico acima de  $0,1 \text{ g.kg}^{-1}$  MS refletem a atividade de microrganismos do gênero *Clostridium* sp. sobre o material ensilado e estão relacionadas a menores taxas de decréscimo e maiores valores finais de pH nas silagens.

A concentração de etanol observada nas silagens avaliadas variou de 3,5 a  $36,1 \text{ g.kg}^{-1}$  MS, com média de  $14,3 \text{ g.kg}^{-1}$  MS (Tabela 4). Aproximadamente 22% das amostras avaliadas apresentaram teores de etanol acima de  $20,0 \text{ g.kg}^{-1}$  MS. A presença de etanol em silagem é indesejável, por ser um indicativo do crescimento e metabolismo de leveduras e da ocorrência de perda de MS (KRISTENSEN et al., 2007). Contudo, o etanol também pode ser produzido em função do metabolismo de BAL heterofermentativas. O conteúdo médio de etanol das silagens avaliadas ultrapassou os valores encontrados por Wang et al. (2014), no entanto, a maior parte dos resultados obtidos está no intervalo de valores considerados aceitáveis para a concentração de etanol ( $10,0$  a  $30,0 \text{ g.kg}^{-1}$  MS) em silagens de milho (KUNG JUNIOR; SHAVER, 2001).

### **3.5 População dos microrganismos**

A população média dos microrganismos avaliados foi semelhante ao relatado por Filya (2004) (Tabela 5). Do total de silagens avaliadas, 61,1% apresentaram população de BAL superior a  $6,01 \text{ log UFC.g}^{-1}$ , enquanto apenas 11,1% apresentaram contagens inferiores a  $5,00 \text{ log UFC.g}^{-1}$ . Após o estabelecimento das condições de anaerobiose no silo, ocorre aumento exponencial na população de BAL que utilizam os carboidratos disponíveis, produzindo os ácidos orgânicos responsáveis pela conservação do material ensilado (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Foi observada população média de enterobactérias de  $4,23 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , tendo 68,5% das silagens apresentado contagens acima de  $4,01 \log \text{UFC.g}^{-1}$ . Os principais gêneros encontrados nas silagens são *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiela*, *Proteus* e *Salmonella* (HENDERSON, 1993). O desenvolvimento de microrganismos da família *Enterobacteriaceae* é indesejável, visto que eles competem com as BAL pelos carboidratos no início do processo fermentativo, produzindo, principalmente, ácido acético. Além disso, são capazes de degradar proteínas, produzindo aminas biogênicas e reduzindo o valor nutricional da silagem (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

A população média de microrganismos aeróbios formadores de esporos foi de  $4,09 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , variando entre 0,00 e  $6,19 \log \text{UFC.g}^{-1}$ . Em 64,8% das amostras avaliadas, a população encontrada desses microrganismos foi acima de  $4,01 \log \text{UFC.g}^{-1}$ . Os principais microrganismos aeróbios formadores de esporos isolados de silagem incluem *Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. smithii* e *B. sphaericus* (NISHINO et al., 2015). A maioria tem enzimas sacarolíticas e proteolíticas e, por isso, são capazes de fermentar uma grande variedade de carboidratos a ácidos orgânicos, etanol, 2,3-butanodiol e glicerol. Além de esses compostos não apresentarem efeito na preservação da silagem, essas bactérias competem com as BAL por substratos fermentescíveis e ainda estão envolvidas na deterioração inicial da silagem (GIFFEL et al., 2002). Durante o processo de ensilagem, altos níveis de esporos mesofílicos aeróbios frequentemente são observados nas camadas superficiais do silo, em decorrência da maior concentração de oxigênio e em áreas com crescimento de fungos filamentosos e leveduras, evidenciando, assim, o envolvimento deste microrganismo na deterioração de silagens (DRIEHUIS et al., 2009). Esses microrganismos são indesejáveis ao processo, pois os esporos são capazes de sobreviver à passagem pelo trato digestivo dos ruminantes e sua

ocorrência no leite cru tem sido associada com alto número de esporos nas fezes (PAHLOW et al., 2003).

Tabela 5 População dos microrganismos presentes nas silagens de milho avaliadas nas diferentes propriedades rurais

Variável (log UFC.g <sup>-1</sup> )	% de resultados	Mínimo	Máximo	Média
BAL				
Até 5,00	11,1			
5,01 - 6,00	27,8	3,54	7,97	6,25
Acima 6,01	61,1			
Enterobactéria				
Até 2,00	14,8			
2,01 - 4,00	16,7	ND	6,92	4,23
Acima 4,01	68,5			
Esporos de mesófilos aeróbios				
Até 2,00	13			
2,01 - 4,00	22,2	ND	6,19	4,09
Acima 4,01	64,8			
Fungo filamentosos				
Até 2,00	38,9			
2,01 - 4,00	40,7	ND	5,73	2,13
Acima 4,01	20,4			
Levedura				
Até 2,00	18,5			
2,01 - 4,00	27,8	ND	7,12	3,82
Acima 4,01	53,7			

ND – Não detectável

A população média de leveduras nas amostras avaliadas foi de 3,82 log UFC.g<sup>-1</sup>, apresentando, no máximo, 7,12 log UFC.g<sup>-1</sup>. Woolford (1984) relatou que as leveduras são os primeiros microrganismos que causam deterioração aeróbia e aquecimento da silagem, sendo *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* e *Saccharomyces* os principais gêneros envolvidos. A máxima população de fungos filamentosos foi de 5,73 log UFC.g<sup>-1</sup>, tendo aproximadamente 60% das amostras avaliadas apresentado população acima da média observada. Segundo Jonsson e Pahlow (1984), durante as primeiras semanas de ensilagem, a

população de leveduras pode atingir  $10^7$  UFC  $g^{-1}$ , ocorrendo decréscimo gradual durante as etapas subsequentes de armazenagem.

Analisando-se as correlações entre o volume de leite produzido diariamente e a qualidade bromatológica das silagens produzidas, foi possível observar que quanto maior a produção de leite das propriedades, menor o conteúdo de FDN (-0,292) e ácido acético (-0,301) e maiores o conteúdo de amido (0,292) e a frequência de afiação das facas da colhedora (0,296).

O conteúdo de MS das silagens avaliadas apresentou correlação positiva com o tamanho de partículas (0,483) e foi negativamente correlacionado com o conteúdo de PB (-0,272), o processamento da fração grãos (-0,660), a digestibilidade da FDN (-0,432), a concentração de ácido lático (-0,316) e, ainda, com a estimativa de produção de leite (-0,335) (Tabela 6). Silagens com elevado conteúdo de MS apresentaram tamanho de partículas elevado, afetando a qualidade bromatológica e fermentativa, uma vez que as menores taxas de digestibilidade da FDN e as menores concentrações de ácido lático foram observadas nessas silagens, afetando, conseqüentemente, a estimativa de produção de leite pelos animais.

O conteúdo de FDN apresentou correlação negativa com as concentrações de CNF (-0,921), amido (-0,894), DIVMS (-0,551) e também com relação à estimativa de produção de leite (-0,784). Esses resultados já eram esperados, pois, quanto o maior conteúdo de FDN, menor a disponibilidade dos carboidratos disponíveis e também do conteúdo de amido e, conseqüentemente, mais difícil se torna a digestão da fibra (KHAN et al., 2015).

Realizou-se análise de regressão multivariada relacionando teor MS (variável dependente) com o tamanho médio de partículas (TMP), o processamento da fração grãos (PFG), a digestibilidade da FDN (DFDN) e o teor de ácido lático (variáveis independentes) (Tabela 7). Os resultados demonstraram que o maior tamanho médio de partículas, bem como as menores

taxas de processamento de grãos e digestibilidade de FDN em associação com os menores conteúdos de ácido láctico do material ensilado, relacionaram-se a elevados conteúdos de matéria seca.

Correlação positiva foi observada entre a concentração de CNF e o conteúdo de amido (0,850) e a DIVMS (0,450), em que as silagens que apresentaram altas concentrações de CNF também mostraram altas taxas de amido e maior DIVMS. Khan et al. (2015), avaliando o valor nutricional e a performance de animais alimentados com silagem de milho, observaram forte correlação positiva entre o conteúdo de amido e a digestibilidade *in situ* da matéria seca.

A área do silo foi negativamente correlacionada com o conteúdo de FDN (-0,343) e positivamente correlacionado ao teor de amido (0,364), CNF (0,378) e pH (0,424) (Tabela 6). Esses resultados podem estar associados ao atraso no enchimento dos silos, devido ao menor porte das colhedoras (verificado na maioria das propriedades analisadas), o que favorece a colheita de plantas com maior grau de maturidade, acúmulo de amido na fração grãos e diluição da fração FDN da planta. Além disso, atraso no processo de enchimento do silo favorece a degradação de açúcares solúveis (principal substrato do processo de fermentação), diminuindo a capacidade de acidificação do meio. Dessa forma, silos maiores podem apresentar maiores valores de pH.

Tabela 6 Análises de correlações de Pearson entre as variáveis sobre as práticas de ensilagem, composição bromatológica, produção de metabólitos e população de microrganismos nas silagens avaliadas

VARIÁVEL	PL	MS	PB	FDN	CNF	AMID	DIVMS	TMP	PFG	DFDN	EPL	pH	LAT
PL	<b>1</b>												
MS	0,064	<b>1</b>											
PB	-0,126	<b>-0,272</b>	<b>1</b>										
FDN	<b>-0,292</b>	-0,019	0,038	<b>1</b>									
CNF	0,265	0,093	-0,228	<b>-0,921</b>	<b>1</b>								
AMID	<b>0,292</b>	0,201	-0,160	<b>-0,894</b>	<b>0,850</b>	<b>1</b>							
DIVMS	0,245	-0,184	0,031	<b>-0,551</b>	<b>0,450</b>	<b>0,485</b>	<b>1</b>						
TMP	0,265	<b>0,483</b>	-0,204	-0,052	0,189	0,220	-0,082	<b>1</b>					
PFG	0,187	<b>-0,660</b>	-0,042	-0,097	0,088	-0,009	<b>0,420</b>	-0,260	<b>1</b>				
DFDN	-0,046	<b>-0,432</b>	0,188	<b>-0,352</b>	0,255	0,191	0,264	<b>-0,318</b>	0,185	<b>1</b>			
EPL	0,142	<b>-0,335</b>	0,110	<b>-0,748</b>	<b>0,656</b>	<b>0,573</b>	<b>0,450</b>	-0,187	0,242	<b>0,858</b>	<b>1</b>		
pH	<b>0,697</b>	0,072	-0,075	-0,108	0,134	0,071	0,106	0,101	0,092	-0,160	-0,028	<b>1</b>	
LAT	-0,261	<b>-0,316</b>	0,247	-0,084	0,038	0,092	0,088	-0,093	0,020	0,142	0,138	<b>-0,366</b>	<b>1</b>
ACE	<b>-0,301</b>	-0,139	-0,145	0,011	0,008	0,016	-0,107	<b>-0,285</b>	-0,014	0,088	0,029	-0,212	<b>0,295</b>
PROP	-0,208	-0,027	-0,024	-0,090	0,090	0,118	-0,159	-0,196	-0,108	-0,030	0,001	-0,115	<b>0,281</b>
BUT	0,009	-0,081	-0,123	-0,042	0,085	0,015	-0,023	0,074	0,026	0,150	0,141	-0,007	0,102
ETA	-0,125	-0,183	0,156	-0,032	-0,006	0,018	0,039	-0,105	0,013	<b>0,275</b>	0,198	-0,204	<b>0,397</b>
BAL	0,128	0,096	0,066	0,125	-0,082	-0,160	0,013	0,167	-0,017	0,121	0,019	0,146	-0,257
ENT	-0,013	0,186	-0,021	0,248	-0,218	-0,220	-0,070	0,140	-0,109	-0,172	-0,259	-0,074	<b>-0,333</b>
EMA	0,184	0,080	-0,060	0,137	-0,073	-0,233	-0,176	0,061	-0,071	0,129	0,033	<b>0,294</b>	<b>-0,312</b>
FF	-0,054	-0,142	-0,126	0,023	0,059	-0,061	-0,228	-0,102	-0,098	0,206	0,152	0,013	0,103
LEV	0,187	0,119	-0,100	0,132	-0,042	-0,225	-0,164	<b>0,274</b>	-0,221	-0,087	-0,133	<b>0,285</b>	-0,049
AS	<b>0,647</b>	0,111	-0,176	<b>-0,343</b>	<b>0,378</b>	<b>0,364</b>	0,219	0,201	0,170	-0,109	0,116	<b>0,424</b>	-0,074
FA	<b>0,296</b>	-0,205	-0,066	-0,222	0,208	0,143	<b>0,327</b>	-0,246	0,178	<b>0,323</b>	<b>0,355</b>	0,074	0,079
TF	-0,122	0,101	-0,067	0,231	-0,227	-0,213	-0,216	0,054	-0,144	-0,109	-0,211	-0,007	-0,002
TDR	0,066	-0,025	-0,154	0,006	0,012	0,035	0,110	0,113	0,151	-0,215	-0,135	-0,007	0,008
TA x TD	-0,015	-0,083	0,095	-0,048	0,109	-0,005	-0,083	-0,113	-0,065	0,012	0,042	0,112	0,092

Tabela 6, conclusão

VARIÁVEL	ACE	PROP	BUT	ETA	BAL	ENT	EMA	FF	LEV	AS	FA	TF	TDR	TA x TD
PL														
MS														
PB														
FDN														
CNF														
AMID														
DIVMS														
TMP														
PFG														
DFDN														
EPL														
pH														
LAT														
ACE	<b>1</b>													
PROP	<b>0,785</b>	<b>1</b>												
BUT	<b>0,323</b>	<b>0,325</b>	<b>1</b>											
ETA	-0,012	0,052	0,062	<b>1</b>										
BAL	<b>-0,556</b>	<b>-0,649</b>	-0,114	0,000	<b>1</b>									
ENT	<b>-0,451</b>	<b>-0,522</b>	-0,116	<b>-0,386</b>	<b>0,511</b>	<b>1</b>								
EMA	-0,226	-0,206	0,154	-0,058	0,261	0,106	<b>1</b>							
FF	<b>0,277</b>	0,095	<b>0,325</b>	-0,095	0,052	-0,012	<b>0,380</b>	<b>1</b>						
LEV	<b>-0,306</b>	<b>-0,316</b>	0,050	0,058	<b>0,521</b>	<b>0,297</b>	<b>0,424</b>	<b>0,408</b>	<b>1</b>					
AS	-0,092	0,073	-0,092	0,123	-0,156	<b>-0,406</b>	0,197	0,082	0,117	<b>1</b>				
FA	-0,081	-0,054	-0,005	0,238	0,003	-0,246	0,181	0,124	0,085	<b>0,451</b>	<b>1</b>			
TF	<b>0,291</b>	<b>0,328</b>	<b>0,318</b>	0,243	-0,084	-0,178	-0,004	0,100	0,170	-0,025	-0,132	<b>1</b>		
TDR	0,056	0,041	-0,003	-0,025	-0,224	-0,189	-0,042	0,063	0,049	0,181	0,231	0,097	<b>1</b>	
TA x TD	-0,059	-0,183	-0,193	-0,023	<b>0,305</b>	0,070	0,174	<b>0,366</b>	<b>0,297</b>	-0,013	0,029	-0,199	-0,001	<b>1</b>

Os valores em negrito são diferentes de 0, com nível de significância alfa=0,05

PL, produção de leite; MS, matéria seca; PB, proteína bruta; FDN, fibra em detergente neutro; CNF, carboidratos não fibrosos; DIVMS, digestibilidade INVITRO da MS; TMP, tamanho médio de partícula; PFG, processamento da fração grãos; DFDN, digestibilidade da fibra em detergente neutro; EPL, estimativa de produção de leite; LÁT, ácido láctico; ACÉT, ácido acético; PROP, ácido propiônico; BUT, ácido butírico; ETA, Etanol; BAL, bactéria do ácido láctico; ENT, enterobactéria; EMA, esporos de mesófilos aeróbios; FF, fungo filamentosos; LEV, levedura; AS, área do silo; FA, frequência de afiação facas e contrafacas colhedora; TF, tempo de fermentação; TDR, Taxa diária de retirada; TA x TS, diferença da temperatura ambiente e temperatura da silagem

Análise de regressão multivariada relacionando a estimativa de produção de leite (EPL) (variável dependente) com o conteúdo de FDN, o processamento da fração grãos (PFG) e a digestibilidade da FDN (variáveis independentes) foi realizada. As variáveis independentes citadas foram responsáveis por 96% da variação na estimativa de produção de leite ( $R^2 = 0,96$ ). Esses resultados sugerem que esses parâmetros são pontos-chave na qualidade nutricional das silagens de milho avaliadas, influenciando diretamente a produtividade animal.

Tabela 7 Modelos de regressão linear multivariada para o conteúdo de matéria seca (MS), estimativa de produção de leite (EPL), ácido acético (ACE) e pH

Modelo da equação	R <sup>2</sup>	EQR*
MS = 5,310 × TMP - 1,286 × PFG - 0,585 × DFDN - 0,337 × LAT + 404,80	0,704	16,338
EPL = -3,799 × FDN + 2,829 × PFG + 31,190 × DFDN + 3104,040	0,967	89,803
ACE = 0,428 × PROP + 0,892 × FF - 0,739 × LEV + 6,500	0,760	3,279
pH = -0,067 × LAT + 0,04615 × LEV + 0,059 × AS + 4,039	0,708	0,21

\*EQR, Erro quadrático residual;

MS, matéria seca; TMP, tamanho médio de partícula; PFG, processamento da fração grãos; DFDN, digestibilidade da fibra em detergente neutro; LAT, ácido láctico; EPL, estimativa de produção de leite; FDN, fibra em detergente neutro; ACET, ácido acético; PROP, ácido propiônico; FF, fungo filamentosos; LEV, levedura; AS, área do silo

Analisando-se as correlações entre as características fermentativas e a população dos microrganismos nas silagens avaliadas, foi possível observar correlação negativa entre o conteúdo dos ácidos acético e propiônico e a população de leveduras, enterobactérias e BAL. Quanto maior a concentração desses metabólitos, menor a população observada desses grupos de microrganismos (Tabela 6).

Quando a concentração de ácido acético foi utilizada como variável dependente na análise de regressão multivariada (Tabela 7), as variáveis independentes determinantes na predição foram ácido propiônico, fungos

filamentosos e concentração de leveduras ( $R^2 = 0,76$ ). Segundo Moon (1983), o ácido propiônico, em combinação com o ácido acético, apresenta efeito sinérgico capaz de reduzir o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, elevando, assim, a estabilidade aeróbia da silagem, corroborando os resultados obtidos neste estudo. Correlação positiva foi ainda observada entre a população desses microrganismos de deterioração aeróbia e a diferença entre a temperatura da silagem e aquela observada no ambiente (Tabela 6).

O conteúdo de ácido láctico apresentou correlação positiva com o conteúdo de etanol (0,397) e com a concentração dos ácidos acético (0,295) e propiônico (0,281), o que está relacionado, possivelmente, ao metabolismo de BAL heterofermentativas.

A inibição do crescimento de enterobactérias possivelmente ocorreu em função do metabolismo das BAL, que promoveu a acidificação da massa ensilada em resposta à produção dos ácidos acético e propiônico, além do ácido láctico. Correlação negativa entre o conteúdo de ácido láctico e o valor de pH (-0,366) foi observada entre as silagens avaliadas. Além disso, menores valores de pH foram associados a populações menores de leveduras (0,285) e de microrganismos aeróbios formadores de esporos (0,294) e, ainda, com a capacidade do silo (0,550). As perdas ocasionadas pelo metabolismo de enterobactérias e microrganismos aeróbios esporulantes, durante a ensilagem, podem ser minimizadas por meio de práticas de ensilagem eficientes que visem reduzir a concentração de oxigênio no silo e garantir a manutenção das condições anaeróbias necessárias ao processo fermentativo (DRIEHUIS; ELFERINK, 2000).

A estimativa dos valores de pH (variável dependente) foi relacionada ao conteúdo de ácido láctico, a população de leveduras e a área do silo (Tabela 7). As variáveis independentes citadas foram responsáveis por 70% da variação nos valores de pH. Durante a ensilagem, a escassez de oxigênio e o acúmulo de

ácido láctico resultam em baixo pH, preservando os nutrientes e inibindo o crescimento de microrganismos de deterioração, como leveduras, fungos filamentosos e microrganismos formadores de esporos (RANJIT; KUNG JÚNIOR, 2000). Elevados valores de pH observados em silos com maior capacidade podem ser explicados pela ineficiência do processo fermentativo que pode ter sido ocasionada por falhas nas práticas de ensilagem, como tamanho médio das partículas elevado, dificuldade de compactação da forragem e manutenção das condições de anaerobiose.

A menor população de BAL observada nas silagens com maiores conteúdos dos ácidos acético e propiônico pode ser justificada pela sensibilidade inerente das BAL a condições de elevada acidez, uma vez que, no decorrer do processo fermentativo, até as espécies que são mais resistentes vão perdendo a viabilidade (LIN et al., 1992; SANTOS et al., 2013).

Correlação positiva (0,511) foi observada entre a população de BAL e enterobactérias. Entretanto, esse resultado não era esperado, uma vez que as BAL convertem os carboidratos disponíveis em ácidos orgânicos que reduzem rapidamente o pH do meio e inibem o crescimento de enterobactérias. Possivelmente, o crescimento de enterobactérias nas silagens avaliadas ocorreu em áreas em que o processo de deterioração já havia iniciado em função da entrada de oxigênio. Os microrganismos responsáveis pela deterioração inicial são as leveduras que, sob condições aeróbias, degradam o ácido láctico em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. A degradação do ácido láctico provoca um aumento no pH da massa ensilada, permitindo, desse modo, o crescimento de outros organismos deterioradores, como as enterobactérias e microrganismos aeróbios esporulantes (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

### 3.6 Avaliação da diversidade bacteriana

O perfil de amplicons no gel de DGGE mostrou variação no perfil da comunidade bacteriana, tanto entre as regiões avaliadas quanto entre amostras da mesma região. Maior diversidade de microrganismos foi observada entre as amostras das propriedades que apresentaram os melhores resultados para os parâmetros avaliados (Figura 2).

*Lactobacillus plantarum* - HG798424.1 (bandas 1 e 2) e *Bacillus* sp. - JX126127.1 (banda 3) foram encontrados em todas as amostras avaliadas. De acordo com Muck (2013), *Lactobacillus plantarum* apresenta ampla distribuição em silagens de diferentes culturas forrageiras.

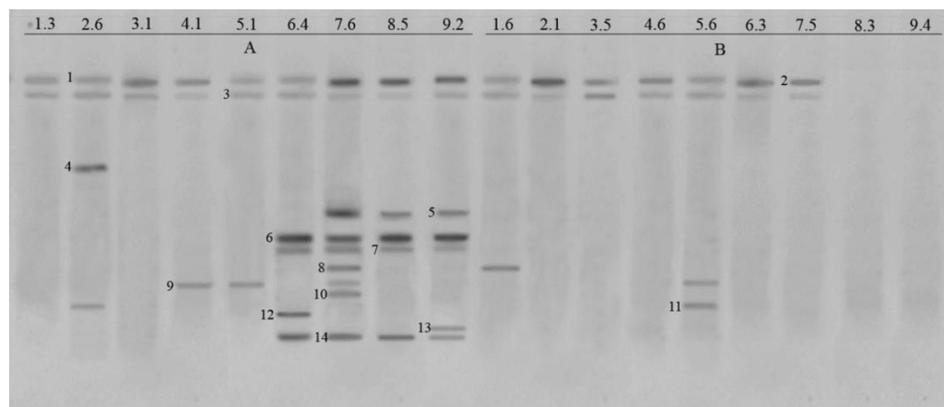


Figura 2 Comunidade bacteriana nas silagens de milho

Grupo A – Propriedades que apresentaram silagens com os melhores resultados para os parâmetros contagem dos microrganismos, temperatura da silagem e valores de pH.

Grupo B - Propriedades que apresentaram silagens com os piores resultados para os parâmetros avaliados.

Os números correspondem aos códigos das fazendas das regiões avaliadas.

Bandas 1 e 2 - *Lactobacillus plantarum*; Banda 3 - *Bacillus* sp.; Banda 4 - *Lactobacillus diolivorans*; Banda 5 - *Lactobacillus buchneri*; Banda 6 - *Lactobacillus helveticus*; Banda 7 - *Lactobacillus hilgardii*; Banda 8 - *Acetobacter pasteurianus*; Banda 9 - *Escherichia* sp.; Banda 10 - *Enterobacter* sp.; Banda 11 - *Bacillus amyloliquefaciens*; Banda 12 - *Enterococcus* sp.; Banda 13 - *Streptococcus* sp.; Banda 14 - *Burkholderia cepacia*

Grande diversidade de bactérias do ácido lático foi observada entre as amostras que apresentaram boa avaliação. *Lactobacillus helveticus* - KP764179.1 (banda 6) e *Lactobacillus hilgardii* - KR919620.1 (banda 7) foram observados nas silagens das regiões 6, 7, 8 e 9, enquanto *Lactobacillus buchneri* - CP003043.1 (banda 5) foi encontrado nas silagens coletadas nas regiões 7, 8 e 9. *Lactobacillus diolivorans* - NR\_037004.1 (banda 4), *Enterococcus* sp. - HQ717227.1 (banda 12) e *Streptococcus* sp. - HQ717251.1 (banda 13) foram observados somente nas regiões 2, 6 e 9, respectivamente. A melhor qualidade dessas amostras, possivelmente, foi em função da maior diversidade de BAL encontrada, visto que correspondem ao principal grupo de microrganismos que atuam no processo fermentativo da silagem. O metabolismo heterofermentativo das BAL observadas nas amostras avaliadas contribui para o incremento na concentração dos ácidos lático e acético (AXELSSON, 2004), inibindo o desenvolvimento dos principais microrganismos deterioração (MOON, 1983) e aumentando, conseqüentemente, a qualidade da silagem. As BAL frequentemente encontradas em silagens correspondem aos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (TOHNO et al., 2012).

Além das BAL, foram encontrados alguns microrganismos indesejáveis, tais como *Acetobacter pasteurianus* - KP272146.1 (banda 8), *Enterobacter* sp. - AJ874746.1 (banda 10), *Bacillus amyloliquefaciens* - KP826776.1 (banda 11), *Escherichia* sp. - JF753424.1 (banda 9) e *Burkholderia cepacia* - EU130541.1 (banda 14), tendo as duas últimas espécies apresentado maior distribuição entre as regiões avaliadas.

*Acetobacter pasteurianus* - KP272146.1 (banda 8), *Escherichia* sp. - JF753424.1 (banda 9) e *Bacillus amyloliquefaciens* - KP826776.1 (banda 11) foram ainda observados pontualmente em algumas amostras das propriedades que apresentaram os piores resultados para os parâmetros avaliados.

Os principais gêneros de microrganismos da família *Enterobacteriaceae* relatados em silagens são *Escherichia*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Proteus* e *Enterobacter* (HENDERSON, 1993) e seu desenvolvimento é indesejável, visto que competem com as BAL pelos carboidratos disponíveis, produzindo, principalmente, ácido acético (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Parvin et al. (2010), avaliando a qualidade de silagens de diferentes culturas forrageiras pela técnica de DGGE, também observaram a presença de *Burkholderia* sp.

*Acetobacter pasteurianus* também foi relatada por Li e Nishino (2011) em silagens de milho, contudo, não é comumente observado na microbiota epifítica de silagens. Sob condições aeróbicas, este microrganismo oxida etanol a ácido acético (NANDA et al., 2001). A presença de bactérias de ácido acético em silagem é considerada indesejável, uma vez que elas podem iniciar o processo de deterioração aeróbia, visto que são capazes de degradar ácido láctico, produzindo ácido acético, etanol e CO<sub>2</sub> (SPOELSTRA; COURTAIN; BEERS, 1988).

#### **4 CONCLUSÃO**

Foi possível avaliar as práticas de ensilagem que são empregadas na região em estudo, bem como suas correlações com as características bromatológicas, microbiológicas e o perfil fermentativo das silagens de milho produzidas. Apesar da predominância de pequenos produtores com participação proporcionalmente menor no volume total de leite produzido, grandes propriedades especializadas foram observadas na região, sendo possível observar que a qualidade da silagem está associada ao grau de especialização da propriedade. Grande diversidade entre as práticas de ensilagem foi observada e isso reflete tanto na qualidade nutricional quanto no perfil fermentativo e microbiológico das silagens avaliadas e, conseqüentemente, na produtividade animal. Maior diversidade de bactérias do ácido láctico foi observada nas amostras que apresentaram melhor qualidade. Melhorias na qualidade das silagens produzidas na região e, conseqüentemente, a produção leiteira, podem ser alcançadas por meio de maior atenção às práticas de ensilagem empregadas, como, por exemplo, avaliação correta do estágio de maturidade da planta na colheita, regulação do tamanho médio das partículas e dimensionamento dos silos. Práticas extensionistas, em colaboração com agências locais de desenvolvimento rural, podem ser desenvolvidas no intuito de esclarecer aos produtores os principais fatores a serem melhorados, desde o dimensionamento do silo, o processo de ensilagem e o descarregamento, de modo a contribuir para melhorias na qualidade nutricional das silagens de milho produzidas na região, aumentando, assim, a eficiência dos sistemas de produção.

## REFERÊNCIAS

- ALI, M. et al. Relationship between chemical composition and in situ rumen degradation characteristics of maize silages in dairy cows. **Animal**, Cambridge, v. 8, n. 11, p. 1832-1838, 2014.
- ARRIOLA, K. J. et al. Effect of applying bacterial inoculants containing different types of bacteria to corn silage on the performance of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 8, p. 3979-3979, Aug. 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. 15<sup>th</sup> ed. Arlington, 1990. v. 1, 771 p.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. von (Ed.). **Lactic acid bacteria**. New York: M. Dekker, 2004. p. 1-63.
- BAL, M. A. et al. Crop processing and chop length of corn silage: effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 6, p. 1264-1273, June 2000.
- BERNARDES, T. F.; ADESOGAN, A. T. Aerobic deterioration of silages in warm climates. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL PRODUCTION UNDER GRAZING, 2012, Viçosa, MG. **Proceedings...** Viçosa, MG: UFV, 2012. p. 249-268.
- BERNARDES, T. F. et al. Produção e uso de silagens em fazendas leiteiras em três mesorregiões do Estado de Minas Gerais. **Revista de Ciências Agrárias**, Recife, v. 56, n. 2, p. 133-138, abr./jun. 2013.
- BERNARDES, T. F.; NUSSIO, L. G.; AMARAL, R. C. Top spoilage losses in maize silage sealed with plastic films with different permeabilities to oxygen. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 67, n. 1, p. 34-42, Mar. 2012.
- BERNARDES, T. F.; RÊGO, A. C. do. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 3, p. 1852-1861, Mar. 2014.
- BOLSEN, K. K. Silage: basic principles. In: BARNES, R. F.; MILLER, D. A.; NELSON, C. J. (Ed.). **Forages**. 5<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University, 1995. p. 163-176.

CANALE, A.; VALENTE, M. E.; CIOTTI, A. Determination of volatile carboxylic acids (C1-C5) and acid lactic in aqueous acid extracts of silage by high performance liquid chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 35, n. 5, p. 1178-1182, May 1984.

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

COLLAO SAENZ, E. A. Modelagem da redução do tamanho de partículas na alimentação de ruminantes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 4, p. 886-893, jul./ago. 2005.

CÔRREA, C. E. S. et al. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 3008-3012, Nov. 2002.

CRUZ, J. C. et al. **477 cultivares de milho estão disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2015/16**. 2015. Disponível em: <<http://www.apps.agr.br/upload/Cultivares%20de%20Milho%20dispon%C3%A2veis%20no%20mercado%20na%20safra%202015%2016.pdf>>. Disponível em: 3 jan. 2016.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A. **Cultivo do milho**. 5. ed. Brasília: EMBRAPA, 2009. 10 p.

DER BEDROSIAN, M. C.; KUNG JUNIOR, L.; NESTOR JUNIOR, K. E. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 9, p. 5115-5126, Sept. 2012.

DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S. J. W. H. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **The Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 22, n. 1, p. 212-217, Jan./Mar. 2000.

DRIEHUIS, F. et al. The occurrence of spores of *Bacillus* and *Paenibacillus* in silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: US Dairy Forage Research Center; USDA - Agricultural Research Service, 2009. p. 377-378.

DRIEHUIS, F.; SPOELSTRA, S. F.; COLE, S. C. J. Improving aerobic stability by inoculation with *Lactobacillus buchneri*. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11., 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth, 1996. p. 106-107.

ELFERINK, S. J. W. H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J. C. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 125-132, Jan. 2001.

FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D. Impact of whole-plant corn silage hybrid type on intake, digestion, ruminal fermentation and lactation performance by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 4, p. 2662-2675, Apr. 2015.

FILYA, I. Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 116, n. 1/2, p. 141-150, Sept. 2004.

FILYA, I.; SUCU, E. The effects of lactic acid bacteria on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 65, n. 4, p. 446-455, Dec. 2010.

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

HEINRICH, A. J. Evaluating particle size of forages and TMRs using the Penn State Particle Size Separator. **Dairy & Animal Science**, Champaign, v. 20, p. 1-9, 1996.

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

HOTT, M. C. et al. Elaboração de um banco de dados geográficos sobre produção de leite do gado Holandês no estado de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 2009, Natal. **Anais...** Natal, 2009. p. 25-30.

HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, n. 3, p. 852-867, Mar. 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.

**Mesorregiões de Minas Gerais.** Disponível em:

<<http://www.mapasparacolorir.com.br/mapa/estado/mg/estado-minas-gerais-mesorregioes-nomes.png>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal.** Rio de Janeiro, 2014. 39 p.

JOHNSON, L. M. et al. Corn silage management: effects of maturity, inoculation, and mechanical processing on pack density and aerobic stability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 2, p. 434-444, Feb. 2002.

JONES, C. M. et al. **From harvest to feed:** understanding silage management. Pennsylvania: The Pennsylvania State University, 2004. 40 p.

JONSSON, A.; PAHLOW, G. Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures. **Animal Research and Development**, Tubingen, v. 20, n. 3, p. 7-22, 1984.

KEPLIN, L. A. S. Recomendação de sorgo e milho (silagem) safra 1992/93. **Revista Batavo**, Carambeí, n. 8, p. 16-19, 1992.

KHAN, N. A. et al. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 95, n. 2, p. 238-252, Jan. 2015.

KONONOFF, P. J.; HEINRICH, A. J.; LEHMAN, H. A. The effect of corn silage particle size on eating behavior, chewing activities, and rumen fermentation in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 10, p. 3343-3353, Oct. 2003.

KRISTENSEN, N. B. et al. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 3, p. 1364-1377, Mar. 2007.

KUNG JUNIOR, L.; SHAVER, R. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. **Focus on Forage**, Wisconsin, v. 3, n. 13, p. 1-5, 2001.

KUNG JUNIOR, L.; STOKES, M. R.; LIN, C. J. Silage additives. In: BUXTON, D. R.; MUCK R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 305-360.

LI, Y.; NISHINO, N. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 110, n. 6, p. 1561-1570, June 2011.

LIN, C. et al. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 73, p. 375-387, 1992.

MARTIN, M. D.; KAISER, A. G.; PILTZ, J. W. Feeding silage. In: KAISER, A. G. et al. (Ed.). **Successful silage**. 2<sup>nd</sup> ed. Melbourne: Department of Primary Industries and Dairy Australia, 2004. p. 254-273.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **Biochemistry of silage**. 2<sup>nd</sup> ed. Marlow: Chalcombe, 1991. 340 p.

MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, p. 454-460, 1983.

MUCK, R. Recent advances in silage microbiology. **Agricultural and Food Science**, Jokioinen, v. 22, n. 1, p. 3-15, 2013.

MUCK, R. E.; MOSER, L. E.; PITT, R. E. Postharvest factors affecting ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARISSON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 251-304.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology: mini review. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 73, p. 127-141, 1998.

NANDA, K. et al. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 986-990, Feb. 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7<sup>th</sup> ed. Washington, 2001. 381 p.

NISHINO, N. et al. Identification of bacteria in total mixed ration silage produced with and without crop silage as an ingredient. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 86, n. 1, p. 45-50, June 2015.

NKOSI, B. D. et al. Effects of ensiling whole crop maize with bacterial inoculants on the fermentation, aerobic stability, and growth performance of lambs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 154, n. 3, p. 193-203, Nov. 2009.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 31-94.

PARVIN, S. et al. Effects of inoculation with lactic acid bacteria on the bacterial communities of Italian ryegrass, whole crop maize, guinea grass and rhodes grass silages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 160, n. 3, p. 160-166, 2010.

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn grain on the in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 8, p. 2178-2184, 1998.

PILTZ, J. W.; KAISER, A. G. Principles of silage fermentation. In: KAISER, A. G. et al. (Ed.). **Successful silage**. 2<sup>nd</sup> ed. Melbourne: Department of Primary Industries and Dairy Australia, 2004. p. 26-56.

RAMOS, C. L. et al. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 2/3, p. 225-231, June 2010.

RAMOS, F. J. G. Remolques autocargadores y cosechadoras de forraje. **Revista Vida Rural**, Lisboa, n. 208, p. 76-81, 2005.

RANJIT, N. K.; KUNG JÚNIOR, L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 3, p. 526-535, Mar. 2000.

RESTLE, J. et al. Silagem de diferentes híbridos de milho para produção de novilhos super-jovens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 35, n. 5, p. 2066-2076, set./out. 2006.

RODRIGUES, P. H. M. et al. Avaliação do uso de inoculantes microbianos sobre a qualidade fermentativa e nutricional da silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 3, p. 538-545, jul./ago. 2004.

SANTOS, A. O. et al. Fermentative profile and bacterial diversity of corn silages inoculated with new tropical lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 120, n. 2, p. 266-279, 2016.

SANTOS, E. M. et al. Lactic acid bacteria in tropical grass silages. In: KONGO, M. (Ed.). **Lactic acid bacteria: R&D for food, health and livestock purposes**. Rijeka: InTech, 2013. p. 335-362.

SHAVER, R. D.; LAUER, J. G. Review of Wisconsin corn silage milk per ton models. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, p. 282, 2006. Supplement 1.

SHINNERS, K. J. et al. Processing whole-plant corn silage with crop processing rolls on a pull-type forage harvester. **Applied Engineering in Agriculture**, Saint Joseph, v. 16, n. 4, p. 323-331, 2000.

SOEST, P. J. van. **Nutrition ecology of the ruminant**. 2<sup>nd</sup> ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

SOEST, P. J. van; 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**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, Oct. 1991.

SPOELSTRA, S. F.; COURTAINE, M. G.; BEERS, J. A. C. van. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of whole crop maize silage. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v. 111, n. 2, p. 127-132, Mar. 1988.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STAT 9.3 user's guide**. Version 9.3. Cary, 2012. 8640 p.

TOHNO, M. et al. Genotypic and phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian ryegrass silage. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 83, p. 111-120, Feb. 2012.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE; FOREIGN AGRICULTURE SERVICE. **Dairy: world markets and trade**. Washington, 2015. Disponível em: <<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/dairy-market/dairy-market-12-17-2015.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

VIEIRA, V. C. et al. Caracterização da silagem de milho, produzida em propriedades rurais do sudoeste do Paraná. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 4, p. 462-469, 2011.

WANG, C. et al. A survey of fermentation products and bacterial community in corn silage produced in a bunker silo in China. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 85, n. 1, p. 32-36, Jan. 2014.

WEINBERG, Z. G.; ASHBELL, G. Engineering aspects of ensiling. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 181-188, Mar. 2003.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York: M. Dekker, 1984. 350 p.

Anexo A Composição químico-bromatológica e microbiológica das silagens avaliadas

PROPRIEDADE	MS (g.kg <sup>-1</sup> )	PB	FDN (g.kg <sup>-1</sup> MS)	CNF	AMI	DIG (%)	TMP (mm)	KPS (%)	DFDN	EPL kg.t <sup>-1</sup> MS	pH
1.1	343,00	69,00	499,00	369,00	359,00	71,30	11,94	46,20	34,52	1107,09	3,82
1.2	379,00	79,00	668,00	182,00	179,00	49,50	9,65	42,50	23,61	632,02	4,20
1.3	312,00	71,00	573,00	272,00	269,00	63,20	9,14	84,90	30,34	956,39	4,00
1.4	331,00	66,00	558,00	312,00	308,00	72,40	9,40	73,80	36,60	1073,02	3,87
1.5	327,00	59,00	609,00	257,00	254,00	65,60	9,65	83,80	31,56	879,78	3,95
1.6	313,00	75,00	635,00	219,00	206,00	68,40	6,60	73,80	27,72	747,29	3,99
2.1	352,00	72,00	628,00	217,00	250,00	61,40	9,65	43,20	34,09	892,78	3,89
2.2	313,00	55,00	553,00	317,00	323,00	75,40	8,13	82,30	30,83	1013,62	3,82
2.3	342,00	71,00	492,00	385,00	381,00	73,60	8,89	55,70	38,32	1146,22	3,84
2.4	294,00	84,00	684,00	149,00	176,00	47,50	9,14	55,20	34,77	758,02	3,72
2.5	346,00	77,00	473,00	396,00	389,00	72,90	9,14	45,10	50,14	1311,58	3,89
2.6	312,00	81,00	643,00	182,00	209,00	48,00	9,14	65,30	44,67	1037,21	3,58
3.1	293,00	72,00	619,00	234,00	244,00	47,50	7,62	67,00	25,21	820,89	4,22
3.2	348,00	55,00	513,00	363,00	378,00	70,50	9,91	54,00	34,61	1032,84	4,18
3.3	352,00	98,00	696,00	115,00	182,00	50,30	9,14	47,30	34,37	767,14	4,28
3.4	300,00	79,00	583,00	244,00	234,00	53,20	8,64	68,00	33,00	965,34	4,25
3.5	364,00	58,00	553,00	494,00	309,00	48,50	11,18	62,30	20,88	887,90	4,39
3.6	307,00	69,00	553,00	299,00	282,00	58,90	7,11	67,40	33,19	968,38	4,26
4.1	334,00	77,00	523,00	325,00	312,00	75,10	8,38	70,00	37,70	1111,90	3,95
4.2	313,00	80,00	549,00	297,00	363,00	58,40	6,86	69,30	30,94	1045,75	3,97
4.3	284,00	71,00	578,00	269,00	246,00	48,30	6,86	61,80	53,99	1277,92	4,07
4.4	378,00	58,00	605,00	242,00	344,00	66,20	9,14	55,70	26,55	736,15	3,85
4.5	336,00	79,00	522,00	314,00	311,00	73,50	7,87	74,90	49,21	1288,49	3,62
4.6	345,00	72,00	554,00	284,00	295,00	71,40	9,40	53,80	32,55	979,12	4,60
5.1	342,00	61,00	556,00	306,00	293,00	69,50	7,37	67,40	32,45	980,54	3,91
5.2	303,00	74,00	524,00	322,00	294,00	72,30	7,11	73,80	55,06	1432,67	4,12
5.3	305,00	79,00	593,00	227,00	234,00	66,70	7,11	72,30	30,15	884,56	3,98
5.4	294,00	87,00	614,00	205,00	214,00	70,60	6,60	77,40	29,84	782,82	4,02
5.5	341,00	68,00	499,00	361,00	356,00	74,60	11,94	80,00	26,28	989,07	4,17
5.6	342,00	64,00	522,00	336,00	344,00	72,40	10,41	79,30	22,47	937,92	6,09

Anexo A, continuação

<b>PROPRIEDADE</b>	<b>MS (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>PB</b>	<b>FDN (g.kg<sup>-1</sup> MS)</b>	<b>CNF</b>	<b>AMI</b>	<b>DIG (%)</b>	<b>TMP (mm)</b>	<b>KPS (%)</b>	<b>DFDN</b>	<b>EPL kg.t<sup>-1</sup> MS</b>	<b>pH</b>
<b>6.1</b>	335,00	61,00	498,00	350,00	361,00	60,10	7,37	71,80	37,05	1111,34	3,84
<b>6.2</b>	364,00	71,00	597,00	240,00	242,00	54,30	8,89	48,50	25,26	715,63	3,81
<b>6.3</b>	335,00	72,00	516,00	339,00	345,00	68,50	8,64	60,30	47,14	1225,84	3,71
<b>6.4</b>	399,00	58,00	684,00	163,00	211,00	34,70	9,14	44,50	14,96	590,44	3,88
<b>6.5</b>	293,00	61,00	693,00	184,00	177,00	40,20	10,16	70,30	40,11	850,97	3,85
<b>6.6</b>	310,00	68,00	531,00	326,00	314,00	69,40	8,38	61,20	37,33	1123,23	3,78
<b>7.1</b>	405,00	61,00	703,00	152,00	142,00	51,50	10,16	44,50	20,20	556,59	4,36
<b>7.2</b>	351,00	71,00	584,00	285,00	277,00	48,80	11,18	55,80	27,98	870,36	4,00
<b>7.3</b>	367,00	72,00	518,00	344,00	335,00	48,90	9,65	48,20	22,50	917,31	3,81
<b>7.4</b>	364,00	58,00	642,00	235,00	213,00	55,10	7,37	49,10	29,83	685,15	4,16
<b>7.5</b>	293,00	64,00	693,00	156,00	149,00	44,30	7,11	66,10	40,71	851,14	4,02
<b>7.6</b>	326,00	68,00	615,00	223,00	170,00	49,40	7,62	64,50	31,21	851,82	3,79
<b>8.1</b>	354,00	71,00	529,00	317,00	284,00	51,80	8,64	39,10	24,38	937,52	4,00
<b>8.2</b>	308,00	63,00	587,00	283,00	185,00	56,50	7,87	71,40	30,33	935,80	4,16
<b>8.3</b>	292,00	74,00	572,00	294,00	192,00	75,10	6,35	77,90	66,72	1498,76	4,06
<b>8.4</b>	357,00	69,00	444,00	410,00	386,00	54,80	9,14	50,45	59,57	1510,24	4,00
<b>8.5</b>	334,00	87,00	513,00	338,00	293,00	59,70	9,14	66,60	31,85	1045,88	3,91
<b>8.6</b>	352,00	72,00	479,00	392,00	388,00	57,30	9,14	58,10	38,38	1181,19	3,94
<b>9.1</b>	345,00	77,00	593,00	240,00	236,00	58,20	7,62	57,10	32,88	886,45	4,41
<b>9.2</b>	319,00	81,00	501,00	342,00	317,00	67,60	7,62	64,80	31,05	1092,15	4,42
<b>9.3</b>	357,00	68,00	491,00	356,00	350,00	59,10	7,37	44,70	34,59	1068,85	4,52
<b>9.4</b>	293,00	71,00	538,00	322,00	284,00	76,20	8,89	77,30	45,71	1203,17	4,41
<b>9.5</b>	304,00	75,00	515,00	341,00	297,00	66,40	7,62	64,20	49,08	1316,98	4,42
<b>9.6</b>	347,00	67,00	502,00	362,00	363,00	50,80	8,64	63,20	55,20	1402,74	4,42

Anexo A, continuação

PROPRIEDADE	LAT	ACE	PRO (g.kg <sup>-1</sup> MS)	BUT	ETA	BAL	ENT	EMA (log UFC.g <sup>-1</sup> )	FF	LEV
1.1	113,44	15,85	19,18	1,83	4,31	6,28	5,64	2,67	4,24	6,52
1.2	36,26	2,68	3,69	0,09	10,14	7,29	6,92	5,90	0,00	7,12
1.3	51,48	-0,09	11,66	0,24	21,90	6,74	5,45	4,40	0,00	5,49
1.4	63,48	9,61	6,26	0,12	10,76	6,90	4,82	1,82	0,00	4,83
1.5	45,11	10,08	8,31	0,04	16,37	7,15	2,97	3,05	0,00	3,52
1.6	58,20	11,27	9,00	0,10	9,88	6,72	6,57	6,19	4,43	6,63
2.1	50,70	7,43	4,98	0,20	22,17	6,82	5,66	5,66	3,24	4,65
2.2	62,52	18,11	20,70	0,27	29,75	4,85	0,00	4,44	2,12	2,12
2.3	60,12	16,69	25,31	1,06	30,94	5,38	0,00	2,73	2,12	2,43
2.4	76,08	5,16	6,11	0,46	35,82	6,74	6,39	5,76	3,77	6,23
2.5	75,42	10,02	14,55	0,44	27,91	7,52	5,32	3,36	0,00	5,40
2.6	73,97	5,72	9,23	0,62	36,13	7,01	3,81	4,70	0,00	2,12
3.1	72,35	16,78	24,72	0,62	14,67	5,12	3,54	4,01	2,12	3,92
3.2	56,15	8,68	12,92	0,58	7,48	5,82	5,19	5,66	3,73	3,87
3.3	50,46	15,57	22,92	0,21	6,54	7,56	4,03	5,68	2,43	3,94
3.4	67,78	12,72	5,97	0,72	12,88	6,75	3,43	3,72	4,43	5,36
3.5	42,36	13,54	19,90	0,68	9,20	6,51	4,71	5,22	3,90	4,80
3.6	65,38	16,98	19,38	0,34	11,57	3,54	2,90	3,83	2,82	3,27
4.1	66,34	13,53	23,35	0,04	10,40	5,90	4,73	4,09	0,00	0,00
4.2	59,41	8,40	15,66	0,24	5,34	7,05	5,12	0,00	2,12	0,00
4.3	31,07	10,73	21,91	0,11	9,28	5,20	3,94	3,47	0,00	0,00
4.4	74,76	14,92	9,56	0,03	16,79	5,17	4,77	0,00	0,00	0,00
4.5	21,57	1,29	3,64	0,24	4,94	6,12	5,97	6,14	0,00	0,00
4.6	0,97	1,07	2,66	0,28	3,46	6,79	5,57	6,09	2,73	5,43
5.1	36,43	10,81	12,73	0,51	5,89	6,09	4,22	5,72	0,00	0,00
5.2	33,75	24,89	12,64	1,47	5,50	5,15	4,08	6,08	4,90	0,00
5.3	63,38	6,76	3,69	0,12	13,55	7,17	6,78	0,00	0,00	0,00

Anexo A, conclusão

PROPRIEDADE	LAT	ACE	PRO (g.kg <sup>-1</sup> MS)	BUT	ETA	BAL	ENT	EMA (log UFC.g <sup>-1</sup> )	FF	LEV
5.4	60,33	23,94	35,40	0,41	13,52	4,09	2,12	0,00	0,00	0,00
5.5	25,32	8,63	13,99	2,64	3,95	6,58	6,08	4,22	0,00	3,33
5.6	2,06	0,02	1,48	0,03	3,49	7,32	6,73	6,15	0,00	6,59
6.1	49,44	19,99	27,42	0,94	13,40	6,05	5,56	3,64	4,40	3,40
6.2	45,96	13,65	16,55	0,22	9,52	6,27	5,73	4,05	0,00	4,33
6.3	51,69	16,50	18,32	0,12	11,07	5,82	4,82	0,00	2,60	3,33
6.4	42,10	21,50	32,14	2,25	8,64	4,75	4,25	5,03	5,12	3,94
6.5	56,73	17,73	23,26	3,75	7,50	5,62	4,29	5,25	5,73	4,36
6.6	59,10	16,19	19,22	0,38	19,56	5,07	4,45	0,00	0,00	4,30
7.1	11,03	2,64	2,93	0,03	15,53	7,77	6,87	3,81	0,00	6,56
7.2	40,87	17,25	24,95	0,03	12,06	4,20	0,00	2,12	0,00	0,00
7.3	29,00	5,22	9,76	0,03	13,94	5,31	5,25	4,56	2,12	4,24
7.4	14,52	16,09	14,31	2,04	8,32	7,82	5,68	5,07	2,12	4,51
7.5	28,45	19,87	14,41	0,04	9,42	7,32	5,93	5,65	4,73	6,09
7.6	76,69	19,56	26,17	0,04	12,37	5,38	3,39	4,75	0,00	3,88
8.1	50,03	5,52	8,37	0,03	5,82	6,79	5,01	4,19	3,12	5,60
8.2	33,58	8,60	4,98	0,04	10,13	7,97	6,03	3,90	4,12	6,78
8.3	61,36	7,40	7,75	2,38	24,01	7,47	6,02	5,87	5,61	7,06
8.4	21,63	14,96	18,87	1,07	21,89	7,21	5,03	5,00	2,67	4,44
8.5	59,45	5,17	5,40	0,04	9,04	6,01	4,39	4,03	3,08	4,47
8.6	51,64	13,07	16,64	0,65	13,51	7,62	5,46	4,68	3,90	5,82
9.1	64,19	14,35	26,05	0,37	21,88	5,44	3,03	5,12	2,82	4,19
9.2	65,81	15,45	24,21	3,10	35,87	5,60	0,00	3,08	0,00	2,60
9.3	54,94	19,08	40,42	1,06	12,95	4,30	0,00	4,30	4,20	3,90
9.4	53,08	10,65	11,38	0,04	19,06	7,53	0,00	5,16	3,82	6,16
9.5	86,98	14,43	19,68	1,73	17,39	5,61	0,00	5,74	2,30	4,49
9.6	65,63	8,88	6,95	0,03	24,46	7,03	0,00	5,29	3,67	4,33

MS, matéria seca; PB, proteína bruta; FDN, fibra em detergente neutro; CNF, carboidratos não fibrosos; DIG, digestibilidade INVITRO da MS; TMP, tamanho médio de partícula; PFG, processamento da fração grãos; DFDN, digestibilidade da fibra em detergente neutro; EPL, estimativa de produção de leite; LÁT, ácido lático; ACÉT, ácido acético; PROP, ácido propiônico; BUT, ácido butírico; ETA, etanol; BAL, bactéria do ácido lático; ENT, enterobactéria; EMA, esporos de mesófilos aeróbios; FF, fungo filamentosos; LEV, levedura

### CAPÍTULO 3

#### **Metabolic and genotypic characterisation of lactic acid bacteria isolated from Brazilian maize silage**

*Artigo formatado conforme normas do periódico indexado: Journal of Applied Microbiology*

#### **ABSTRACT**

**Aims:** The purpose of the present study was to identify and characterise metabolic and genotypically the lactic acid bacteria (LAB) isolated from maize silage produced in Brazil.

**Methods and Results:** Eighty eight isolates of LAB isolated from maize silage produced in three mesoregions of Minas Gerais state were grouped based on metabolite production (lactic acid, acetic acid and ethanol) profile determined by HPLC and genotypically by RAPD-PCR and REP-PCR techniques. The fingerprints obtained by RAPD-PCR with M13 primer were more discriminatory than those obtained with the REP-PCR technique using (GACA)<sub>4</sub> primer. All isolates were clearly grouped in separate clusters according to their respective taxonomic designations by RAPD-PCR. They were identified as *Lactobacillus acidophilus*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. diolivorans*, *L. hilgardii*, *L. paracasei*, *L. parafarraginis*, *L. plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. zaeae*, and *Pediococcus acidilactici*. *Lactobacillus rhamnosus* and *L. buchneri* have a higher amplitude distribution among regions. Differences regarding metabolite production were observed among the isolates assessed.

**Conclusions:** The results demonstrated the usefulness of RAPD-PCR genomic fingerprinting as a rapid method and alternative strategy to other methods of

(sub)species identification and enabled the precise grouping of isolated LAB. The metabolic characterisation of isolates allowed the grouping of the same according to the production profile of metabolites evaluated and showed correlation with the results obtained by genotypic characterisation.

**Significance and Impact of Study:** This research has contributed to our understanding of the bacterial community structure of lactic acid present in maize silage produced in the Brazilian Minas Gerais state. From the knowledge and identification of lactic microbiota present in maize silage produced in this region, further studies can be conducted to assess the potential of these isolates as starter cultures for the production of maize silage.

**Key Words:** DNA fingerprinting; (GACA)<sub>4</sub> primer; M13 primer; maize silage; RAPD-PCR; REP-PCR

## 1 INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is a forage plant most often used for the production of silage in many parts of the world. This plant has adequate characteristics for good fermentation in a silo (Khan *et al.*, 2015).

The microbiota of silage plays a key role in the quality of the forage conservation process, which can be divided basically into two groups, desirable microorganisms, represented by lactic acid bacteria (LAB) and propionic bacteria (BAP) and those undesirable which are associated with losses in silage, occasioned by microbial anaerobic deterioration (*Clostridium* spp. and *Enterobacteriaceae*) and aerobic deterioration (*Bacillus* spp., *Listeria* spp., yeasts and filamentous fungi) (McDonald *et al.*, 1991).

LAB correspond to the main group of microorganisms that act in the fermentation process. Among the species often found in silage, are mentioned those of *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Streptococcus* (Cai *et al.*, 1999; Pahlow *et al.*, 2003). These bacteria are Gram-positive, rod-shaped, non spore-forming, catalase negative organisms that are devoid of cytochromes and are of non-aerobic habit but are aerotolerant. The final fermentation product is lactic acid, however, some groups produce considerable amount of CO<sub>2</sub>, ethanol and other metabolites, these being called heterofermentative (Axelsson, 2004). Particularly, *Lactobacillus plantarum* is the larger silage fermentative bacterium (Ohmomo *et al.*, 2002). *Lactococcus*, *Enterococcus* and *Streptococcus* are very important in the initial stage of fermentation, because they keep an acidic environment, which then becomes predominantly colonized by *Lactobacillus* genus (Lin *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 2013b).

Detection and identification of microorganisms were, until recently, performed mainly through phenotypic and biochemical methods. However, these

methods are labour intensive, time consuming and do not always give unequivocal results. In response to this situation, more robust genetic methods based upon molecular biology have been developed for the identification and subtyping of bacteria. Molecular techniques provide outstanding tools for the typing, taxonomy and evolution of bacteria involved in many processes (Giraffa and Neviani, 2000; Germond *et al.*, 2003).

In general, more than one method is usually needed to obtain both identification and typing of unknown isolates (Rossetti and Giraffa, 2005). Several studies have reported success in using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) for differentiation of LAB isolates (Rossetti and Giraffa *et al.*, 2005; Mancini *et al.*, 2012; Parente *et al.*, 2016). Another PCR-based technique is repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) (Woods *et al.*, 1993; Versalovic *et al.*, 1994), which is a powerful tool for identifying several types of LAB, including lactobacilli (Gevers *et al.*, 2001; Antonio and Hillier, 2003), and is commonly used to assess LAB species (Dasen *et al.*, 2003; Parente *et al.*, 2010; Bove *et al.*, 2011).

In a process for selection of starter cultures, the compatibility between the forage plant and the inoculated microorganism is a factor that contributes to the successful use of microbial inoculants in silages (Muck, 2008). However, there is no work in the literature that isolate and identify LAB present in maize silage produced in Brazil. According to our best knowledge, only Santos *et al.* (2013a) tested LAB strains isolated from sugar cane silages (*Saccharum* spp.) in maize silages.

The purpose of the present study was to characterise metabolic and genotypically the LAB isolated from different maize silage produced in Brazil.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Bacterial strains and growth conditions**

Lactic acid bacteria isolates used in this study were collected from several samples of maize silages produced in bunker silos in the 9 Brazilian micro-regions of Minas Gerais state: Lavras, Elói Mendes, Silvianópolis, São Sebastião do Paraíso, Passos, Muzambinho, Piranguinho, Itumirim and, Nepomuceno. These micro-regions correspond to the most representative cities in the current milk production scenario of South, Southwest and Campo das Vertentes mesoregions of the state. Two farms were randomly selected in each micro-region, making a total of 18 experimental units.

Bacterial strains were isolated and cultivated at 37 °C for 48 h in MRS agar medium (CM0361, Oxoid; Hampshire, England). The isolates were preserved and maintained in frozen stocks at -80 °C in MRS broth medium (CM0359, Oxoid) with glycerol 20% (v/v) as cryoprotective agent. Purity was checked by plating on corresponding agar medium and by microscopic examination.

### **2.2 Genomic DNA extraction**

Frozen isolates were reactivated into freshly prepared MRS broth plus cysteine (0.5 g L<sup>-1</sup>) and incubated at 37 °C for 48h. Ten µL of active broth culture was re-inoculated into 2 mL MRS broth plus cysteine (0.5 g L<sup>-1</sup>) and incubated at 37 °C for 24h.

The genomic DNA extraction was performed according to Sachinandan *et al.* (2010) with some modifications. Post incubation, the bacteria were harvested by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. The medium

supernatant was decanted and the pellet washed twice with 1 mL of NaCl-EDTA (30 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.0). The washed bacterial pellet was resuspended in 100  $\mu$ L of NaCl-EDTA (30 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.0) and 50  $\mu$ L of freshly prepared lysozyme solution (concentration 10 mg mL<sup>-1</sup> in NaCl-EDTA) (0663-5G, AMRESCO; Solon, Ohio) was added and mixed. The mixture was incubated at 37 °C for 1 h with intermittent shaking. The volume of the mixture was then made up to 500  $\mu$ L with 50  $\mu$ L of a 10% SDS solution followed by 10  $\mu$ L of proteinase K solution (20 mg L<sup>-1</sup>) (740506, Macherey-Nagel; Duren, Germany) and additional 290  $\mu$ L of NaCl-EDTA solution. The contents were mixed thoroughly and incubated at 55 °C for 1 h. After incubation, an equal volume of Tris-saturated phenol (pH 8.0) was added and mixed thoroughly. The resultant mixture was centrifuged at 10,000 rpm at 22 °C for 15 min and the upper aqueous phase was separated without disturbing the interphase containing cell debris and proteins. This step was repeated once with a fresh aliquot of phenol-chloroform mixture (1:1) and the supernatant was collected in a sterile microtube. DNA in the supernatant was precipitated out with 2 volumes of cold isopropanol. The precipitated DNA was pelleted by centrifugation at 10,000 rpm at 4 °C for 10 min. The supernatant was discarded and the DNA pellet was washed once with freshly prepared 70% ethanol and air-dried. The final pellet thus obtained was dissolved in 50  $\mu$ L sterile distilled water and stored frozen at -20 °C till further analysis. The ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm was used to assess the purity of DNA by NanoDrop (1000; Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

### **2.3 PCR fingerprinting amplification**

Genomic DNA from different strains was used as a template for PCR fingerprinting using the M13 primer with sequence 5'-

GAGGGTGGCGGTTCT-3' and (GACA)<sub>4</sub> primer with sequence 5'-GACAGACAGACAGACA-3'. PCR reactions were performed in 25 µL reaction mixtures containing NZYTaQ 2x Green master Mix, genomic DNA (50 ng) and 0.4 mM of primer. Amplification conditions for primer M13 consisted of an initial denaturation step of 94 °C for 5 min was followed by 40 cycles of 94 °C for 1 min (denaturing), 45 °C for 20 s (annealing) and 72 °C for 2 min (extension). Final extension was carried out at 72 °C for 5 min (Torriani *et al.*, 1999). For primer (GACA)<sub>4</sub>, amplification reactions were performed according to the optimised protocol previously described (Shehata *et al.*, 2008). PCR was carried out for initial denaturation step of 95 °C for 5 min was followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 43 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 2 min, followed by a final extension step at 72 °C for 5 min.

Amplified products were resolved by electrophoresis (50 V cm<sup>-1</sup> for 1.5h) on 0.8% (w vol<sup>-1</sup>) agarose in 0.5 x TAE buffer gels, stained with GreenSafe Premium (MB13201, Nzytech; Lisbon, Portugal) and photographed with a Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (170-8070; BioRad Laboratories, CA, USA). One kbp NZYDNA ladder III (MB04402, Nzytech; Lisbon, Portugal) was used as a DNA molecular weight marker and as a normalization reference.

#### **2.4 Identification to species level by 16S rRNA gene sequencing**

A total of 28 representatives obtained by RAPD-PCR were selected for 16S rRNA gene sequence analysis using the primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') according to Lane (1991).

Amplification reactions were performed in a total volume of 50  $\mu\text{L}$ . Amplification conditions consisted of an initial denaturation step of 95  $^{\circ}\text{C}$  for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95  $^{\circ}\text{C}$  for 30 s, annealing at 55  $^{\circ}\text{C}$  for 55 s, extension at 72  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min, and followed by a final extension step at a 10 min final incubation at 72  $^{\circ}\text{C}$  (Tajabadi *et al.*, 2013).

Amplified PCR products were sent to sequencing at STABVIDA (Portugal). The sequences were then compared to the Gen-Bank database using the BLAST algorithm (National Center for Biotechnology Information, Maryland, USA).

## 2.5 Characterisation of target metabolities

First, the 88 strains were cultivated in MRS broth for 48 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After this period, the inoculum was standardized using a spectrophotometer at 620 nm wavelength at an optical density of 1.0. Subsequently, approximately 200  $\mu\text{L}$  of each strain was inoculated into 1800  $\mu\text{L}$  of MRS broth, which was incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$ . After 48 h of fermentation, samples of the cultures were analysed for lactic acid, acetic acid, propionic acid, and ethanol, using high-performance liquid chromatography (HPLC) (JASCO model LC 4000; (JASCO International Co., Tokyo, Japan). The acids and ethanol were identified by comparing their retention times with those of known standards. The HPLC apparatus was equipped with a dual detection system consisting of a UV detector (JASCO UV-2075Plus) and a refractive index detector (JASCO RI-2031). An ion exclusion column from BioRad (Aminex HPX-87H; 7.8 mm i.d., 30 cm long) operated at 60  $^{\circ}\text{C}$  was used for the chromatography separation. The mobile phase consisted of 0.005 M sulfuric acid solution with a flow rate of 0.7  $\text{mL min}^{-1}$ . The acids were detected by UV absorbance. Ethanol was identified using the refractive index detector.

## **2.6 Data analysis**

The images of the gels were then saved as TIFF files and exported into the pattern analysis software package BioNumerics (version 6.6; Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium) for processing. Calculation of similarity of the PCR fingerprinting profiles were based on the Pearson correlation coefficient. A dendrogram was deduced from the matrix of similarities by the unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm (Vauterin and Vauterin, 1992). Data regarding the production of metabolites by strains were analysed using principal component analysis (PCA) using the XL Stat software, version 7.5.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Genotypic characterisation

A total of 88 isolates were subjected to (GACA)<sub>4</sub> and M13 fingerprinting by PCR generating bands sized between 200 and 3000 bp.

The fingerprints obtained by RAPD-PCR with M13 primer (Figure 1) were more complex and discriminatory than those obtained with the REP-PCR technique using (GACA)<sub>4</sub> primer (Figure 2). The (GACA)<sub>4</sub> showed a low discriminatory power between LAB isolates, on the basis reduced number of bands observed thus making it difficult to distinguish single groups according to species. In contrast, the M13 fingerprint profiles were relatively heterogeneous. This variability can be useful for intraspecific differentiation of isolates within the same species (Turková *et al.*, 2012).

M13 have already been used for lactobacilli typing and were proven to be useful for differentiation of a wide range of lactobacilli at the species, subspecies and potentially up to the strain level (Rossetti and Giraffa, 2005; Švec *et al.*, 2010).

The average reproducibility of M13 technique was 96%, and this value was used to estimate the differentiation among isolates (Figure 1). All isolates were clearly grouped in separate clusters according to their respective taxonomic designations and nine clusters were detected. In particular, six out of the nine clusters included isolates belonging to the same species. The isolates of cluster 1, 3, 5, 6, 8, and 9 were identified as *Pediococcus acidilactici* (7 isolates), *Lactobacillus rhamnosus* (10 isolates), *L. hilgardii* (24 isolates), *L. plantarum* (6 isolates), *L. casei* (6 isolates) and *L. zae* (4 isolates), respectively. Cluster 2 contained 13 isolates of *L. paracasei* and 1 isolate of *L. acidophilus*. *L. diolivorans* (10 isolates) and *L. parafarraginis* (2 isolates) were grouped with

96.8% of similarity in the cluster 4. Cluster 7 contained 12 isolates of *L. buchneri* and 1 isolate of *L. casei* grouped with 94.6% of similarity. Evaluating the genotypic profile obtained by M13 is possible to observe small differences in band profile between isolates within the same species, thus suggesting the presence of clones in different silages. According to the grouping by M13, 28 isolates were selected and sequenced (Table 1).

The LAB isolated were grouped into four distinct taxonomic groups. The family *Lactobacillaceae*, described by Winslow *et al.* (1917), consists of the genera *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* and *Pediococcus* (Schleifer, 2009) that they are subdivided into 18 taxonomic groups (Felis and Dellaglio, 2007).

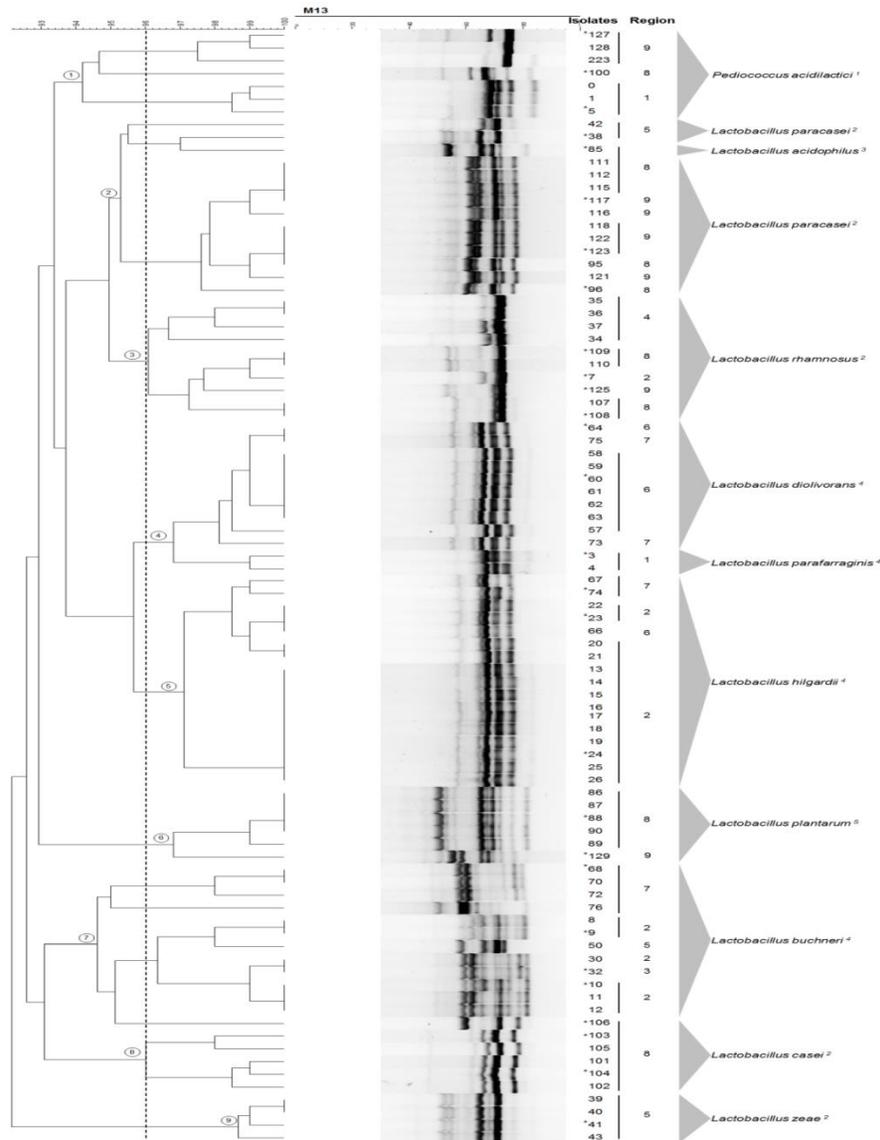


Figure 1 Dendrogram generated after cluster analysis of fingerprints using M13 primer of the UFLA SLM LAB isolates. Stars indicate isolates selected to sequence analysis

Collection regions of maize silage samples: Lavras (1), Elói Mendes (2), Silvianópolis, (3), São Sebastião do Paraíso (4), Passos (5), Muzambinho (6), Piranguinho (7), Itumirim (8), and Nepomuceno (9).

Superscripts codes correspond to the phylogenetic groups: <sup>1</sup>*Pediococcus* group; <sup>2</sup>*L. casei* group; <sup>3</sup>*Lactobacillus delbruecki* group; <sup>4</sup>*L. buchneri* group; <sup>5</sup>*L. plantarum* group.

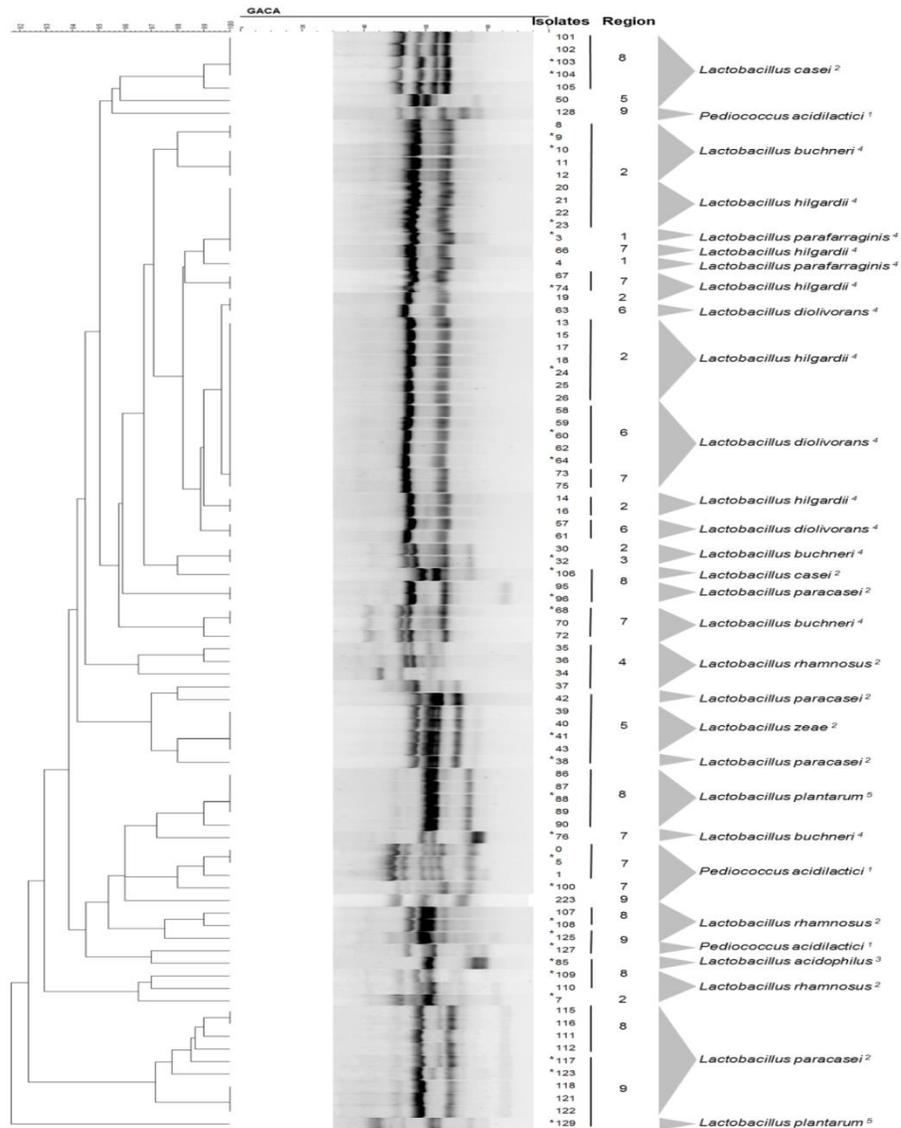


Figure 2 Dendrogram generated after cluster analysis of REP-PCR fingerprints using (GACA)<sub>4</sub> primer of the UFLA SLM LAB isolates. Stars indicate isolates selected to sequence analysis

Collection regions of maize silage samples: Lavras (1), Elói Mendes (2), Silvianópolis, (3), São Sebastião do Paraíso (4), Passos (5), Muzambinho (6), Piranguinho (7), Itumirim (8), and Nepomuceno (9).

Superscripts codes correspond to the phylogenetic groups: <sup>1</sup>*Pediococcus* group; <sup>2</sup>*L. casei* group; <sup>3</sup>*Lactobacillus delbrueckii* group; <sup>4</sup>*L. buchneri* group; <sup>5</sup>*L. plantarum* group.

Isolates of *Pediococcus acidilactici*, belonging to the *Pediococcus* phylogenetic group were grouped with 94.2% similarity. *L. paracasei* and *L. rhamnosus* were grouped with 94.9% similarity. The species *Lactobacillus casei*, *L. paracasei*, and *L. rhamnosus* are phylogenetic and phenotypically closely related and are regarded together as the *Lactobacillus casei* group within the facultative heterofermentative (Felis and Dellaglio, 2007).

The *L. diolivorans*, *L. hilgardii* and *L. parafarraginis* isolates were grouped with 95.7% similarity to *L. buchneri* group. However, isolates of *L. buchneri* were not grouped. The isolates of *L. plantarum* belonging to the phylogenetic group *L. plantarum*, were grouped with 96.8% similarity.

Evaluating the diversity of microorganisms in maize silages collected in different regions, it is observed that 11 different species of LAB were isolated and identified (Table 2). *L. buchneri* and *L. rhamnosus* have a broad distribution between samples, being isolated in 4 different regions (Elói Mendes, Passos, Piranguinho, and Silvianópolis; Elói Mendes, Itumirim, Nepomuceno, and São Sebastião do Paraíso, respectively), while *L. parafarraginis* and *L. zae* were isolated in only one single region, Lavras and Passos, respectively. *L. acidophilus* and *L. casei* were isolated only in Itumirim region.

Table 1 Molecular identification of LAB isolates

<b>Isolates code UFLA SLM</b>	<b>Blast alignment</b>	<b>Code at NCBI</b>	<b>% Identity</b>
3	<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	KR055510.1	99
5	<i>Pediococcus acidilactici</i>	LC097074.1	100
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	KT982211.1	100
9	<i>Lactobacillus buchneri</i>	KR055508.1	99
10	<i>Lactobacillus buchneri</i>	KR055508.1	100
23	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	LC064898.1	99
24	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	LC064898.1	99
32	<i>Lactobacillus buchneri</i>	KR055508.1	100
38	<i>Lactobacillus paracasei</i>	KT159936.1	100
41	<i>Lactobacillus zeae</i>	KT630827.1	100
60	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	KP763951.1	99
64	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	KP763951.1	99
68	<i>Lactobacillus buchneri</i>	KR055508.1	100
74	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	LC064898.1	99
85	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LN869545.1	100
88	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KP406154.1	100
96	<i>Lactobacillus paracasei</i>	KT159936.1	100
100	<i>Pediococcus acidilactici</i>	LC097074.1	100
103	<i>Lactobacillus casei</i>	JN560867.1	100
104	<i>Lactobacillus casei</i>	JN560867.1	100
106	<i>Lactobacillus casei</i>	JN560867.1	100
108	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	KT982211.1	100
109	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	KT982211.1	100
117	<i>Lactobacillus paracasei</i>	KT159936.1	100
123	<i>Lactobacillus paracasei</i>	KT159936.1	100
125	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	KT982211.1	100
127	<i>Pediococcus acidilactici</i>	LC097074.1	100
129	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KP406154.1	100

Table 2 Distribution of LAB according to the collection regions of maize silage samples

Species	Regions <sup>1</sup>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Pediococcus acidilactici</i>	x							x	x
<i>Lactobacillus paracasei</i>					x			x	x
<i>Lactobacillus acidophilus</i>								x	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		x		x				x	x
<i>Lactobacillus diolivorans</i>						x	x		
<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	x								
<i>Lactobacillus hilgardii</i>		x				x	x		
<i>Lactobacillus plantarum</i>								x	x
<i>Lactobacillus buchneri</i>		x	x		x		x		
<i>Lactobacillus casei</i>								x	
<i>Lactobacillus zeae</i>					x				

<sup>1</sup>Collection regions of maize silage samples: Lavras (1), Elói Mendes (2), Silvianópolis (3), São Sebastião do Paraíso (4), Passos (5), Muzambinho (6), Piranguinho (7), Itumirim (8) and Nepomuceno (9)

Samples of maize silage collected in the regions of Itumirim and Nepomuceno showed the highest diversity of microorganisms being isolated *Pediococcus acidilactici*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* and *L. plantarum* in both regions. Samples collected in the of Silvianópolis and São Sebastião do Paraíso regions showed the least diversity of LAB in which were isolated respectively *L. buchneri* and *L. rhamnosus*.

According to Lin *et al.* (1992) and Santos *et al.* (2013b), during the silage fermentation process a succession of genera of LAB occurs. In the initial stage, bacteria belonging to the genus *Streptococcus* dominate the process being replaced later by *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactobacillus*, which are more resistant to acidic conditions. In the process, while the LAB of the *Lactobacillus* genus begin to loose viability, some specialized microorganisms such as *Lactobacillus buchneri* remain active but at a low density level.

Ávila *et al.* (2014) evaluated the use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. They observed that the usage of *Lactobacillus hilgardii* isolates UFLA SIL51 and UFLA SIL52 resulted in silage with the best characteristics in relation to dry matter (DM) loss, low ethanol content, higher LAB population, and low butyric acid content.

Evaluating the quality of silage produced in Italy, Rossi and Dellaglio (2007) found that *L. plantarum* was the main species isolated from alfalfa silage, while *L. buchneri* corresponded to the main species isolated from maize silage, thus confirming the results obtained in this study. The species *Lactobacillus casei*, *L. paraplantarum* and *L. zeae* were isolated in less number but only in alfalfa silage (Rossi and Dellaglio, 2007). The finding that the clusters of *L. buchneri* were the most numerous confirmed that these species are the most frequently isolated from plant materials (Rossi and Dellaglio, 2007). The presence of *L. buchneri* in maize silage is important because of its heterolactic metabolism being able to improve aerobic stability by producing acetic acid that inhibits yeasts and filamentous fungi (Driehuis *et al.*, 1999; Elferink *et al.*, 2001).

*L. diolivorans* was isolated from maize silage in Belgium as reported by Krooneman *et al.* (2002). Based on the ability of *L. diolivorans* to ferment 1,2-propanediol to 1-propanol and propionic acid under conditions that prevail in silage and the observed absence of 1,2-propanediol in experimental and full-scale aerobically stable silages, *L. diolivorans* may play an important role in stabilizing maize silages.

Brusetti *et al.* (2006) evaluated the LAB in maize silage over a 30-day fermentation period using the length heterogeneity PCR technique. They observed that species of *Lactobacillus* were reported at various fermentation times, and *L. plantarum* was present in lower numbers in all fermentation phases. *L. brevis* was mainly found after six days of fermentation and *L.*

*paraplantarum* was found from the 13<sup>th</sup> day to the 20<sup>th</sup> day. Using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), Li and Nishino (2011) identified the dominant bacterial species in maize silage. They reported finding *L. brevis*, *Pediococcus parvulus* and *Weissella confusa* during the pre-ensiling stage and later in the silage.

### **3.2 Metabolic characterisation**

Differences regarding metabolite production was observed between the isolates assessed (Table 3). The isolates exhibited production of lactic and acetic acids ranging from 8.84 to 25.33 g L<sup>-1</sup> and from 0.99 to 4.11 g L<sup>-1</sup>, respectively. All isolates had low ethanol production (from 0.17 to 4.64 g L<sup>-1</sup>). UFLA SLM 100 isolate did not show any production of ethanol and acetic acid, while UFLA SLM 17 and 106 isolates did not produce ethanol. None of the assessed isolates produced propionic acid.

Table 3 Contents of lactic, acetic, and ethanol by UFLA SLM LAB isolated from maize silage

Isolates	Identification	Metabolites concentration (g L <sup>-1</sup> )			Metabolism <sup>1</sup>
		Lactic acid	Acetic acid	Ethanol	
0	<i>Pediococcus acidilactici</i>	19.28	1.66	0.31	A
1	<i>Pediococcus acidilactici</i>	20.58	1.75	0.31	A
3	<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	11.42	2.48	2.95	B
4	<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	14.57	3.42	3.98	B
5	<i>Pediococcus acidilactici</i>	20.09	1.68	0.31	A
7	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	16.49	2.12	0.28	B
8	<i>Lactobacillus buchneri</i>	14.96	2.27	4.64	C
9	<i>Lactobacillus buchneri</i>	12.54	1.74	3.85	C
10	<i>Lactobacillus buchneri</i>	14.27	2.19	4.62	C
11	<i>Lactobacillus buchneri</i>	13.72	2.02	4.21	C
12	<i>Lactobacillus buchneri</i>	13.39	2.02	4.31	C
13	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	13.09	2.43	2.86	C
14	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	16.79	3.47	3.33	C
15	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	14.99	2.98	3.21	C
16	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	16.16	3.08	3.84	C
17	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	17.47	1.19	ND	C
18	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	12.06	2.30	2.87	C
19	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	13.40	2.30	3.38	C
20	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	15.72	2.43	4.23	C
21	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	16.66	2.59	4.31	C
22	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	11.48	2.64	1.67	C
23	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	25.33	2.55	2.01	C
24	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	12.99	2.65	2.97	C
25	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	12.86	2.11	2.50	C
26	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	15.58	3.32	3.94	C
30	<i>Lactobacillus buchneri</i>	11.95	1.51	3.49	C
32	<i>Lactobacillus buchneri</i>	12.73	1.76	2.42	C
34	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	15.61	1.61	0.18	B
35	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	16.15	1.57	0.18	B
36	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	21.68	1.84	0.54	B
37	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	13.64	1.56	0.17	B
38	<i>Lactobacillus paracasei</i>	22.70	1.79	0.22	B
39	<i>Lactobacillus zeae</i>	23.29	1.80	0.20	B

Table 3, continuation

Isolates	Identification	Metabolites concentration (g L <sup>-1</sup> )			Metabolism <sup>1</sup>
		Lactic acid	Acetic acid	Ethanol	
40	<i>Lactobacillus zeae</i>	23.30	1.82	0.21	B
41	<i>Lactobacillus zeae</i>	23.22	1.81	0.21	B
42	<i>Lactobacillus paracasei</i>	23.68	1.89	0.18	B
43	<i>Lactobacillus zeae</i>	22.97	1.76	0.21	B
50	<i>Lactobacillus buchneri</i>	9.52	1.18	0.20	C
57	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	12.93	2.59	3.12	C
58	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	12.73	3.02	3.07	C
59	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	12.82	2.63	2.98	C
60	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	14.88	2.80	2.99	C
61	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	16.11	3.07	3.66	C
62	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	15.72	3.11	3.26	C
63	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	14.28	2.77	3.12	C
64	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	15.22	2.88	2.91	C
66	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	23.97	1.65	1.17	C
67	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	22.36	2.23	1.75	C
68	<i>Lactobacillus buchneri</i>	12.67	1.52	3.56	C
70	<i>Lactobacillus buchneri</i>	14.63	2.05	3.70	C
72	<i>Lactobacillus buchneri</i>	13.32	1.74	2.92	C
73	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	14.01	2.79	3.27	C
74	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	11.20	2.40	1.69	C
75	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	16.82	4.11	3.73	C
76	<i>Lactobacillus buchneri</i>	22.29	1.79	0.29	C
85	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10.74	1.48	0.38	A
86	<i>Lactobacillus plantarum</i>	22.24	1.93	0.31	B
87	<i>Lactobacillus plantarum</i>	20.66	1.68	0.31	B
88	<i>Lactobacillus plantarum</i>	21.10	1.70	0.31	B
89	<i>Lactobacillus plantarum</i>	20.45	1.61	0.30	B
90	<i>Lactobacillus plantarum</i>	21.36	1.77	0.33	B
95	<i>Lactobacillus paracasei</i>	21.63	1.46	0.23	B
96	<i>Lactobacillus paracasei</i>	22.30	1.54	0.22	B
100	<i>Pediococcus acidilactici</i>	20.96	1.02	0.30	A
101	<i>Lactobacillus casei</i>	13.99	1.06	0.27	B
102	<i>Lactobacillus casei</i>	10.97	1.07	0.27	B

Table 3, conclusion

Isolates	Identification	Metabolites concentration (g L <sup>-1</sup> )			Metabolism <sup>1</sup>
		Lactic acid	Acetic acid	Ethanol	
103	<i>Lactobacillus casei</i>	14.23	1.08	0.26	B
104	<i>Lactobacillus casei</i>	18.31	1.07	0.24	B
105	<i>Lactobacillus casei</i>	14.38	1.03	0.25	B
106	<i>Lactobacillus casei</i>	8.84	1.02	ND	B
107	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	9.02	1.01	0.20	B
108	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	9.04	0.99	0.28	B
109	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	20.79	1.09	0.24	B
110	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	22.66	1.08	0.24	B
111	<i>Lactobacillus paracasei</i>	22.02	1.01	0.24	B
112	<i>Lactobacillus paracasei</i>	21.63	1.05	0.19	B
115	<i>Lactobacillus paracasei</i>	21.94	1.02	0.18	B
116	<i>Lactobacillus paracasei</i>	20.61	1.03	0.18	B
117	<i>Lactobacillus paracasei</i>	20.47	1.04	0.18	B
118	<i>Lactobacillus paracasei</i>	21.61	1.02	0.21	B
121	<i>Lactobacillus paracasei</i>	20.64	1.02	0.21	B
122	<i>Lactobacillus paracasei</i>	21.11	1.04	0.21	B
123	<i>Lactobacillus paracasei</i>	20.39	1.03	0.23	B
125	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	22.78	1.09	0.23	B
127	<i>Pediococcus acidilactici</i>	19.58	1.03	0.28	A
128	<i>Pediococcus acidilactici</i>	19.35	1.06	0.27	A
129	<i>Lactobacillus plantarum</i>	18.29	1.04	0.28	B
223	<i>Pediococcus acidilactici</i>	20.55	ND	ND	A

<sup>1</sup>Type of glucose fermentation, following the conventions of Hammes and Hertel (2003), metabolism is indicated with capital letters for obligatory homofermentative (A), facultative heterofermentative (B), and obligatory heterofermentative (C).

ND – Not detected

In the Principal Component Analysis (PCA) the first two components (PC1 and PC2) explain 93.27% of the total variance (Figure 3). Some isolates correlated only with lactic acid (left upper quadrant). The isolates that correlated with acetic acid, in the right upper quadrant, also correlated with ethanol.

Isolates present in the lower quadrants did not correlate with any of the metabolites.

The differences found in metabolite production among the 88 isolates were due to the metabolism of the bacteria. In the isolates that have obligatory homofermentative metabolism, the average content of lactic acid was  $18.89 \text{ g L}^{-1}$  and higher than the average observed in isolates that have the obligatory heterofermentative metabolism ( $14.96 \text{ g L}^{-1}$ ) (Table 3). The average content of acetic acid ( $2.41 \text{ g L}^{-1}$ ) and ethanol ( $2.98 \text{ g L}^{-1}$ ) was relatively higher in isolates that have obligatory heterofermentative metabolism compared to those which show, respectively, facultative heterofermentative metabolism ( $1.44$  and  $2.41 \text{ g L}^{-1}$ ) and obligatory homofermentative ( $1.21$  and  $0.27 \text{ g L}^{-1}$ ).

LAB can be classified as homofermentative, producing almost exclusively lactic acid on hexoses, and heterofermentatives that, besides lactic acid, also produce acetic acid, ethanol and  $\text{CO}_2$  as products of the fermentation of hexoses and pentoses (Axelsson, 2004). The facultative heterofermentative use the same hexoses pathway of homofermentative, but they are able to ferment pentoses, as they have aldolase and fosfocetolase enzymes. The facultative heterofermentative may produce lactic and acetic acids when the substrate is a pentose, or lactic acid, ethanol and  $\text{CO}_2$  when hexose is the substrate, due to the need of oxidation of two NAD molecules produced in the glycolytic pathway (White, 2000).

According to Moon (1983), propionic and acetic acids shows a synergistic effect that is able to reduce the growth of yeasts and filamentous fungi and can increase the aerobic stability of silage. When the pH value was below 4.73, acetic acid was primarily in its undissociated form. In this form, the membranes of yeasts and filamentous fungi become permeable to the acetic acid. Within the cell, the acid is dissociated ( $\text{RCOO}^- + \text{H}^+$ ) due to the pH being close

to 7.0, releasing  $H^+$  ions, which reduces the intracellular pH leading to death of the microorganism (McDonald *et al.*, 1991; Davidson, 2007).

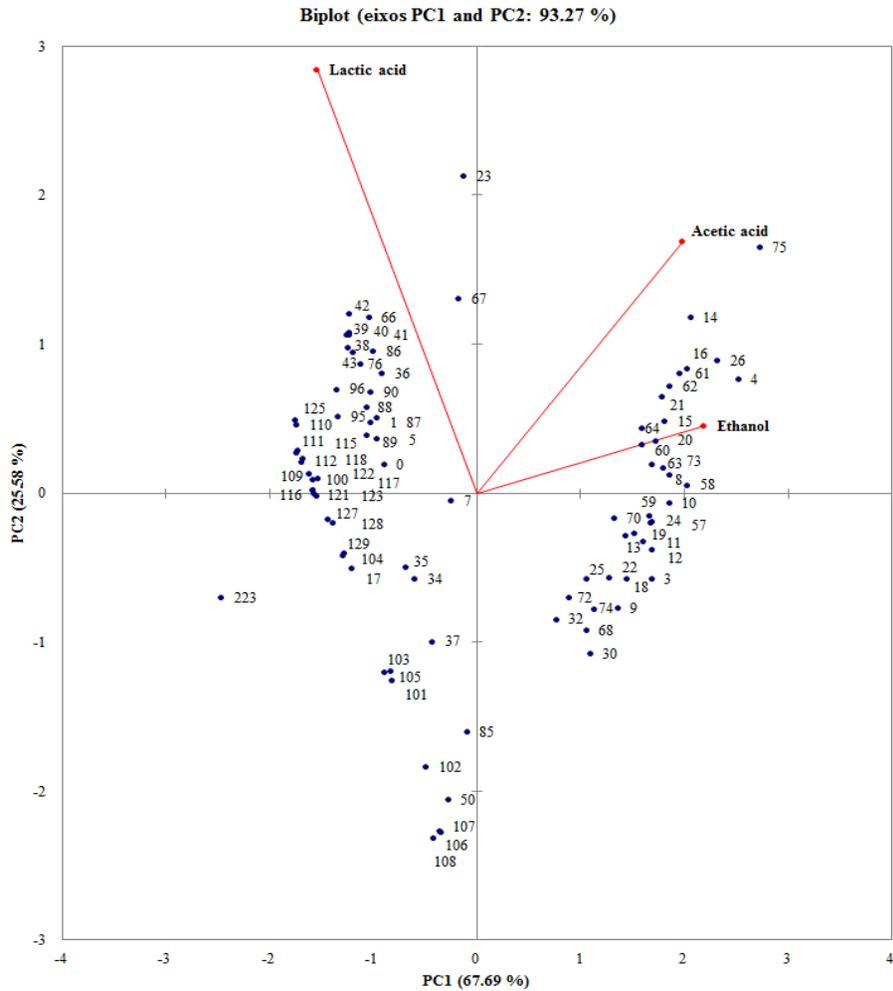


Figure 3 Principal component analysis of the products of metabolism (lactic acid, acetic acid and ethanol) of UFLA SLM LAB isolates evaluated

#### 4 CONCLUSION

This research has contributed to our understanding of the bacterial community structure of lactic acid present in maize silage produced in the Brazilian Minas Gerais state, since studies that describe the LAB population present in the region evaluated are uncommon. The fingerprints obtained by RAPD-PCR with M13 primer were more complex and discriminatory than those obtained with the REP-PCR technique using (GACA)<sub>4</sub> primer. The results demonstrate the usefulness of M13 fingerprinting as a rapid method and alternative strategy to other methods of (sub)species identification and enabled the precise grouping of isolated LAB isolates. Eleven species were identified in the silages evaluated wherein *L. buchneri* and *L. rhamnosus* have a higher amplitude distribution among samples. Previously described species in silages from other forage crops were found in the evaluated maize silage.

The metabolic characterisation of isolates allows the grouping of the same according to the production profile of metabolites evaluated and showed correlation with the results obtained by genotypic characterisation.

From the knowledge and identification of lactic microbiota present in maize silage produced in this region, further studies can be conducted to assess the potential of these isolates as starter cultures for the production of maize silage.

## REFERENCES

- Antonio, M.A. and Hillier, S.L. (2003). DNA fingerprinting of *Lactobacillus crispatus* strain CTV-05 by repetitive element sequence-based PCR analysis in a pilot study of vaginal colonization. *J Clin Microbiol* **41**, 1881–1887.
- Ávila, C.L.S., Carvalho, B.F., Pinto, J.C., Duarte, W.F. and Schwan, R.F. (2014). The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. *J Dairy Sci* **97**, 1–12.
- Axelsson, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology (2004). In: Salminen, S. & Von Wright, A. (Ed.) *Lactic Acid Bacteria*. New York: Marcel Dekker, p. 1-63.
- Bove, C.G., De Dea Lindner, J., Lazzi, C., Gatti, M., and Neviani, E. (2011). Evaluation of genetic polymorphism among *Lactobacillus rhamnosus* non-starter Parmigiano Reggiano cheese strains. *Int J Food Microbiol* **144**, 569–572.
- Brusetti, L., Borin, S., Mora, D., Rizzi, A., Raddadi, N., Sorlini, C. and Daffonchio, D. (2006). Usefulness of length heterogeneity-PCR for monitoring lactic acid bacteria succession during maize ensiling. *FEMS Microbiol Ecol* **56**, 154–164.
- Cai, Y., Benno, Y., Ogawa, M., and Kumai, S. (1999). Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. *J Dairy Sci* **82**:520–526.
- Dasen, A., Berthier, F., Grappin, R., Williams, A.G., and Banks, J. (2003). Genotypic and phenotypic characterization of the dynamics of the lactic acid bacterial population of adjunct-containing Cheddar cheese manufactured from raw and microfiltered pasteurised milk. *J Appl Microbiol* **94**, 595–607.
- Davidson, P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds (2007). In: Doyle, M.P., L.R. Beuchat and T.J. Monteville (Ed.) *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*. Washington: ASM. p. 713–746.
- Driehuis, F., Elferink, S.J.W.H.O. and Spoelstra, S.F. (1999). Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J Appl Microbiol* **87**, 583-594.

- Elferink, S.J.W.H.O., Krooneman, J. and Gottschal, J.C. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 125–132.
- Felis, G.E. and Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr Issues Intest Microbiol* **8**, 44–61.
- Germond, J.E., Lapiere, L., Delley, M., Mollet, B., Felis, G.E., and Dellaglio, F. (2003). Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic study with reflections on prokaryotic species concept. *Mol Biol Evol* **20**, 93– 104.
- Gevers, D., Huys, G., and Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* **205**, 31–36.
- Giraffa, G. and Neviani, E. (2000). Molecular identification and characterisation of food-associated lactobacilli. *Ital J Food Sci* **12**, 403– 423.
- Hammes, W. P. and Hertel, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* (2003). In: DWORKIN, M. et al. (Ed.). *The Prokaryotes, an evolving electronic resource for the microbiological community*. New York: Springer-Verlag, p. 320-403.
- Khan, N.A., Yu, P., Ali, M., Cone, J.W., and Hendriks, W.H. (2015). Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. *J Sci Food Agric* **95**, 238–252.
- Krooneman, J., Faber, F., Alderkamp, A.C., Elferink, O.S.J.H.W., Driehuis, F., Cleenwerck, I., Swings, J., Gottschal, J.C. and Vancanneyt, M. (2002). *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 639-646.
- Lane, D. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques*. (1991). In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (Ed.) *Bacterial Systematics*. J Wiley and Sons, Chichester: 115-175.
- Li, Y. and Nishino, N. (2011) Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. *J Jpn Grassl Sci* **57**, 184–191.
- Lin, C., Bolsen, K.K., Brent, B.E., and Fung, D.Y.C. (1992) Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *J Appl Microbiol* **73**, 375–387.

- Mancini, A., Lazzi, C., Bernini, V., Neviani, E., and Gatti, M. (2012). Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNA Ala-23S rDNA-RFLP. *J Microbial Methods*, **91**, 380-390.
- Mcdonald, P., Henderson, A.R. and Heron, S.J.E. (1991). The biochemistry of silage, 2nd ed. Lincon, UK: Chalcombe Publications.
- Moon, N. J. 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J Appl Bacteriol* **55**, 454-460.
- Muck, R.E. (2008). Improving alfalfa silage quality with inoculants and silo management. In Henry, S.A., Nyrop, J.P., Knuth, B.A., Viands, D.R., Dillard, H.R. Proceedings of the 70th Annual Cornell Nutrition Conference For Feed Manufacturers, p 137-146. Cornell University, Syracuse, NY.
- Ohmomo, S., Tanaka, O., Kitamoto, H.K., and Cai, Y. (2002). Silage and microbial performance, old history but new problem. *JARQ*, v. 40, n. 2, p. 59-71.
- Pahlow, G., Muck, R.E., and Driehuis, F. (2003). Microbiology of ensiling. In: Silage Science and Technology. Madison. Proceedings... Madison: ASCSSA-SSSA, Agronomy 42, p. 31-93
- Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G.E., and Torriani, S. (2010). Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: a multivariate screening study. *Int J Food Microbiol* **144**, 270-279.
- Parente, E., Guidone, A., Matera, A., De Filippis, F., Mauriello, G., and Ricciardi, A. (2016). Microbial community dynamics in thermophilic undefined milk starter cultures. *Int J Food Microbiol* **217**, 59-67.
- Rossetti, L., and Giraffa, G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J Microbiol Methods* **63**, 135-144.
- Rossi, F. and Dellaglio, F. (2007) Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. *J Appl Microbiol* **103**, 1707-1715.
- Sachinandan, D., Gurpreet, K., Amit, R., Gaurav, D., Ramakant, K., Paras Y., Rameshwar, S., Tirtha, K.D., and Surender, L.G. (2010). A Simple Method for the Efficient Isolation of Genomic DNA from *Lactobacilli* Isolated from Traditional Indian Fermented Milk (dahi). *Indian J Microbiol* **50**, 412-418.

- Santos, A.O., Ávila, C.L.S. and Schwan, R.F. (2013a). Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. *J Dairy Sci* **96**, 7777-7789.
- Santos, E. M., Silva, T. C., Macedo, C. H. O., and Campos, F. S. (2013b). Lactic acid bacteria in tropical grass silages. In: Kongo, M. (Ed.) *Lactic Acid Bacteria: R&D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech, Rijeka, Croatia, p. 335-362.
- Schleifer K.H. (2009) Family I. *Lactobacillaceae* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, familia. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D. et al. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edn. Vol. 3: The *Firmicutes*. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, pp. 465–532.
- Shehata, A.S., Mukherjee, P.K., Aboulatta, H.N., El Akhras, A.I., Abbad, S.H., and Ghannoum, M.A. (2008). Single-Step PCR Using (GACA)<sub>4</sub> Primer: Utility for Rapid Identification of Dermatophyte Species and Strains. *J Clin Microbiol* **46**, 2641–2645.
- Švec, P., Kukletova, M., and Sedláček, I. (2010). Comparative evaluation of automated ribotyping and RAPD-PCR for typing of *Lactobacillus* spp. occurring in dental carries. *Antonie van Leeuwenhoek* **98**, 85–92.
- Tajabadi, N., Mardan, M., Saari, N., Mustafa, S., Bahreini, R. and Abdul Manap, M. (2013). Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Braz J Microbiol*, **44**, 717-722.
- Torriani, S., Zapparoli, G., and Dellaglio, F. (1999). Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4351-4356.
- Turková, K., Rittich, B., and Španová, A. (2012). Identification and determination of relatedness of lactobacilli using different DNA amplification methods. *Chemical Papers* **66**, 842-851.
- Vauterin, L. and Vauterin, P. (1992). Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. *Eur Microbiol* **1**, 37-41.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., and Lupski, J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Meth Mol Cell Biol* **5**, 25-40.
- White, D. (2000). *The physiology and biochemistry of Prokaryotes*. Oxford University Press, ISBN 0195125797, USA

- Winslow, C.E.A., Broadhurst, J., Buchanan, R.E., Krumwiede, C., Jr, Rogers, L.A. and Smith, G.H. (1917). The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization of bacterial types. *J Bacteriol* **2**, 505–66.
- Woods, C.R., Versalovic, J., Koeuth, T., and Lupski, J.R. (1993). Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *J Clin Microbiol* **31**, 1927–1931.