



**MARCUS VINICIUS SANTA BRÍGIDA CARDOSO**

**SELEÇÃO E USO DE ISOLADOS EPIFÍTICOS DE  
BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO COMO INOCULANTES  
PARA SILAGEM DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADOS**

**LAVRAS - MG  
2023**

**MARCUS VINICIUS SANTA BRÍGIDA CARDOSO**

**SELEÇÃO E USO DE ISOLADOS EPIFÍTICOS DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO  
LÁTICO COMO INOCULANTES PARA SILAGEM DE GRÃOS DE MILHO  
REIDRATADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Prof<sup>a</sup> Dr. Carla Luiza da Silva Ávila  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2023**

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

Cardoso, Marcus Vinicius Santa Brígida.

Seleção e uso de isolados epifíticos de bactérias do ácido láctico  
como inoculantes para silagem de grãos de milho reidratados /  
Marcus Vinicius Santa Brígida Cardoso. - 2023.

105 p.

Orientador(a): Carla Luiza da Silva Ávila.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.  
Bibliografia.

1. Inoculante bacteriano. 2. Bactéria do ácido láctico. 3.  
Processo de ensilagem. I. Ávila, Carla Luiza da Silva. II. Título.

**MARCUS VINICIUS SANTA BRÍGIDA CARDOSO**

**SELEÇÃO E USO DE ISOLADOS EPIFÍTICOS DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO  
LÁTICO COMO INOCULANTES PARA SILAGEM DE GRÃOS DE MILHO  
REIDRATADOS**

**SCREENING AND USE OF EPITHYTIC LACTIC ACID BACTERIA AS  
INOCULANTS IN REHYDRATED CORN GRAIN SILAGE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em 06 de Outubro de 2023

Dr. Aníbal Coutinho do Rêgo – UFC

Dr. Cristina Ferreira Silva – UFLA / DBI

Dr. Filipe Elias de Freitas Soares – UFLA / DQI

Dr. João Luiz Pratti Daniel - UEM



Prof<sup>a</sup> Dr. Carla Luiza da Silva Ávila

Orientadora

**LAVRAS – MG  
2023**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por todas as portas que me foram abertas até hoje para que eu consiga alcançar meus objetivos.

Aos meus pais Elias Navarro Cardoso e Sandra Catarina Costa Santa Brígida por todos os ensinamentos, toda a educação, carinho, amor, e apoio prestado durante esses anos. Vocês são meus principais pilares durante toda essa caminhada. Obrigado por tudo. Amo vocês.

Ao meu irmão Victor Cardoso e todos os meus familiares que, mesmo longe, estão sempre me apoiando.

À Universidade Federal de Lavras e ao PPGZ pela oportunidade.

À minha querida orientadora Prof.<sup>a</sup> Carla Ávila por todo o conhecimento, paciência, orientação, apoio e por ter me concedido a oportunidade de ser seu aluno.

Aos meus parceiros (as) da pós-graduação pelo companheirismo e principalmente a amizade.

Aos meus amigos do grupo da microbiologia, da conservação e ao grupo NEFOR que sempre estiveram dispostos a me ajudar com os experimentos.

Ao meu professor e amigo Thiago Fernandes Bernardes por tudo o fez por mim e por ter acreditado no meu potencial no começo do doutorado e me dado a chance de continuar com a minha trajetória. Meu mais sincero muito obrigado.

Aos meus grandes amigos Álvaro Chelone e Hullas Júnior que sempre estiveram do meu lado dando apoio, amizade, parceria e todos os bons momentos que compartilhamos nesses anos.

Às repúblicas Tipo1Bar e Kongo e todos os membros da casa pela amizade e por sempre me receberam de braços e portas abertas. Que Deus abençoe cada um de vez.

Aos demais amigos que ganhei durante esses anos, em especial Marcos Paulo, Laura, Bianca, Edna, dentre muitos outros, pela amizade e momentos de descontração dentro e fora da universidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e finalização deste trabalho.

*Muito obrigado!!!*

## RESUMO GERAL

Com o objetivo de selecionar e avaliar o uso de microrganismos epifíticos de silagens de grãos de milho reidratados (SGMR) como inoculantes bacterianos, foram realizados dois estudos. No primeiro trabalho o objetivo foi isolar, caracterizar e selecionar com base em testes laboratoriais, cepas de BAL com capacidade de utilização como inoculantes em SGMR. O milho foi moído (1 mm) e reidratado (320 L H<sub>2</sub>O.ton<sup>-1</sup>), atingindo 33,9% de umidade. Foi compactado, em média, 5,096 ± 0,04 kg de milho reidratado (densidade = 943,66 ± 8,67 kg.m<sup>-3</sup>) e as silagens foram estocadas por 1, 3, 5, 15, 30 e 60 dias. Foi realizada a contagem de BAL em dois meios de cultura: MP = MRS Padrão; MM = MRS modificado. Os isolados foram avaliados quanto o seu crescimento, capacidade de reduzir pH, produção de compostos orgânicos, produção de gás, inibição de microrganismos deterioradores/patogênicos e degradação de amido. Todos os isolados foram capazes de reduzir o pH para valores menores que 4,00 e 78,5% dos isolados aumentaram sua contagem (5,000 para 9,674 log UFC.mL<sup>-1</sup>). Todos os isolados foram capazes de produzir compostos orgânicos e de inibir o crescimento de microrganismos deterioradores/patogênicos. Um total de 140 isolados viáveis foram obtidos e 21 foram selecionados para avaliação em silagens como possíveis inoculantes bacterianos. No segundo trabalho o objetivo foi avaliar inoculantes bacterianos compostos por isolados epifíticos de BAL previamente selecionados para estas silagens, sobre o perfil de fermentativo, valor nutritivo e estabilidade aeróbia de SGMR em diferentes tempos de estocagem. Os tratamentos consistiram em SGMR sem inoculante (Controle), SGMR inoculadas com nove diferentes inoculantes; 8 isoladas de SGMR (S-52; S-86; S-106; S-110; S-116; S-180; S-190; S-221) e *Lactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 (CCMA 0170) (S-LH), estocadas por 45 e 90 dias. O milho (5,361 ± 0,08 kg) foi compactado em baldes (5L; densidade = 992,85 ± 16,37 kg m<sup>-3</sup>). As características químicas, valor nutritivo e estabilidade aeróbia das silagens foram avaliadas. Maiores PMS foram observadas na silagem S-LH (6,71%; *P* = 0,001). Silagem S-190 e estocadas por 45 dias tiveram menor valor de pH (3,71; *P* < 0,001). O N-NH<sub>3</sub> aumentou com a estocagem (2,30 vs 5,34%; *P* < 0,001). A silagem S-190 promoveu silagens com menor concentração de zeína (4,02%; *P* < 0,001). Menores contagens de leveduras foram obtidas na silagem S-116 (1,259 log UFC; *P* < 0,001), bem como com o tempo de estocagem (2,780 vs 1,409 log UFC; *P* < 0,001). O tempo de fermentação aumentou as concentrações de ácido láctico (2,08 vs 2,43%; *P* = 0,010) e acético (0,26 vs 0,35%; *P* < 0,001) e reduziu o teor de etanol (0,52 vs 0,42%; *P* = 0,033). Maior teor de ácido láctico e acético observadas nas silagens S-116 e S-190 (2,79%; 2,90%; *P* < 0,001) e S-LH (0,76%; *P* foram < 0,001), respectivamente. Maior tempo de estabilidade foi observado na silagem S-LH estocada por 90 dias (*P* = 0,019). O tempo de estocagem aumentou (*P* < 0,001) a digestibilidade *in situ* do amido das silagens.

**Palavras-chave:** Inoculante bacteriano. Bactéria do ácido láctico. Processo de Ensilagem. Atividade Proteolítica.

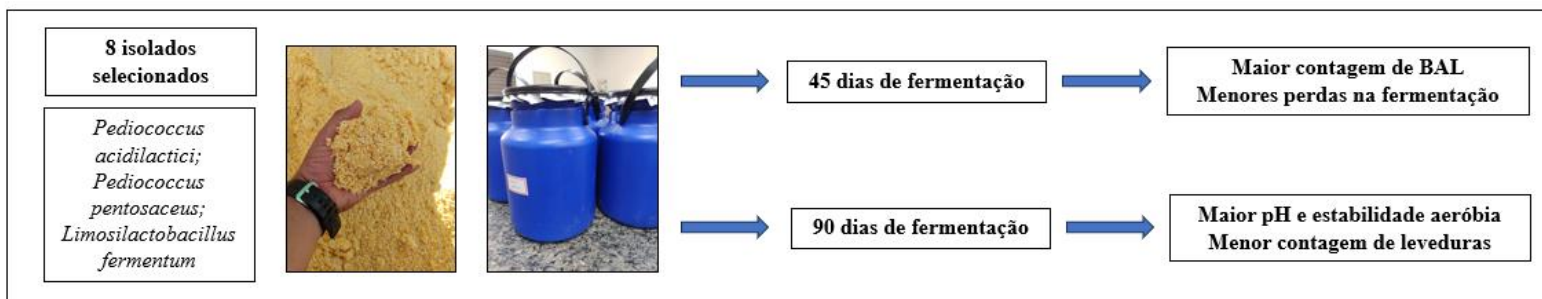
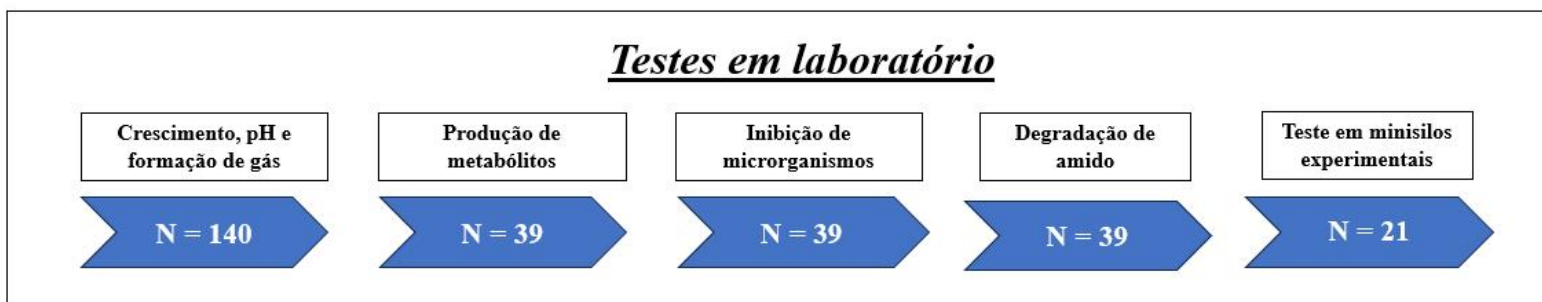
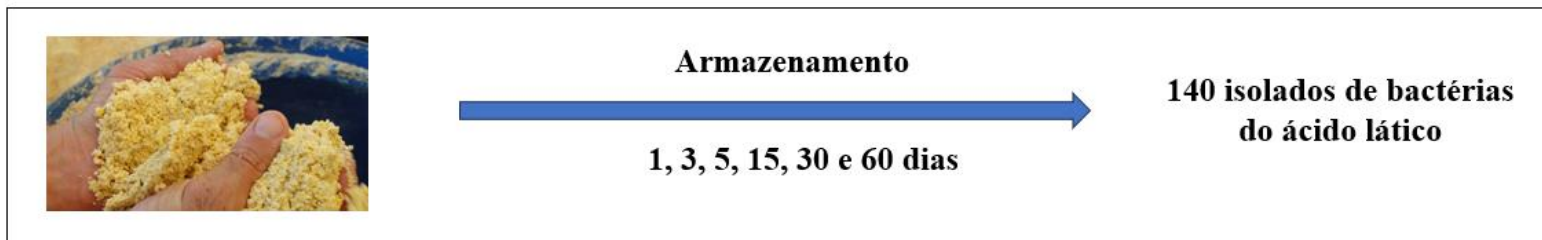
## GENERAL ABSTRACT

Two experiments were carried out to select and evaluate the use of native microorganism from rehydrated corn grain silage (RCGS) as bacterial inoculants. For the first experiment, the aim with this study was to identify, characterized and select based on laboratory trials, LAB strains that can be used as bacterial inoculants for rehydrated corn grain silage (RCGS). The corn was grounded (1 mm) and rehydrated ( $320 \text{ H}_2\text{O} \cdot \text{ton}^{-1}$ ), reaching a humidity concentration of 33.9%. It was packed, in average,  $5.096 \pm 0.04 \text{ kg}$  of rehydrated corn (density =  $943.66 \pm 8.67 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ) and silages were storage by 1, 3, 5, 15, 30 and 60 days. The microorganism count was carried out using two different culture mediums: MP = standard MRS; MM = modified MRS. The isolates were evaluated in different tests: growth, the ability to reduce pH, organic compounds production, gas production, reduce deteriorate/pathogenic microorganism growth and starch degradation. The pH was lower than 4.00 for all the isolates evaluated and 78.5% of the isolates increased their count ( $5.000$  to  $9.674 \text{ log CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). All the isolates were capable of to produce organic compounds and to reduce the deteriorate/pathogenic microorganism growth. A total of 140 viable isolates were obtained and 21 were selected to silage evaluation as bacterial inoculants. For the second experiment, the aim was to evaluate the effect of bacterial inoculants based on LAB isolates previously selected from rehydrated corn grain silage (RCGS) for these silages on fermentative profile, nutritive value and aerobic stability. The treatments were: RCGS without inoculant (control), RCGS inoculated with eight different bacterial isolates (S-52; S-82; S-106; S-110; S-116; S-180; S-190; S-221), and *Lactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 (CCMA 0170) (S-LH), storage for 45 and 90 days. In average,  $5.361 \pm 0.08 \text{ kg}$  of silage was packed, reaching a density of  $992.85 \pm 16.37 \text{ kg m}^{-3}$ . The silage fermentative characteristics, nutritive value and aerobic stability were evaluated. The S-LH silage had higher DM losses (6.71%;  $P = 0,001$ ). Inoculated silage with the 190 isolate and storage for 45 days had lower pH value in comparison to the other silages (3.71;  $P < 0.001$ ). The  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration increased with the storage time (2.30 vs 5.34%;  $P < 0.001$ ). The S-190 silage had lower zein concentration (4.02%;  $P < 0.001$ ). The yeast count was lower for S-116 silage ( $1.256 \text{ log CFU}$ ;  $P < 0.001$ ), as well as the storage time (2.780 vs  $1.409 \text{ log UFC}$ ;  $P < 0.001$ ). The fermentation time increased the lactic (2.08 vs 2.43%;  $P = 0.010$ ) and acetic (0.26 vs 0.35%;  $P < 0.001$ ) acid concentrations and reduced the ethanol concentration (0.52 vs 0.42%;  $P = 0.033$ ). The higher lactic and acetic acid concentrations were observed in S-116 and S-190 (2.79%; 2.90%;  $P < 0.001$ ) and S-LH silages (0.52 vs 0.42%;  $P = 0.033$ ), respectively. The S-LH silage stored by 90 days had the higher aerobic stability ( $P = 0,019$ ). The storage time increased ( $P < 0,001$ ) the starch in situ digestibility.

**Keywords:** Bacterial inoculant. Lactic Acid Bacteria. Ensiling Process. Proteolytic Activity

## RESUMO INTERPRETATIVO E RESUMO GRÁFICO

O propósito foi isolar, caracterizar e selecionar cepas epifíticas de bactérias do ácido de silagens de grãos reidratados de milho como base para a formação de inoculantes. Um total de 140 isolados viáveis foram obtidos, caracterizados e 8 isolados com boas características foram estudados como inoculantes nestas silagens em diferentes tempos de estocagem. Os inoculantes afetaram de forma variável nas características fermentativas, nutricionais e na estabilidade aeróbia das silagens. Alguns isolados mostraram efeitos positivos quanto a redução de perdas de matéria seca, aumento de estabilidade aeróbia e controle do crescimento de microrganismos deterioradores, além de aumentar a concentração dos produtos da fermentação dessas silagens.





## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>10</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Silagem de grãos de milho reidratados: estado da arte</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 Metabolismo e sistema proteolítico de BAL</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2.1 – Metabolismo de hexoses e pentoses em silagens por BAL</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2.2 – Enzimas</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2.3 – Proteína do grão de milho (zeína)</b> .....	<b>31</b>
<b>2.2.4 – Sistema proteolítico e uso de aminoácidos por BAL</b> .....	<b>32</b>
<b>2.3 Bioprospecção de inoculantes para silagens</b> .....	<b>37</b>
<b>2.3.1 – Isolamento dos microrganismos (meio de cultura) e testes bioquímicos</b> .....	<b>38</b>
<b>2.3.2 – Teste de fermentação de carboidratos e produção de gás em BAL</b> .....	<b>40</b>
<b>2.3.3 – Atividade antagônica</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	<b>52</b>
<b>ARTIGO 1 – SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO DE SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADO PARA USO COMO INOCULANTES</b> .....	<b>52</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
<b>2.1 Ensilagem e amostragem</b> .....	<b>55</b>
<b>2.2 Isolamento dos microrganismos</b> .....	<b>57</b>
<b>2.3 Avaliação do crescimento e capacidade de redução do pH em extrato de grãos de milho</b> .....	<b>57</b>
<b>2.4 Teste de inibição de microrganismos deterioradores/patogênicos e de degradação de amido</b> .....	<b>57</b>
<b>2.5 Análise estatística</b> .....	<b>58</b>
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
<b>3.1 Perdas na ensilagem, pH e contagem de BAL</b> .....	<b>59</b>
<b>3.2 Seleção dos inoculantes</b> .....	<b>59</b>

<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>

**ARTIGO 2 – CEPAS EPIFÍTICAS DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADO MODIFICAM DE FORMA VARIÁVEL AS CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS E NUTRICIONAIS DESTAS SILAGENS..... 78**

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>81</b>
<b>2.1 Processo de ensilagem.....</b>	<b>81</b>
<b>2.2 Análises químicas e fermentativas.....</b>	<b>82</b>
<b>2.3 Análises microbiológicas .....</b>	<b>83</b>
<b>2.4 Atividade enzimática específica .....</b>	<b>83</b>
<b>2.5 Estabilidade aeróbia .....</b>	<b>84</b>
<b>2.6 Digestibilidade in situ .....</b>	<b>84</b>
<b>2.7 Análise Estatística .....</b>	<b>85</b>
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>85</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>95</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>103</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

Silagens de grãos de milho reidratados (SGMR) tem sido extensivamente explorado nos sistemas de produção animal no Brasil (SILVESTRE; MILLEN, 2021; SANTOS et al., 2019; BERNARDES et al., 2018). A ensilagem dos grãos de milho proporciona benefícios nutricionais (e.g. maior digestão do amido) além de uma melhor eficiência alimentar quando comparado com grãos moídos na dieta dos animais (JACOVACI et al., 2021; FERRARETTO et al., 2015). Contudo, a menor disponibilidade de carboidratos solúveis pode comprometer a fermentação dos grãos quando ensilados.

As bactérias do ácido lático (BAL) são os microrganismos protagonistas e que dominam a fermentação da silagem de grãos (FERNANDES et al., 2022; MUCK, et al. 2018). Em SGMR, a atividade proteolítica é um dos principais processos metabólicos realizados durante a estocagem (HOFFMAN et al., 2011). Segundo Junges et al. (2017), a proteólise oriunda de bactérias é o maior contribuinte da degradação da matriz proteica do grão, porém, os mesmos autores não relataram quais microrganismos são capazes de realizar tal processo. Carvalho et al. (2017) identificaram microrganismos em SGMR estocadas de 0 a 280 dias e observaram a dominância de BAL ao longo da fermentação, contudo, nenhuma inferência sobre a capacidade proteolítica das BAL identificadas foi realizada na pesquisa.

Nos últimos anos (2005 – 2023), um comportamento crescente do total de estudos publicados na literatura sobre SGMR pôde ser observado, onde os primeiros estudos científicos no Brasil foram reportados em 2005 (BENTON et al., 2005; LOPES et al., 2005). Dentre eles, os estudos envolvendo a caracterização e identificação de microrganismos epifíticos foram pouco explorados (FERNANDES et al., 2022; AGARUSSI et al., 2022; CARVALHO et al., 2017), bem como estudos envolvendo o efeito de inoculantes bacterianos na ensilagem, exclusivamente, de grãos reidratados de milho (ZANIN et al., 2022; CRUZ et al., 2021; SILVA et al., 2019; SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2016). Não obstante, nenhum trabalho estudou a possibilidade de se utilizar microrganismos epifíticos de SGMR como possíveis inoculantes bacterianos para estas silagens.

A adição de inoculantes bacterianos na ensilagem é uma tecnologia que pode auxiliar no melhor padrão de fermentação durante a estocagem dos grãos e o uso de microrganismos epifíticos podem atender a essa demanda. Estudos na literatura relatam a eficácia e os efeitos positivos que microrganismos epifíticos podem trazer quando inoculados em silagens

(AMARAL et al., 2022; LI et al., 2015; ÁVILA et al., 2014; CARVALHO et al., 2014; SANTOS et al., 2013; SAARISALO et al., 2007). É possível que inoculantes bacterianos baseados em microrganismos nativos de SGMR com capacidade proteolítica podem também trazer resultados positivos para essas silagens.

Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo: (I) isolar, caracterizar e selecionar com base em testes laboratoriais, cepas de BAL com capacidade de utilização como inoculantes em silagens de SGMR; (II) avaliar inoculantes bacterianos compostos por isolados epifíticos de BAL previamente selecionados para estas silagens, sobre o perfil fermentativo, valor nutritivo e estabilidade aeróbia de SGMR em diferentes tempos de estocagem.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Silagem de grãos de milho reidratados: estado da arte

No Brasil, o milho é a cultura mais utilizada para a produção de silagem (SANTOS et al., 2020; BERNARDES et al., 2018; BERNARDES; RÊGO, 2014) e a ensilagem de milho (e.g. planta inteira, grãos úmidos, reidratados e espigas) têm sido cada vez mais utilizada em sistemas intensivos de produção de corte e leite (SILVESTRE; MILLEN, 2021; BERNARDES et al., 2018).

Em se tratando de silagem de grãos de milho reidratados (SGMR), Bernardes et al. (2018) entrevistaram 146 fazendas leiteiras em 6 estados brasileiros e observaram que SGMR foram utilizados na dieta de vacas por 16,6% dos fazendeiros. Em sistemas intensivos de gado de corte, Bernardes e Castro (2019) avaliando 82 confinamentos brasileiros, relataram que o uso de SGMR representaram 2% dos ingredientes da dieta dos animais. Silvestre e Millen (2021), por sua vez, entrevistando 96 fazendas brasileiras de produção de bovinos de corte reportaram que o uso de SGMR representavam 2,78% dos ingredientes na dieta, respectivamente.

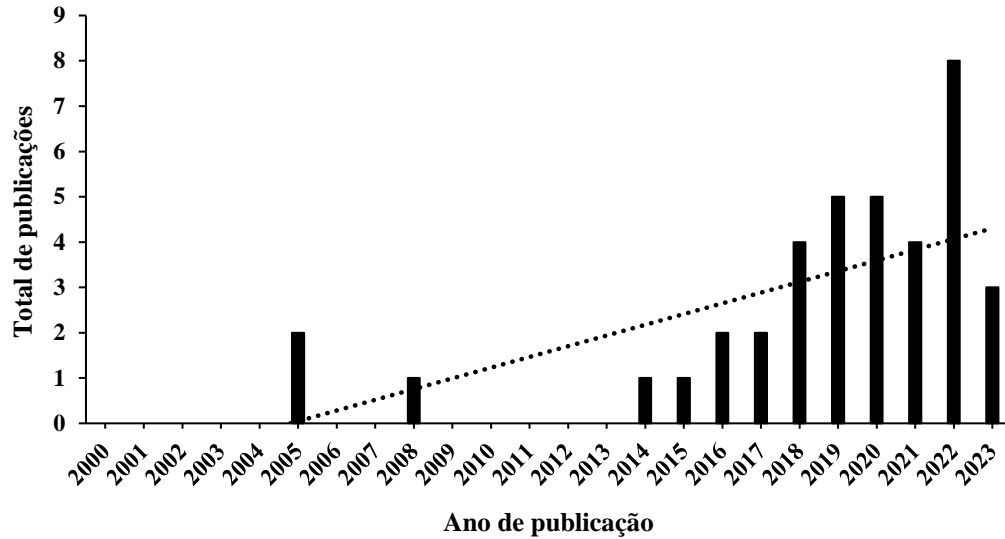
O fato desse alimento se mostrar mais presente nas dietas impulsiona pesquisadores e empresas a buscar mais conhecimento das características gerais da SGMR. Com o objetivo de obter informações e entender o cenário atual das pesquisas que envolvem a SGMR, um levantamento dos últimos 23 anos foi realizado sobre as principais pesquisas realizadas que envolvem esse alimento. Nesse levantamento, foram considerados apenas estudos devidamente indexados em periódicos científicos no período de Janeiro de 2000 a Agosto de 2023, excluindo pesquisas publicadas anteriores à esse período. A pesquisa dos *papers* foi realizada no *Scopus*, *Scielo* e *Wiley Online Library*. Foi observado um total de 38 artigos publicados sobre SGMR (Gráfico 1).

Os períodos compreendidos entre 2000 e 2004 e os anos 2006 e 2007, não foram encontrados nenhuma publicação sobre estudos realizados com SGMR e apenas dois trabalhos publicados no ano de 2005 e um em 2008. As pesquisas com SGMR tiveram um pequeno impulso somente em 2014 e com uma tendência de mais estudos com o decorrer dos anos.

De acordo com Silvestre e Millen (2021), em 2009 apenas 6,5% dos nutricionistas brasileiros recomendavam o uso de SGMR em dietas de confinamentos de gado de corte. Contudo, esse percentual subiu para 24,3% em 2014 e 38,9% em 2019, o que representa um aumento de 32,4% no total de recomendações nesse período de 10 anos. De acordo com o

levantamento, o total artigos publicados tenderam a aumentar ao longo dos anos, provavelmente devido à busca por mais conhecimento sobre esse tipo de silagem.

**Gráfico 1** - Pesquisas realizadas sobre SGMR publicados em periódicos científicos entre Janeiro de 2000 a Agosto de 2023.



Fonte: Arquivo pessoal

Em relação aos artigos publicados, estes mostraram-se bem variados, partindo desde estudos com teor de umidade do grão na ensilagem, avaliação do perfil de fermentação, dinâmica da população de microrganismos, aditivos (químicos, bacterianos, enzimáticos), características do grão na ensilagem sobre a fermentação até a avaliação da digestibilidade do grão após ensilado (Tabela 1).

**Tabela 1** – Total de pesquisas sobre SGMR em periódicos científicos, por ano de publicação (continua).

Ano / Título	Autores
<i>2005</i>	
Método de reconstituição da umidade de grãos de milho e a composição química da massa ensilada	Lopes et al.
Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein	Benton et al.
<i>2008</i>	
Hydration of grain kernels and its effect on drying	Ruiz et al.
<i>2014</i>	
Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality	Rezende et al.
<i>2015</i>	
Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn	Ferraretto et al.
<i>2016</i>	
Estabilidade de silagens de grãos úmidos de milho e milho reidratado	Silva et al.
Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability	Arcari et al.

**Tabela 1** – Total de pesquisas sobre SGMR em periódicos científicos, por ano de publicação (continua).

Ano / Título	Autores
<i>2017</i>	
Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages	Junges et al.
Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage	Carvalho et al.
<i>2018</i>	
Rehydration of dry corn grain as an alternative for conservation purposes	Mombach et al.
Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage treated with different doses of <i>Lactobacillus buchneri</i> or a combination of <i>Lactobacillus plantarum</i> and <i>Pediococcus acidilactici</i>	Silva et al.
Effect of ensiling time on fermentation profile and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated corn with or without varied concentrations of wet brewers grains	Ferraretto et al.
Corn grain processing improves chemical composition and fermentative profile of rehydrated silage	Silva et al.
<i>2019</i>	
Silage of rehydrated corn grain	Mombach et al.
Influence of storage length and inoculation with <i>Lactobacillus buchneri</i> on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of high-moisture corn and rehydrated corn grain silage	Silva et al.
Effects of exogenous amylolytic enzymes on fermentation, nutritive value, and in vivo digestibility of rehydrated corn silage	Oliveira et al.
Caracterização da silagem de grão de milho reidratado associado ao resíduo de tilápia	Ávila et al.
Amylolytic activity and chemical composition of rehydrated ground maize ensiled with $\alpha$ -amylase or glucoamylase	Gandra et al.



**Tabela 1** – Total de pesquisas sobre SGMR em periódicos científicos, por ano de publicação (continua).

Ano / Título	Autores
<i>2020</i>	
Fermentation profile and hygienic quality of rehydrated corn grains treated with condensed tannins from quebracho plant extract	Bueno et al.
Avaliação química da silagem de grão de milho reidratado em diferentes níveis de adição de água	Benini et al.
Rehydration of dry corn preserves the desirable bacterial community during ensiling	Carvalho-Estrada et al.
Effects of hybrid, kernel maturity, and storage period on the bacterial community in high-moisture and rehydrated corn grain silages	Carvalho-Estrada et al.
Short communication: Effects of processing, moisture, and storage length on the fermentation profile, particle size, and ruminal disappearance of reconstituted corn grain	Gomes et al.
<i>2021</i>	
Influence of hybrid, moisture, and length of storage on the fermentation profile and starch digestibility of corn grain silages	Fernandes et al.
Effect of particle size on storage time of rehydrated corn grain	Zacaron et al.
Effect of kernel breakage on the fermentation profile, nitrogen fractions, and in vitro starch digestibility of whole-plant corn silage and ensiled corn grain	Saylor et al.
Fermentative losses and chemical composition and in vitro digestibility of corn grain silage rehydrated with water or acid whey combined with bacterial-enzymatic inoculant	Cruz et al.

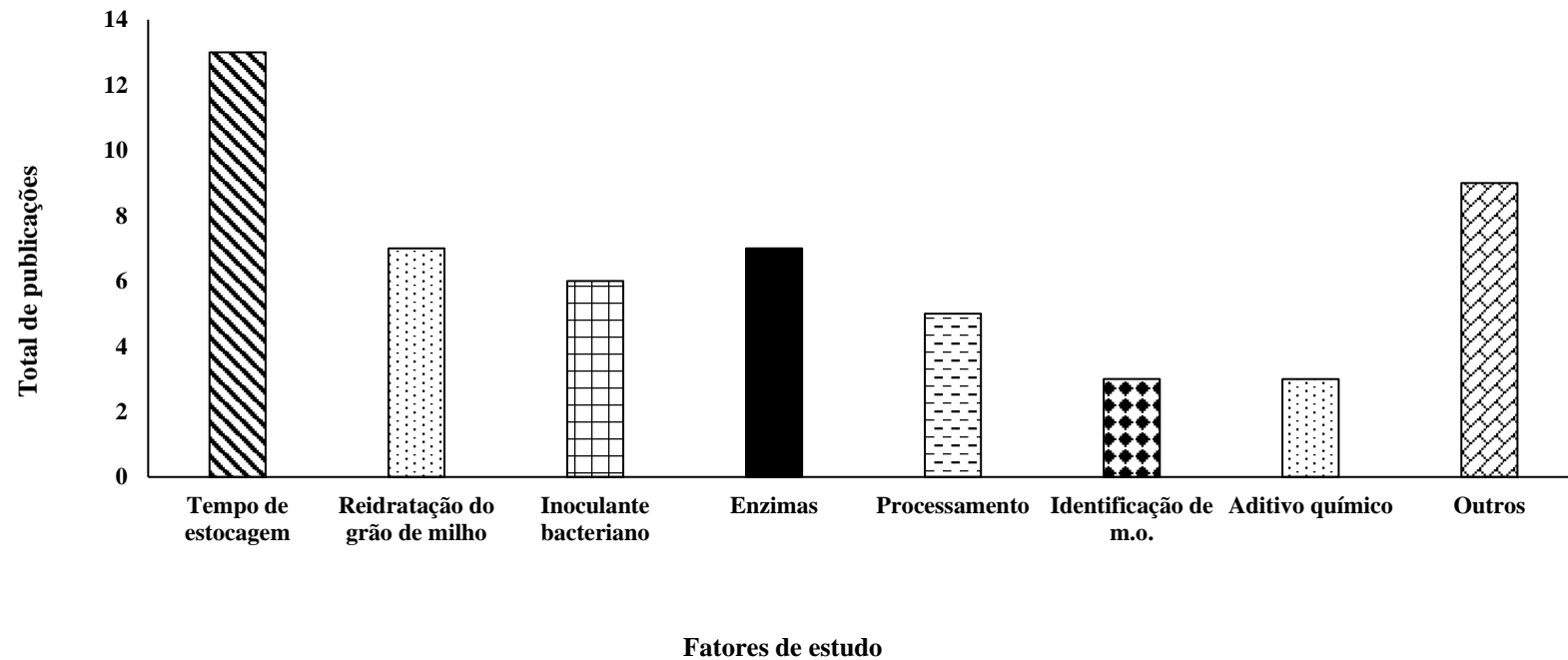
**Tabela 1** – Total de pesquisas sobre SGMR em periódicos científicos, por ano de publicação (conclusão).

Ano / Título	Autores
<i>2022</i>	
Effect of cactus pear as a moistening additive in the production of rehydrated corn grain silage	Pereira et al.
Effect of amylases and storage length on losses, nutritional value, fermentation, and microbiology of silages of corn and sorghum kernels	Fernandes et al.
Effects of different moist orange pulp inclusions in the corn grain rehydration for silage production on chemical composition, fermentation, aerobic stability, microbiological profile, and losses	Menezes et al.
Microbiome of rehydrated corn and sorghum grain silages treated with microbial inoculants in different fermentation periods	Agarussi et al.
Effects of amylase and glucoamylase on rehydrated corn ensiled for an extended period: nutritive value, fermentation profile, and amylolytic activity	Batista et al.
Propionic acid-based additive with surfactant action on the nutritive value of rehydrated corn grain silage for growing ewe lambs performance	Silva Neto et al
Effects of acid whey on the fermentative chemical quality and aerobic stability of rehydrated corn grain silage	Zanin et al.
Applying the benzoate equivalent concept in rehydrated corn grain silage	Daniel et al.
<i>2023</i>	
Effect of length of storage and chemical additives on the nutritive value and starch degradability of reconstituted corn grain silage	Oliveira et al.
Effects of exogenous protease addition on fermentation and nutritive value of rehydrated corn and sorghum grains silages	Roseira et al.
Particle size and storage length affect fermentation and ruminal degradation of rehydrated corn grain silage	Costa et al.

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Os principais fatores pesquisados nos estudos encontrados com SGMR foram tempo de estocagem (n=12), seguidos por teor de umidade do grão de milho (n=7), enzimas (n=7), inoculantes bacterianos (n=6), processamento de grãos (n=5) e aditivos químicos (n=3). Estudos que envolveram a identificação de microrganismos e avaliação de aditivos químicos nessas silagens foram menos observados (n=3) (Gráfico 2).

**Gráfico 2** - Principais fatores de estudo realizados com SGMR publicados em periódicos científicos.



Fonte: Arquivo pessoal

A análise de variáveis relacionadas aos objetivos dos estudos auxilia na busca por informações referentes ao alimento, bem como possibilitam aos pesquisadores entender como variáveis comuns ou específicas de uma determinada pesquisa se comportam frente a um fator aplicado. Diversas são as variáveis que podem ser estudadas com esse intuito. Em relação aos artigos publicados, composição química (matéria seca, proteína bruta, amido, entre outros), contagem de microrganismos, variáveis relacionadas ao perfil de fermentação (pH, produção de metabólitos, entre outros) e estabilidade aeróbia se mostraram como as variáveis comumente estudadas em todos os trabalhos publicados. Contudo, outras variáveis também foram observadas, porém em menor escala (Tabela 2). Vale ressaltar que uma análise mais refinada de cada variável deve ser realizada para melhor entender as particularidades de cada variável dentro de cada estudo.

**Tabela 2** – Variáveis analisadas em estudos realizados com SGMR publicados em periódicos científicos (n=38).

Variável	Total de papers	%
<i>Digestibilidade in situ MS (Frações A e B)</i>	13	34,2
<i>Perdas por gases</i>	11	28,9
<i>Perdas por efluentes</i>	8	21,1
<i>Proteína solúvel</i>	8	21,1
<i>Digestibilidade in vitro MS</i>	6	15,8
<i>Prolamina</i>	6	15,8
<i>Carboidrato solúvel</i>	6	15,8
<i>Tamanho geométrico médio de partícula</i>	5	13,2
<i>Digestibilidade in situ do amido</i>	5	13,2
<i>Atividade enzimática (amilolítica)</i>	5	13,2
<i>Digestibilidade in vitro do amido</i>	3	7,9
<i>Vitriosidade do grão</i>	2	5,3
<i>Acidez titulável</i>	2	5,3
<i>Aminas biogênicas e micotoxinas</i>	1	2,6
<i>Digestibilidade in situ da proteína</i>	1	2,6
<i>Degradação ruminal efetiva MS</i>	1	2,6
<i>Fração nitrogenada (A, B e C)</i>	1	2,6
<i>Fração solúvel MS</i>	1	2,6
<i>Glicose</i>	1	2,6

Fonte: Arquivo pessoal.

Variáveis relacionadas à digestibilidade do alimento foram muito frequentes nos trabalhos utilizando diferentes técnicas, sendo mais frequente os estudos relacionados com a digestão da matéria seca (MS), enquanto apenas 6 (15,8%) e 3 (7,9%) trabalhos avaliaram a digestão *in situ* e *in vitro* do amido, respectivamente. Em se tratando de

SGMR, avaliar a digestão do amido pode ser mais interessante do ponto de vista nutricional, uma vez que o processo de ensilagem dos grãos tem uma correlação positiva com a maior digestibilidade do amido (FERNANDES et al., 2021). Outras variáveis que também são de grande interesse no que diz respeito à SGMR são a concentração de prolamina e proteína solúvel. A proteína solúvel é um produto formado a partir da proteólise e que, quanto maior sua concentração, maior indicativo de atividade proteolítica durante a fermentação (FERRERATTO et al. 2015). Aliado a isso, a proteína solúvel pode ser tida como um melhor indicativo de proteólise em comparação ao N-NH<sub>3</sub> por este ser um indicativo do processo de desaminação (JUNGES et al., 2017). Ambas as variáveis possuem relação com a atividade proteolítica nos grãos ensilados, em especial a prolamina por ter um impacto direto nas respostas de digestibilidade (FERNANDES et al., 2021; JUNGES et al. 2017). Porém, poucos são os trabalhos que analisaram proteína solúvel (n=8; 21,1%) e prolamina (n=6; 15,8%) em SGMR (Tabela 2).

Algumas informações podem ser ressaltadas a partir dos principais fatores de estudos avaliados nos trabalhos publicados. A forma como o tempo de estocagem afeta diversas variáveis referentes à composição química, perfil de fermentação e microbiologia em SGMR foi observado. Estudos revelam que o avanço do tempo de estocagem tende a diminuir a concentração de MS da silagem. Costa et al. (2023) observaram uma redução de 588 para 534 g.kg<sup>-1</sup> (redução de 0,27 g.kg<sup>-1</sup> MS.dia<sup>-1</sup>) em SGMR estocadas de 0 a 200 dias. Fernandes et al (2022) observaram resultado similar onde a MS também reduziu em SGMR armazenadas de 30 (MS = 667 g.kg<sup>-1</sup>) a 180 dias (636 g.kg<sup>-1</sup>), redução de 0,21 g.kg<sup>-1</sup> MS.dia<sup>-1</sup>. Fernandes et al. (2021) avaliando SGMR de diferentes híbridos também relataram redução da concentração de MS quando as silagens foram armazenadas de 0 a 120 dias: 0,17 g.kg<sup>-1</sup> MS.dia<sup>-1</sup> para híbrido AG 1051 e 0,16 g.kg<sup>-1</sup> MS.dia<sup>-1</sup> para híbrido IAC 8390.

Maiores tempos de estocagem tendem a reduzir a concentração de MS, como pode ser observado pelos resultados citados anteriormente. De forma paralela, trabalhos relatam que as perdas de MS aumentam ao longo da estocagem, em outras palavras, ocorrem inversamente à redução da concentração de MS (FERNANDES, et al., 2022; BORREANI et al., 2018; CARVALHO et al., 2017). Os microrganismos no processo de ensilagem reforçam o seu uso como inoculantes bacterianos com o objetivo de reduzir tais perdas.

Similar à MS, os trabalhos demonstraram que o teor de amido das silagens também tende a diminuir com o avanço do armazenamento. Redução de 40 g.kg<sup>-1</sup> amido (0,20 g.kg<sup>-1</sup> amido.dia<sup>-1</sup>) foram observados em SGMR estocadas de 0 (700 g.kg<sup>-1</sup> amido) a 200 (660 g.kg<sup>-1</sup> amido) dias (COSTA et al., 2023). Oliveira et al. (2023) relataram redução de 34 g.kg<sup>-1</sup> amido quando SGMR foram ensiladas de 15 a 60 dias. De acordo com Van Soest (1994), as concentrações de amido, pectina e celulose não são degradados por microrganismos produtores de lactato durante o processo de ensilagem, podendo ser degradados por outras bactérias que não produzem ácido lático, proporcionalmente a atividade microbiana no interior do silo. Por outro lado, BAL representantes dos grupos *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* são reportados por produzirem ácido lático diretamente do amido como fonte de carbono, porém são considerados bastante raros (PETROVA; PETROV; STOYANCHEVA, 2013).

Como citado anteriormente, as concentrações de proteína solúvel, N-NH<sub>3</sub> e prolamina estão fortemente relacionadas à atividade proteolítica na fermentação das silagens de grãos e o tempo de estocagem pode afetar diretamente o teor de cada componente (JUNGES et al., 2017). Fernandes et al. (2022) observaram aumento na concentração de N-NH<sub>3</sub> de 0,50 para 0,95 g.kg<sup>-1</sup> MS quando SGMR foram estocadas por 30 e 180 dias. Fernandes et al. (2021) relataram redução das concentrações de prolamina de 51,4 para 30,8 g.kg<sup>-1</sup> MS e de 40,4 para 30,5 g.kg<sup>-1</sup> MS de SGMR estocadas de 0 a 120 dias, respectivamente. Além disso, estes mesmos autores observaram aumento nas concentrações de proteína solúvel e N-NH<sub>3</sub> nas silagens avaliadas. A proteína solúvel aumentou de 74,7 para 396 g.kg<sup>-1</sup> PB e de 108,7 para 420,2 g.kg<sup>-1</sup> PB para SGMR; o N-NH<sub>3</sub> foi de 3,5 para 33,5 g.kg<sup>-1</sup> MS e de 2,7 para 38,2 g.kg<sup>-1</sup> MS (FERNANDES et al., 2021). Oliveira et al. (2023) avaliando SGMR estocadas por 15, 30 e 60 dias observaram aumento da concentração de N-NH<sub>3</sub> de 1,5 para 3,75% N-total de 15 para 60 dias. Silva et al. (2019) também observaram redução na concentração de prolamina de 50,0 para 30,0 g.kg<sup>-1</sup> MS e aumento no teor de N-NH<sub>3</sub> de 0,40 para 0,80 g.kg<sup>-1</sup> MS em SGMR estocadas por 15 e 300 dias respectivamente. De modo geral, é possível perceber que o tempo de estocagem tende a aumentar as concentrações de proteína solúvel e N-NH<sub>3</sub> ao mesmo tempo que reduz as concentrações de prolamina em SGMR.

O efeito do teor de umidade sobre a SGMR é um fator bastante estudado nos trabalhos com SGMR. O estudo do perfil de fermentação de um alimento é de fundamental importância, pois o entendimento de quais vias metabólicas os

microrganismos utilizam os substratos, qual a capacidade de utilizar os substratos e os produtos formados irão definir fortemente a fermentação da silagem produzida (ROOKE; HATFIELD, 2003) e a capacidade de manter ou melhorar o seu valor nutricional durante o armazenamento (MUCK, 2013).

Uma particularidade de SGMR consiste na ausência da porção vegetativa da planta inteira de milho, sendo estocados apenas os grãos. Desse modo, existe uma alteração no que diz respeito a proporção das características básicas para ensilagem (e.g. matéria seca). Dentre os componentes da planta de milho, os grãos são os mais importantes e que mais influenciam a adsorção de água, devido a estrutura coloidal e das forças químicas e físicas oriundas da estrutura química do grão (BROOKER et al., 1992).

A adição de água na produção de SGMR é fundamental pois favorece o processo fermentativo. Um estudo realizado por Mombach et al. (2019) retrata bem como a reidratação afeta alguns parâmetros de SGMR. Esses autores avaliaram níveis de inclusão de água (0, 10, 20, 30, 40%) e observaram redução nas concentrações de MS e PB e aumento das perdas totais de MS com aumento dos níveis de reidratação. No mesmo trabalho, também foram observados que valores de pH são mais elevados em menores inclusões de água, bem como a estabilidade da fermentação se torna mais extensa, necessitando de maiores períodos de fermentação. De modo geral, esse estudo demonstra os efeitos positivos e negativos quando uma alta ou baixa taxa de reidratação é aplicada e concluem que, em média, a reidratação com 30% de inclusão de água na matéria fresca permite a estocagem da silagem, com menores valores de pH e menores perdas totais de MS, melhorando o perfil de fermentação.

As pesquisas envolvendo o uso de enzimas em SGMR representam, aproximadamente, 17% dos estudos publicados (Gráfico 2). As enzimas proteases (FERRARETTO et al., 2015), amilases (BATISTA et al., 2022), glucoamilase (BATISTA et al., 2022; GRANDA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019), alfa-amilase (GANDRA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019), amiloglucosidase (FERNANDES et al., 2022) e um complexo enzimático baseado em celulose (CRUZ et al., 2021) foram testados.

As alfa-amilases são responsáveis por hidrolisar as ligações glicosídicas alfa-1,4 internas das moléculas de amido, produzir dextrina e oligossacarídeos ramificados, enquanto as glucoamilases quebram as ligações glicosídicas alfa-1,4 nas extremidades não redutoras das moléculas de amido, liberando glicose e, também, pode clivar as

ligações glicosídicas alfa-1,6 das ramificações da amilopectina (LIN et al. 1992). De modo geral, as pesquisas envolvendo enzimas amilolíticas objetivaram melhoria dos padrões de fermentação a partir da quebra dos grânulos de amido.

Ferraretto et al. (2015) avaliaram a adição de protease exógena em SGMR e não foram observadas alterações no valor de pH e nas concentrações de MS entre as SGMR com adição de protease e silagens controle. A concentração de proteína bruta das silagens também não diferiu, bem como o nitrogênio amoniacal, porém, a concentração de proteína solúvel aumentou com a adição da enzima. Desse modo, a observação da constituição dessa proteína se torna mais interessante do ponto de vista nutricional do que apenas da concentração total do nutriente. Esses mesmos autores observaram que a adição exógena de protease aumentou as concentrações de ácido lático e reduziu a concentração de etanol.

A avaliação de inoculantes bacterianos na SGMR também merece ser ressaltado. É elucidado na literatura que cepas de bactérias do ácido lático (BAL) são as mais importantes nesse processo (PAHLOW et al., 2003). Desse modo, buscou-se apenas observar quais as principais espécies de BAL avaliadas nos estudos com SGMR (Tabela 3). É notória a prevalência de cepas de bactérias homofermentativas nos inoculantes bacterianos. Também foi possível perceber que quase todos os inoculantes avaliados constituem de combos entre cepas de bactérias homoláticas e heteroláticas. Apenas o estudo publicado por Silva et al. (2019) avaliou uma cepa de bactéria *L. buchneri* como único microrganismo compondo o inoculante. Além disso, a bactéria *L. buchneri* foi o único microrganismo heterolático utilizados nos estudos. Outro ponto que podemos observar é a presença de uma cepa de *Bacillus subtilis* em estudo realizado por Silva et al. (2016). Apesar das bactérias do gênero *Bacillus ssp.* serem geralmente ditas como indesejáveis ao processo de fermentação da silagem, algumas espécies de *Bacillus* podem se mostrar benéficas por produzirem compostos antifúngicos (MUCK et al., 2018).

Um fato que pode ser destacado é o grande uso de bactérias homoláticas nos inoculantes. O fato de SGMR apresentarem queda mais lenta do pH (CARVALHO et al., 2017) quando comparado com silagens de milho planta inteira, por exemplo, pode ter levado o maior número de pesquisas envolvendo microrganismos homoláticos. Assim é comum a utilização deste tipo de inoculante nestas silagens. Atualmente a comercialização de inoculantes contendo combos de bactérias são muito mais recorrentes do que produtos contendo uma cepa isolada. No entanto, não existem



resultados de pesquisa ou inoculantes comerciais contendo microrganismos isolados de SGMR ou selecionados especificamente para estas silagens, o que ressalta ainda mais a importância em se ter conhecimento sobre os possíveis efeitos da inoculação com microrganismos obtidos em SGMR sobre a fermentação.

**Tabela 3** – Principais espécies de BAL em inoculantes bacterianos utilizados em estudos com SGMR.

<b>Bactéria</b>	<b>% artigos (n=6)</b>
<i>Lactobacillus buchneri</i> ( <i>Lentilactobacillus buchneri</i> )	83,3
<i>Lactobacillus plantarum</i> ( <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> )	83,3
<i>Pediococcus acidilactici</i>	66,7
<i>Enterococcus faecium</i>	50,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	33,3
<i>Lactobacillus curvatus</i> ( <i>Latilactobacillus curvatus</i> )	33,3
<i>Lactobacillus lactis</i> ( <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> )	33,3
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	33,3
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	33,3
<i>Bacillus subtilis</i>	16,7
<i>Lactobacillus casei</i> ( <i>Lactcaseibacillus casei</i> )	16,7
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ( <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> )	16,7
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	16,7

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Ainda que bactérias homoláticas sejam dominantes no que diz respeito a composição dos inoculantes, a espécie *L. buchneri* é a principal bactéria heterolática presente nessa composição. De fato, desde o estudo realizado por Muck (1996), diversos trabalhos foram extensivamente realizados e que comprovam a eficácia da *L. buchneri* em controlar o processo de deterioração em silagens de milho e, conseqüentemente, aumento da estabilidade aeróbia das silagens (AGARUSSI et al., 2022; SILVA et al., 2019; MUCK et al., 2018; MORAIS et al., 2017; YITBAREK; TAMIR, 2014; REICH; KUNG, 2010; KLEINSCHMIT; KUNG, 2006; DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1996).

Do total de artigos publicados, quatro deles avaliaram o efeito do processamento do grão de milho na fermentação de SGMR (COSTA et al., 2023; SAYLOR et al., 2021; GOMES et al., 2020; ZACARON et al., 2020; SILVA et al., 2018). Poucos estudos avaliaram tal fator e todos muito recentes na literatura. A partir dos artigos publicados, os processamentos avaliados foram grãos de milho moídos a 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 e 10 mm e quebrado (manualmente). De modo geral, quanto menor o tamanho de partícula aplicado na moagem, melhor o perfil de fermentação das silagens, em outras

palavras, uma fermentação mais intensa pôde ser observada, alterando variáveis relacionadas ao perfil de fermentação como: maiores concentrações de ácidos orgânicos, N-NH<sub>3</sub> e menor pH (COSTA et al., 2023; GOMES et al., 2020; ZACARON et al., 2020). Outros efeitos também podem ser observados em outras variáveis quando o grão é processado em menores tamanhos de partícula, tais como: redução nas concentrações de carboidratos solúveis e amido, e maiores concentrações de proteína solúvel (SAYLOR et al., 2021; ZACARON et al., 2020; SILVA et al., 2018).

Em 2022 e 2023 foi observado estudos envolvendo aditivos químicos na SGMR (OLIVEIRA et al., 2023; DANIEL et al., 2022; SILVA NETO et al., 2022). Isso nos leva a pressupor que empresas e pesquisadores estão buscando alternativas de aditivos, que não os inoculantes bacterianos, em melhorar o perfil de fermentação e/ou redução de perdas na etapa de desabastecimento. O ácido propiônico, polisorbato 80 e suas combinações (OLIVEIRA et al., 2023; SILVA NETO et al., 2022) e sais de ácidos orgânicos (sorbato de potássio (SP), benzoato de sódio (BS), propionato de sódio (PS) e a combinação de ambos) (DANIEL et al., 2022) foram avaliados em SGMR.

No estudo realizado por Daniel et al. (2022) com sais de ácidos orgânicos, de modo geral, estes autores observaram que todos os aditivos, sozinhos ou combinados, diminuíram as contagens de leveduras e fungos filamentosos, concentrações de etanol e perda de MS durante a fermentação, enquanto mais carboidratos solúveis em água se mantiveram constantes nas silagens inoculadas. A SGMR sem aditivo mostrou um rápido processo de deterioração após a exposição ao ar (~ 41 h de estabilidade aeróbica) e os inoculantes SP, BS e PS, sozinho ou combinados, melhorou a estabilidade aeróbica das silagens com uma taxa crescente de aplicação. Dependendo da finalidade, aditivos químicos compostos por ácidos ou sais de ácidos orgânicos podem ser uma alternativa em comparação ao inoculantes comerciais na ensilagem dos grãos. Contudo, variáveis como taxa, custo e o método de aplicação do produto durante a ensilagem devem ser considerados durante a produção do alimento.

Apenas três trabalhos durante o período estabelecido pelo levantamento foram publicados e que identificaram a dinâmica populacional de microrganismos ao longo do tempo de estocagem (AGARUSSI et al., 2022; FERNANDES et al., 2022; CARVALHO et al. 2017). A diferença entre ambas as pesquisas é que, no trabalho publicado por Carvalho et al. (2017), os autores observaram a dinâmica populacional sem a aplicação de nenhum outro fator de estudo que não somente o tempo de estocagem. No estudo, os autores avaliaram os tempos 0, 5, 15, 30, 60, 90, 150, 210 e

280 dias de estocagem e relatam a dominância de BAL no processo de fermentação a partir de 5 dias de armazenamento. Na pesquisa realizada por Agarussi et al. (2022), estes trabalharam com os tempos 0, 3, 7, 21, 90 e 360 dias de estocagem e, em SGMR sem a adição de inoculante bacteriano, os autores também observaram a dominância de bactérias homoláticas a partir de 3 dias de fermentação e, nas silagens com 360 dias de estocagem, a população de BAL reduziu por volta de 3 vezes em comparação às silagens com 90 dias de estocagem, mesmo nas silagens inoculadas. Da mesma forma, Fernandes et al. (2022) também relataram a dominância de BAL nas silagens estocadas por 90 e 180 dias. Em SGMR estocadas por 280 dias é possível observar a dominância das BAL na população bacteriana (CARVALHO et al., 2017), o que podemos pressupor que em entre 280 e 360 dias de estocagem, a população de BAL começa a reduzir ao longo do tempo de fermentação. Todavia, podemos concluir que, ainda assim, as BAL são os principais microrganismos que dominam a fermentação de SGMR durante a estocagem, em comparação a outros microrganismos (e.g. *Enterobacter*, *Clostridium*, *Bacillus*).

Em ambos os estudos, bactérias do gênero anteriormente chamados de *Lactobacillus* (alguns atualmente classificados como *Lentilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Latilactobacillus*, entre outros) foram os que aumentaram sua contagem e se tornaram dominantes ao longo da fermentação. Apenas o estudo realizado por Carvalho et al. (2017) realizou testes em laboratório com o objetivo de caracterizar os isolados obtidos de SGMR. Contudo, uma carência em isolar, caracterizar e selecionar BAL como possíveis inoculantes para SGMR é recorrente, principalmente isolados com maior capacidade proteolítica. Os trabalhos que realizaram a identificação dos microrganismos em SGMR utilizaram o meio MRS como base para o isolamento e identificação e nenhum dos artigos utilizou de ferramentas que permitam uma caracterização dos isolados quanto a sua capacidade de degradar proteína (AGARUSSI et al. 2022; FERNANDES et al., 2022; CARVALHO et al. 2017). Desse modo, a seleção de isolados também com base em sua capacidade proteolítica se torna interessante, especialmente para SGMR.

Em suma, diversas são os objetivos que circundam os estudos envolvendo SGMR. É possível perceber que o efeito do tempo de estocagem é fortemente adotado nas pesquisas, ao passo que a identificação de microrganismos nessas silagens é muito pouco explorada. Por outro lado, nenhum trabalho até então buscou desenvolver inoculantes bacterianos baseados em microrganismos epifíticos de SGMR com

capacidade proteolítica, ou não. De modo geral, a literatura ainda carece de mais pesquisas sobre SGMR.

## **2.2 Metabolismo e sistema proteolítico de BAL**

É possível entendermos o metabolismo microbiano como um conjunto de reações interligadas de uma célula, incluindo diversas funções da célula (biossíntese de aminoácidos, metabolismo de carboidratos e produção e utilização de energia). Aliado a isso, o metabolismo celular pode estar intimamente relacionado com a sobrevivência e preservação / perpetuação de uma determinada espécie (MADIGAN et al. 2016)

Moléculas orgânicas são compostos disponíveis para obtenção e incorporação por células para a biossíntese de macromoléculas, permitindo o crescimento celular (WOOLFORD, 1984). Dentre os processos metabólicos relacionados à oxidação anaeróbia de compostos orgânicos, temos a chamada fermentação. Nesse tipo de metabolismo, as reações de oxirredução acontecem no citosol e o ATP é formado por fosforilação ao nível de substrato (NELSON; COX, 2014). Ocorre a oxidação do NADH por compostos formados pelo próprio metabolismo celular e as substâncias então reduzidas não são utilizadas pelas células, sendo eliminadas no meio. Dessa forma, a metabolização de carboidratos por fermentação pode ser caracterizada pela grande quantidade de compostos orgânicos formados no final do processo, como álcoois e ácidos orgânicos.

### **2.2.1 – Metabolismo de hexoses e pentoses em silagens por BAL**

Essencialmente, ensilagem é a fermentação dos açúcares pela microbiota presente na cultura colhida e depois ensilada. O metabolismo dos açúcares ocorre para a obtenção de energia para o crescimento e formação dos produtos da fermentação, especialmente ácidos. Dentre os substratos, glicose e frutose são os principais carboidratos utilizados para fermentação do material ensilado (PAHLOW et al., 2003).

As BAL podem ser divididas em dois grupos distintos, dependendo da sua via metabólica, em homofermentativas e heterofermentativas (PAHLOW et al., 2003). Uma característica que diferencia ambos os grupos é a formação dos compostos oriundos da fermentação dos carboidratos em silagens. As BAL homofermentativas são aquelas capazes de realizar seu metabolismo com perdas de energia quase nulas, aliado com uma elevada recuperação de matéria seca (JOBIM; NUSSIO, 2013). Em contrapartida, BAL heterofermentativas apresentam perdas de matéria seca durante o processo de

ensilagem, com a formação de gases, em especial o CO<sub>2</sub>, produto característico da rota fermentativa dessas bactérias (BORREANI et al., 2018; MUCK et al., 2018). Essa é uma característica importante no que se refere ao tipo de microrganismo que está sendo analisado.

As BAL homofermentativas e heterofermentativas são utilizadas com diferentes propósitos, direcionando o principal objetivo da seleção das culturas. Enquanto as BAL homoláticas são importantes para o processo de fermentação, os produtos da fermentação heteroláticas irão atuar na etapa pós-abertura do silo. Ainda que estas bactérias apresentem perdas de matéria seca (produção de CO<sub>2</sub>) nas vias de fermentação de açúcares, durante a ensilagem, os ganhos que esses microrganismos proporcionam na estabilidade da silagem no desabastecimento, podem compensar tais perdas na estocagem. Isso ocorre, principalmente, devido a capacidade de BAL heteroláticas produzirem ácidos orgânicos fracos (e.g. ácido acético e ácido propiônico) que irão auxiliar no controle do processo de deterioração da silagem causado por leveduras e fungos filamentosos na presença do oxigênio (MUCK, et al., 2018; MOON, 1983).

A produção de ácido em um ambiente anaeróbico pode ser considerada crítico para o sucesso da conservação da forragem ensilada. No que diz respeito à microbiota da silagem, a produção de ácido é um meio de garantir o equilíbrio redox durante o metabolismo anaeróbico de substratos gerando energia (ATP) para o crescimento (NELSON; COX, 2014).

Dado as diferenças na eficiência de produção de ácido lático a partir da fermentação de hexoses, as BAL são divididas em dois grupos. As BAL que produzem somente ácido lático a partir da fermentação de hexose são classificadas como homofermentativas, enquanto aquelas que produzem além do ácido lático outros produtos como etanol e/ou ácido acético e CO<sub>2</sub> são classificadas como heterofermentativas (WOOLFORD, 1984). Em relação à eficiência no uso do substrato a via homofermentativa é mais eficiente, sem perda de matéria seca (MS) e pequenas perdas de energia. No entanto, os dois caminhos de fermentação láctica podem ocorrer simultaneamente (PAHLOW et al., 2003).

A fermentação láctica consiste na oxidação anaeróbia de carboidratos, onde após a absorção dos monossacarídeos pelas células microbianas, cada molécula é clivada em ácidos pirúvico que são convertidos em ácidos lático (ROOKE; HATFIELD, 2003; McDONALD, 1991). A via segue o esquema de Embden-Meyerhof nas etapas para piruvato seguido por uma desidrogenação deste produto para produzir lactato, onde a

via glicolítica é o principal mecanismo da fermentação homolática (NELSON; COX, 2014). Outra via metabólica de degradação de glicose que também pode ser utilizada por BAL é a fosfoquetolase. O metabolismo da glicose através dessa via produz uma molécula de piruvato, uma molécula de acetil fosfato e uma molécula de CO<sub>2</sub>. Após a glicólise de Embden-Meyerhof, essa via é a mais importante na produção de silagem e é a rota primária para o catabolismo de açúcares pentose (ROOKE; HATFIELD, 2003).

É importante ressaltar a presença de outra via metabólica que pode ser utilizada pelas BAL para degradação de pentoses, denominada via da pentose fosfato (NELSON; COX, 2014; WOOLFORD, 1984). Diferentemente da via da fosfoquetolase, a pentose fosfato inicia-se com uma molécula de pentose e não a glicose. Em se tratando da fermentação da glicose por BAL heterofermentativas, a via da hexose monofosfato é a principal rota utilizada pelos microrganismos (WOOLFORD, 1984). Nessa, se a glicose for o substrato, um mol de glicose é dividido assimetricamente para produzir um mol de lactato, etanol e dióxido de carbono; por outro lado, se a frutose for usada, então a cada três moles de frutose será produzido um mol de lactato, acetato e dióxido de carbono e dois moles de manitol (WOOLFORD, 1984).

A fermentação heterolática é menos eficiente em termos de produção de ácido do que a homolática. Além disso, a fermentação heterolática será ainda menos eficiente nestes termos se a frutose for mais abundante do que a glicose (PAHLOW et al., 2003). Na fermentação heterolática, quando o substrato para fermentação é glicose, as perdas de MS são de 24% e de energia de 1,7%, e quando o substrato é frutose, as perdas são de 4,8% para MS e 1,0% para energia (McDONALD et al., 1991).

As BAL também podem metabolizar a glicose, por uma via metabólica alternativa denominada Entner-Doudoroff (ROOKE; HATFIELD, 2003). Semelhante à via glicolítica clássica, a Entner-Doudoroff é capaz de produzir dois açúcares de 3 carbonos a partir da glicose (CONWAY, 1992). No entanto, difere porque a glicose 6-fosfato é reduzida a ácido 6-fosfogluconico e depois clivada por uma aldolase específica em gliceraldeído 3-fosfato e ácido pirúvico. Em contraste com a glicólise, apenas uma molécula de ATP é gerada pela fosforilação em nível de substrato e apenas uma molécula de NADPH deve ser reoxidada (NELSON; COX, 2014). A via de Entner-Doudoroff também é capaz de preservar energia na forma de ATP onde cada mol de glicose que é convertida ao piruvato, produz um mol de ATP (CONWAY, 1992). A reação de redução do NAD em ambas as vias de Entner-Doudoroff e Embden-

Meyerhof, onde um mol de NAD e um mol de NADPH é formado por mol de glicose oxidada (NELSON; COX, 2014).

### 2.2.2 – Enzimas

As enzimas são proteínas constituídas por cadeias de aminoácidos e desempenham a tarefa crítica de reduzir as energias de ativação de reações químicas dentro da célula (NELSON; COX, 2014). As enzimas fazem isso ligando-se às moléculas do reagente e prendendo-as de forma a fazer com que os processos de quebra e formação de ligações químicas ocorram mais rapidamente, reduzindo a energia de ativação necessária para atingir um estado de transição (COPELAND, 2000).

As proteínas são sintetizadas a partir do processo de tradução do RNAm, podendo ser divididas, entre outras, em proteínas catalisadoras, irão apresentar função catalítica em algum processo metabólico da célula (enzimas), e proteínas estruturais, relacionadas com a estruturação da célula e de tecidos (MADIGAN et al., 2016). As enzimas possuem quatro estruturas denominadas primárias, secundária, terciária e quaternária, além dos cofatores (coenzimas) e apoenzimas (COPELAND, 2000; BRANDEN; TOOZE, 1991).

A estrutura e a reatividade de uma proteína são definidas pela identidade dos aminoácidos que compõem sua cadeia polipeptídica e pela ordem em que esses aminoácidos ocorrem na cadeia, constituindo, então, a sequência de aminoácidos ou estrutura primária da proteína (MADIGAN et al., 2016; BUGG, 2004). Três tipos de estruturas secundárias são encontradas na estrutura das enzimas, sendo elas:  $\alpha$ -hélice (rede de ligações de hidrogênio entre o oxigênio carbonil de um resíduo e o próton nitrogenado do resíduo); conformação  $\beta$  ou  $\beta$ -folha pregueada (cadeias polipeptídicas totalmente estendidas ligadas entre si por pontes de hidrogênio interamidas entre fitas adjacentes da folha); e  $\beta$  *turn* (segmentos curtos da cadeia polipeptídica que permitem que girem ou se curvem sobre si) são encontradas na estrutura das enzimas (COPELAND, 2000).

O termo "estrutura terciária" refere-se ao arranjo dos elementos da estrutura secundária e interações da cadeia lateral de aminoácidos que definem a estrutura tridimensional da proteína dobrada (MADIGAN et al., 2016). Dentre as vantagens do dobramento adequado de uma proteína, é que a aproximação desses grupos permite a proteína formar centros quimicamente reativos, conhecidos como os sítios ativos das enzimas, definido por uma cavidade ou bolsa na qual a molécula de um substrato se liga

para iniciar a reação enzimática (WATSON et al., 2015; FREY; HEGEMAN, 2007). Por sua vez, a estrutura quaternária é formada a partir do arranjo das subunidades (cópias múltiplas da mesma cadeia polipeptídica (homomultímero) ou podem representar polipeptídeos distintos (heteromultímero); e.g. subunidades A, B e C de uma proteína heterotrimérica) de uma proteína em relação umas às outras (FERSH, 1998). Grupos químicos não-proteicos necessários para atender uma demanda de reatividade que não pode ser alcançada apenas com os aminoácidos, são chamados de cofatores enzimáticos ou coenzimas (FREY; HEGEMAN, 2007; BUGG, 2004).

### **2.2.3 – Proteína do grão de milho (zeína)**

Uma via alternativa de fermentação das BAL consiste na degradação da proteína do grão de milho, consistindo no processo denominado de proteólise. Tal processo consiste, basicamente, na quebra da proteína e utilização dos aminoácidos pelas BAL durante seu metabolismo (JUNGES et al., 2017).

As proteínas do grão de milho são conhecidas como zeínas, o qual são derivadas do endosperma do grão de milho, classificando-as no grupo das prolaminas, solúveis em álcool e que são caracterizadas pelo alto teor de aminoácidos de caráter polar em sua constituição (FERRARETTO et al., 2015). A zeína pode corresponder a até 60% do total da proteína do milho, constituída de 17 aminoácidos, em sua grande maioria apolares, e é caracterizada considerando sua similaridade em massa molecular, solubilidade em solventes e suas quatro subclasses que compõem sua estrutura: alfa, beta, gama e delta, sendo a alfa-zeína aquela com a maior concentração (PAPALIA LONDERO, 2015; LANDRY; MOUREAUX, 1980). Por apresentar diferentes subclasses, é de se esperar que diferentes aminoácidos irão compor tais estruturas. Larkins et al. (1993) e Oliveira et al. (2004) relatam a presença da alanina, leucina e prolina, aminoácidos sulfurados e resíduos de prolina na subclasses alfa, beta, gama e delta-zeína, respectivamente.

É sabido que a tradução é retratada como a última etapa de transferência da informação biológica onde um ácido nucleico é utilizado como molde para formar um polipeptídeo, no caso, proteínas (MADIGAN et al., 2016). A partir disso, é plausível que a quebra das proteínas por BAL irão, mais precisamente, quebrar as ligações peptídicas dando origem aos aminoácidos livres e que serão utilizados pelas proteínas (TORTORA et al, 2017).



Estruturalmente, as zeínas ficam externamente ao amido, formando estruturas circulares, onde o centro é composto principalmente pelo delta e gama-zeína, circundada pela alfa-zeína (ANDERSON; LAMSAL, 2011; PAES, 2006). Um modelo estrutural que demonstra a união entre os aminoácidos polares e apolares presentes nas zeínas foi proposto por Argos et al. (1982). Neste, uma hélice coloidal é formada em função da estrutura secundária da zeína ( $\alpha$ -hélice), estrutura essa comum em todas as proteínas (incluindo enzimas). Os aminoácidos apolares ficam unidos através de três segmentos polares, repetidas em nove hélices sequenciais (Up) e antiparalelas (Dn) em superfície plana molecular, formando um empilhamento dessas hélices por interações de resíduos de glutamina, parte polar nas extremidades da cadeia. Conforme as proteínas zeínas se desenvolvem e se distendem com o avanço da maturidade, as  $\beta$ - e  $\gamma$ -zeínas ligam-se entre si e  $\alpha$ - e  $\delta$ -zeínas se introduzem nessa rede, encapsulando amido em uma matriz proteica hidrofóbica (BUCHANAN et al., 2000; MU-FORSTER; WASSERMAN, 1998).

Inferências do estudo realizado por Hoffman et al. (2011) sugerem que as proteínas zeína hidrofóbicas são mais provavelmente degradadas por meio da atividade proteolítica do que por solubilização. A redução nas proteínas zeína pela atividade proteolítica pode ser associada com a concentração de  $\text{NH}_3\text{-N}$ , que pode aumentar gradativamente com o tempo de ensilagem. Em silagens, o  $\text{NH}_3\text{-N}$  é mais frequentemente definido como um produto da desaminação bacteriana de aminoácidos, em vez de um produto da hidrólise ácida por ácidos da silagem (OHSHIMA; McDONALD, 1978). As proteínas zeínas hidrofóbicas, especialmente as  $\gamma$ -zeínas, na matriz proteica são degradadas durante o processo de ensilagem (JURJANZ; MONTEILS, 2005; PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1998). As  $\gamma$ -zeínas ficam periféricas e reticuladas com  $\alpha$ - e  $\delta$ -zeínas na matriz proteica, aderindo assim aos grânulos de amido e formando a matriz proteica (BUCHANAN et al., 2000; MU-FORSTER; WASSERMAN, 1998). Hoffman et al. (2011) revelaram que as  $\gamma$ -zeína são altamente degradadas durante a fermentação de silagem de grão de milho e a degradação de  $\gamma$  e de outras proteínas zeínas responsáveis pela ligação dos grânulos de amido deve resultar em uma dissociação desses grânulos em silagem de grãos.

#### **2.2.4 – Sistema proteolítico e uso de aminoácidos por BAL**

A maioria das bactérias lácticas pode utilizar aminoácidos e peptídeos para atender suas demandas de crescimento (VAN BOVEN; KONINGS, 1988; THOMAS;

MILLS, 1981; LAW, 1978; RICE et al., 1978). A quebra das proteínas no processo de proteólise das BAL ocorre pela ação de proteinases e peptidases formando polipeptídeos, aminoácidos e peptídeos (SAVIJOKI et al., 2006; BINTSIS et al., 2003). As proteinases e peptidases são enzimas que podem ser encontradas de forma extracelular e secretadas como enzimas livres fora da célula ou intracelulares dentro da célula. Esse sistema proteolítico de BAL são importantes como uma forma de disponibilizar proteínas, peptídeos e aminoácidos para o crescimento bacteriano (BINTSIS et al., 2003, LIU et al., 2010).

Os sistemas proteolíticos das BAL são formados por três componentes: 1) a proteinase ligada à parede celular que inicia a degradação da proteína extracelular em oligopeptídeos, 2) transportadores de peptídeos que absorvem os peptídeos na célula e 3) peptidases intracelulares que degradam peptídeos em peptídeos e aminoácidos mais curtos (LIU et al., 2010). Os aminoácidos podem ser posteriormente convertidos em vários compostos como aldeídos, álcoois e ésteres (LIU et al., 2008).

As BAL requerem de vários aminoácidos e peptídeos para atender sua demanda de nitrogênio (SAVIJOKI et al., 2006). Aminoácidos e peptídeos podem ser obtidos pela ação de proteases ou proteólise, onde os peptídeos são metabolizados em aminoácidos livres e outros compostos de utilização subsequentes, podendo ser fatores de crescimento essenciais ou fatores estimuladores para BAL (CALDERON et al, 2001; LETORT; JUILLARD, 2001).

O crescimento de BAL depende desses aminoácidos de fontes de nitrogênio orgânico, uma vez que BAL tem capacidade muito limitada para sintetizar aminoácidos de fonte de nitrogênio inorgânico (VON WRIGHT; AXELSSON, 2011) Em particular, a arginina é fermentada em ornitina e a serina é desaminada em piruvato por algumas espécies (POOLMAN, 1993). Também é possível que o metabolismo de aminoácidos possa ser acoplado à oxidação de lactato a acetato por BAL quando a glicose não é acessível. Rooke (1991) descobriu que lisina e serina foram utilizadas anaerobicamente em pH 4,0 por BAL homofermentativo e arginina, glutamato e serina por BAL heterofermentativo quando nenhuma glicose estava disponível, embora nenhuma evidência sobre as vias metabólicas envolvidas tenha sido obtida. Vale ressaltar que os requisitos de aminoácidos das BAL possuem uma ampla gama de diferenças entre as espécies e cepas de bactérias (BARRANGOU et al., 2011; LETORT; JUILLARD, 2001).

Diversos estudos na literatura relatam a utilização de diferentes aminoácidos por BAL. Dunn et al. (1947) avaliando o requerimento de aminoácidos de 23 cepas de BAL a partir da acidificação de um meio de cultura, estes observaram que para a cepa *Leuconostoc mesenteries*, somente o glutamato e valina eram essenciais, enquanto a cepa de *Lactobacillus brevis* requeria 15 aminoácidos. Dentre os aminoácidos utilizados, o glutamato e a valina eram requeridos por todas as cepas, enquanto a isoleucina foi essencial para todas, exceto três, e a leucina, para todas as cepas, exceto quatro.

Lim et al. (2019) realizaram um estudo sobre o potencial de produção de aminoácidos de forma extracelular de 17 cepas de BAL (9 pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e 8 do gênero *Pediococcus*). Todas as cepas avaliadas tiveram potencial de produzir pelo menos um aminoácido em diferentes concentrações. Com exceção de uma única cepa de *L. plantarum*, o glutamato e valina foram produzidos por todos os microrganismos. Em contrapartida, nenhum dos isolados foi capaz de produzir arginina, o que foi evidenciado pela redução da concentração do perfil de arginina no meio. Outro ponto importante consiste no requerimento de serina ao invés de arginina pelo gênero *Lactobacillus*.

Lee et al. (2014) analisaram o perfil de aminoácidos durante a formação do ácido láctico por cepas de *L. salivarius*, *P. acidilactici* e *L. plantarum*. Estes observaram que *L. salivarius* diminuiu a concentração de todos os aminoácidos no meio, com exceção da alanina e glicina, o qual são fatores de crescimento essenciais para estas bactérias. Os isolados de *P. acidilactici* aumentaram a concentração dos aminoácidos presentes no meio, com exceção da citrulina, cisteína e glicina, considerados essenciais para o crescimento das cepas. A *L. plantarum*, por sua vez, foi a bactéria que mais apresentou redução em quase todos os aminoácidos presentes no meio, particularmente dos aminoácidos alanina, asparagina, ácido aspártico, citrulina, cisteína, ácido glutamina, glicina, histidina, lisina, fenilalanina, prolina, tirosina, arginina, isoleucina, leucina, metionina, serina, treonina, triptofano e valina, o quais são essenciais para o crescimento desta bactéria. O aminoácido ornitina foi o único que teve sua concentração aumentada no meio. Dentre as cepas avaliadas, todas mostraram uma boa produção de ácido láctico.

Muitos trabalhos avaliam a utilização de aminoácidos por BAL nas mais diversas áreas, em especial da microbiologia, entretanto, estudos que envolvem o perfil de aminoácidos durante a fermentação de silagens são muito escassos na literatura. Por

outro lado, algumas pressuposições são passíveis de serem feitas. Carvalho et al. (2017) identificaram os principais gêneros e espécies de BAL na fermentação de silagens de grãos reidratados, sendo as bactérias do gênero *Lactobacillus* ssp. as dominantes do processo de fermentação. Esse fato ressalta a participação das BAL na fermentação dessas silagens principalmente em silagem de grãos onde a atividade proteolítica ocorrerá de forma mais intensa,

Alguns trabalhos buscaram conhecer a alteração do perfil de aminoácidos em silagens de milho após a fermentação da forragem. Chalupa e Sniffen (1996) observaram o perfil de aminoácidos em silagem de planta inteira de milho e detectaram a presença de 9 aminoácidos, sendo a leucina a mais abundante, seguida da valina e fenilalanina. Der Bedrosian e Kung (2019) analisaram a alteração do perfil de aminoácidos essenciais e não essenciais em planta inteira de milho antes e após 45 dias de ensilagem. Com exceção da metionina, valina, cisteína e taurina, todos os demais aminoácidos tiveram alguma alteração após o período de fermentação. Dentre eles, a tirosina e a arginina tiveram redução da sua concentração de 63,3 e 52,9%, respectivamente, enquanto a ornitina teve um aumento em sua concentração de 91,2% após o período de ensilagem. Resultados similares também foram observados por Bergen et al. (1974). Silagens de milho após 20 dias de ensilagem obtiveram alterações no perfil de aminoácidos dessas silagens, onde foi possível observar um aumento de mais de 50% nas concentrações dos aminoácidos lisina, histidina, treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina e fenilalanina; por outro lado, glutamato, alanina e asparagina tiveram redução em sua concentração.

Um estudo mais aprofundado envolvendo a comunidade bacteriana e a dinâmica do metaboloma e suas interações que modulam o processo de fermentação da silagem de planta inteira de milho com ou sem inoculante bacteriano foi realizado por Xu et al. (2020). Estes autores demonstraram que existem correlações entre as bactérias da silagem e metabólitos preditos com suas biofunções, sendo elas: lisina, metionina, fenilalanina, entre outros (naringina, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 4-aminobutírico, ácido L-málico, ácido ferúlico e ácido linolênico). Aminoácidos essenciais como lisina, metionina e fenilalanina foram detectados no presente estudo realizado. Estes mesmos autores observaram que a lisina e a tiramina possuem uma correlação positiva com a formação dos ácidos láctico e propiônico.

Diversas são as diferentes rotas utilizadas pelas BAL em metabolizar os aminoácidos. A arginina é um dos substratos que, além dos carboidratos, as BAL

podem utilizar como fonte adicional de energia para o seu crescimento (ARENA et al., 1999a; ARENA et al., 1999b; MANCA DE NADRA et al., 1981;). A capacidade de metabolizar a arginina está aparentemente distribuída entre os vários grupos de bactérias. Enquanto alguns lactobacilos não degradam a arginina (MARTENS et al., 1997; EDWARDS et al., 1999), outros lactobacilos homofermentativos como cepas de *Lactococcus lactis* (CROW; THOMAS, 1982) e *Lactobacillus plantarum* (JONSSON et al., 1983) são capazes de metabolizar o aminoácido. Arena et al. (1999a) demonstraram a capacidade de duas cepas de *L. plantarum* em degradar arginina via da arginina desiminase (ADI). A citrulina também pode ser degradada pela mesma via e, assim como a arginina, também pode ser utilizada como uma fonte de energia para as bactérias.

Toe et al. (2019) avaliando a produção de aminoácidos por bactérias lácticas observaram que cepas de *P. acidilactici* foram capazes de utilizar o aminoácido fenilalanina durante o período de incubação. Estes reportaram que, juntamente com a arginina e a tirosina, a fenilalanina é um aminoácido crucial para a sobrevivência dessas bactérias. Em estudo realizado por Sriphochanart et al (2011), estes afirmam que a fenilalanina e a tirosina são aminoácidos críticos para o crescimento e produção de ácido láctico pelas bactérias.

Lim et al. (2019) observaram a depleção de serina avaliando cepas de *L. plantarum* e este efeito pode ser atribuída à ação da serina desidratase, que é responsável pela desaminação da serina em amônia e piruvato e, finalmente, em ácidos orgânicos. Estes mesmo autores também relatam a formação de amônia, acetato e formato a partir da degradação da serina por cepas de *L. plantarum*, e que a formação de acetato sugeriu que a piruvato oxidase é a enzima chave para o metabolismo do piruvato.

Ainda que estes estudos relacionem o perfil dos aminoácidos em planta inteira de milho, esses resultados não devem ser de todo ignorados, principalmente pelo fato de que não existem relatos na literatura sobre as alterações desses aminoácidos em silagens exclusivamente de grãos de milho. Com base nos trabalhos até então citados e diversos outros relatados na literatura, é possível pressupor que a arginina e a serina são os principais aminoácidos utilizados pelas BAL e de grande importância para as bactérias. Estudos que envolvam a avaliação do metabolismo de aminoácidos por BAL e seus impactos em SGMR são completamente escassos na literatura.

### **2.3 Bioprospecção de inoculantes para silagens**

Em várias partes do mundo, a adoção de alimentos conservados está fortemente presente nos mais diversos sistemas de produção animal. Dentre os alimentos conservados, a silagem é tida como um dos ingredientes mais utilizados nas dietas de animais ruminantes, seja no Brasil ou no exterior (GRANT; ADESOGAN 2018). O princípio básico da conservação do alimento por meio da ensilagem parte da sua conservação por processo fermentativo em ambiente anaeróbio, onde microrganismos desejáveis são responsáveis em metabolizar os carboidratos e estabelecer um ambiente ácido. Dentre os microrganismos responsáveis por essa conservação, as BAL são as principais protagonistas, uma vez que produzem o ácido láctico como o principal produto formado pelo seu metabolismo anaeróbio (WOOLFORD, 1984).

Entender a dinâmica desses microrganismos durante a ensilagem é importante para conhecer a microbiota dominante nas diferentes etapas do processo, bem como possibilitar a intervenção com o objetivo de melhorar a qualidade da silagem. Cada microrganismo possui características e exigências diferentes para seu crescimento, sendo crucial conhecer as demandas do microrganismo que se pretende estudar e assim obter um crescimento considerado ótimo (MADIGAN et al., 2016). Isso é importante pois, dependendo do tipo de microrganismo a ser estudado, as técnicas de obtenção desse organismo em laboratório também precisam ser adaptadas ou previamente estabelecidas de acordo com o microrganismo alvo.

Na literatura estudos relatam a presença de BAL durante o processo de fermentação de silagens ao longo da fermentação (FERNANDES et al., 2022; AGARUSSI et al., 2022; CARVALHO et al., 2017). Contudo, nenhum trabalho atualmente buscou selecionar isolados oriundos da população epifítica das SGMR como o objetivo de utilizá-los como possíveis inoculantes bacterianos. A população epifítica associada com o alimento pode ser entendida como uma “mistura complexa” de bactérias e outros tipos de microrganismos presentes naturalmente naquele alimento (PAHLOW et al., 2003). De modo geral, a diversidade microbiana presente no alimento altera com o tempo de estocagem pois ocorrem mudanças nas condições do ambiente, com redução de pH e concentração de oxigênio e modificação nos tipos e concentrações de substratos e metabólitos presentes. Nestas condições, microrganismos aeróbios obrigatórios e aquelas sensíveis ao ambiente ácido tendem a morrer ou cessam seu crescimento na ausência de oxigênio ou em ambiente ácido (CARVALHO et al., 2017). A caracterização das populações microbianas epifíticas associadas ao processo de

ensilagem, com base em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas exige um esforço significativo em função da diversidade microbiana. Para avaliar a composição das comunidades bacterianas associadas ao alimento conservado, uma ampla variedade de técnicas tem sido usada.

### **2.3.1 – Isolamento dos microrganismos (meio de cultura) e testes bioquímicos**

As BAL são os principais organismos vivos responsáveis pela fermentação da forragem em anaerobiose (ÁVILA; CARVALHO, 2019). Outros microrganismos como, enterobactérias, *Clostridium*, listeria, leveduras, fungos filamentosos, bactérias aeróbias total, entre outras, também podem ser encontradas na planta ou no alimento, contudo, não trazem benefícios para o processo de conservação (MUCK et al., 2018).

A obtenção de culturas iniciadoras para silagens parte da utilização de microrganismos benéficos ao processo de ensilagem, com o propósito de obter cepas capazes de potencializar algum padrão de fermentação e, geralmente, são oriundos da própria matéria-prima (e.g. silagem). A caracterização desses microrganismos é um passo importante para obter informações específicas de uma determinada cultura que podem auxiliar no melhor manuseio desses microrganismos.

O material utilizado em laboratórios para o crescimento de microrganismos é comumente conhecido como meios de cultura. Os meios de cultura devem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos e devem estar associados com condições ambientais de cultivo. O meio de cultura mais comum utilizado para cultivo de BAL em laboratório, é o MRS (Man Rogosa Shaper Agar). Contudo, os meios de cultivo podem ser modificados com objetivo de avaliar alguma característica inerente à BAL, onde o principal substrato do meio (e.g. glicose) é substituído por outro. No caso do MRS, a glicose normalmente é totalmente substituída por outra fonte de substrato, por exemplo, caseína e amido (PETROVA; PETROV, 2011; LIM et al., 2019).

A caseína é uma proteína encontrada em grande concentração no leite e é utilizada amplamente na avaliação da capacidade de BAL em degradar proteína (LIM et al., 2019). Nesse sentido, as bactérias podem ser classificadas/caracterizadas como sendo proteolíticas, ainda que sejam capazes de degradar outros substratos. O amido, por sua vez, é um polissacarídeo incluído no meio de cultura com o objetivo de promover o crescimento de bactérias capazes de degradar o amido. Em ambos os casos, as bactérias devem ser capazes de produzir enzimas para utilizar os diferentes

substratos. Em suma, meios de cultura modificados podem ser considerados como meios seletivos, haja visto que proporciona o crescimento apenas de bactérias capazes de degradar um determinado substrato (e.g. caseína) ou alguma característica de interesse.

Os testes bioquímicos realizados em laboratório são importantes para a caracterização inicial dos isolados obtidos, por exemplo, teste de coloração de Gram, catalase, motilidade, entre outros. A técnica de coloração de Gram consiste na coloração de um microrganismo anteriormente isolado com um corante primário, como o cristal violeta, seguido de um tratamento fixador (e.g. lugol), caracterizando as bactérias como sendo gram-positivas ou gram-negativas (MADIGAN et al., 2016). O teste de coloração de Gram é uma metodologia de coloração muito utilizado em diversas áreas que envolvem a microbiologia, principalmente para dar início à caracterização de uma bactéria isolada.

A grande maioria das bactérias ácido lácticas são consideradas aerotolerantes e possuem respostas induzíveis ao estresse oxidativo. O oxigênio, particularmente, não é tóxico para os microrganismos, mas pode ser convertido em substâncias nocivas oriundas do  $O_2$ , capazes de danificar ou causar morte celular. Os principais produtos incluem o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila (OH), resultado da redução de  $O_2$  e  $H_2O$  na respiração. Ainda que BAL sejam consideradas tolerantes ao oxigênio, a exposição ao  $O_2$  é suficiente para entrar em contato com essas substâncias tóxicas e, se não destruídas do organismo celular, causam danos à célula. Na microbiologia comumente é realizado o teste de catalase que consiste na avaliação de isolados puros quanto a presença ou ausência da enzima catalase. Esse teste auxilia na distinção de diferentes grupos de bactérias, ou até mesmo de espécies dentro de um mesmo gênero, caracterizando o isolado.

A motilidade é uma característica de células que conseguem se locomover em determinadas condições ou ambientes em função da presença de estruturas responsáveis por sua translocação, como os flagelos e o pili. Em sua grande maioria, as células microbianas realizam sua motilidade por autopropulsão e, em geral, seu deslocamento ocorre em condições em que há a falta de recursos para a célula ou oportunidades de crescimento desfavorável.



### 2.3.2 – Teste de fermentação de carboidratos e produção de gás em BAL

Os testes de fermentação de carboidratos visam verificar se uma bactéria é capaz de fermentar determinados carboidratos, produzindo ácido com ou sem formação de gás. As vias de fermentação metabólica de diferentes carboidratos são características das espécies, sendo um dos caracteres fenotípicos mais utilizados para a identificação de bactérias (CARVALHO et al., 2022). Os processos de fermentação são sequências de reações de oxirredução que transformam a glicose em um ou mais compostos de carbono, gerando energia no final das reações ou processo (NELSON; COX, 2014). O tipo de produto final de oxidação da glicose, ou seja, o tipo de fermentação, variam de espécie para espécie ou entre cepas e incluem ácidos, álcoois, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> (WOOLFORD, 1984).

O teste de fermentação de carboidratos é realizado com um meio de cultura básico, podendo ser específico para um determinado microrganismos (e.g. caldo MRS para bactéria láctica). O vermelho de fenol é utilizado no teste como um indicador de pH, de coloração laranja – avermelhada, mudando para vermelha ou rosa quando o pH se torna alcalino, ou amarelo quando o ambiente se torna ácido. (MACFADDIN, 2000). O carboidrato a ser testado é adicionado no caldo base em uma concentração pré-determinada (e.g. 1%) e depois incubado até 48 horas a 37 °C. Se o resultado for positivo, a coloração do meio altera para amarelo e, se negativo, apresenta uma coloração vermelho-rosada.

De modo geral, os isolados puros devem ser reativados e, após formação das colônias, inoculado em caldo MRS por, 24 h a 35 °C. A detecção da produção de CO<sub>2</sub> a partir da glicose é realizado utilizando um caldo MRS em tubo de ensaio contendo tubos de Durhan invertidos que serão responsáveis por coletar esse gás. Desse modo, a presença de gás caracterizará a cultura pura como sendo homofermentativa (resultado negativo) ou heterofermentativa (resultado positivo).

Estes testes são importantes para auxiliar na identificação e para conhecer o processo fermentativo, visto que os microrganismos irão responder ao teste de fermentação com a formação dos metabólitos e produção de gás. Na seleção de isolados de silagens, tais resultados são de grande importância, pois o tipo de produto formado não só auxilia na identificação do isolado, como também na finalidade de seu uso como um possível inoculante.

### 2.3.3 – Atividade antagônica

A capacidade das cepas BAL de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis na silagem (fungos filamentosos, a maioria das leveduras e alguns grupos de bactérias) é essencial na seleção de inoculantes. A atividade antimicrobiana pode ser avaliada usando o teste de antagonismo para bactérias e leveduras (HARRIS, 1989). Essa técnica consiste em cultivar simultaneamente as espécies microbianas indesejáveis e as BAL. A capacidade de BAL em inibir o crescimento do microrganismo indesejável é avaliada medindo o halo de inibição formado (AMARAL et al. 2020). A atividade antagônica é resultado da ação de diversos mecanismos empregados pela BAL como a produção de ácido lático, ácido acético, peróxido de hidrogênio, lactato peroxidase, lisozima e bacteriocinas e substâncias do tipo bacteriocina (NES et al. 2012). Costa et al. (2021) observaram resposta positiva com a formação de halo no teste de atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *B. cereus*, *A. flavius* e *A. parasiticus* para 37 de 53 isolados de BAL avaliados. De acordo com Saarisalo et al. (2007), a atividade antagônica é essencial como critério inicial de seleção de linhagens para silagem e caracterização de BAL quanto produtoras de compostos antimicrobianos.

**REFERÊNCIAS**

- AGARUSSI, M. C. N. et al. Microbiome of rehydrated corn and sorghum grain silages treated with microbial inoculants in different fermentation periods. **Scientific Reports**. v. 12, n. 16864, 2022.
- AMARAL, R. C. et al. Novel lactic acid bacteria strains enhance the conservation of elephant grass silage cv. BRS Capiaçú. **Animal Feed Science and Technology**. v. 264, n. 114472. 2020.
- ANDERSON, T. J.; LAMSAL, B. P. Development of new method for extraction of  $\alpha$ -Zein from corn gluten meal using different solvents. **Cereal Chemistry**. v. 88, n. 4, p. 356-362. 2011.
- ARCARI, M. A. et al. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 53, n. 1, p. 60-71, 2016.
- ARENA, M. E.; SAGUIR, F. M.; MANCA de NADRA, M. C. Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange. **International Journal of Food Microbiology**. v. 47, n. 3, p. 203-209. 1999a.
- ARENA, M. E.; SAGUIR, F. M.; MANCA de NADRA, M. C. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. **International Journal of Food Microbiology**. v. 52, n. 3, p. 155-161. 1999b.
- ARGOS, P. et al. A structural model for maize zein proteins. **Journal of Biological Chemistry**. v. 257, n.17, p. 9984-9990, 1982.
- ÁVILA, C. L. S.; CARVALHO, B. F. Silage fermentation—updates focusing on the performance of micro-organisms. **Journal of Applied Microbiology**. v. 128, n. 4, p. 966-984. 2019.
- ÁVILA, N. R. B. et al. Caracterização da silagem de grão de milho reidratado associado ao resíduo de tilápia. **Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science**. v. 20, p. 1-12, 2019.
- AXELSSON, L. 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects**. (Eds.) SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. 2<sup>nd</sup> edição. Marcel Dekker, New York, p.1-72.
- BARRANGOU, R.; et al. 2011. Genus *Lactobacilli*. In: **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. (Eds.) LAHTINNE, S.; SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A., CRC Press pp. 77-92.
- BATISTA, J. D. O. et al. Effects of amylase and glucoamylase on rehydrated corn ensiled for an extended period: nutritive value, fermentation profile, and amyolytic activity. **New Zealand Journal of Agricultural Research**. v. 65, n. 6, p. 520-533, 2022.

BENINI, M. C. et al. Avaliação química da silagem de grão de milho reidratado em diferentes níveis de adição de água. **PubVet**. v. 14, n. 7, p. 1-6, 2020.

BENTON, J. R.; KLOPFENSTEIN, T. J.; ERICKSON, G. E. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. **Nebraska Beef Cattle Report**. p. 31, 2005.

BERGEN, W. G.; CASH, E. H.; HENDERSON, H. E. Changes in nitrogenous compounds of the whole corn plant during ensiling and subsequent effects on dry matter intake by sheep. **Journal of Animal Science**. v. 39, n. 3, p. 629-637, 1974.

BERNARDES, T. F. et al. Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, p. 4001-4019. 2018.

BERNARDES, T. F.; CARDOSO, M. V. S. B.; LIMA, L. M. Silage feeding programs on intensive dairy farms. In: **Annual Meeting of the American Dairy Science Association**. Knoxville, Tennessee. 2018.

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

BINTSIS, T. et al. Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from feta cheese brine. **Journal of Applied Microbiology**. v. 95, n. 1, p. 68-77, 2003.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. Introduction to protein structure. **Biochemistry and molecular biology education**. New York: Garland Publishing. 302p. 1991.

BROOKER, D. B. et al. Drying and storage of grains and oil seeds. **Van Nostrand Reinhold**, New York. 462p. 1992.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. 2000. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Biologists. 2<sup>nd</sup> Edição. Rockville, MD.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Biologists**. Rockville, MD. 1.264p. 2000.

BUENO, A. V. I. Fermentation profile and hygienic quality of rehydrated corn grains treated with condensed tannins from quebracho plant extract. **Animal Feed Science and Technology**. v. 267, 114559, 2020.

BUGG, T. **Introduction to enzyme and coenzyme chemistry**. 3 ed. Hoboken, NJ: Wiley. 279p. 2012.

- BUXTON, D. R.; P. O'KIELY. 2003. Preharvest plant factors affecting ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Eds). **Silage science and technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy. p. 199- 250.
- CALDERON, M.; LOISEAU, G.; GUYOT, J. P. Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi e1 during heterolactic fermentation of starch. **Journal of Applied Microbiology**. v. 90, n. 4, p. 508-516, 2001.
- CARVALHO, B. F. et al. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 122, n. 31, p. 589-600, 2017.
- CARVALHO-ESTRADA, P. A. et al. Effects of hybrid, kernel maturity, and storage period on the bacterial community in high-moisture and rehydrated corn grain silages. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 43, n. 5, 126131, 2020b.
- CARVALHO-ESTRADA, P. A. et al. Rehydration of dry corn preserves the desirable bacterial community during ensiling. **FEMS Microbiology Letters**. v. 367, n. 17, fnaa139, 2020a.
- CHALUPA, W.; SNIFFEN, C. J. Protein and amino acid nutrition of lactating dairy cattle-today and tomorrow. **Animal Feed Science and Technology**. v. 58, n. 1-2, p. 65-75, 1996.
- CONWAY, T. The Entner-Doudoroff pathway – History, physiology and molecular biology. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 9, n. 1, p. 1-28. 1992.
- COPELAND, R. A. Structural components of enzymes. In: COPELAND, R. A. (Ed). **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis**. 2 ed. Wiley-VCH. p. 42-75. 2000.
- COSTA, D. M. et al. Particle size and storage length affect fermentation and ruminal degradation of rehydrated corn grain silage. **Archives of Animal Nutrition**. v. 77, n. 3, p. 245-259, 2023.
- COSTA, D. M. et al. New epiphytic strains of lactic acid bacteria improve the conservation of corn silage harvested at late maturity. **Animal Feed Science and Technology**. v. 274, 114852, 2021.
- CROW, V. L.; THOMAS, T. D. Arginine metabolism in lactic streptococci. **Journal of Bacteriology**. v. 150, n. 3, p. 1024-1032, 1982.
- CRUZ, F. N. F. et al. Fermentative losses and chemical composition and in vitro digestibility of corn grain silage rehydrated with water or acid whey combined with bacterial-enzymatic inoculant. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 42, n. 6, p. 3497-3514, 2021.
- DANIEL, J. L. P. et al. Applying the benzoate equivalent concept in rehydrated corn grain silage. **Animal Feed Science and Technology**. v. 294, 115482, 2022.

DER BEDROSIAN, M. C.; KUNG, L. The effect of various doses of an exogenous acid protease on the fermentation and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**. v. 102, n. 12, p. 10925-10933, 2019.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeasts growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**. v. 87, n. 4, p. 583-594, 1999.

DUNN, M. S. et al. The amino acid requirements of twenty-three lactic acid bacteria. **Journal of Biological Chemistry**. v. 168, n. 1, p. 1-22, 1947.

EDWARDS, C. G. et al. *Lactobacillus* spp. from Washington states wines: isolation and characterization. **Journal of Food Science**. v. 58, n. 2, p. 453-458. 1993.

FERNANDES, J. et al. Influence of hybrid, moisture, and length of storage on the fermentation profile and starch digestibility of corn grain silages. **Animal Feed Science and Technology**. v. 271, 114707, 2021.

FERNANDES, T. et al. Effect of amylases and storage length on losses, nutritional value, fermentation, and microbiology of silages of corn and sorghum kernels. **Animal Feed Science and Technology**. v. 285, 115227, 2022.

FERRARETTO, L. F.; FREDIN, S. M.; SHAVER, R. D. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. v. 98, n. 10, p. 7318-7327, 2015.

FERSH, A. **Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding**. Freeman. 650p. 1998.

FREY, P. A; HEGEMAN, A. D. **Enzymatic reactions mechanisms**. 9 ed. Oxford. 852p. 2007.

GANDRA, J. R. et al. Amylolytic activity and chemical composition of rehydrated ground maize ensiled with  $\alpha$ -amylase or glucoamylase. **The Journal of Agricultural Science**. v. 157, n. 5, 2019.

GOMES, A. L. M. et al. Effects of processing, moisture, and storage length on the fermentation profile, particle size, and ruminal disappearance of reconstituted corn grain. **Journal of Animal Science**. v. 98, n. 11, skaa332, 2020.

GRANT, R. J.; ADESOGAN, A. T. Journal of dairy science silage special issue: introduction. **Journal of Dairy Science** v. 101, n. 5, p. 3935-3936. 2018.

HARRIS, L. J. et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection** v. 52, n. 6, p. 384-387. 1989.

HÉBERT, E. M.; RAYA, R. R.; GIORI, G. S. Nutritional requirements of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in a chemically defined medium. **Current Microbiology**. v. 49, p. 341-345, 2004.

HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 2465–2474, 2011.

JACOVACI, F. A. et al. Effect of ensiling on the feeding value of flint corn grain for feedlot beef cattle: A meta-analysis. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 50, e20200111. 2021.

JOBIM, C. C.; NUSSIO, L. G. 2013. Princípios básicos da fermentação na ensilagem. In: REIS, R. A.; BERNARDES, T. F. e SIQUEIRA, G. R. (Eds) **Forragicultura: Ciência, tecnologia e gestão dos recursos forrageiros**. 1 ed. Funep. 714p.

JONSSON, S.; CLAUSEN, E.; RAA, J. Amino acid degradation by a *Lactobacillus plantarum* strain from fish. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 4, n. 1, p. 148-154, 1983.

JUNGES, D. et al. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. **Journal of Dairy Science**. v. 100, n. 11, p. 9048-9051, 2017.

JURJANZ, S.; MONTEILS, V. Ruminant degradability of corn forages depending on the processing method employed. **Animal Research**. v. 54, n. 1, p. 3-15, 2005.

KLEINSCHMIT, D. H.; KUNG JR, L. The effects of *Lactobacillus buchneri* 40788 and *Pediococcus pentosaceus* R1094 on the fermentation of corn silage during various stages of ensiling. **Journal of Dairy Science**. v. 89, n. 10, p. 3999-4004, 2006.

LANDRY, J.; MOUREAUX, T. Distribution and amino acid composition of protein groups located in different histological parts of maize grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 28, n. 6, p. 1186-1191, 1980.

LARKINS, B. A. et al. Modification of maize-seed-protein quality. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 58, suppl. 2, p. 264-269, 1993.

LAW, B. A. Peptide utilization by group N streptococci. **The Journal of General Microbiology**. v. 105, n. 1, p. 113-118, 1978.

LEE, K.; KIM, H.; PARK, S. Amino acids analysis during lactic acid fermentation by single strain cultures of lactobacilli and mixed culture starter made from them. **African Journal of Biotechnology**. v. 13, n. 28, p. 2867-2873, 2014.

LETORT, C.; JUILLARD, V. Development of a minimal chemically defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, n. 6, p. 1023-1029, 2001.

- LIM, Y. H et al. Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. v. 10, n. 15, p. 1-13. 2019.
- LIN, C. et al. Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. **Journal of Dairy Science**. v. 75, p. 2484-2493, 1992.
- LIU, M. et al. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. **BMC Genomics**. v. 11, n. 36, p. 1-15, 2010.
- LIU, M. et al. Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 15, p. 4590-4600, 2008.
- LIU, Z. et al. Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. **Nucleic Acids Research** v. 36, n. 18, e120. 2008.
- LIU, S. Q. et al. Serine metabolism in *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 89, n. 2-3, p. 265-73, 2003.
- LOPES, A. B. R. C. et al. Método de reconstituição da umidade grãos de milho e a composição química da massa ensilada. **Bioscience Journal**. v. 21, n. 1, p. 95-101, 2005.
- MAcFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 912p. 2000.
- MADIGAN, T. M. et al. 2016. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed. 1033p.
- MANCA de NADRA, M. C.; PESCE de RUIZ HOLGADO, A. A; OLIVER, G. Utilization of L-arginine by *Lactobacillus buchneri*: Arginine deiminase. **Milchwissenschaft**. v. 36, n. 6, p. 356-359, 1981.
- MARTENS, H.; ISERETANT, D.; VERACHTERT, H. Microbiological aspects of a mixed yeast-bacterial fermentation in the production of a special Belgian acidic ale. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 103, n. 2, p. 85-91, 1997.
- McALLAN, A. B.; PHIPPS, R. H. The effect of sample date and plant density on the carbohydrate content of forage maize and changes that occurs in silage. **Journal of Agricultural Science**. v. 89, n. 3, p. 589-597, 1977.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2 ed. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK. 340p. 1991.
- MENEZES, G. K. et al. Effects of different moist orange pulp inclusions in the corn grain rehydration for silage production on chemical composition, fermentation, aerobic stability, microbiological profile, and losses. **Animal Science Journal**. v.93, n. 1, e13701, 2022.



- MOMBACH, M. A. et al. Silage of rehydrated corn grain. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 71, n. 3, p. 959-966, 2019.
- MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 55, p. 453-460, 1983.
- MORAIS, G. et al. Additives for grain silages: a review. **Slovak Journal of Animal Science**. v. 50, p. 42-54, 2017.
- MORETRO, T.; HAGE, B. F.; AXELSSON, L. A new, completely defined medium for meat *Lactobacilli*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 85, n. 4, p. 715-722, 1998.
- MUCK, R. E. A lactic acid bacteria strain to improve aerobic stability of silages. **Research Summaries**. U.S. Dairy Forage Res. Center, Madison, WI. p. 42-43, 1996.
- MUCK, R. E. et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science** v. 101, n. 5, p. 3980-4000. 2018.
- MUCK, R. E. Recent advances in silage microbiology. **Agricultural and Food Science**. v. 22, p. 3-15, 2013.
- MU-FORSTER, C.; WASSERMAN, B. P. Surface localization of zein storage proteins in starch granules from maize endosperm: Proteolytic removal by thermolysin and in vitro cross-linking of granule-associated polypeptides. **Plant Physiology**. v. 116, n. 4, p. 1563–1571, 1998.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Glicólise, Gliconeogênese e Via das Pentose-Fosfato. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Eds). **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Artmed: Porto Alegre. p. 543-586. 2014.
- NES, I. F.; KJOS, M.; DIEP, D. B. 2012. Antimicrobial components of lactic acid bacteria. In: **Lactic Acid Bacterial – Microbiological and Functions Aspects**. (Eds.) LAHTINEN, S. et al. Boca Raton, FL: CRC Press – Taylor e Francis Group. pp. 1-16.
- OHSHIMA, M.; McDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 29:497–505. 1978.
- OLIVEIRA, J. P. et al. Teor de proteína no grão em populações de milho de alta qualidade proteica e seus cruzamentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 34, n. 1, p. 45-51, 2004.
- OLIVEIRA, K. S. et al. Effect of length of storage and chemical additives on the nutritive value and starch degradability of reconstituted corn grain silage. **Agronomy**. v. 13, n. 1, p. 209, 2023.
- PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Embrapa milho e sorgo. **Circular Técnica** 75. 2006.

PAHLOW, G. et al. 2003. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Eds). **Silage science and technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy. p. 31-94.

PAPALIA, I. S.; LONDERO, P. M. G. Extração de zeína e sua aplicação na conservação dos alimentos. **Ciência Rural**. v. 45, n. 3, p.552-559, 2015.

PEREIRA, D. M. et al. Effect of cactus pear as a moistening additive in the production of rehydrated corn grain silage. **Journal of Agricultural Science**. v. 159, n. 9-10, p. 731-74. 2022.

PETROVA, P. M.; PETROV, K. K. Antimicrobial activity of starch-degrading *Lactobacillus* strains isolated from boza. **Biotechnology and Biotechnological Equipment** v. 25 (supple) p. 114-116. 2011.

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science**. v. 81, n. 8, p. 2178–2184, 1998.

POOLMAN, B. Energy transduction in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 12, n. 1-3, p. 125-148, 1993.

REICH, L. J.; KUNG, L. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Animal Feed Science and Technology**. v. 159, n. 3-4, p. 105-109, 2010.

REZENDE, A. V. et al. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality. **Animal Feed Science and Technology**. v. 197, p. 213-221, 2014.

RICE, G. et al. The uptake of amino acids and peptides by *Streptococcus lactis*. **Journal of Dairy Research**. v. 45, n. 1, p. 93-107, 1978.

ROOKE, J. A. 1991. Acetate silages: microbiology and chemistry. In: **Forage conservation towards 2000**. (Eds.) G. PAHLOW; H. HONIG. FAL, Braunschweig, Germany. p.309-312.

ROOKE, J. A.; HATFIELD, R. D. 2003. Biochemistry of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Eds). **Silage science and technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy. p. 95-139.

ROSEIRA, J. P. S. et al. Effects of exogenous protease addition on fermentation and nutritive value of rehydrated corn and sorghum grain silages. **Scientific Reports**. v. 13, n. 7302, 2023.

RUIZ, R. S.; VIZCARRA, M. G.; MARTINEZ, C. Hydration of grain kernels and its effect on drying. **LWT – Food Science and Technology**. v. 41, n. 7, p. 1310-1316, 2008.

- SAARISALO, E. et al. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. **Journal of Applied Microbiology** v. 102, n. 2, p. 327-336. 2007.
- SANTOS, A. O. et al. A survey of Whole-plant corn silages from Minas Gerais dairy farms. **Scientia Agricola**. v. 77, n. 2, e20180080, 2020.
- SAVIJOKI, K; INGMER, H.; VARMANEN, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 71, n. 4, p. 394-406. 2006.
- SAYLOR, B. A. et al. Effect of kernel breakage on the fermentation profile, nitrogen fractions, and in vitro starch digestibility of whole-plant corn silage and ensiled corn grain. **JDS Communications**. v. 2, n. 4, p. 191-195, 2021.
- SILVA NETO, A. B. et al. Propionic acid-based additive with surfactant action on the nutritive value of rehydrated corn grain silage for growing ewe lambs performance. **Animal Feed Science and Technology**. v. 294, 115515, 2022.
- SILVA, C. M. et al. Estabilidade de silagens de grãos úmidos de milho e milho reidratado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 17, n. 3, p. 331-343, 2016.
- SILVA, N. C. et al. Influence of storage length and inoculation with *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of high-moisture corn and rehydrated corn grain silage. **Animal Feed Science and Technology**. v. 251, p. 124-133, 2019.
- SILVESTRE, A. M.; MILLEN, D. D. The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 50, e20200189, 2021.
- SMITH, D. 1973. The nonstructural carbohydrates. In: BUTLER, G. W.; BAILEY, R. W. (Eds.) **Chemistry and biochemistry of herbage**. Vol. I. Academic Press, New York. p. 106-156.
- SRIPHOCHANART, W. et al. Effect of amino acid requirements on the growth and lactic acid production of *Pediococcus acidilactici* culture. **African Journal of Microbiology Research**. v. 5, n. 22, p. 3815–3822, 2011.
- THOMAS, T. D.; MILLS, O. E. Proteolytic enzymes of starter bacteria. **Netherlands Milk and Dairy Journal**. v. 35, p. 255-273, 1981.
- TOE, C. J. et al. Extracellular proteolytic activity and amino acid production by lactic acid bacteria isolated from Malaysian foods. **International Journal of Molecular Science**. v. 20, n. 7, p. 1777, 2019.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. 2017. **Microbiologia**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed. 964p.

VAN BOVEN, A.; KONINGS, W. N. Uptake of peptides by microorganisms. **Netherlands Milk and Dairy Journal**. v. 40, p. 117-127, 1986.

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

VON WRIGHT, A.; AXELSSON, L. 2011. Lactic acid bacteria: an introduction. In: **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. (Eds.) LAHTINNE, S.; SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. CRC Press pp.1-17.

WATSON, J. D., et al. 2015. **Biologia molecular do gene**. 7 ed. Artmed: Porto Alegre. 912p.

WOOLFORD, M. K. The chemistry of silage. In: WOOLFORD, M. K. (Ed). **The silage fermentation**. 10 ed. Mercel Dekker, UE. 350p. 1984.

XU, D. et al. The bacterial community and metabolome dynamics and their interactions modulate fermentation process of whole crop corn silage prepared with or without inoculants. **Microbial Biotechnology**. v. 14, n. 2, p. 561-576, 2020.

YITBAREK, M. B.; TAMIR, B. Silage additives: Review. **Journal of Applied Sciences**. v. 4, n. 5, p. 258-274, 2010.

ZACARON, W. N. et al. Effect of particle size on storage time of rehydrated corn grain. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 42, n. 3, p. 1189-1208, 2021.

ZANIN, E. et al. Effects of acid whey on the fermentative chemical quality and aerobic stability of rehydrated corn grain silage. **Revista Mexicana de Ciências Pecuárias**. v. 13, n. 4, p. 943-961, 2022.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

### ARTIGO 1 – SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO DE SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADO PARA USO COMO INOCULANTES

#### RESUMO

A seleção de bactérias do ácido lático como microrganismos iniciadores de fermentação de silagens, possibilita conhecer a atuação destas bactérias nas silagens e encontrar inoculantes mais eficientes, melhorando as características fermentativas destas silagens. Diante disso, objetivou-se com o presente estudo isolar, caracterizar e selecionar com base em testes laboratoriais, cepas de BAL com capacidade de utilização como inoculantes em silagens de grãos reidratados de milho (SGMR). O milho foi moído a 1 mm e reidratado ( $320 \text{ L H}_2\text{O.ton}^{-1}$ ), atingindo 33,9% de umidade. Foi compactado, em média,  $5,096 \pm 0,04 \text{ kg}$  de milho reidratado (densidade =  $943,66 \pm 8,67 \text{ kg.m}^{-3}$ ) e as silagens foram estocadas por 1, 3, 5, 15, 30 e 60 dias. Foi realizada a contagem de bactérias lácticas em dois meios: MP = MRS Padrão; MM = MRS modificado (glicose e peptona substituída por caseína). Os isolados obtidos foram avaliados quanto o seu crescimento, capacidade de reduzir pH em extrato de grãos de milho, produção de metabólitos, produção de gás, inibição de microrganismos deterioradores/patogênicos e degradação de amido. Foi realizada uma análise de componentes principais para identificar uma possível correlação entre os isolados. A contagem de microrganismos reduziu com o tempo de estocagem de forma similar entre os meios utilizados (MP = 7,072 vs 6,491; MM = 7,211 vs 6,395; 1 e 60 dias de estocagem, respectivamente). Um total de 140 isolados viáveis foram obtidos. O maior número de isolados foi obtido com 30 e 60 dias de ensilagem. A maioria dos isolados foram identificados como gram-positivos (93,6%), forma de cocos (82,0%) e homofermentativos (82,2%). Todos os isolados foram capazes de reduzir o pH para valores menores que 4,00 e 78,5% dos isolados aumentaram sua contagem no teste de crescimento em extrato ( $5,000$  para  $9,674 \text{ log UFC.mL}^{-1}$ ). Todos os isolados foram capazes de produzir metabólitos e de inibir o crescimento de microrganismos deterioradores/patogênicos. A concentração de ácido lático variou entre 1,21 e  $13,7 \text{ g.L}^{-1}$  e de ácido acético entre 0,07 e  $0,31 \text{ g.L}^{-1}$ . Os valores de ácido propiônico variaram de 0,13 a  $0,38 \text{ g.L}^{-1}$ . A distância dos halos no teste contra *E. coli* variou de 0,07 para 1,23 cm, enquanto para *B cereus* foi de 0,36 para 2,09 cm. Nenhum dos isolados avaliados mostrou capacidade de degradação de amido. As concentrações de ácido lático, acético, propiônico e resultados de pH e crescimento foram os maiores contribuintes que explicaram a maior variância (33,1%) na análise de PCA. Do total de 140 isolados, 21 foram considerados promissores e identificados como pertencentes as espécies *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Limosilactobacillus fermentum* e selecionados para avaliação em silagens como possíveis inoculantes bacterianos.

**Palavras-chave:** Inoculante bacteriano. *Lactiplantibacillus plantarum*.

*Limosilactobacillus fermentum*. Microrganismo epifítico. *Pediococcus*. Reidratação

## ABSTRACT

The use of lactic acid bacteria (LAB) as starter microorganism for silage fermentation are important to develop bacterial inoculants to improve the silage fermentative characteristics. The aim with this study was to identify, characterized and select based on laboratory trials, LAB strains that can be used as bacterial inoculants for rehydrated corn grain silage (RCGS). The corn was grounded (1 mm) and rehydrated ( $320 \text{ H}_2\text{O ton}^{-1}$ ), reaching a humidity concentration of 33.9%. It was packed, in average,  $5.096 \pm 0.04$  kg of rehydrated corn (density =  $943.66 \pm 8.67 \text{ kg.m}^{-3}$ ) and silages were storage by 1, 3, 5, 15, 30 and 60 days. The microorganism count was carried out using two different culture mediums: MP = standard MRS; MM = modified MRS (glucose and peptone replaced by casein). The isolates were evaluated in different tests: growth, the ability to reduce pH, organic compounds production, gas production, reduce deteriorate/pathogenic microorganism growth and starch degradation. The principles components analysis was carried out to identify the correlation among the isolates. The storage time reduced the microorganism count on a similar way for both culture mediums (MP = 7.7072 vs 6.491; MM = 7.211 vs 6.395/ 1 and 60 days of ensiling, respectively). A total of 140 viable isolates were obtained. The higher amount of those isolates was obtained with 30 and 60 days of ensiling. The isolates were identified as gram-positive (93.6%), coccus (82,0%) and homofermentative (82.2%). The pH was lower than 4.00 for all the isolates evaluated and 78.5% of the isolates increased their count in the growth test ( $5.000$  to  $9.674 \text{ log CFU mL}^{-1}$ ). All the isolates were capable of to produce organic compounds and to reduce the deteriorate/pathogenic microorganism growth. The lactic acid concentration varied from 1.21 to  $13.7 \text{ g L}^{-1}$ , and the acetic acid from 0.07 to  $0.31 \text{ g L}^{-1}$ , as well. The propionic acid concentration varied between 0.13 and  $0.38 \text{ g L}^{-1}$ . The halo formation against *E. coli* was between 0.07 and 1.23 cm, and for *B. cereus* was between 0.36 and 2.09 cm. The isolates weren't capable of to degrade starch. The lactic, acetic, propionic acid concentrations, pH values and growth were the highest contributing factors that explained the variation (33.1%) in the PCA analysis. From 140 isolates, 39 were evaluated as hopeful isolates, identified as *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Limosilactobacillus fermentum* and selected as bacterial inoculants for silage evaluation.

**Keywords:** Bacterial inoculant. *Lactiplantibacillus plantarum*. *Limosilactobacillus fermentum*. Epiphytic microorganism. *Pediococcus*. Rehydration.

## 1 INTRODUÇÃO

As silagens são alimentos produzidos a partir da fermentação da forragem ou de um alimento (e.g. grãos) em condições de anaerobiose e baixo pH (PAHLOW et al., 2003). O processo consiste na fermentação de açúcares durante a estocagem tanto por microrganismos benéficos ou indesejáveis ao processo (WOOLFORD, 1984). As bactérias do ácido lático são os principais microrganismos benéficos responsáveis pela fermentação do alimento, produzindo ácido lático, abaixando o pH e inibindo outros microrganismos indesejáveis (MUCK et al., 2018).

Em se tratando de SGMR, uma das principais vantagens nutricionais que ocorre com a fermentação do grão ensilado está ligado ao aumento da digestibilidade do amido no trato digestivo total dos animais ruminantes (FERRARETTO et al., 2015). O grão de milho possui uma matriz proteica que circunda os grânulos de amido, impedindo a degradação desse carboidrato pelos microrganismos ruminais (HOFFMAN et al., 2011). Contudo, durante a estocagem ocorre a degradação dessa matriz proteica facilitando o acesso pelos microrganismos ruminais aumentando o valor nutricional da silagem (HOFFMAN et al., 2011). Junges et al (2017) observaram que 60% da atividade proteolítica em silagens de grãos é realizada por bactérias, mas não relatam quais microrganismos estão de fato ligados a esse processo.

Durante a estocagem, ocorre alteração na população e diversidade microbiana nas silagens (CARVALHO et al., 2017) e diversos são os estudos que estudam a dinâmica e a identificação de microrganismos em silagens (AGARUSSI et al., 2022; SANTOS et al., 2019; HU et al., 2018; CARVALHO et al., 2017; OGUNADE et al., 2017; LI; NISHINO, 2011). Porém existem poucos dados sobre a microbiota presente em SGMR. Em estudo realizado por Carvalho et al (2017), os autores observaram a dominância de BAL em SGMR pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* com 5 dias de fermentação, contudo, nenhuma inferência sobre a capacidade proteolítica desses microrganismos foi realizada pelos autores. Tais gêneros de BAL são comumente conhecidos por serem, em sua maioria, homoláticos (WOLFOORD, 1984) e, por isso, a seleção de isolados pertencente a esses gêneros podem ter um grande potencial em auxiliar na fermentação de SGMR. No entanto, gêneros heteroláticos podem ser encontrados atuando no aumento da estabilidade aeróbia das silagens.

As populações microbianas epifíticas associadas ao processo de ensilagem são extremamente complexas, exigindo um esforço significativo para caracterizar os microrganismos com base em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Isso torna a obtenção de isolados bastante laborioso e minucioso, dispondo de diversas etapas durante o processo de seleção onde, inicialmente, grandes números de microrganismos são obtidos e a partir de testes simples em laboratório, um isolado é obtido. Trabalhos anteriormente realizados para selecionar inoculantes baseados em cepas epifíticas foram realizados e mostraram resultados positivos na ensilagem de diferentes forragens (AMARAL et al., 2020; LI et al., 2015; ÁVILA et al., 2014; CARVALHO et al., 2014).

Considerando a dominância por BAL e a possibilidade de melhorarem a fermentação destas silagens, é possível que microrganismos oriundos da SGMR possam atuar de forma mais efetiva melhorando as características químicas, microbiológicas e nutricionais destas silagens. A hipótese do presente trabalho é que BAL são os principais microrganismos presentes em SGMR e que podem ser capazes de serem utilizados como base para formação de inoculantes bacterianos. Diante disso, objetivou-se com o presente estudo isolar, caracterizar e selecionar com base em testes laboratoriais, cepas de BAL com capacidade de utilização como inoculantes em SGMR.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Ensilagem e amostragem**

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Lavras, Brasil (21°13'49" S, 44°58'10" W). O grão de milho foi obtido em fábrica de ração armazenado em silos, posteriormente foi moído com peneira de crivo de 1 mm e hidratado até atingir  $33,9 \pm 0,2$  % de umidade. Como silos experimentais foram utilizados baldes com tampa de capacidade de 5 litros e compactados  $5,096 \pm 0,047$  kg de milho reidratado a uma densidade de  $943,66 \pm 8,67$  kg de massa fresca  $m^{-3}$ . Os silos foram fechados, pesados e mantidos em sala fechada, longe de qualquer possível fonte de contaminação.

Os tratamentos incluíram silagem de grão de milho reidratado (SGMR) em seis tempos de estocagem: 1, 3, 5, 15, 30 e 60 dias. Foram preparadas 4 repetições para cada tempo de estocagem, totalizando 24 silos experimentais. Passados os referidos tempos de estocagem, os minisilos foram novamente pesados e abertos e amostras coletadas



para análises de perdas na fermentação, pH, contagem de BAL e isolamento dos microrganismos. As perdas na fermentação foram calculadas por diferença entre o peso do material antes da ensilagem e o peso final no momento da abertura. Os valores de pH foram mensurados através da utilização de um potenciômetro digital (Digimed Analítica, modelo DM20®).

A contagem da população de bactérias lácticas (BAL) das silagens foi realizada a partir do extrato aquoso obtido pela homogeneização de 30 g de cada amostra com 270 mL de água peptonada (0,1%), agitada em um aparelho homogeneizador (Stomacher 400, Seward, London, UK) por 4 minutos, a 200 rpm. Foi utilizada a técnica de plaqueamento em superfície para contagem dos microrganismos. Para a contagem de bactérias lácticas, foram utilizados dois meios cultura: MRS Agar Padrão (MP) (de MAN, ROGOSA and SHARPE, Merck KGaA) e MRS modificado (MM) (Tabela 1), ambos com agente antifúngico (nistatina), na relação de 4 mL por litro de meio de cultura, onde foram preparadas diluições em séries de  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$ , também em duplicata (TABACCO et al., 2009). As placas permaneceram em estufa, a 37 °C, durante três dias para a contagem das bactérias.

**Tabela 1** – Composição dos meios de cultura MRS padrão e modificado.

Item (g.L <sup>-1</sup> )	Meio de cultura <sup>1</sup>	
	MP	MM
Extrato de levedura	-	-
Peptona de soja	-	-
Cloreto de Sódio	-	-
Fosfato dissódico	-	-
Ágar	14	14
Acetato de sódio	5	5
Citrato de amônia	2	2
Dipotásio hidrogeno fosfato	2	2
Extrato de carne	8	8
Extrato de levedura	4	4
Glicose	20	-
Peptona de caseína	10	-
Sulfato de magnésio	0.2	0.2
Sulfato de manganês	0.04	0.04
Tween 80 (mL/L)	1	1
Caseína	-	5
Nistatina (mL/L)	250	250

<sup>1</sup>MP = MRS padrão; MM = MRS modificado.

## **2.2 Isolamento dos microrganismos e teste de produção de gás**

Após a contagens da população de BAL em cada meio, foi feita a caracterização dos diferentes morfotipos das colônias e a contagem do número total de colônias de cada morfotipo. O número de isolados correspondente à raiz quadrada do número total de colônias de cada morfotipo, foi purificado e a pureza verificada por meio da coloração de Gram e observação da morfologia em microscópio. Todos os isolados foram avaliados quanto a capacidade de produção de gás por meio da inoculação dos isolados em tubos de ensaio (10 mL) contendo caldo MRS e tubos de Durham invertido a 35° C, por 24 horas. O resultado do teste foi atribuído como positivo quando houve formação de gás dentro do tubo de Durham, sendo o isolado classificado como heterofermentativo.

## **2.3 Avaliação do crescimento e capacidade de redução do pH em extrato de grãos de milho**

Um extrato aquoso foi preparado misturando milho moído e água destilada e deixando em banho-maria por 2 horas a 50 °C. Posteriormente esse extrato foi filtrado em papel filtro esterilizado, diluído em solução salina (0,85% NaCl) suplementada com glicose (1%), e autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Todos os isolados obtidos previamente foram cultivados em caldo MRS (HIMEDIA® - M369) por 24 horas a 30 °C e inoculados no extrato. A padronização do inóculo foi realizado através de espectrofotometria. Imediatamente após a inoculação e 24h após a fermentação, foram retiradas amostras para a avaliação do crescimento do inóculo e mensurado o pH do extrato utilizando uma probe acoplada a um medidor de pH (Potenciômetro DIGIMED® DM 20, Digicrom Instrumentos, SP, Brasil). O crescimento foi avaliado por turbidimetria em espectrofotômetro a 600 nm (Shimadzu model UV-2501; Shimadzu Corp., Tokyo, Japan). Uma alíquota de 2 mL do extrato foi acidificada com 10 µL de ácido sulfúrico 50% (v/v) e utilizado para determinar a concentração de metabólitos por HPLC de acordo com Santos et al. (2015).

## **2.4 Teste de inibição de microrganismos deterioradores/patogênicos e de degradação de amido e identificação dos isolados**

Os isolados selecionados que apresentaram melhor crescimento, maior redução de pH em extrato de grão de milho, foram também avaliados quanto a capacidade de inibição de *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* e degradação de amido. Os isolados

foram reativados em meio MRS e incubados a 37 °C, por 24 horas. A bactéria *E. coli* foi reativada em tubos de ensaio contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion - HIMEDIA®), e o *B. cereus* em caldo Ágar Nutriente, ambos foram incubados por 24 horas a 37 °C. O teste de inibição foi conduzido pelo método de difusão em ágar (WEESE & ROUSSEAU, 2005). Foram preparados meio de cultura BHI e Ágar Nutriente semi sólido (70% ágar) e adicionado o respectivo inóculo previamente incubado. Posteriormente, o meio foi despejado nas placas MRS contendo os isolados previamente incubados. O potencial inibitório foi mensurado através do halo formado pelos isolados utilizando um paquímetro.

Para o teste de degradação de amido, os mesmos isolados previamente selecionados foram inoculados em meio de cultura MRS modificado (0,5% peptona, 0,7% extrato de levedura, 0,2% NaCl, 2% amido, e 1,5% ágar) suplementado com 0,25% de amido. Após a incubação (48 h, 37 °C), a zona de clareamento foi observada pela adição de lugol como agente de detecção (TALLAPRAGADA et al., 2018).

Os isolados selecionados ao final do processo de seleção foram identificados utilizando a análise de espectrometria de massa com a técnica de MALDI-TOF, de acordo com Carvalho et al. (2017).

## 2.5 Análise estatística

O experimento com a silagem foi conduzido como delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (tempos de estocagem = 1, 3, 5, 15, 30, 60 dias) e quatro repetições, totalizando 24 unidades experimentais. Os resultados de perdas na ensilagem, pH e contagem de BAL ( $\log_{10}$ ) foram analisados utilizando o PROC GLM do programa estatístico SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute, 2001). As médias foram estimadas pelo “LSMEANS” e a comparação foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O modelo estatístico utilizado foi  $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$ ; sendo  $Y_{ij}$  = valor da variável referente à repetição que recebeu o tratamento  $i$ ;  $\mu$  = média geral;  $T_i$  = efeito fixo do tempo de estocagem  $i$ , para  $i = 1, 3, 5, 15, 30, 60$ ;  $e_{ij}$  = erro aleatório associado a cada observação  $Y_{ij}$ .

Os resultados referentes aos testes bioquímicos foram avaliados a partir de uma análise descritiva dos dados. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada no software estatístico R® utilizando os testes em laboratório como dados ativos e os isolados obtidos como dado suplementar para identificar a correlação dos microrganismos com os testes laboratoriais.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Perdas na ensilagem, pH e contagem de BAL

As perdas de MS durante a ensilagem aumentaram de 0,51 para 1,67% ( $P < 0,001$ ) de 1 para 60 dias de estocagem, sendo maior para as silagens armazenadas por 60 dias em comparação às silagens de 1, 3 e 5 dias, mas não diferindo de 15 e 30 dias (Tabela 2). O pH diminuiu com a estocagem ( $P < 0,001$ ) sendo menor para a silagem com 30 dias de fermentação, não diferindo daquelas estocadas por 15 e 60 dias, em comparação às silagens com 1, 3 e 5 dias (Tabela 2). A contagem de BAL diminuiu em de forma similar para ambos os meios de cultura utilizados à medida que o tempo de estocagem aumentou ( $P < 0,001$ ). A contagem de BAL se manteve contante de 1 a 15 dias de fermentação, reduzindo a partir de 30 dias, não diferindo das silagens com 60 dias de armazenamento (Tabela 2).

**Tabela 2** – Perdas na ensilagem (%) e valores de pH de SGMR em diferentes tempos de estocagem.

Estocagem (dias)	Perdas (%)	pH	Contagem BAL (log UFC)	
			MP	MM
1	0,51 d	5,21 a	7,068 a	7,210 a
3	0,92 cd	4,68 ab	7,144 a	7,294 a
5	1,07 bc	4,31 bc	7,246 a	7,066 a
15	1,25 abc	3,94 cd	7,296 a	7,303 a
30	1,49 ab	3,67 d	6,325 b	6,331 b
60	1,67 a	3,83 cd	6,486 b	6,387 b
<b>Média</b>	1,15	4,27	6,927	6,923
<b>P-valor</b>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Letras minúsculas na mesma coluna iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

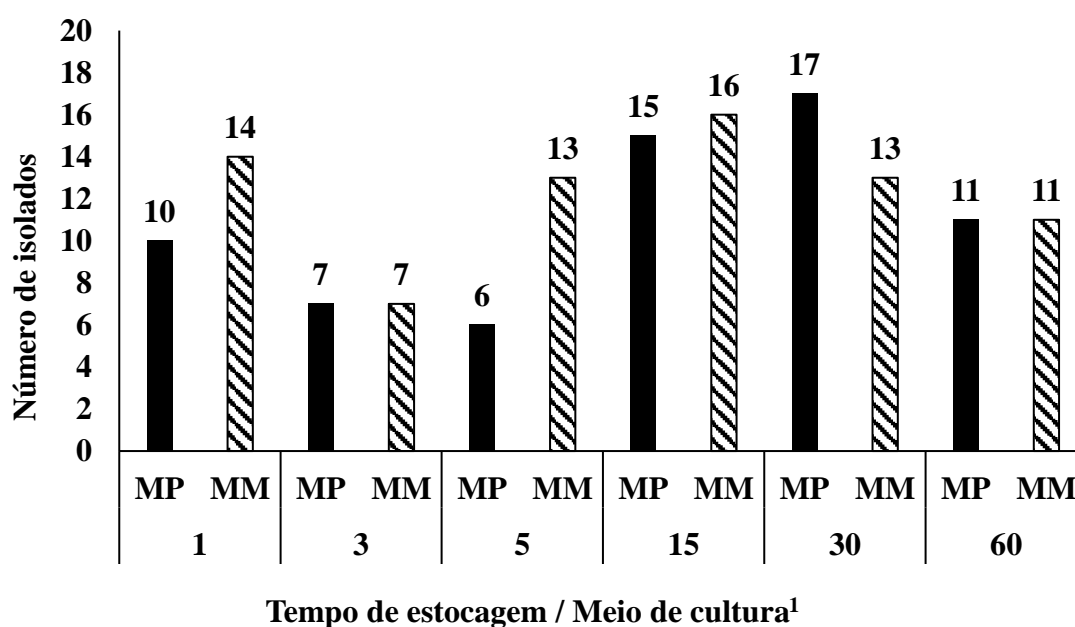
#### 3.2 Seleção dos inoculantes

Um total de 140 isolados viáveis foram obtidos na silagem de SGMR ao longo dos tempos de estocagem e foram submetidos a posteriores testes de seleção em laboratório (Tabela suplementar I). O total de isolados de cada meio de cultura foi numericamente menor aos 3 dias e maior número de isolados obtidos foram com 15 e 30 dias de ensilagem, representando 22,1 e 21,4% do total de isolados viáveis (n=140), respectivamente. A maior parte das bactérias isoladas nos dois meios utilizados foram gram-positivos (93,6%), formato de cocos (82,0%) e homofermentativas (82,1%). Os

isolados 21, 22, 23, 26, 32, 34.1, 55, 76, 78, 85.1, 87, 102, 104, 106, 107, 108, 110, 114, 115, 116, 122, 126, 131, 175.2, e 188.1 produziram gás, sendo classificados como heterofermentativas (Tabela suplementar I).

Em relação aos meios de cultura, 47,1 e 52,9% do total de isolados viáveis (n=140) foram obtidos utilizando os meios MP e MM, não havendo variação numérica significativa no número de isolados nos dois meios ao longo dos tempos de estocagem, com exceção no quinto dia de estocagem, quando 68,4% (n=19) dos isolados foram oriundos do meio MM (Gráfico 1).

**Gráfico 1** – Distribuição dos isolados de BAL obtidos de SGMR em função do tempo de estocagem x meio de cultura.



<sup>1</sup>MP = MRS – Padrão; MM = MRS – Modificado

Os resultados do teste de crescimento em extrato por 24 h e redução de pH estão apresentados na Tabela Suplementar 1. O crescimento das cepas variou de 5,00 a 9,67 log UFC mL<sup>-1</sup> e a queda do pH variou de 3,04 a 4,01. Dentre os 140 isolados viáveis, 78,5% destes apresentaram um aumento na contagem no teste de crescimento. O crescimento microbiano foi utilizado como primeiro critério de seleção e então associados aos menores valores de pH para os próximos testes. Diante disso, 39 isolados avaliados apresentaram tal critério e foram submetidos aos testes de produção de metabólitos e inibição de *E. coli* e *B. cereus* (Tabela 3).

**Tabela 3** – Metabólitos produzidos (g.L<sup>-1</sup>) e teste de inibição contra *E. coli* e *B. cereus*

ISOLADO	SUC <sup>1</sup>	LAT <sup>2</sup>	ACE <sup>3</sup>	PROP <sup>4</sup>	BUT <sup>5</sup>	ETA <sup>6</sup>	1,2-PROP <sup>7</sup>	<i>E. coli</i> (cm)	<i>B. cereus</i> (cm)
4	0,02	4,68	0,11	0,13	0	0,19	0	-	-
7*	0,02	3,44	0,08	0,19	0	0	0	0,87	1,63
26*	0,06	10,37	0,17	0,26	0,05	0,37	0	0,34	1,64
32	0,04	6,94	0,17	0,27	0	0	0	0,29	0,5
52 <sup>#</sup>	0,04	11,83	0,30	0,29	0	2,10	0	0,54	2,07
75*	0,03	4,05	0,17	0,26	0	0	0	0,56	1,95
77*	0,03	4,87	0,08	0,29	0	0	0	0,47	2,09
79*	0,02	3,22	0,07	0,23	0	0	0	0,28	1,7
82*	0,03	5,56	0,16	0,27	0	0	0	0,3	1,74
84 <sup>▶</sup>	0,02	11,92	0,14	0,33	0	0	0	0,29	1,54
87	0,04	10,72	0,25	0,27	0	1,78	0	-	-
88	0	9,56	0,09	0,30	0	0	0	0,2	0,85
90	0,03	1,36	0,31	0,38	0	0	0	0,34	1,19
104 <sup>†</sup>	0,02	8,05	0,11	0,24	0,03	0,46	0	0,61	0,81
106 <sup>†</sup>	0,03	8,11	0,25	0,26	0	1,09	0,04	0,84	0,36
108 <sup>†</sup>	0,04	11,71	0,25	0,29	0,03	1,55	0	0,89	0,89
110 <sup>#</sup>	0,01	11,13	0,16	0,31	0	0,38	0	0,49	1,25
114 <sup>†</sup>	0,04	6,94	0,10	0,30	0	0,29	0	0,45	1,48
116 <sup>†</sup>	0,05	13,70	0,22	0,28	0	0,41	0	1,23	1,63
124	0,04	8,69	0,22	0,36	0	0,89	0,04	0,3	0,66
126*	0,02	5,17	0,08	0,18	0	0,21	0	0,51	1,2
131	0,05	10,99	0,22	0,28	0	0,61	0	0,07	1,18
172	0,02	5,95	0,11	0,22	0	0	0	0,42	1,33
175	0,04	8,36	0,14	0,25	0	0,67	0	0,45	1,06
178	0,03	4,17	0,15	0,27	0	0	0	0,78	1,19
179	0,03	6,37	0,19	0,33	0	0	0	0,7	1,69
180*	0,02	4,38	0,09	0,27	0	0	0	0,82	1
185 <sup>#</sup>	0,47	7,19	0,16	0,42	0	0	0	0,79	1,32
189 <sup>▶</sup>	0,28	4,54	0,09	0,31	0	0	0	0,62	0,41
190 <sup>#</sup>	0,25	3,84	0,09	0,25	0	0	0	0,76	0,88
191	0,4	6,14	0,07	0,34	0	0	0	0,46	1,69
199	0,03	3,95	0,09	0,31	0	0	0	0,49	1,59
200	0,02	3,63	0,10	0,29	0	0	0	0,78	1,23
201	0,01	1,21	0,07	0,10	0	0	0	0,74	1,2
210*	0,02	3,02	0,16	0,22	0	0	0	0,83	1,04
220	0,02	8,19	0,08	0,22	0	0	0	0,53	1,58
221 <sup>#</sup>	0,02	10,11	0,23	0,29	0	0	0	0,55	1,17
223	0,02	6,74	0,09	0,29	0	0	0	0,47	1,19
225	0,01	2,16	0,13	0,19	0	0	0	0,56	0,78

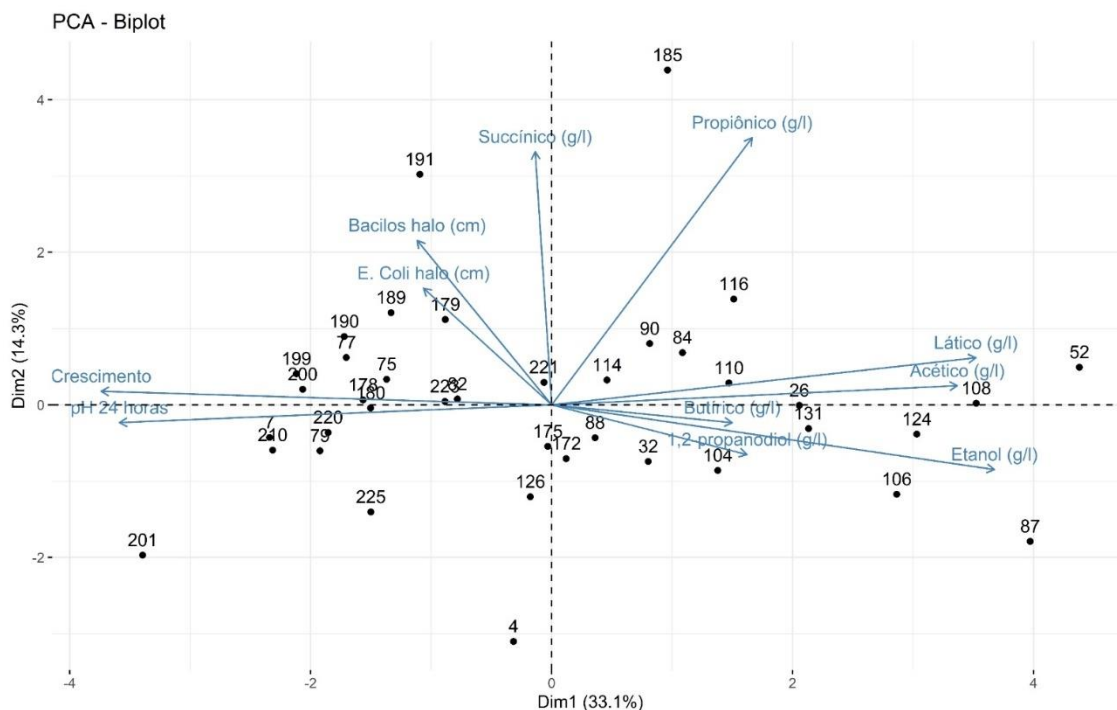
<sup>1</sup>SUC = ácido succínico; <sup>2</sup>LAT = ácido láctico; <sup>3</sup>ACE = ácido acético; <sup>4</sup>PROP = ácido propiônico; <sup>5</sup>BUT = ácido butírico; <sup>6</sup>ETA = etanol; <sup>7</sup>1,2-PROP = 1,2-propanodiol; \**Pediococcus acidilactici*; <sup>#</sup>*Pediococcus pentosaceus*; <sup>▶</sup>*Lactiplantibacillus plantarum*; <sup>†</sup>*Limosilactobacillus fermentum*.

Nas cepas onde foi detectado ácido succínico, as concentrações variaram de 0 a 0,47 g.L<sup>-1</sup>, sendo menor e maior nos isolados 8 e 185, respectivamente. Maior e menor concentração de ácido láctico foram observados nos isolados 116 (13,7 g.L<sup>-1</sup>) e 201 (1,21 g.L<sup>-1</sup>). Os isolados 90 (0,31 g.L<sup>-1</sup>) e 191 (0,07 g.L<sup>-1</sup>) apresentaram maior e menor concentração de ácido acético, respectivamente. Os valores de ácido propiônico variaram de 0,10 (isolado 200) a 0,38 g/L (isolado 90; Tabela 4). O ácido butírico foi detectado em pequenas quantidades nas cepas 26 (0,05 g.L<sup>-1</sup>), 104 (0,03 g.L<sup>-1</sup>) e 108 (0,03 g.L<sup>-1</sup>; Tabela 3). O etanol variou de 0,4 (isolado 4) para 2,10 g.L<sup>-1</sup> (isolado 52; Tabela 4). O 1,2-propanodiol foi detectado somente nos isolados 106 e 124 com concentração igual a 0,04 g/L (Tabela 3).

Todos os isolados avaliados inibiram o crescimento das bactérias *E. coli* e *B. cereus* (Tabela 3). Os isolados demonstraram maior formação de halos contra *B. cereus* em comparação à *E. coli* (Tabela 3). A distância dos halos formados pelos isolados durante o teste de inibição contra *E. coli* variou de 0,07 (isolado 131) para 1,23 cm (isolado 116). Em relação ao teste de inibição contra *B. cereus*, uma variação de 0,36 (isolado 106) para 2,09 cm (isolado 77) foram observados. Somente os isolados 52 e 77 apresentaram um halo maior que 2 cm. Todos os isolados avaliados apresentaram resposta negativa para o teste de degradação de amido.

O resultado do PCA dos 39 isolados estão apresentados na Figura 1. A análise de PCA foi realizada com o intuito de identificar a correlação entre os isolados com base nos testes realizados para os 39 isolados obtidos nas silagens de SGMR previamente selecionados e avaliados no presente estudo. O primeiro e o segundo componentes (Dim1; Dim2) explicaram 33,1% e 14,3% do total da variância baseada na análise de componentes principais, respectivamente. Os dados referentes ao crescimento, pH, ácido láctico, ácido acético e etanol foram os que mais contribuíram com o primeiro componente, ao passo que o ácido succínico, ácido propiônico e inibição contra *Bacillus* foram o que mais contribuíram com o segundo componente. Uma correlação positiva foi observada para ácido láctico, ácido acético e etanol e negativa para crescimento e pH dentro do componente 1, onde maior concentração desses ácidos acarreta menor crescimento microbiano e valores de pH (Tabela 4). Por outro lado, o crescimento e o pH tiveram correlação positiva e negativa, respectivamente, no componente 2, ressaltando que maior crescimento microbiano ocasiona em menores valores de pH (Tabela 4).

**Figura 1** – Análise de componentes principais (PCA) das variáveis relacionadas aos testes em laboratório de isolados de SGMR.



**Tabela 4** – Valores das correlações das variáveis dentro de cada componente.

Variáveis	Componente 1	Componente 2
Ácido succínico (g.L <sup>-1</sup> )	-0,03020617	0,73504205
Ácido lático (g.L <sup>-1</sup> )	0,78040949	0,13657147
Ácido acético (g.L <sup>-1</sup> )	0,74606423	0,05547837
Ácido propiônico (g.L <sup>-1</sup> )	0,36876935	0,77581486
Ácido butírico (g.L <sup>-1</sup> )	0,33213268	-0,05186430
Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	0,81440911	-0,18800492
1,2-propanodiol (g.L <sup>-1</sup> )	0,35926725	-0,14450174
<i>E. coli</i> (cm)	-0,23548654	0,33880764
<i>B. cereus</i> (cm)	-0,24723347	0,47760445
pH	-0,79482785	-0,05164530
Crescimento	-0,82841226	0,03959047

#### 4 DISCUSSÃO

As perdas na fermentação durante a ensilagem é um reflexo inerente ao processo de ensilagem e que irá ocorrer de forma natural durante a estocagem. Dentre os fatores que afetam as perdas na ensilagem, o tempo de estocagem é uma variável que tende a aumentar tais perdas ao longo do armazenamento (CARVALHO et al., 2017).



Fernandes et al. (2022) avaliaram SGMR estocadas por 30 e 180 dias e observaram PMS de 3,1 e 8,9%, respectivamente, superior ao observado nas silagens avaliadas no presente estudo. Carvalho et al. (2017) observaram uma variação de 3,1 a 7,6% nas PMS em SGMR estocadas de 0 a 280 dias, também superior ao observado no presente trabalho. Em silagens, as perdas durante a fermentação podem estar associadas à formação de CO<sub>2</sub>, composto orgânico oriundo do metabolismo microbiano (BORREANI et al., 2018; McALLISTER; HRISTOV, 2000). Na ensilagem, o CO<sub>2</sub> pode ser formado pelo metabolismo de microrganismos aeróbios (e.g. leveduras) ou por bactérias que utilizam a via de degradação de glicose conhecida como fosfoquetolase (e.g. BAL heterofermentativas), produzindo uma molécula de piruvato, uma molécula de acetil fosfato e uma molécula de CO<sub>2</sub> (WOOLDFORD, 1984). No presente trabalho, o aumento das perdas durante a estocagem muito provavelmente está atrelado à atividade microbiana com conseqüente formação de CO<sub>2</sub>.

A redução do pH em silagens é tido como um reflexo do processo de fermentação. O metabolismo homolático de bactérias lácticas convertem os carboidratos solúveis em ácido láctico, principal produto orgânico da fermentação responsável pela queda do pH das silagens (WOOLDFORD, 1984). No presente estudo é notório a redução do pH ao longo da estocagem. As silagens quando estocadas por 1 dia tiveram pH igual a 5,21, enquanto a partir de 15 dias de fermentação o pH reduziu para valores abaixo de 4,00 e não diferiu das silagens armazenadas por 30 e 60 dias. Costa et al. (2023) avaliando SGMR estocadas por 0, 10, 30, 90 e 200 dias observaram valores de pH menor que 4,00 com 10 dias de fermentação. De forma similar, Oliveira et al. (2023) estudando SGMR ensiladas por 15, 30 e 60 dias também relataram valores de pH menor que 4,00 com 15 dias de fermentação, corroborando com o resultado do presente trabalho. Em contrapartida, quando comparadas com silagem de planta inteira de milho (SPIM), a redução do pH em SGMR pode se mostrar mais lenta.

Weinberg e Chen (2023) avaliando SPIM em diferentes tempos de estocagem observaram valores de pH menor que 4,00 com apenas uma semana de fermentação. Diepersloot et al. (2022) também avaliando SPIM armazenadas por 5, 7, 14, 28 e 56 dias também observaram valores de pH inferior a 4,00 nas silagens com 5 dias de fermentação. Em ambos os trabalhos, o tempo de fermentação necessário para que as SPIM apresentarem valores de pH igual aos de SGMR citados anteriormente, bem como do presente estudo, mostrou-se inferior. Isso remete ao fato de que, SGMR necessitam de mais dias de fermentação para alcançar um perfil de fermentação similar à uma

SPIM, reforçando a necessidade de selecionar inoculantes bacterianos capazes de promover uma acidificação mais acelerada em SGMR.

O processo de fermentação de silagens acarreta mudanças tanto no perfil quanto na dinâmica populacional de microrganismos no interior do silo (WU et al., 2023; GUAN et al., 2018; MUCK et al., 2018). Carvalho et al. (2017) estudando a dinâmica populacional desses microrganismos em SGMR observaram um aumento na contagem total de BAL de 4,05 para 7,35 log UFC quando foram estocadas até 280 dias. Por outro lado, estes mesmos autores observaram que houve uma redução na contagem da população de cada gênero/espécie identificado ao longo da fermentação. No presente trabalho, a contagem de BAL diminuiu de 7,068 para 6,486 log UFC e de 7,210 para 6,387 log UFC nos meios MP e MM quando aumentou o tempo de ensilagem de 1 para 60 dias, respectivamente, o que possivelmente é reflexo da contagem de BAL em função do gênero/espécie dos microrganismos.

A redução da contagem de BAL não necessariamente correspondeu ao mesmo comportamento quanto à distribuição dos isolados obtidos ao longo do armazenamento das SGMR. Uma diferença na viabilidade dos isolados obtidos em cada tempo de fermentação possivelmente refletiu no total de isolados para cada tempo de estocagem. Carvalho et al. (2017) observaram que existe uma diferença em gênero e espécie desses microrganismos ao longo da estocagem. Nos primeiros dias de ensilagem, bactérias do gênero *Pediococcus* eram dominantes e, ao decorrer da estocagem, outras BAL se tornaram predominantes (e.g. bactérias classificadas como gênero *Lactobacillus*). Ainda segundo Carvalho et al. (2017), bactérias do gênero *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostococcus* tendem a diminuir sua população ao longo da fermentação de SGMR em função do menor pH, alterando a dominância de BAL.

A partir dos resultados obtidos, foi possível perceber que ocorreu uma alternância entre os microrganismos em função da sua forma celular. Nas silagens armazenadas por 1 dia a forma celular de cocus foi superior à de bastonetes (14,3 vs 2,9%; n=140), e reduziu ao longo da estocagem para até 8,6% (n=140) nas silagens com 60 dias de fermentação. De forma paralela, microrganismos de forma celular de bastonetes aumentaram com a fermentação, representando 7,1% (n=140) dos isolados obtidos nas silagens com 60 dias de armazenamento. As silagens estocadas por 15 e 30 dias tiveram uma participação similar de microrganismos de ambas as formas celulares. Com 15 dias, microrganismos com formato de cocus representaram 10% (n=140) contra

12,3% (n=140) referentes à forma celular de bastonete, ao passo que com 60 dias de ensilagem, a representatividade de ambas as formas foi a mesma (10,7%; n=140).

Ainda que uma identificação a nível de gênero e espécie não tinha sido realizada durante o presente trabalho para todas os isolados, a identificação da forma celular pode auxiliar numa possível inferência sobre o gênero de determinado microrganismo. Diante disso, podemos pressupor que uma alternância na dominância de microrganismos ao longo da fermentação ocorreu, visto que a forma celular também está relacionada à um gênero específico de BAL, comportamento similar ao observado no estudo realizado por Carvalho et al. (2017). Aliado a isso, o aumento do número de isolados até 30 dias de fermentação provavelmente está associado a essa alternância de BAL de diferentes gêneros no decorrer da ensilagem, mais adaptadas ao ambiente ácido, o que possibilitou a obtenção de um maior número de isolados viáveis, especialmente aos 15 e 30 dias de armazenamento.

A partir dos dados observados com a contagem de BAL nos meios MP e MM, houve uma similaridade entre o número de isolados obtidos dos meios de cultura utilizados no presente estudo, exceto para as SGMR estocadas por 5 dias. Maior número de isolados de BAL foram oriundos do meio MM e comparação ao meio MP. As BAL comumente utilizam os carboidratos solúveis (e.g. glicose) como principal substrato para seu metabolismo, porém podem utilizar de outros componentes para realizar seu metabolismo, por exemplo, proteínas (WOOLFORD, 1984). O processo de desaminação refere-se à capacidade que BAL possuem de degradar compostos nitrogenadas e utilizar o esqueleto de carbono em sua via metabólica (OHSHIMA; McDONALD, 1978). No presente estudo, foram utilizados dois meios de cultura diferentes em sua composição quanto ao principal substrato disponível para o crescimento dos microrganismos (MP = glicose; MM = caseína). O fato de ter ocorrido uma semelhança nas contagens de BAL tanto em meio MP quanto em MM nos levar a acreditar que os microrganismos não tiveram seu crescimento afetado, independente do substrato utilizado nos meios de cultura.

Associado as características anteriormente citadas, a formação de gás durante o metabolismo bacteriano auxilia na seleção e identificação dos isolados, agrupando BAL em dois grupos distintos: homoláticos e heteroláticos. Com relação à formação de gás, essa é uma característica de fermentação heterolática, onde um mol de glicose é dividido assimetricamente para produzir um mol de lactato, etanol e dióxido de carbono (MUCK et al., 2018). No presente estudo, apenas 17,8% dos isolados avaliados

apresentam formação de gás durante o teste, o que nos leva a assumir que pertencem ao grupo das BAL heteroláticas.

A capacidade de redução do pH ocorreu de forma similar para todos os isolados avaliados. Kung et al. (2018) relatam que um intervalo entre de pH entre 4,0 – 4,5 é ideal na fermentação de silagem de grãos úmidos de milho. O pH é um dos critérios de maior importância no que se refere à fermentação de silagens, pois confere não somente a estabilização da fermentação, mas também auxilia no controle de microrganismos indesejáveis em silagens (MUCK et al., 2018). Associado à redução do pH, o crescimento bacteriano ocorre de forma concomitante durante a fermentação das silagens. O teste de crescimento em extrato revelou que 2/3 dos isolados foram capazes de aumentar a contagem de BAL (Tabela suplementar I). A diferença na variação do crescimento entre os isolados para cada dia de ensilagem provavelmente está atrelado à capacidade individual de crescimento de cada microrganismo.

O fato de ter sido utilizado um meio de cultura contendo nitrogênio como principal substrato para o crescimento bacteriano pode ter causado mudanças no metabolismo celular dos isolados. Savijoki et al. (2006) relataram que BAL são microrganismos capazes de se adaptarem em função do ambiente com o intuito de manter seu crescimento. Somado a isso, hexoses (e.g. glicose) como substratos são os substratos preferidos pelas BAL, contribuindo de forma mais eficiente para o crescimento bacteriano (WOOLFORD, 1984). Logo, a adaptação dos isolados, principalmente em relação ao metabolismo microbiano na presença da glicose, pode ter contribuído para uma contagem de BAL similar após 24 h de fermentação, independente do meio de cultura o qual o microrganismo foi originalmente obtido.

Uma das principais respostas e reflexo do crescimento bacteriano consiste na formação de metabólitos (MUCK et al., 2018). Como dito anteriormente, BAL são capazes de produzir diversos produtos em sua via metabólica, definidos a partir do tipo de substrato e da rota utilizada, além de classificar os microrganismos em diferentes grupos (MUCK et al., 2018). Atualmente, a maioria das bactérias do grupo das homoláticas são reconhecidas taxonomicamente como espécies BAL heterofermentativas facultativas, em vez de espécies homofermentativas obrigatórias (PAHLOW et al., 2003). As BAL heterofermentativas facultativas fermentam hexoses, como a glicose, da mesma forma que os homoláticas obrigatórias, produzindo quase exclusivamente ácido lático, oposto ao que ocorre com as BAL heterofermentativas obrigatórias que produzem outros compostos a partir de hexoses em adição do ácido

lático (BORREANI et al., 2018; MUCK et al., 2018). As heterofermentativas facultativas diferem das obrigatórias por possuírem a enzima fofuquetolase, que permite a fermentação de pentoses, produzindo principalmente ácido lático e acético (MUCK et al., 2018). No presente trabalho, todos os isolados apresentaram concentrações dos ácidos lático e acéticos pelo teste de produção de metabólitos, além da formação de gás, enquadrando-os como sendo BAL homofermentativas ou heterofermentativas.

Curiosamente, concentrações de ácido propiônico e ácido butírico foram observadas no teste de fermentação com os isolados. Woolford (1984) relata que BAL são microrganismos formadores de lactato e acetato, e não de ácido propiônico. Contudo, uma via de fermentação que aumenta a concentração de ácido propiônico em resposta à conversão de 1,2-propanodiol formado pela degradação do ácido lático pode ocorrer pelo metabolismo de BAL que produzem ácido acético e 1,2-propanodiol (KROONEMAN et al., 2002; OUDE ELFERINK et al., 2001). Somente dois isolados (106, 124) apresentaram formação de 1,2-propanodiol pelo teste de fermentação (Tabela 3). O isolado 106 foi identificado como sendo da espécie *Lactobacillus fermentum* com resposta positiva para formação de gás, o que o caracteriza como um microrganismo heterolático, desse modo, a presença do 1,2-propanodiol pode estar relacionado a sua via de fermentação, porém estudos sobre o metabolismo desse isolado devem ser realizados. O isolado 124, por sua vez, não apresentou formação de gás durante o teste em laboratório e foi classificado como sendo, até então, um microrganismo homolático. De acordo com Woolford (1984), o etanol é um produto final da fermentação de BAL pertencentes ao grupo das heterofermentativas, capazes de converter a glicose como substrato e, na presença da enzima desidrogenase alcoólica, formam o etanol. O fato de não ter conhecimento de todos os isolados a nível de gênero ou espécie torna difícil explicar com exatidão no presente estudo a origem dos compostos orgânicos durante o teste de formação de metabólitos. Além do mais são cepas indígenas isoladas recentemente, cujo metabolismo precisa ser estudado mais detalhadamente, bem como fazer a caracterização fenotípica e genotípica destes isolados.

A atividade microbiana no processo de deterioração durante o desabastecimento do silo é a etapa de maiores perdas nutricionais do alimento (BORREANI et al., 2018). As silagens de grãos de milho reidratado são um alimento de alto valor nutritivo, mas que também podem ser acometidas pela deterioração aeróbia (BERNARDES et al., 2018). As leveduras e os fungos filamentosos são os principais microrganismos responsáveis pela deterioração e consequente perda nutricional das silagens. Borreani et

al. (2018) relatam que perdas de MS até 18% podem ocorrer nessa etapa. Durante o processo de seleção, a avaliação de isolados capazes de inibir o crescimento de microrganismos deterioração se torna essencial como critério de seleção de isolados para inoculantes (CARVALHO et al., 2021).

Os resultados mostram que isolados demonstraram maior capacidade de inibição contra *B. cereus* do que *E. coli*. A inibição do crescimento bacteriano por BAL é reflexo do efeito inibitório dos ácidos orgânicos produzidos. Ácido acético e propiônico são capazes de se dissociar e penetra a membrana celular, alterando o pH interno e causando a morte celular (KUNG et al., 2018; MOON, 1983). Ainda, nenhum dos isolados mostrou capacidade de degradação de amido. Van Soest (1994) relatam que BAL não são capazes de degradar carboidratos mais complexos (e.g. amido), e que a síntese de amilase é uma característica muito rara nesses microrganismos (ANURADHA et al., 1999).

A partir dos resultados da análise de PCA podemos perceber que os isolados não necessariamente estão relacionados à uma única característica, de modo que não foi possível encontrar todas as características desejáveis em um único microrganismo. Contudo, os isolados que tiveram maior crescimento foram os que também tiveram maior efeito sobre a redução do pH. No presente trabalho, 82,2% dos isolados foram classificados como sendo BAL homofermentativas com produção mais eficiente de ácido lático, logo, o maior crescimento bacteriano atrelado a maior concentração de ácido lático influenciou em menores valores de pH (KUNG et al., 2018; MUCK et al., 2018). Curiosamente, isolados com maior formação de ácido lático tiveram correlação positiva com ácido acético e etanol. Da mesma forma, os isolados que apresentaram maior formação de ácido propiônico mostraram maior formação de ácido succínico e foram mais eficientes em inibir o crescimento de *B. cereus*.

Ainda que não tenha ocorrido a formação de grupos bem definidos, as cepas que apresentaram os melhores resultados combinando maior crescimento, maior capacidade de reduzir pH e maior habilidade de inibir *E. coli* ou *Bacillus* e/ou inibir os dois, bem como formação de metabólitos, foram destacadas como promissoras e foram identificadas. Assim, cepas das espécies *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Limosilactobacillus fermentum* apresentam características desejáveis como inoculantes para silagem e devem ser avaliadas em silos em estudos posteriores

## 5 CONCLUSÃO

Todos os isolados foram capazes de crescer tanto na presença de glicose quanto de caseína. A grande maioria dos isolados foram classificando como sendo BAL homofermentativas. Microrganismos das espécies *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactplantibacillus plantarum* e *Limosilactobacillus fermentum* foram identificados em SGMR. Do total de 140 isolados, 21 foram selecionados por apresentarem maior produção de ácidos orgânicos, maior crescimento microbiano, redução do pH e inibição de microrganismos indesejáveis para avaliação em silagens como possíveis inoculantes bacterianos.

## REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**, 15th ed. Arlington, VA, USA: AOAC International, 1990.
- AGARUSSI, M. C. N. et al. Microbiome of rehydrated corn and sorghum grain silages treated with microbial inoculants in different fermentation periods. **Scientific Reports**. v. 12, n. 16864, 2022.
- ANURADHA, R.; SURESH, A. K.; VENKATESH, K. V. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 367-375, 1999.
- BERNARDES, T. F. et al. Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, p. 4001-4019. 2018.
- BORREANI, G. et al. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**. v. 101, p. 3952-3979, 2018.
- CARVALHO, B. F. et al. Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. **Journal of Applied Microbiology**. v. 130, n. 2, p. 341-355, 2021.
- CARVALHO, B. F. et al. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 122, n. 31, p. 589-600, 2017.
- COSTA, D. M. et al. Particle size and storage length affect fermentation and ruminal degradation of rehydrated corn grain silage. **Archives of Animal Nutrition**. v. 77, n. 3, p. 245-259, 2023.
- DIEPERSLOOT, E. C. et al. Effect of cutting height, microbial inoculation, and storage length on fermentation profile and nutrient composition of whole-plant corn silage. **Translation Animal Science**. v. 6, n. 2, txac037, 2022.
- FERRARETTO, L. F.; FREDIN, S. M.; SHAVER, R. D. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. v. 98, n. 10, p. 7318-7327, 2015.
- FREIRE, T. T. et al. Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 11, e513101119964, 2021.
- GUAN, H. et al. Microbial communities and natural fermentation of corn silages prepared with farm bunker-silo in Southwest China. **Bioresource Technology** v. 265, p. 282-290. 2018.
- HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 2465–2474, 2011.



- HOLMES, B. J. 2006. Density in silage storage. Silage for Dairy Farms: Growing, Harvesting, Storing and Feeding Conference **Proceedings** (NRAES-181), Natural Resource, Agriculture and Engineering Service, Ithaca, NY.
- HU, Z. et al. Diversity of bacterial community during ensiling and subsequent exposure to air in whole-plant maize silage. **Asian-Australasian Journal of Animal Science** v. 31, n; 9, p. 1464-1473. 2018.
- JUNGES, D. et al. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. **Journal of Dairy Science**. v. 100, n. 11, p. 9048-9051, 2017.
- KUNG, L. et al. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, p. 4020-4033, 2018.
- 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** v. 110, n. 6, p. 1561-1570. 2011.
- MADIGAN, T. M. et al. 2016. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed. 1033p.
- MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 55, p. 453-460, 1983.
- MUCK, R. E. et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science** v. 101, n. 5, p. 3980-4000. 2018.
- OGUNADE, I. M. et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and bacterial diversity in corn silage contaminated with the pathogen and treated with chemical or microbial additives. **Journal of Dairy Science** v. 100, n. 3, p. 1780–1794. 2017.
- OHSHIMA, M.; McDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 29:497–505. 1978.
- OLIVEIRA, K. S. et al. Effect of length of storage and chemical additives on the nutritive value and starch degradability of reconstituted corn grain silage. **Agronomy**. v. 13, n. 1, 209, 2023.
- OUDE ELFERINK, S. J. et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 1, p. 125-32, 2001.
- PAHLOW, G. et al. 2003. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Eds). **Silage science and technology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy. p. 31-94.

ROOKE, J. A.; R. D. HATFIELD. 2003. Biochemistry of ensiling. In: **Silage Science and Technology**. (Eds.) BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, H. J. American Society of Agronomy, Madison, WI. p. 95-139.

SANTOS, A. O. et al. Lactic acid bacteria diversity in corn silage produced in Minas Gerais (Brazil). **Annals of Microbiology** v. 69, n. 5, p. 1445-1459. 2019.

SANTOS, W. P. et al. Glycerin as an additive for sugarcane silage. **Journal of Dairy Science**. v. 65, n. 3, p. 1547-1556, 2015.

SAVIJOKI, K; INGMER, H.; VARMANEN, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 71, p. 394-406. 2006.

TABACCO, E. et al. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. **Journal of Applied Microbiology**. v. 107, n. 5, p. 1632-41, 2009.

TALLAPRAGADA, P. et al. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v. 16, n. 2, p. 357-362, 2018.

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

WEINBERG, Z. G.; CHEN, Y. Effects of storage period on the composition of whole crop wheat and corn silages. **Animal Feed Science and Technology**. v. 185, n. 3-4, p. 196-200, 2013.

WOOLFORD, M. K. The chemistry of silage. In: WOOLFORD, M. K. (Ed). **The silage fermentation**. 10 ed. Mercel Dekker, UE. 350p. 1984.

WU, B. et al. Microbial Community and fermentation quality of alfalfa silage stored in farm bunker silos in Inner Mongolia, China. **Fermentation**. V. 9, n. 5, p. 455, 2023.

**Tabela suplementar 1** – Características de cepas isoladas de SGMR e crescimento após 24h e redução de pH de cepas de BAL isoladas de silagem (continua).

Dias de estocagem	Meio <sup>1</sup>	Morfotipo	Isolado	Forma <sup>2</sup>	Gram	Produção de gás	pH 24 horas	Log UFC mL <sup>-1</sup>		
1	MP	1	1	C	+	-	3,43	6,699		
			2	C	+	-	3,4	6,813		
			3	C	+	-	3,51	0		
			4*	C	+	-	3,12	8,667		
			5	C	+	-	3,53	0		
			7*	C	+	-	3,58	8,923		
			10	C	+	-	3,56	0		
		2	11	C	+	-	3,5	6,778		
			13	C	+	-	3,43	0		
			14	C	+	-	3,44	0		
			MM	1	21	B	+	+	3,16	6,778
					22	C	+	+	3,19	7,431
					23	B	+	+	3,13	0
					25	B	+	-	3,19	0
	34,1	B			+	+	3,2	0		
	2	26*			C	+	+	3,09	7,829	
		27			C	+	-	3,43	0	
		28	C	+	-	3,5	5,544			
		29	C	+	-	3,7	7,458			
		30	C	+	-	3,43	0			
		31	C	+	-	3,52	6,398			
		32*	C	+	+	3,11	7,771			
	3	MP	1	33	C	+	-	3,19	8,688	
				34,2	C	+	-	3,4	0	
				41	C	+	-	3,57	6,778	
				42,1	C	+	-	3,6	6,544	
				43	C	+	-	3,57	7,491	
				44,1	C	+	-	3,5	0	
				44,2	C	+	-	3,56	0	
		2	44,2	C	+	-	3,59	0		
			46	B	+	-	3,17	5,845		
			MM	1	48	C	+	-	3,58	0
					49	C	+	-	3,53	0
					50	C	+	-	3,44	0
51					C	+	-	3,49	6,301	
52*	C	+			-	3,08	6,000			
2	53	C			+	-	3,44	7,613		
	55	C	+	+	3,16	7,772				

<sup>1</sup>MRS padrões (MP); MRS modificado (MM); <sup>2</sup>C (forma celular de cocos); B (forma celular de bastonete). \*Cepas com maior crescimento e maior redução de pH

**Tabela suplementar 1** – Características de cepas isoladas de SGMR e crescimento após 24h e redução de pH de cepas de BAL isoladas de silagem (continua).

Dias de estocagem	Meio <sup>1</sup>	Morfotipo	Isolado	Forma <sup>2</sup>	Gram	Produção de gás	pH 24 horas	Log UFC mL <sup>-1</sup>			
5	MP	1	75*	C	+	-	3,58	8,763			
			76	C	+	+	3,19	0			
			77*	C	+	-	3,58	8,789			
			78	C	+	+	3,49	7,927			
			79*	C	+	-	3,57	8,725			
			80	C	+	-	3,49	8,626			
			MM	1	82*	C	+	-	3,43	8,773	
					83	C	+	-	3,42	0	
					84*	B	+	-	3,14	7,869	
					85,1	B	+	+	3,2	0	
	86	C			+	-	3,57	6,813			
	87*	C			+	+	3,1	8,531			
	88*	B			+	-	3,1	6,544			
	89	B			+	-	3,46	0			
	90*	C			+	-	3,15	8,145			
	91	B			+	-	3,44	6,544			
			2	85,2	C	+	-	3,42	6,639		
				92	C	+	-	3,39	6,602		
				93	B	+	-	3,44	5,699		
				15	MP	1	102	B	+	+	3,15
103							C	+	-	3,58	0
104*							B	+	+	3,08	7,431
105,1							C	+	-	3,55	0
106*							B	+	+	3,1	7,906
107							B	+	+	3,16	0
108*							B	+	+	3,08	7,512
109	C	+	-				3,17	0			
110*	C	+	+				3,12	7,650			
111	C	+	-				3,21	7,406			
113	B	+	-	3,39	7,021						
114*	B	+	+	3,14	7,544						
115	B	+	+	3,21	7,771						
116*	B	+	+	3,15	7,782						
		2	105,2	C	+	-	3,79	6,653			

<sup>1</sup>MRS padrões (MP); MRS modificado (MM); <sup>2</sup>C (forma celular de cocos); B (forma celular de bastonete). \*Cepas com maior crescimento e maior redução de pH

**Tabela suplementar 1** – Características de cepas isoladas de SGMR e crescimento após 24h e redução de pH de cepas de BAL isoladas de silagem (continua).

Dias de estocagem	Meio <sup>1</sup>	Morfotipo	Isolado	Forma <sup>2</sup>	Gram	Produção de gás	pH 24 horas	Log UFC mL <sup>-1</sup>
15	MM	1	118	B	+	-	3,17	7,225
			119	C	+	-	3,51	7,728
			120	C	+	-	3,5	0
			121	C	+	-	3,39	6,845
			122	B	+	+	3,47	6,903
			123,1	C	+	-	3,18	0
			124*	C	+	-	3,14	7,898
			125	B	+	-	3,25	7,568
			126*	C	+	+	3,1	7,462
			127	B	+	-	3,49	6,176
			128	B	+	-	3,42	6,602
			129	C	+	-	3,61	5,653
			130	B	+	-	3,51	6,929
			131*	B	+	+	3,11	7,648
30	MP	2	132	B	+	-	3,51	7,511
			123,2	C	+	-	3,42	7,230
		1	164	C	+	-	3,54	6,740
			165,1	C	+	-	3,57	6,699
			166	B	+	-	3,41	6,778
			167	B	+	-	3,22	6,740
			168	B	-	-	3,25	7,898
			169	B	+	-	3,36	6,484
			170	C	+	-	3,46	7,423
			171	C	+	-	3,53	0
172*	B	+	-	3,15	7,176			
174	B	+	-	3,19	8,530			
175,2	B	+	+	3,1	7,230			
176	C	+	-	3,7	8,262			
177	C	-	-	3,55	8,306			
178*	C	-	-	3,7	8,794			
179*	C	-	-	3,51	9,298			
2	165,2	C	+	-	3,2	7,097		
	175,1	C	+	-	3,47	0		

<sup>1</sup>MRS padrões (MP); MRS modificado (MM); <sup>2</sup>C (forma celular de cocos); B (forma celular de bastonete). \*Cepas com maior crescimento e maior redução de pH

**Tabela suplementar 1** – Características de cepas isoladas de SGMR e crescimento após 24h e redução de pH de cepas de BAL isoladas de silagem (conclusão).

Dias de estocagem	Meio <sup>1</sup>	Morfotipo	Isolado	Forma <sup>2</sup>	Gram	Produção de gás	pH 24 horas	Log UFC mL <sup>-1</sup>		
30	MM	1	180*	C	+	-	3,31	9,388		
			181	C	-	Nd	3,32	6,176		
			182	C	+	-	3,32	8,255		
			188,1	C	+	+	3,72	6,954		
			2	183	B	-	-	3,29	5,000	
				184	B	-	Nd	3,35	8,097	
				185*	B	+	-	3,04	7,550	
		186		B	-	-	3,31	6,161		
		187	B	+	-	3,32	6,653			
		188,2	B	+	-	3,16	7,362			
		189*	B	+	-	3,34	9,657			
		190*	C	+	-	3,35	9,477			
		191*	B	+	-	3,32	9,059			
		60	MP	1	199*	C	+	-	3,84	9,003
200*	C				+	-	3,7	9,186		
201*	C				+	-	3,83	9,295		
202	C				+	-	4,01	7,966		
203	C				+	-	3,88	8,204		
204	C				+	-	3,78	8,681		
205	C				+	-	3,71	9,273		
206	C				+	-	3,74	8,241		
208	C				+	-	3,85	8,657		
209	C				+	-	3,84	7,973		
210*	C				+	-	3,83	9,409		
MM	1				219	B	+	-	3,46	7,161
					220*	B	+	-	3,71	9,269
			221*	C	+	-	3,38	9,674		
			222	B	+	-	3,54	6,740		
			223*	B	+	-	3,19	9,516		
			224	B	+	-	3,24	6,929		
			225*	B	+	-	3,3	9,175		
226	B		+	-	3,22	7,204				
228	B		+	-	3,6	6,653				
229	B	+	-	3,46	6,477					
230	B	+	-	3,23	7,789					

<sup>1</sup>MRS padrões (MP); MRS modificado (MM); <sup>2</sup>C (forma celular de cocos); B (forma celular de bastonete). \*Cepas com maior crescimento e maior redução de pH

## ARTIGO 2 – CEPAS EPIFÍTICAS DE GRÃOS DE MILHO REIDRATADO MODIFICAM DE FORMA VARIÁVEL AS CARACTERÍSTICAS FERMENTATIVAS E NUTRICIONAIS DESTAS SILAGENS

### RESUMO

O desenvolvimento de inoculantes com fermentativas microrganismos epifíticos é uma alternativa para melhorar características de silagens. Com isso, objetivou-se com o presente estudo, avaliar inoculantes bacterianos compostos por isolados epifíticos de BAL previamente selecionados para estas silagens, sobre o perfil de fermentativo, valor nutritivo e estabilidade aeróbia de SGMR em diferentes tempos de estocagem. Os tratamentos consistiram em SGMR sem inoculante (Controle), SGMR inoculadas com nove diferentes inoculantes; 8 isoladas de SGMR (S-52; S-86; S-106; S-110; S-116; S-180; S-190; S-221) e *Lactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 (CCMA 0170) (S-LH), estocadas por 45 e 90 dias. O milho ( $5,361 \pm 0,08$  kg) foi compactado em baldes com densidade de  $992,85 \pm 16,37$  kg m<sup>-3</sup>. Após 45 e 90 dias de estocagem, os silos foram abertos para posteriores análises. Foi utilizado DIC, em arranjo fatorial 10 x 2, sendo 9 inoculantes mais o controle e 2 tempos de estocagem, com três repetições. As variáveis foram analisadas utilizando o PROC GLM do SAS (SAS Institute). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância e tendência considerada entre 5 e 10%. Maiores PMS foram observadas na silagem S-LH (6,71%;  $P = 0,001$ ). O tempo de estocagem reduziu ( $P < 0,001$ ) o amido em 4,32% e a silagem S-190 teve menor concentração de amido (53,86%;  $P = 0,057$ ). Silagens inoculadas com isolado 190 e estocadas por 45 dias tiveram menor valor de pH em comparação às demais (3,71;  $P < 0,001$ ). O teor de N-NH<sub>3</sub> aumentou com a estocagem (2,30 vs 5,34%;  $P < 0,001$ ) e foi menor nas silagens S-180 e S-190 (2,33%; 1,99%;  $P = 0,010$ ). A silagem S-190 promoveu silagens com menor concentração de zeína (4,02%;  $P < 0,001$ ). Menores contagens de leveduras foram obtidas na silagem S-116 (1,259 log UFC;  $P < 0,001$ ), bem como com o tempo de estocagem (2,780 vs 1,409 log UFC;  $P < 0,001$ ). O tempo de fermentação aumentou as concentrações de ácido láctico (2,08 vs 2,43%;  $P = 0,010$ ) e acético (0,26 vs 0,35%;  $P < 0,001$ ) e reduziu o teor de etanol (0,52 vs 0,42%;  $P = 0,033$ ) das silagens. Maior teor de ácido láctico e acético foram observadas nas silagens S-116 e S-190 (2,79%; 2,90%;  $P < 0,001$ ), e S-LH (0,76%;  $P < 0,001$ ), respectivamente. A silagem S-190 teve menor concentração de etanol (0,17%;  $P < 0,001$ ) em comparação as demais silagens. A interação inoculação x tempo de estocagem afetou a estabilidade aeróbia ( $P = 0,019$ ). Maior tempo de estabilidade foi observado na silagem S-LH (168 h). O tempo de estocagem aumentou ( $P < 0,001$ ) a digestibilidade *in situ* do amido das silagens. Todos isolados avaliados foram capazes de afetar características fermentativas e valor nutritivo das silagens.

**Palavras-chave:** BAL; Inoculante Bacteriano; Microrganismos Epifíticos; Reidratação

## ABSTRACT

The use of native microorganisms as bacterial inoculants is an alternative to improve the silage fermentation. Their aim was to evaluate the effect of bacterial inoculants based on LAB isolates previously selected from rehydrated corn grain silage (RCGS) for these silages on fermentative profile, nutritive value and aerobic stability. The treatments were: RCGS without inoculant (Control), RCGS inoculated with eight different bacterial isolates (S-52; S-82; S-106; S-110; S-116; S-180; S-190; S-221), and *Lactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 (CCMA 0170) (S-LH), storage for 45 and 90 days. In average,  $5.361 \pm 0.08$  kg of silage was packed, reaching a density of  $992.85 \pm 16.37$  kg m<sup>-3</sup>. After 45 and 90d, the silos were opened for chemical, microbiology, fermentative silage characteristics, aerobic stability and *in situ* starch digestibility analysis. A completely randomized design was used, with a factorial arrangement 10 x 2 (9 inoculants plus control and 2 different storage time), with three replications. Variables were analyzed using the PROC GLM procedure of the SAS (SAS Institute). The means were compared by Tukey test at 5% level and 5 to 10% tendencies. The storage time reduced ( $P < 0.001$ ) the starch concentration by 4.32% and the S-190 silage had lower starch concentration (53.86%;  $P = 0.057$ ). Inoculated silage with the 190 isolate and storage for 45 days had lower pH value in comparison to the other silages (3.71;  $P < 0.001$ ). The NH<sub>3</sub>-N concentration increased with the storage time (2.30 vs 5.34%;  $P < 0.001$ ) and was lower in S-180 and S-190 silages (2.33%; 1.99%;  $P = 0.010$ ). The S-190 silage had lower zein concentration (4.02%;  $P < 0.001$ ). The yeast count was lower for S-116 silage (1.256 log CFU;  $P < 0.001$ ), as well as the storage time (2.780 vs 1.409 log UFC;  $P < 0.001$ ). The fermentation time increased the lactic (2.08 vs 2.43%;  $P = 0.010$ ) and acetic (0.26 vs 0.35%;  $P < 0.001$ ) acid concentrations and reduced the ethanol concentration (0.52 vs 0.42%;  $P = 0.033$ ). The higher lactic and acetic acid concentrations were observed in S-116 and S-190 (2.79%; 2.90%;  $P < 0.001$ ) and S-LH silages (0.52 vs 0.42%;  $P = 0.033$ ), respectively. The S-190 silage had lower ethanol concentration (0.17%;  $P < 0.001$ ). The bacterial inoculation x storage time interaction affected the aerobic stability ( $P = 0.019$ ). The S-LH silage had the higher aerobic stability (168 h). The storage time increased ( $P < 0,001$ ) the *in situ* starch digestibility. All the isolates evaluated were able to affect the silage fermentative characteristics and the nutritive value.

**Keywords:** LAB; Bacterial Inoculant; Native Microorganisms; Rehydration



## 1 INTRODUÇÃO

A silagem de grãos de milho reidratados vem ganhando espaço nos sistemas de produção bovinos de corte e leite no Brasil e no mundo (SILVESTRE; MILLEN, 2021; BERNARDES et al., 2018; GRANT; ADESOGAN, 2018). O padrão de fermentação destas silagens é caracterizado como uma fermentação adequada, porém com queda lenta do pH, em função da baixa concentração de carboidratos solúveis (CARVALHO et al., 2017). Este fato pode afetar negativamente o perfil de fermentação dos grãos de milho ensilados (McDONALD et al., 1991). Outro fator importante das SGMR é que o processo aumenta o valor nutritivo desse alimento por aumentar a digestibilidade do amido (FERRARETTO et al., 2015). Tecnologias como o uso de inoculantes bacterianos são comumente utilizados no processo de ensilagem com objetivo de melhorar o perfil de fermentação dessas silagens no campo. Porém, cada tipo de alimento requer um inoculante com características específicas em função da sua utilização (CARVALHO et al., 2021).

Diversos são os tipos de inoculantes disponíveis no mercado com diferentes propósitos, desde potencializar a fermentação no interior do silo, inibindo a atividade de microrganismos indesejáveis durante todo o processo quanto atuar na abertura do silo, aumentando a estabilidade aeróbia (MUCK et al., 2018). Contudo, novos inoculantes a partir do desenvolvimento de novas cepas de BAL são avaliados e estudados com o intuito de se obter um microrganismo mais eficaz em melhorar o padrão de fermentação. Estudos na literatura relatam o efeito de inoculantes bacterianos em SGMR (CRUZ et al, 2021; SILVA et al., 2019), porém, em nenhum deles foram avaliados cepas epifíticas selecionadas para estas silagens.

Outros estudos na literatura avaliaram o uso de microrganismos selecionados a partir de cepas epifíticas de diferentes culturas, com efeitos positivos sobre as características fermentativas e estabilidade aeróbia das respectivas silagens (AMARAL et al., 2020; LI et al., 2015; ÁVILA et al., 2014; CARVALHO et al., 2014; SANTOS et al., 2013; SAARISALO et al., 2007). Estes estudos, além de possibilitar o desenvolvimento de novos produtos, também trazem muitas informações sobre a microbiologia e bioquímica do processo de fermentação das silagens (AMARAL et al, 2020; SAARISALO et al., 2007).

O metabolismo microbiano ao longo da estocagem é responsável pelo curso da fermentação de silagens. A estocagem da silagem tem grande impacto no que se refere

às características da SGMR, uma vez que quanto maior a estocagem, maior será a prevalência do ambiente anaeróbico no interior do silo, beneficiando o crescimento dos microrganismos responsáveis pela conservação do alimento (e.g. BAL; CARVALHO et al., 2017). O padrão de fermentação, bem como a formação de compostos orgânicos pelo metabolismo microbiano, pode ser afetado pelo tempo em que a silagem permanece estocada (FERNANDES et al., 2022). Não somente isso, mas uma melhor estabilização do alimento no pós-abertura e ganhos nutricionais também podem ser observados em SGMR estocadas por maiores tempos de estocagem; de forma contrária, menores tempos de armazenamento podem não permitir que a silagem consiga alcançar uma resposta desejável no que se refere à formação de produtos da fermentação e melhor estabilidade aeróbia (FERNANDES et al., 2022; FERNANDES et al., 2021; CARVALHO-ESTRADA et al, 2020).

Diante disso, a hipótese do presente trabalho consistiu que inoculantes bacterianos formados a partir de cepas epifíticas de SGMR associado com o tempo de fermentação podem alterar as características fermentativas dessas silagens. Com isso, objetivou-se com o presente estudo, avaliar inoculantes bacterianos compostos por isolados epifíticos de BAL previamente selecionados para estas silagens, sobre o perfil fermentativo, valor nutritivo e estabilidade aeróbia de SGMR em diferentes tempos de estocagem.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Processo de ensilagem

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Lavras, Brasil (21°13'49" S, 44°58'10" W). O grão de milho foi obtido em fábrica de ração armazenado em silo, posteriormente foi moído com peneira de crivo de 6 mm e hidratado até atingir  $34 \pm 0,3\%$  de umidade. Como silos experimentais foram utilizados baldes com tampo de capacidade de 5 litros e compactados  $5,096 \pm 0,04$  kg de milho reidratado a uma densidade de  $992,85 \pm 16,37$  kg de massa fresca  $m^{-3}$ . Os silos foram fechados, pesados e mantidos em sala fechada, longe de qualquer possível fonte de contaminação.

Os tratamentos consistiram em: SGMR sem inoculante (Controle), SGMR inoculadas com 8 diferentes cepas de BAL isolados de SGMR (S-52; S-86; S-106; S-110; S-116; S-180; S-190; S-221) e SGMR inoculado com *Lactobacillus hilgardii*

CNCM I-4785 (CCMA 0170) (S-LH). A dosagem foi de  $1 \times 10^{-6}$  para os isolados 52, 82, 106, 110, 116, 180 e de  $1 \times 10^{-5}$  para os isolados 190, 221 e a cepa *L. hilgardii*. Os isolados de SGMR foram selecionados especificamente para estas silagens a partir da realização de testes laboratoriais conforme descrito no Capítulo 2 desta tese e posterior avaliação em silos experimentais (SILVA, 2021). As 8 cepas que mostraram as melhores características com relação à capacidade de melhorar o padrão fermentativo, redução de perdas de MS e amido e aumentar a estabilidade aeróbia de SGMR foram selecionadas, conforme avaliadas no trabalho de Silva (2021).

Após 45 e 90 dias de estocagem, os silos foram novamente pesados e abertos. As perdas de matéria seca e amido foram calculadas por diferença entre o peso seco do material antes da ensilagem e o peso seco final no momento da abertura dos silos. A camada superficial com sinais de deterioração de cada unidade experimental foi completamente removida e descartada e a silagem remanescente foi retirada e homogeneizada para posterior coleta de amostras.

## 2.2 Análises químicas e fermentativas

O material pré-ensilado e as silagens foram divididas em duas subamostras. Uma subamostra foi pré-seca em estufa com circulação forçada de ar a  $55 - 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 72 horas e moída em moinho de facas tipo Willey, com peneira de 1mm. As amostras moídas foram analisadas para MS total a  $105^{\circ}\text{C}$ ; nitrogênio total pelo método de Kjeldhal, de acordo com a AOAC (1990), e a concentração de proteína bruta foi calculada através da multiplicação do nitrogênio total por 6,25. O teor de amido pelo método de Hall e Mertens (2008). A concentração de prolamina das silagens foi quantificada pelo método de Nellis et al. (2013), utilizando zeína como padrão.

A segunda subamostra foi armazenada em freezer a  $-30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os valores de pH e concentração de nitrogênio amoniacal, foram determinados em extrato aquoso, contendo 30 g de amostra fresca e 270 mL de água destilada, homogeneizados durante 4 minutos, a 200 rpm, em um aparelho homogeneizador (Stomacher 400, Seward, London, UK). Para os valores de pH, 50 mL do extrato foi filtrado com gases e feita a leitura em um potenciômetro (HI 2221, Hanna Instruments), utilizando um aparelho multiparâmetro (A214 pH / ISE Thermo Scientific Orion Star). O nitrogênio amoniacal foi determinado por calorimetria de acordo com o método INCT-CA N-006/1 (2012).

As concentrações dos ácidos lático, acético, propiônico e butírico e dos álcoois 1,2-propanodiol e etanol foram avaliadas por meio de cromatografia líquida de alta

eficiência (HPLC), seguindo metodologia descrita por Santos et al. (2014). O extrato aquoso foi acidificado com ácido sulfúrico 50% (v/v), filtrado e analisado em cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corporation -Tokio, Japão) equipado com um sistema de detecção duplo, composto por um detector de radiação ultravioleta (UV) (UV - Vis/SPD - 10Ai) e um detector de índice de refração (RID 10A). Na separação cromatográfica dos ácidos, foi utilizada uma coluna de exclusão de íons (Shim-pack SCR-101H, 7.9 mm×30 cm) operada a 50 °C. A fase móvel foi constituída de uma solução de ácido perclórico com pH 2,1 e uma vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>. A detecção dos álcoois foi feita por índice de refração e a detecção dos ácidos orgânicos por radiação UV com comprimento de onda de 210 nm.

### **2.3 Análises microbiológicas**

Um extrato foi preparado misturando 25g das amostras do milho moído com 225 mL de água peptonada estéril a 0,1% e homogeneizada em shaker orbital por 20 min para contagem de BAL, leveduras, fungos filamentosos, enterobactérias e bactérias aeróbias esporulantes. Diluições decimais foram preparadas para quantificar os grupos microbianos usando a técnica de plaqueamento em superfície. Leveduras e fungos filamentosos foram enumerados em meio DRBC Agar (Difco; Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA). As placas foram incubadas a 28°C por 3 dias para leveduras e 5 dias para fungo filamentoso. As leveduras foram diferenciadas dos fungos filamentosos pela aparência das colônias e pela morfologia celular. Para contagem de BAL foi utilizado meio MRS Agar (M64II, Himedia) mais nistatina (4 mL.L<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas a 36°C por 72 horas. Foi utilizado o meio Ágar EMB para contagem de enterobactérias e as placas foram incubadas a 36°C por 24 horas. Para as bactérias aeróbias formadoras de esporos, o extrato foi aquecido em banho maria a 80 °C por 10 minutos e utilizado o meio Agar Nutriente, onde as placas foram incubadas a 30 °C durante três dias.

### **2.4 Atividade específica da protease**

Amostras da silagem armazenada por 45 dias foram utilizadas para um extrato aquoso contendo 50 g de silagem e 100 mL de água destilada foi agitado em shaker a 120 rpm por 2h. O extrato foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado. A atividade proteolítica foi medida de acordo com a metodologia modificada proposta por Braga et al. (2011). Dessa forma, 100 µL de extrato foram

incubados a 50°C na presença de 500 µL de caseína a 1% (p/v) e 400 µL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 5,71) por 60 minutos. A reação foi interrompida com adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v). A reação zero foi preparada nas mesmas condições do ensaio enzimático, porém a reação foi interrompida por TCA antes da adição do extrato contendo enzimas. Após o período de incubação, as suspensões foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para leitura de absorbância a 280 nm. Uma unidade de atividade enzimática de protease foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µg de tirosina por minuto nas condições experimentais descritas acima.

A quantificação da proteína solúvel total foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), onde 500 µL de extrato foram adicionados a 500 µL de reagente de Bradford e 2 mL de água destilada. As amostras foram armazenadas no escuro por 10 minutos. Em seguida, a absorbância foi lida a 595 nm. Soluções de albumina sérica bovina (BSA) foram utilizadas para a confecção de uma curva padrão. A atividade específica da protease (U/mg) foi determinada pela razão entre a atividade proteolítica e a proteína solúvel total.

## **2.5 Estabilidade aeróbia**

As silagens foram submetidas a um teste de estabilidade aeróbia. Foram utilizados 3 kg de cada silagem, permanecendo expostas ao ar durante 7 dias, em temperatura ambiente, utilizando caixas de isopor, com dimensões de 25,5 cm x 17,5 cm. Uma folha de gaze foi colocada em cada caixa de isopor para permitir a troca gasosa e evitar possíveis contaminações por elementos externos. A temperatura, tanto da sala quanto das silagens, foi registrada a cada 60 minutos por meio de dataloggers (Escort iMini), sendo 1 para cada amostra e 3 para o ambiente. A estabilidade aeróbia foi definida como o tempo total, em horas, em que a silagem permaneceu estável antes de atingir uma temperatura de 2 °C acima da temperatura ambiente (MORAN et al., 1996).

## **2.6 Digestibilidade in situ**

O ensaio de digestibilidade foi realizado em duas vacas Nelore (450 ± 29 kg) canuladas, não-lactantes, alimentadas com silagem de planta inteira de milho, grão seco de milho moído, DDG, ureia e mistura mineral, duas vezes por dia, durante 10 dias anterior à incubação. A silagem fresca foi seca a 55° por 72 horas, moída (2 mm),

pesada (5,000 g) e transferida para sacos de tecido Failete (porosidade 50  $\mu\text{m}$ ) de dimensões 10 x 20 cm para posterior incubação. Um saco sem amostra (branco) foi adicionado na incubação. A incubação foi realizada 2 horas após o fornecimento do primeiro trato dos animais e incubados por 7 horas (ROSEIRA et al., 2023). Os sacos foram imersos em água morna (35 °C) por 30 segundos antes de serem incubados. Decorrido o tempo de incubação, os sacos foram retirados e colocados em caixa térmica contendo água fria e gelo por 15 minutos para finalizar a fermentação. Os sacos incubados foram lavados em máquina de lavar (3 ciclos), secos em estufa a 55 °C por 48 horas e pesados. A amostra remanescente foi moída a 1 mm para posterior análise do teor de amido pelo método de Hall e Mertens (2009).

## 2.7 Análise Estatística

Os dados de contagem de microrganismos foram transformados em  $\log_{10}$ . Os resultados de a proteína solúvel e a atividade específica da protease foram avaliados a partir de análise descritiva. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em fatorial 10 x 2 (9 inoculantes mais um controle x dois tempos de estocagem), com vinte tratamentos e três repetições, totalizando 60 unidades experimentais. Os dados foram analisados utilizando o PROC GLM do programa estatístico SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute, 2001). As médias dos tratamentos foram estimadas pelo “LSMEANS” e a comparação foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e tendência de 5 a 10%, utilizando o modelo estatístico  $Y_{ijk} = \mu + I_i + T_j + (I \times T)_{ij} + e_{ijk}$ , sendo  $Y_{ijk}$  = valor da variável referente à repetição que recebeu o inoculante  $i$  no tempo de estocagem  $j$ ;  $\mu$  = média geral;  $I_i$  = efeito fixo do inoculante  $i$ , para  $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ ;  $T_j$  = efeito fixo do tempo de estocagem  $j$ , para  $j = 1, 2$ ;  $T$  tempo;  $(I \times T)_{ij}$  = efeito da interação entre o inoculante  $i$  no tempo de estocagem  $j$ ;  $e_{ijk}$  = erro aleatório associado a cada observação  $Y_{ijk}$ .

## 3 RESULTADOS

As características do grão de milho antes da ensilagem estão apresentadas na Tabela 1. Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da inoculação e do tempo de estocagem, sobre os teores de MS (Tabela 2). Houve efeito da inoculação sobre perdas de MS, maior na silagem S-LH em relação às silagens controle, S-106, S-110, S-180 e S-190. As silagens inoculadas com as outras cepas foram semelhantes entre si e ao controle (Tabela 2). O

tempo de estocagem ( $P < 0,001$ ) e a inoculação ( $P = 0,057$ ) alteraram a concentração de amido das silagens. O avanço da fermentação reduziu a concentração de amido de 59,50 para 55,18% (Tabela 2). A silagem S-106 apresentou maior teor de amido do que a silagem S-190, mas não diferiram das demais silagens e do controle (Tabela 2). O aumento do tempo de estocagem resultou em aumento das perdas de amido em 5,54% de 45 para 90 dias (Tabela 2).

**Tabela 1** – Características do grão de milho antes da ensilagem.

<b>Variáveis</b>	
Matéria seca (%)	92
Matéria seca pós-reidratação (%)	66
Proteína (%MS)	9,02
Amido (%MS)	71,4
Prolamina (zeína) (%MS)	5,12
Contagem de microrganismo (log UFC.g <sup>-1</sup> )	
Leveduras	3,89
Fungo filamentosos	3,01
Bactérias do ácido lático	4,11
Bactérias aeróbia esporulantes	<2,00

A interação tempo de estocagem x inoculação ( $P = 0,036$ ) alterou a concentração de proteína das silagens (Tabela 3). O teor de proteína reduziu de 45 para 90 dias em todas as silagens, exceto nas silagens S-82, S-221 e S-LH (Tabela 3). As silagens estocadas por 45 dias não tiveram diferença na concentração de proteína, porém foi maior na silagem S-82 do que nas silagens S-106, S-110, S-116 e S-180 armazenadas por 90 dias, e não diferiram das demais (Tabela 3). Nenhuma silagem apresentou teor de proteína diferente do controle. Houve efeito da inoculação ( $P = 0,010$ ;  $P < 0,001$ ) e tempo de estocagem ( $P < 0,00$ ;  $P = 0,030$ ) para as variáveis N-NH<sub>3</sub> e zeína, respectivamente, sem interação entre os fatores (Tabela 3). O maior tempo de estocagem (90 d) resultou em silagens com maior concentração de N-NH<sub>3</sub> e menor concentração de zeína (Tabela 3). A silagem S-110 teve maior teor de N-NH<sub>3</sub> em comparação às silagens S-190 e S-221, mas não diferiu das demais (Tabela 3). A concentração de zeína na silagem S-190 foi menor que nas silagens controle, S-52, S-82 e S-106, mas não diferiu das demais (Tabela 3).

**Tabela 2** – Concentração de MS, perdas de MS, amido e perdas de amido durante a estocagem de silagens de grãos de milho reidratado inoculadas e estocadas em diferentes tempos de ensilagem

Tratamento <sup>1</sup>	Variável <sup>2</sup>											
	MS (%)		Média	PMS (%MS)		Média	Amido (% MS)		Média	PAM (% amido)		Média
	45	90		45	90		45	90		45	90	
<b>Controle</b>	61,02	60,14	60,58	4,28	4,71	4,49 b	60,90	57,39	59,14 ab	17,78	22,75	20,27
<b>S-52</b>	60,00	60,07	60,04	5,90	5,37	5,64 ab	61,02	56,21	58,62 ab	18,62	24,62	21,62
<b>S-82</b>	60,77	60,31	60,54	5,75	5,10	5,43 ab	57,29	56,99	57,14 ab	17,74	20,20	18,97
<b>S-106</b>	60,01	60,13	60,07	4,07	4,86	4,47 b	60,87	59,83	60,35 a	23,53	23,55	23,54
<b>S-110</b>	60,98	60,70	60,84	4,71	4,19	4,45 b	56,90	54,17	55,54 ab	23,63	26,39	25,01
<b>S-116</b>	60,03	59,92	59,97	5,69	5,50	5,59 ab	59,60	55,40	57,50 ab	20,72	26,00	23,36
<b>S-180</b>	60,91	60,99	60,95	4,11	3,41	3,76 b	60,50	50,78	55,64 ab	18,35	30,78	24,56
<b>S-190</b>	61,04	60,43	60,73	4,30	3,96	4,13 b	57,82	49,91	53,86 b	22,14	32,33	27,24
<b>S-221</b>	60,34	60,30	60,32	5,17	4,39	4,78 ab	58,16	56,35	57,25 ab	22,32	23,93	23,13
<b>S-LH</b>	60,25	59,36	59,80	6,44	6,99	6,71 a	61,99	54,81	58,40 ab	18,01	27,64	22,82
<b>Média</b>	60,53	60,95		5,04	4,85		59,50 A	55,18 B		20,28 B	25,82 A	
<b>P-valor<sup>3</sup></b>												
<b>I</b>		0,159			0,001			0,057			0,109	
<b>T</b>		0,147			0,500			<0,001			<0,001	
<b>I*T</b>		0,945			0,924			0,924			0,269	

<sup>1</sup>Controle = SGMR sem inoculação; S-52, S-82, S-106, S-110, S-116, S-180, S-190, S-221 = SGMR inoculadas com seus respectivos isolados; S-LH = SGMR inoculada com *Lactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 (CCMA 0170). <sup>2</sup>MS = matéria seca; PMS = perdas de matéria seca. <sup>3</sup>I = inoculante; T = tempo de estocagem; I\*T = interação inoculante x tempo de estocagem.

Letras minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Pediococcus pentosaceus* (52, 110, 190, 221); *Pediococcus acidilactici* (82, 180) *Limosilactobacillus fermentum* (106, 116); LH (*Lentilactobacillus hilgardii*)



**Tabela 3** – Concentração de proteína bruta (PB), N-NH<sub>3</sub> e zeína (prolamina) de silagens de grãos de milho reidratado inoculadas e estocadas em diferentes tempos de ensilagem

Tratamento <sup>1</sup>	Variável <sup>2</sup>								
	PB (%MS)			N-NH <sub>3</sub> (% N-Total)			Zeína (%MS)		
	45	90	Média	45	90	Média	45	90	Média
<b>Controle</b>	7,60 aA	6,46 abB	7,03	2,04	4,05	3,05 ab	4,31	4,42	4,37 bcd
<b>S-52</b>	7,60 aA	5,42 abB	6,51	2,38	6,05	4,22 ab	4,49	4,51	4,50 ab
<b>S-82</b>	7,05 aA	7,76 aA	7,40	2,75	3,92	3,34 ab	4,69	4,18	4,43 abc
<b>S-106</b>	6,72 aA	4,12 bB	5,42	2,92	5,57	4,24 ab	4,81	4,65	4,73 a
<b>S-110</b>	6,91 aA	4,21 bB	5,56	2,76	8,43	5,60 a	4,20	4,08	4,14 cde
<b>S-116</b>	7,22 aA	4,60 bB	5,91	2,30	5,87	4,09 ab	4,10	4,06	4,08 de
<b>S-180</b>	6,36 aA	4,60 bB	5,48	2,08	6,93	4,50 ab	4,20	4,11	4,15 cde
<b>S-190</b>	6,79 aA	5,19 abB	5,99	0,81	3,85	2,33 b	4,04	4,00	4,02 e
<b>S-221</b>	5,60 aA	5,23 abA	5,41	0,77	3,22	1,99 b	4,15	4,10	4,13 cde
<b>S-LH</b>	6,28 aA	6,21 abA	6,25	4,25	5,52	4,88 ab	4,11	4,04	4,08 de
<b>Média</b>	6,81	5,38		2,30 B	5,34 A		4,31 A	4,21 B	
<b>P-valor<sup>3</sup></b>									
<b>I</b>		0,005			0,010			<0,001	
<b>T</b>		<0,001			<0,001			0,030	
<b>I*T</b>		0,036			0,337			0,167	

<sup>1</sup>Controle = SGMR sem inoculação; S-52, S-82, S-106, S-110, S-116, S-180, S-190, S-221 = SGMR inoculadas com seus respectivos isolados; S-LH = SGMR inoculada com *Lactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 (CCMA 0170). <sup>2</sup>PB = proteína bruta; N-NH<sub>3</sub> = nitrogênio amoniacal. <sup>3</sup>I = inoculante; T = tempo de estocagem; I\*T = interação inoculante x tempo de estocagem.

Letras minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Pediococcus pentosaceus* (52, 110, 190, 221); *Pediococcus acidilactici* (82, 180) *Limosilactobacillus fermentum* (106, 116); LH (*Lentilactobacillus hilgardii*)

Houve interação dos fatores inoculação x tempo de estocagem ( $P < 0,001$ ) para os valores de pH das silagens (Tabela 4). Aos 45 dias de estocagem as silagens S-52, S-106 e S-LH tiveram maior pH em relação à silagem controle, sendo que a silagem S-LH foi a que apresentou o maior resultado de pH em relação às demais silagens. A silagem S-190 foi a que teve menor valor de pH dentre as silagens avaliadas e em relação ao controle, mas não diferiu da silagem S-180 (Tabela 4). As silagens S-106 e S-180 foram as únicas que não tiveram alteração no pH ao longo da estocagem, ao passo que as demais apresentaram maior pH aos 90 dias (Tabela 4). Aos 90 dias de estocagem, a silagem S-52 teve maior pH em comparação aos demais tratamentos e, juntamente com as silagens S-82 e S-LH, aumentaram o pH em relação à silagem controle. A silagem S-190 foi a que teve menor pH dentre as silagens avaliadas, mas não diferiu da silagem S-180 (Tabela 4).

Não foi observado crescimento de enterobactérias e bactérias aeróbias formadoras de esporos nas silagens avaliadas. Houve interação dos fatores ( $P = 0,019$ ) sobre a contagem de BAL (Tabela 4). Aos 45 dias, silagem S-190 foi a única que teve maior contagem de BAL em comparação ao controle, mas não diferiu das silagens S-52, S-106, S-110 e S-180. Nenhuma silagem teve contagem de BAL menor que a silagem controle (Tabela 4). As silagens S-106 e S-190 tiveram redução da contagem de BAL com o avanço da estocagem de 45 para 90 dias (Tabela 4). A contagem de BAL foi igual para todas as silagens com 90 dias de fermentação. O tempo de estocagem alterou os resultados da contagem de levedura ( $P < 0,001$ ) e fungo filamentosos ( $P < 0,001$ ), com redução na contagem desses microrganismos (Tabela 4). A inoculação afetou ( $P < 0,001$ ) apenas a contagem de levedura das silagens (Tabela 4). A contagem de leveduras não diferiu entre as silagens controle, S-52, S-82, S-106, S-110, S-180, S-190, S-221 e S-LH (Tabela 4). Somente a silagem S-116 foi capaz de reduzir a contagem de leveduras para valores menores que a da silagem controle, mas não diferiu das silagens S-52, S-106, S-110, S-180, S-190 e S-LH (Tabela 4).

**Tabela 4** – Valores de pH e contagem de leveduras, fungo filamentososo e BAL em silagens de grãos de milho reidratado inoculadas e estocadas em diferentes tempos de ensilagem

Tratamento	Variável (log UFC)											
	pH		Média	Levedura		Média	Fungo filamentososo		Média	BAL		Média
	45	90		45	90		45	90		45	90	
<b>Controle</b>	3,85cdB	3,97 deA	3,91	3,21	1,97	2,59 abc	2,30	0,89	1,60	5,90 bcA	5,88 aA	5,89
<b>S-52</b>	4,06 bB	4,57 aA	4,31	3,26	1,00	2,13 abcd	1,93	1,45	1,69	7,10 abA	6,69 aA	6,90
<b>S-82</b>	3,95bcB	4,09 cA	4,02	3,96	2,06	3,01 ab	1,66	1,24	1,45	6,28 bcA	6,50 aA	6,39
<b>S-106</b>	4,02 bA	4,07 cdA	4,04	2,57	1,00	1,78 bcd	1,30	1,38	1,34	6,78 abA	5,66 aB	6,22
<b>S-110</b>	3,96bcB	4,05 cdA	4,00	2,75	1,00	1,87 bcd	2,05	1,15	1,60	6,81 abA	6,56 aA	6,68
<b>S-116</b>	3,89cdB	4,01cdeA	3,95	1,41	1,10	1,25 d	2,16	1,43	1,79	6,13 bcA	6,09 aA	6,11
<b>S-180</b>	3,81deA	3,85 fgA	3,83	2,41	1,00	1,70 cd	1,85	1,00	1,42	6,83 abA	6,26 aA	6,54
<b>S-190</b>	3,71 eB	3,80 gA	3,76	1,90	1,10	1,50 cd	1,20	1,05	1,12	7,65 aA	6,12 aB	6,88
<b>S-221</b>	3,83 dB	3,93 efA	3,88	3,67	2,84	3,26 a	2,49	1,34	1,19	5,17 cA	5,58 aA	5,37
<b>S-LH</b>	4,29 aB	4,37 bA	4,33	2,61	1,00	1,80 bcd	1,00	1,38	1,19	6,38 bcA	6,25 aA	6,31
<b>Média</b>	3,94	4,07		2,78 A	1,40 B		1,79 A	1,23 B		6,50	6,16	
<b>P-valor</b>												
<b>I</b>		<0,001			<0,001			0,200			<0,001	
<b>T</b>		<0,001			<0,001			<0,001			0,005	
<b>I*T</b>		<0,001			0,302			0,112			0,019	

<sup>1</sup>Controle = SGMR sem inoculação; S-52, S-82, S-106, S-110, S-116, S-180, S-190, S-221 = SGMR inoculadas com seus respectivos isolados; S-LH = SGMR inoculada com *Lactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 (CCMA 0170). <sup>2</sup>BAL = bactérias do ácido lático. <sup>3</sup>I = inoculante; T = tempo de estocagem; I\*T = interação inoculante x tempo de estocagem.

Letras minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Pediococcus pentosaceus* (52, 110, 190, 221); *Pediococcus acidilactici* (82, 180) *Limosilactobacillus fermentum* (106, 116); LH (*Lentilactobacillus hilgardii*)

Os resultados de proteína solúvel estão apresentados na Tabela 5. Uma variação de 0,065 a 0,036 mg.mL<sup>-1</sup> foi observada. As silagens S-106, S-110, S-116, S-180, S-190 e S-LH tiveram resultados de proteína solúvel numericamente maior que as da silagem controle.

**Tabela 5** – Proteína solúvel de SGMR em diferentes tempos de estocagem.

<b>Tratamento</b>	<b>Proteína solúvel (mg.mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>Controle</b>	0,166
<b>S-52</b>	0,065
<b>S-82</b>	0,116
<b>S-106</b>	0,209
<b>S-110</b>	0,190
<b>S-116</b>	0,215
<b>S-180</b>	0,165
<b>S-190</b>	0,366
<b>S-221</b>	0,099
<b>S-LH</b>	0,160

*Pediococcus pentosaceus* (52, 110, 190, 221); *Pediococcus acidilactici* (82, 180) *Limosilactobacillus fermentum* (106, 116); LH (*Lentilactobacillus hilgardii*)

Foram observadas atividade específica da protease somente nas silagens controle (17,1 U.mg<sup>-1</sup>); S-106 (10,1 U.mg<sup>-1</sup>); S-110 (10,8 U.mg<sup>-1</sup>); S-180 (16,1 U.mg<sup>-1</sup>); S-190 (3,9 U.mg<sup>-1</sup>) e S-LH (15,5 U.mg<sup>-1</sup>) e nulos para as outras silagens. Nenhuma silagem teve resultado de atividade enzimática numericamente superior ao da silagem controle.

Houve efeito de inoculação ( $P < 0,05$ ) e do tempo de estocagem ( $P < 0,05$ ) nas concentrações de ácido láctico, ácido acético e etanol das silagens (Tabela 6). Os ácidos propiônico e butírico não foram observados nas silagens e as concentrações de 1,2-propanodiol ficaram abaixo do limite de detecção (Tabela 6). Nenhuma das silagens inoculadas teve diferença na concentração de ácido láctico em relação à silagem controle (Tabela 6). Contudo, as silagens S-116 e S-190 tiveram as maiores concentrações do ácido láctico em comparação às silagens S-52 e S-LH, mas não diferiram das demais (Tabela 6). O avanço do tempo de estocagem de 45 para 90 dias aumentou a concentração de ácido láctico das silagens (Tabela 6).

**Tabela 6** – Concentrações de ácido láctico, ácido acético e etanol (%MS) de silagens de grãos de milho reidratado inoculadas e estocadas em diferentes tempos de ensilagem

Tratamento <sup>1</sup>	Variáveis (%MS)								
	Ácido Láctico			Ácido acético			Etanol		
	45	90	Média	45	90	Média	45	90	Média
<b>Controle</b>	1,72	2,73	2,22 abc	0,17	0,23	0,20 cd	0,58	0,51	0,55 ab
<b>S-52</b>	1,32	1,97	1,64 bc	0,21	0,45	0,33 bc	0,71	0,69	0,70 a
<b>S-82</b>	1,95	2,04	1,99 abc	0,19	0,20	0,19 cd	0,56	0,54	0,55 ab
<b>S-106</b>	2,06	2,69	2,37 abc	0,31	0,44	0,37 b	0,45	0,60	0,52 abc
<b>S-110</b>	2,20	2,16	2,18 abc	0,27	0,36	0,31 bc	0,47	0,43	0,45 abc
<b>S-116</b>	2,67	2,90	2,79 a	0,26	0,35	0,31 bc	0,69	0,49	0,57 ab
<b>S-180</b>	2,65	2,49	2,57 ab	0,20	0,42	0,31 bc	0,57	0,34	0,46 abc
<b>S-190</b>	2,50	3,31	2,90 a	0,20	0,24	0,22 bcd	0,32	0,03	0,17 c
<b>S-221</b>	2,30	2,35	2,32 abc	0,12	0,14	0,13 d	0,45	0,15	0,30 bc
<b>S-LH</b>	1,43	1,65	1,54 c	0,65	0,87	0,76 a	0,46	0,46	0,46 abc
<b>Média</b>	2,08 B	2,43 A		0,26 B	0,35 A		0,52 A	0,42 B	
<b>P-valor</b>									
<b>I</b>		<0,001			<0,001			<0,001	
<b>T</b>		0,010			<0,001			0,033	
<b>I*T</b>		0,507			0,221			0,505	

<sup>1</sup>Controle = SGMR sem inoculação; S-52, S-82, S-106, S-110, S-116, S-180, S-190, S-221 = SGMR inoculadas com seus respectivos isolados; S-LH = SGMR inoculada com *Lactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 (CCMA 0170).

Letras minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Pediococcus pentosaceus* (52, 110, 190, 221); *Pediococcus acidilactici* (82, 180) *Limosilactobacillus fermentum* (106, 116); LH (*Lentilactobacillus hilgardii*)

As silagens S-106 e S-LH aumentaram a concentração de ácido acético em relação à silagem controle (Tabela 6). Dentre os tratamentos, a silagem S-LH foi a que apresentou maior concentração de ácido acético (Tabela 6). As demais silagens inoculadas não tiveram diferença na concentração de ácido lático em relação à silagem controle. O maior tempo de estocagem promoveu silagens com maior concentração de ácido acético (Tabela 6). A silagem S-190 foi a única que apresentou redução da concentração de etanol em comparação à silagem controle, mas não diferiu das silagens S-106, S-110, S-180, S-221 e S-LH (Tabela 6). O aumento de 45 para 90 dias de estocagem reduziu a concentração de etanol das silagens (Tabela 6).

Houve interação inoculação x tempo de estocagem ( $P = 0,019$ ) para a estabilidade das silagens (Tabela 7). Não foi observado diferença na estabilidade aeróbia das silagens estocadas por 45 dias (Tabela 7). Todas as silagens aumentaram a sua estabilidade de 45 para 90 dias de fermentação (Tabela 7).

**Tabela 7** – Estabilidade aeróbia de SGMR inoculadas e estocadas em diferentes tempos de ensilagem.

Tratamento <sup>1</sup>	Variável		Média
	Estabilidade (h)		
	45	90	
<b>Controle</b>	43 bcB	64 dA	53
<b>S-52</b>	39 bcB	89 bcA	64
<b>S-82</b>	53 bB	88 cA	70
<b>S-106</b>	47 bcB	97 bcA	73
<b>S-110</b>	49 bcB	156 aA	102
<b>S-116</b>	59 bB	96 bcA	77
<b>S-180</b>	55 bB	110 bA	81
<b>S-190</b>	45 bcB	105 bcA	75
<b>S-221</b>	29 cB	43 dA	36
<b>S-LH</b>	83 aB	168 aA	125
<b>Média</b>	50	102	
<b>P-valor<sup>2</sup></b>			
<b>I</b>		<0,001	
<b>T</b>		<0,001	
<b>I*T</b>		<0,001	

<sup>1</sup>Controle = SGMR sem inoculação; S-52, S-82, S-106, S-110, S-116, S-180, S-190, S-221 = SGMR inoculadas com seus respectivos isolados; S-LH = SGMR inoculada com *Lactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 (CCMA 0170). <sup>2</sup>I = inoculante; T = tempo de estocagem; I\*T = interação inoculante x tempo de estocagem.

Letras minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Pediococcus pentosaceus* (52, 110, 190, 221); *Pediococcus acidilactici* (82, 180) *Limosilactobacillus fermentum* (106, 116); LH (*Lentilactobacillus hilgardii*)

A inoculação com *L. hilgardii* promoveu silagens com maior estabilidade, estocadas tanto com 45 como para 90 dias de estocagem em comparação às demais silagens (Tabela 7). Aos 90 dias de estocagem, somente a silagem S-221 não apresentou estabilidade maior que a silagem controle (Tabela 7).

Uma tendência para a interação inoculação x tempo de estocagem ( $P = 0,068$ ) foi observada. Nenhuma das silagens inoculadas avaliadas teve digestibilidade diferente da silagem controle aos 45 dias de estocagem, mas foi maior para a silagem S-116 em comparação às silagens S-180 e S-190 (Tabela 8). Aos 90 dias de estocagem, não houve diferença da digestibilidade do amido entre as silagens (Tabela 8). As silagens S-180, S-190 e S-LH foram as únicas que aumentaram a digestibilidade do amido quando aumentou o tempo de estocagem de 45 para 90 dias (Tabela 8).

**Tabela 8** – Digestibilidade *in situ* do amido (7h) de SGMR inoculadas e estocadas em diferentes tempos de ensilagem.

Tratamento <sup>1</sup>	Digestibilidade <i>in situ</i> do amido (7h)		Média
	45	90	
Controle	83,4 abcA	85,5 aA	84,5 ab
S-52	83,5 abcA	87,7 aA	85,6 a
S-82	88,5 abA	94,7 aA	91,6 a
S-106	83,3 abcA	87,6 aA	85,5 a
S-110	84,6 abA	86,1 aA	85,4 a
S-116	91,5 aA	90,8 aA	91,1 a
S-180	75,6 bcB	91,7 aA	83,6 ab
S-190	70,2 cB	81,5 aA	75,8 b
S-221	84,6 abA	82,1 aA	83,3 ab
S-LH	85,9 abB	94,5 aA	90,2 a
Média	83,1 B	88,2 A	
<b>P-valor<sup>2</sup></b>			
I		<0,001	
T		<0,001	
I*T		0,068	

<sup>1</sup>Controle = SGMR sem inoculação; S-52, S-82, S-106, S-110, S-116, S-180, S-190, S-221 = SGMR inoculadas com seus respectivos isolados; S-LH = SGMR inoculada com *Lactobacillus hilgardii* CNCM I-4785 (CCMA 0170). <sup>2</sup>I = inoculante; T = tempo de estocagem; I\*T = interação inoculante x tempo de estocagem.

Letras minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Pediococcus pentosaceus* (52, 110, 190, 221); *Pediococcus acidilactici* (82, 180) *Limosilactobacillus fermentum* (106, 116); LH (*Lentilactobacillus hilgardii*)

## 4 DISCUSSÃO

O processo de fermentação consiste em eventuais PMS ao longo da estocagem e tais perdas estão atreladas ao metabolismo dos microrganismos ali presentes (BORREANI et al., 2018). A silagem S-LH foi a única que aumentou as perdas em relação à silagem controle, apresentando PMS durante o processo de 6,71%, o que pode estar atrelado ao seu metabolismo heterolático. Ainda que diferenças nas perdas durante a estocagem tenham sido observadas, no presente trabalho a concentração de MS das silagens com ou sem inoculante não diferiram entre os tratamentos em diferentes tempos de estocagem.

As perdas de MS se estabilizaram aos 45 dias, mas as de amido continuaram aumentando, sugerindo que esse amido pode ter sido degradado mais intensamente no final da fermentação por outros microrganismos. O avanço do tempo de estocagem de 45 para 90 dias reduziu em 4,32% a concentração de amido e apresentou perdas de amido de 5,54%. Estudos realizados com SGMR também observaram redução na concentração de amido em maiores tempos de estocagem. Arcari et al. (2016) avaliando SGMR observaram redução nas concentrações amido em 2,4% com 330 dias de fermentação, inferior ao observado em nosso estudo. Fernandes et al. (2022), por outro lado, relataram uma redução de 7,8% no teor de amido de SGMR de 30 para 180 dias de fermentação, superior ao encontrado nas silagens avaliadas. No presente trabalho, os isolados foram previamente selecionados e, como demonstrado em estudo prévio, demonstraram atividade negativa para o teste de degradação de amido (Capítulo 2). A redução do teor de amido e do conseqüente aumento das perdas de amido com a inoculação pode estar atrelada à um efeito indireto da inoculação com a atividade de outros microrganismos capazes de degradar o amido da silagem.

A atividade proteolítica durante o processo de ensilagem torna o amido do grão disponível para fermentação, mesmo no interior do silo. Logo, é possível pressupor que a redução do amido nas silagens avaliadas tenha sido ocasionada principalmente por outros microrganismos e não pelos isolados testados, devido ao melhor acesso ao amido em virtude da atividade proteolítica. De acordo com Van Soest (1994), as concentrações de amido, pectina e celulose não são degradados por microrganismos produtores de lactato durante o processo de ensilagem, podendo ser degradados por outras bactérias (e.g. Clostrídeos) ou até mesmo leveduras capazes de degradar amido (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*; COUTINHO et al. 2013).

Uma resposta relacionada à SGMR consiste na atividade proteolítica durante o processo de fermentação (JUNGES et al., 2017). A quebra da proteína durante a estocagem de



SGMR é de grande importância na nutrição animal devido a maior disponibilidade do amido e maior desempenho dos animais quando a silagem é introduzida na dieta (FERRARETTO et al., 2015). No presente estudo, uma redução de 1,5 e aumento de 2,04 unidades percentuais de PB e N-NH<sub>3</sub> foram observadas, respectivamente, nas silagens avaliadas quando aumentou o tempo de estocagem de 45 para 90 dias. Isso nos leva a concluir que menores tempos de estocagem (45 d) são insuficientes para observar diferenças significativas na redução da PB e que, possivelmente, alterações mais significativas da concentração de PB podem ter ocorrido no intervalo entre 45 e 90 dias de estocagem. Estas alterações foram diferentes entre as silagens apenas aos 90 dias, revelando uma possível diferença na capacidade individual de cada isolado em reduzir a concentração de PB nas silagens. Dentre os isolados avaliados como inoculantes, somente as silagens S-82, S-221 e S-LH não reduziram a PB com o avanço da estocagem, pressupondo que maior atividade proteolítica pode ter ocorrido nessas silagens em um tempo de estocagem menor do que aquele avaliado no presente trabalho (45d).

A atividade proteolítica por bactérias em silagens resulta na formação de diferentes compostos, entre eles o N-NH<sub>3</sub> e redução na concentração de determinados componentes, como a zeína. Inferências do estudo realizado por Hoffman et al. (2011) sugerem que as proteínas zeína hidrofóbicas são mais provavelmente degradadas por meio da atividade proteolítica. A redução nas proteínas zeína pela proteólise pode ser associada com a concentração de N-NH<sub>3</sub>, que pode aumentar gradativamente com o tempo de ensilagem. No presente estudo a concentração de N-NH<sub>3</sub> nas silagens aumentou 3,04 pontos percentuais de 45 para 90 dias de estocagem. Em silagens, o N-NH<sub>3</sub> é mais frequentemente definido como um produto da desaminação bacteriana de aminoácidos, em vez de um produto da hidrólise ácida por ácidos da silagem (OHSHIMA; McDONALD, 1978). A partir dos resultados obtidos, nenhum dos isolados estudados revelou uma diferença na concentração de N-NH<sub>3</sub> em comparação à silagem controle, mas a inoculação com o isolado 110 (*Pediococcus pentosaceus*) acarretou silagens com maior concentração de N-NH<sub>3</sub> em comparação com as silagens S-190 e S-210, podendo ser um indicativo de uma maior desaminação por esse isolado nas silagens.

De forma similar, o tempo de estocagem aumentou a concentração de N-NH<sub>3</sub>. A partir dos dados observados, a inoculação proporcionou uma variação na concentração de zeína de 4,02 (S-190; *P. pentosaceus*) a 4,73% (S-106; *Limosilactobacillus fermentum*) entre os isolados. As proteínas zeínas hidrofóbicas, especialmente as  $\gamma$ -zeínas, na matriz proteica são degradadas durante o processo de ensilagem (PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1998; JURJANZ; MONTEILS, 2005). As  $\gamma$ -zeínas ficam periféricas e reticuladas com  $\alpha$ - e  $\delta$ -zeínas

na matriz proteica, aderindo assim aos grânulos de amido e formando a matriz proteica (BUCHANAN et al., 2000; MU-FORSTER; WASSERMAN, 1998). Hoffman et al. (2011) revelaram que as  $\gamma$ -zeína são altamente degradadas durante a fermentação de silagem de grão de milho e a degradação de  $\gamma$  e de outras proteínas zeínas responsáveis pela ligação dos grânulos de amido deve resultar em uma dissociação desses grânulos em silagem de grãos. Vale ressaltar que maior concentração de N-NH<sub>3</sub> pode não necessariamente representar maior degradação de zeína durante a estocagem, o que pode estar atrelado as particularidades de diferentes cepas de uma mesma espécie.

No presente trabalho, a inoculação com o isolado 190 (*P. pentosaceus*) foi um dos tratamentos que teve menor concentração de N-NH<sub>3</sub> na silagem, mas ao mesmo tempo foi a que apresentou menor concentração da zeína quando comparada com a silagem controle. A silagem inoculada com o isolado 110 (pertencente ao mesmo gênero que o isolado 190 – *P. pentosaceus*) teve maior concentração de N-NH<sub>3</sub> e, assim como a concentração de zeína, ambas as variáveis não diferiram da silagem controle. A proteína solúvel (PS) também pode ser utilizada como indicativo de proteólise na fermentação de SGMR (JUNGES et al., 2017). O maior valor de PS nas silagens S-190 inoculadas com *P. pentosaceus* sugere que a atividade proteolítica foi mais intensa nessas silagens em comparação às demais, o que pode ter contribuído com o menor valor de zeína dessas silagens em comparação à silagem controle. Estudos posteriores devem ser conduzidos para melhor entender o perfil metabólico desses isolados.

Os resultados de atividade enzimática ressaltam que diferenças na atividade proteolítica na silagem ocorreram durante a fermentação. A atividade nula nas silagens S-52, S-82, S-116 e S-221 muito provavelmente se deve ao fato de a atividade enzimática ter sido cessada antes de 45 dias de fermentação, diferente do que ocorreu na silagem controle. De acordo com Junges et al. (2017), bactérias são as principais contribuintes da proteólise na fermentação dos grãos, o que nos leva a pressupor que os isolados 52, 82, 116 e 221 podem ter promovido atividade enzimática mais intensa em comparação às outras silagens. De forma oposta, maior atividade enzimática na silagem controle e de forma similar nas silagens S-180 e S-LH provavelmente ocorreu devido à menor intensidade dessa atividade nessas silagens. Dentre os tratamentos, a silagem S-190 teve uma baixa atividade, provavelmente como consequência da inoculação.

O metabolismo microbiano durante a fermentação acarreta a alteração de diversos parâmetros da silagem, a exemplo do pH (MUCK et al., 2018). Bactérias do ácido lático são microrganismos capazes de modificar o ambiente aeróbio ao longo da estocagem em função

do seu metabolismo, sendo elas homoláticas ou heteroláticas (WOOLFORD, 1984). No caso do pH, menores valores são alcançados em silagens com maior concentração de ácido lático, composto orgânico formado pelo metabolismo homolático e responsável pela acidificação da silagem durante o período de estocagem (MUCK et al., 2018). No presente estudo, a silagem S-190 (*P. pentosaceus*) estocada por 45 dias teve menor pH nessas silagens em comparação às demais. A *P. pentosaceus* é conhecida como BAL homolática e que possui o ácido lático como principal produto formado na fermentação, o que explica o menor pH na silagem (WOOLFORD, 1984). A silagem S-LH estocada por 45 dias constitui da inoculação de SGMR com cepa de *Lactobacillus hilgardii*, microrganismo heterolático e que não apresenta o ácido lático como principal composto formado durante a fermentação, o que possivelmente contribuiu para o maior pH.

Não somente a inoculação, mas o tempo que a silagem permanece estocada também afeta valores de pH do alimento (ARCARI et al., 2016; FERRARETTO et al., 2015). Diversos são os fatores que podem afetar o pH de uma silagem ao longo da fermentação, como disponibilidade de substrato e perfil microbiano (MUCK et al., 2018; FERRARETTO et al., 2015). As BAL são microrganismos acidotolerantes mas que podem ter uma redução na sua população em longos períodos de estocagem (CARVALHO et al., 2017; WOOLFORD, 1984). A SGMR é um alimento que não apresenta uma elevada concentração de substrato disponível para fermentação e que, possivelmente, se torna um limitante ao crescimento microbiano (MUCK et al., 2018). Logo, a associação entre menor disponibilidade de substrato e a consequente redução na população de BAL na silagem em maiores tempos de estocagem podem reduzir a formação do principal composto responsável pela acidificação da massa, o ácido lático, aumentando os valores de pH em silagens.

Diversos são os microrganismos que contribuem com as perdas de MS da silagem, em especial leveduras e fungos filamentosos (MUCK et al., 2018). O controle sobre o crescimento desses microrganismos é essencial para preservar ao máximo o valor nutritivo das silagens e a inoculação e o maior tempo de estocagem são estratégias que auxiliam nesse controle. O maior tempo de fermentação proporciona maiores concentrações de ácidos antifúngicos (e.g. ácido acético) por bactérias capazes de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis (SILVA et al., 2019; MUCK et al., 2018) o que proporciona menor contagem de leveduras e fungos filamentosos, justificando a redução da contagem de ambos os microrganismos nas silagens avaliadas. De forma similar, a formação de ácidos orgânicos pelo metabolismo microbiano ajuda a controlar o crescimento de leveduras na silagem. As menores contagens de levedura possivelmente estão atreladas à maior

concentração de ácido acético nessas silagens, resposta essa não observada especificamente pelos isolados 82 (*P. pentosaceus*) e 221 (*Pediococcus acidilactici*), ambos microrganismos homoláticos com formação de ácido láctico como principal produto final da fermentação e que não possuem características antifúngicas (MUCK et al., 2018; WOOLFORD, 1984)

O fato de as silagens terem sido inoculadas proporcionou um aumento na contagem de BAL o que justifica os dados observados no presente estudo. Dentre os isolados avaliados, o 190 (*P. pentosaceus*) destacou-se com o maior número de BAL no período de 45 dias de fermentação em comparação a silagem controle. Além disso, uma variação na contagem de BAL ocorreu apenas com 45 dias, ao passo que nenhum das silagens diferiram com 90 dias de ensilagem, com exceção das silagens S-106 e S-190 onde a contagem reduziu. Muito provavelmente os isolados 106 (*L. fermentum*) e 190 (*P. pentosaceus*) apresentaram um crescimento microbiano mais intenso nas primeiras semanas de estocagem em comparação aos demais tratamentos, mas que reduziu com o tempo de estocagem. Carvalho et al. (2017) observaram a presença de *P. pentosaceus* em SGMR inoculadas até 30 dias de estocagem e tiveram uma contagem  $< 2,00 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  partir de 60 dias de fermentação, onde tal comportamento referente ao crescimento desse isolado pode ter sido similar nas silagens avaliadas no presente estudo.

Diferenças nas concentrações dos ácidos orgânicos (lático e acético) sugerem que os isolados apresentam metabolismos distintos. As bactérias pertencentes ao gênero *Pediococcus* identificadas no presente estudo (*P. pentosaceus* e *P. acidilactici*) são comumente conhecidas como BAL homoláticas tendo o ácido láctico como principal produto metabólico (MUCK et al., 2018), o que explica a maior concentração desse ácido nas silagens S-116 e S-190 em comparação à silagem S-52, mesmo que também tenha sido identificado como sendo da espécie *P. pentosaceus*. Isso nos levar a concluir que uma diferença entre cepas atrelado a uma melhor eficiência em produzir ácido láctico pode ter afetado a concentração do ácido láctico nas silagens. Ambos isolados *L. fermentum* e *Lentilactobacillus hilgardii* apresentam metabolismo de característica heterolática, formando não somente ácido láctico, mas também ácido acético no metabolismo, o que explica a maior concentração desse composto nas silagens S-106 e S-LH em comparação à silagem controle (MUCK et al., 2018). Para ambos os ácidos, o tempo de estocagem aumentou a sua concentração de 45 para 90 dias, podendo ser explicado devido a maior formação dos ácidos pelas BAL ao longo da fermentação (FERRARETTO et al., 2015).

O etanol é um álcool formado durante a fermentação de silagens como resultado do metabolismo de leveduras e, dependendo do tipo de microrganismo, por BAL de via

heterolática (WOOLFORD, 1984; MUCK et al., 2018). De modo geral, a formação de etanol pode contribuir com as PMS durante a ensilagem por ser oriundo de atividade de leveduras, reduzindo o valor nutritivo do alimento (BORREANI, et al., 2018; MUCK et al., 2018). A inoculação com o isolado 190 (*P. pentosaceus*) resultou em silagens com menor concentração de etanol e, associado a baixa contagem de leveduras, podem explicar a menor concentração do álcool na silagem.

O aumento da estabilidade aeróbia das silagens pode ser explicado pelo aumento da concentração de ácidos com características antifúngicas, por exemplo o ácido acético (MUCK et al., 2018). As silagens estocadas por 90 dias tiveram maior concentração desse ácido em comparação às silagens com 45 dias de fermentação. A presença do ácido acético nas silagens no pós-abertura auxilia no controle de leveduras assimiladoras de lactato, responsáveis por degradar a silagem e diminuir o tempo de estabilidade do alimento (MUCK et al., 2018). A menor contagem desses microrganismos indesejáveis também auxilia no aumento da estabilidade das silagens (KUNG et al., 2018). No presente estudo, menor contagem de leveduras ( $< 2,00 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ ) foram observadas nas silagens com 90 dias de armazenamento, favorecendo a maior estabilidade dessas silagens. O aumento da estabilidade das silagens com a inoculação com *L. hilgardii* pode ser explicado pelo metabolismo heterolítico desse microrganismo. Aliado a isso, a maior concentração de ácido acético nas silagens S-LH possivelmente favoreceu a inibição de microrganismos deterioradores devido ao efeito antifúngico desse ácido, como dito anteriormente. A inoculação com *L. fermentum* aumentou a estabilidade das silagens S-106 e S-116 em comparação a silagem controle, também provavelmente ao seu metabolismo heterolítico, similar ao que ocorreu na silagem S-LH.

O aumento da digestibilidade do amido com o tempo de estocagem pode estar a maior disponibilidade do amido para fermentação ruminal. Segundo Hoffman et al. (2011), a zeína do grão de milho impede o acesso dos microrganismos ruminais ao amido e maiores tempos de estocagem tendem a reduzir a matriz proteica do grão, melhorando a digestão do amido no rúmen. No presente trabalho, o avanço da estocagem reduziu a concentração de zeína das silagens, possivelmente explicando a maior digestibilidade do amido com 90 dias de fermentação. A diferença dos valores de digestibilidade do amido entre as silagens também possivelmente está atrelada à concentração de zeína dessas silagens e ao metabolismo microbiano. As bactérias são as maiores contribuintes para a atividade proteolítica em silagens de grãos (JUNGES et al., 2017), o que pode ter contribuído com os resultados do presente trabalho.

Apesar da zeína ser a principal barreira para a digestão do amido no rúmen (HOFFMAN et al., 2011), a partir dos dados observados, podemos pressupor que menor concentração de zeína não necessariamente implicará em menor digestibilidade do amido. A silagem S-190 foi o único tratamento que proporcionou silagens com menor concentração de zeína em relação à silagem controle, mas não tiveram diferença na digestibilidade do amido. Curiosamente, a concentração de zeína das silagens S-190 e S-LH não diferiram, mas menor digestibilidade para a silagem S-190 foi observada em comparação à S-LH. Isso nos leva a pressupor que o efeito da digestibilidade do amido pode estar mais relacionado à constituição da zeína propriamente dita e não da sua concentração em si e que a inoculação com isolados epifíticos podem ter modificado o perfil de fermentação das silagens.

A zeína possui uma estrutura helicoidal que circunda o amido e a utilização e escolha de uma fonte proteica pelo microrganismo pode estar relacionado à sua demanda metabólica, o que irá conferir na degradação de diferentes aminoácidos. Não existem dados no presente trabalho que suportem essa hipótese, mas uma possível diferença entre o isolado 190 e a cepa *L. hilgardii* na escolha do aminoácido como substrato durante a proteólise pode ter alterado a constituição da zeína de forma que o amido se torne mais ou menos acessível pelos microrganismos ruminais, afetando a digestibilidade desse nutriente.

A digestibilidade do amido sofre alterações ao longo da fermentação devido a maior disponibilidade do amido como consequência da degradação da matriz proteica do grão (FERRARETTO et al., 2015). Em trabalho realizado por Daniel et al. (2014), estes observaram que maiores ganhos em digestibilidade do amido ocorrem nos primeiros meses de estocagem e que tende a reduzir ao longo da fermentação. Isso pode explicar o fato de as silagens apresentarem diferenças na digestibilidade do amido quando ensiladas por 45 dias, ao passo que não diferiram quando armazenadas por 90 dias.

A principal resposta de proteólise por bactérias consiste na formação de  $N-NH_3$ , produto do processo de desaminação e reflexo do metabolismo bacteriano para seu crescimento (JUNGES et al., 2017; OHSHIMA; McDONALD, 1978). No presente trabalho, diferenças na concentração de  $N-NH_3$  das silagens foram observadas. Menores teores de  $N-NH_3$  ocorreram na silagem S-190, possivelmente relacionado à menor desaminação de aminoácidos por esse isolado, o que pode explicar a menor digestibilidade do amido dessas silagens aliado ao menor tempo de estocagem.

## 5 CONCLUSÃO

Todos isolados avaliados foram capazes de afetar características fermentativas e nutricionais das silagens. Os isolados apresentaram características específicas para uma determinada variável, como menor redução de pH (isolado 190), menor contagem de leveduras (isolado 116) e maior estabilidade aeróbia (isolados 5 2, 82, 106, 110, 116, 180, 190, *L. hilgardii*), o que torna difícil definir um único isolado como sendo o melhor dentre todos os que foram avaliados. Dito isso, a escolha do isolado a ser utilizado como inoculante bacteriano deve ser baseada em um objetivo específico para SGMR (e.g. fermentação durante a estocagem ou estabilidade aeróbia).

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, R. C. et al. Novel lactic acid bacteria strains enhance the conservation of elephant grass silage cv. BRS Capiacú. **Animal Feed Science and Technology**. v. 264, p. 114472, 2020.
- ARCARI, M. A. et al. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 53, n. 1, p. 60-71, 2016.
- ÁVILA, C.L.S., et al. The use of *Lactobacillus* species as starter culture for enhancing the quality of sugarcane silage. **Journal of Dairy Science**. v. 97, n. 2, p. 940– 951, 2014.
- BERNARDES, T. F.; CARDOSO, M. V. S. B.; LIMA, L. M. Silage feeding programs on intensive dairy farms. In: **Annual Meeting of the American Dairy Science Association**. Knoxville, Tennessee. 2018.
- BORREANI, G. et al. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**. v. 101, p. 3952-3979, 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, F. R. et al. Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. *Veterinary Parasitology* 212(3–4):214–218, 2015.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Biologists**. Rockville, MD. 1.264p. 2000.
- CARVALHO, B. F. et al. Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated corn kernel silage. **Journal of Applied Microbiology**. v. 122, n. 31, p. 589-600, 2017.
- CARVALHO, B. F. et al. Aerobic stability of sugar-cane silage inoculated with tropical strains of lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**. v. 70, n. 2, p. 308–323. 2014.
- CARVALHO, B. F. et al. Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. **Animal Feed Science and Technology**. v. 195, p. 1–13, 2014.
- CONAGHAN, P.; O’KIELY., P; O’MARA, F. P. Conservation characteristics of wilted perennial ryegrass silage made using biological or chemical additives. **Journal of Dairy Science**. 93, 628–643, 2010.



COUTINHO, F.S. et al. Perfil de degradação de amido de mandioca por *Saccharomyces cerevisiae* expressando uma amilase de *Cryptococcus flavus*. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 4, p. 15-21, 2013.

DANIEL, et al. Alterações na qualidade de silagens de milho durante o armazenamento. In: JOBIM, C. C.; CECATO, U.; CANTO M. W.; BANKUTI, F. I. (Eds.). Simpósio sobre produção e utilização de forragens conservadas, 5. 2014. Maringá, **Anais...** Maringá, 2014. p.23-36.

FERRARETTO, L. F.; FREDIN, S. M.; SHAVER, R. D. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. v. 98, n. 10, p. 7318-7327, 2015.

GRANT, R. J.; ADESOGAN, A. T. Journal of dairy science silage special issue: introduction. **Journal of Dairy Science** v. 101, n. 5, p. 3935-3936. 2018.

HALL, M. B.; MERTENS, D. R. Technical note: effect of sample Processing procedures on measurement of starch in corn silage and corn grain. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 91, n.12, p. 4830-4833, 2008.

HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 2465–2474, 2011.

JUNGES, D. et al. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. **Journal of Dairy Science**. v. 100, n. 11, p. 9048-9051, 2017.

JURJANZ, S.; MONTEILS, V. Ruminal degradability of corn forages depending on the processing method employed. **Animal Research**. v. 54, p. 3-15, 2005.

MORAN J. P. et al. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: JONES, D. I. H.; JONES, R.; DEWHURST, R; MERRY, R. J. (Eds) **Proceedings...** Aberystwyth: UK, 1996, pp. 162–163. Aberystwyth, UK: University of Wales.

MUCK, R. E. et al. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science** v. 101, n. 5, p. 3980-4000. 2018.

NELLIS, S.E., HOFFMAN, P.C., SHAVER, R.D. A modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**. 96, 4647–4652.

OHSHIMA, M.; McDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 29:497–505. 1978.

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of dairy Science** 81:2178–2184. 1998.

ROSEIRA, J. P. S. et al. Effects of exogenous protease addition on fermentation and nutritive value of rehydrated corn and sorghum grain silages. **Scientific Reports**. v. 13, n. 7302, 2023.

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

SILVA, Y. A. 2022. **Avaliação de bactérias epifíticas para silagem de grãos de milho reidratados**. Dissertação de Mestrado. Un0p. 1984.

SILVA, N. C. et al. Influence of storage length and inoculation with *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of high-moisture corn and rehydrated corn grain silage. **Animal Feed Science and Technology**. v. 251, p. 124-133, 2019.

SILVESTRE, A. M.; MILLEN, D. D. The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 50, e20200189, 2021.

TABACCO, E. et al. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. **Journal of Applied Microbiology**. v. 107, n. 5, p. 1632–41, 2009.

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

WOOLFORD, M. K. The chemistry of silage. In: WOOLFORD, M. K. (Ed). **The silage fermentation**. 10 ed. Mercel Dekker, UE. 350p. 1984.