



ANDRÉIA DE OLIVEIRA DOS SANTOS

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE CEPAS
BACTERIANAS PARA ENSILAGEM DE MILHO**

LAVRAS – MG

2012

ANDRÉIA DE OLIVEIRA DOS SANTOS

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS PARA
ENSILAGEM DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Processos Fermentativos Aplicados e Agroindústria, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila

Coorientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Santos, Andréia de Oliveira dos.

Seleção e avaliação de cepas bacterianas para ensilagem de milho / Andréia de Oliveira dos Santos. – Lavras : UFLA, 2012.
167 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Carla Luiza da Silva Ávila.

Bibliografia.

1. Silagem de milho. 2. Bactérias do ácido láctico. 3. Seleção. 4. Patogênico. 5. DDGE. 6. Estabilidade aeróbia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589.95

ANDRÉIA DE OLIVEIRA DOS SANTOS

**SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE CEPAS BACTERIANAS PARA
ENSILAGEM DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Processos Fermentativos Aplicados e Agroindústria, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 16 de fevereiro de 2012.

Dr. José Cardoso Pinto UFLA

Dra. Rosane Freitas Schwan UFLA

Dr. Whasley Ferreira Duarte UFLA

Dra. Carla Luiza da Silva Ávila
Orientadora

LAVRAS – MG

2012

*A Deus, pela proteção em todos os
momentos e por iluminar e conduzir meus
passos na direção certa,*

OFEREÇO

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

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

Aos meus irmãos, Anderson e Anselmo, pelo carinho e pela torcida constante para minha vitória. Obrigada pelas palavras de conforto, ânimo e alegria nos dias difíceis. Agradeço a vocês também por terem me dado três lindos sobrinhos, Lucas, Matheus e Raphael, que me ensinam, a cada dia, a ver a vida com os olhos de um adulto, mas compreendê-la com o coração puro de uma criança.

Ao Rodrigo, companheiro em todos os momentos. obrigada pela ajuda na abertura dos silos e na coleta das amostras, mas, principalmente, por seu amor, atenção, incentivo e compreensão por minha ausência em muitos momentos importantes. Amo você!

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

Ao professor Dr. Whasley Ferreira Duarte e à técnica Cidinha, pela confiança, amizade e ajuda na realização das análises cromatográficas.

Aos professores Dr. Luís Roberto Batista e Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, pelo fornecimento de cópias de estirpes bacterianas para a execução deste trabalho.

Ao professor José Cardoso Pinto, do Departamento de Zootecnia e à Dra. Simone Marques, pela participação na banca de qualificação e pelas correções.

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

A Ivani, técnica do laboratório de Microbiologia, pelo carinho, amizade e por estar pronta a ajudar. Às técnicas do laboratório de Ciências dos Alimentos, Tina e Flávia, pelos ensinamentos e ajuda na realização das análises bromatológicas.

À aluna de doutorado Beatriz (“Bia”), pelos ensinamentos, exemplo de dedicação ao trabalho e, principalmente, pela amizade que construímos.

Aos alunos de graduação Milena, Cibeli, Marcela, Carolina e Willian, que foram de grande ajuda na execução deste trabalho. Espero que eu possa ter contribuído positivamente para a formação de vocês.

Às grandes e verdadeiras amigas que foram construídas desde que iniciei minhas atividades acadêmicas, em especial Maiara, Mariana Dias, Monique, Gabriela, Igor, Martin, Marco e Gilberto. Vocês foram essenciais para fazer meus dias mais tranquilos e felizes longe de casa.

Ao Sr. Heber, pelo fornecimento das plantas de milho para a confecção da silagem para o experimento e por permitir que ele fosse conduzido em sua fazenda.

À Michelle e Márcia, companheiras de república, pelo carinho, conselhos e, principalmente, pela amizade que construímos.

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

RESUMO

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de selecionar cepas de bactérias do ácido lático (BAL) para serem utilizadas como inoculantes e avaliar seus efeitos sobre a composição químico-bromatológica, a população de microrganismos, as perdas fermentativas e a estabilidade aeróbia de silagens de milho. No primeiro experimento, foi realizada seleção de BAL baseada no perfil de produção de metabólitos em extrato aquoso, taxas de crescimento e eficiência na redução do pH. As cepas que apresentaram os melhores resultados foram avaliadas conforme sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores pelo método de difusão em ágar. Diferenças com relação à produção dos metabólitos entre as cepas foram observadas, no entanto, 9 cepas foram escolhidas para serem avaliadas em silos experimentais de PVC. A inoculação das BAL nas silagens de milho não resultou em diferenças nas características químicas e na população dos microrganismos patogênicos e deterioradores, após 60 dias de fermentação. Os tratamentos 11, 68 e 70 apresentaram elevada produção dos ácidos lático e acético, além de altos índices de etanol. Além disso, os tratamentos 11 e 68 apresentaram os melhores resultados após a exposição aeróbia. No segundo experimento, avaliaram-se os efeitos da inoculação de 9 cepas de BAL selecionadas no experimento anterior, nos perfis bromatológicos e microbiológicos de silagens de milho. Os silos experimentais de PVC foram abertos com 10, 30, 60 e 90 dias de fermentação e retiraram-se amostras para a determinação das características bromatológicas, fermentativas e microbiológicas. A diversidade bacteriana foi determinada pela técnica de PCR-DGGE e, após 90 dias de fermentação, foi feita avaliação da estabilidade aeróbia e perdas de MS. A inoculação das cepas de BAL não influenciou a composição química das silagens. Entretanto, os tratamentos 11, 68 e 73 apresentaram a maior relação entre a proporção dos ácidos lático e acético. Nos tratamentos 11 e 73 foram verificadas as menores contagens de leveduras e fungos filamentosos, tendo, no tratamento 11, sido observada uma menor diversidade bacteriana durante o processo fermentativo, além da maior estabilidade aeróbia e também as menores perdas de MS. Assim, a BAL inoculada no tratamento 11 é considerada fonte promissora para ser utilizada como inoculante em silagens de milho.

Palavras-chave: Silagem de milho. Seleção. Bactérias do ácido lático. Patogênico. DGGE. Estabilidade aeróbia.

ABSTRACT

The present work aimed to select strains of lactic acid bacterias (LAB) in order to use them as inoculants and evaluate their effects on the chemical-bromatological composition, the population of microorganisms, fermentation losses and aerobic stability of corn silage. The first experiment was performed based on the selection of LAB production profile of metabolites in aqueous extract, growth rates and efficiency in reducing the pH. The strains with the best results were evaluated according to their ability to inhibit the growth of pathogenic and spoilage microorganisms by agar diffusion method. Differences in relation to the production of metabolites were observed between the strains; however, nine strains were chosen for evaluation in experimental PVC silos. The inoculation of LAB in corn silage did not result in differences in chemical characteristics and in the population of pathogenic and spoilage microorganisms after 60 days of fermentation. Treatments 11, 68 and 70 showed high production of lactic and acetic acids, and high levels of ethanol. In addition, treatments 11 and 68 showed the best results after the aerobic exposition. In the second experiment, the effects of inoculation of nine strains of LAB selected in the previous experiment were evaluated in bromatological and microbiological profiles of corn silage. The experimental PVC silos were opened after 10, 30, 60 and 90 days of fermentation and samples were taken for determination of bromatological, microbiological and fermentative characteristics. Bacterial diversity was determined by PCR-DGGE and after 90 days of fermentation an evaluation of aerobic stability and DM losses was done. The inoculation of LAB strains did not affect the chemical composition of silages. However, treatments 11, 68 and 73 had the highest ratio between the proportion of lactic and acetic acids. In the treatments 11 and 73 the lowest counts of yeasts and molds were found, and on treatment 11 it was observed a lower bacterial diversity during fermentation, besides the higher aerobic stability and also the lower DM losses. Thus, LAB inoculated into the treatment 11 was considered a promising source to be used as inoculant in corn silage.

Keywords: Corn silage. Selection. Lactic acid bacterias. Pathogenic. DGGE. Aerobic stability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Gráfico 1	Análise de componentes principais dos produtos do metabolismo das BAL avaliadas.....	85
Gráfico 2	Contagem de microrganismos no milho fresco e nos tratamentos inoculados, após 60 dias de fermentação.....	94
Gráfico 3	Contagens de BAL nos diferentes tratamentos com silagem de milho, em função do tempo de fermentação.....	95
Gráfico 4	Variação da temperatura durante a exposição aeróbia das silagens controle e inoculadas com as cepas de BAL.....	99
Gráfico 5	Temperatura máxima alcançada (T_m) e o tempo necessário para alcançá-la (T), nos diferentes tratamentos, após 7 dias de exposição aeróbia.....	100
Gráfico 6	Quebra da estabilidade aeróbia dos diferentes tratamentos inoculados com cepas de BAL.....	101

CAPÍTULO 3

Gráfico 1	Teores médios de matéria seca nas silagens de milho controle e inoculadas com as BAL, no decorrer do período de fermentação.....	132
Gráfico 2	Concentrações de carboidratos solúveis totais nas silagens de milho controle e inoculadas com as BAL, no decorrer do período de fermentação.....	133
Gráfico 3	Teores de fibra em detergente neutro nas silagens de milho controle e inoculadas com as BAL, no decorrer do período de fermentação.....	134
Gráfico 4	Teores de proteína bruta nas silagens de milho controle e inoculadas com as BAL, no decorrer do período de fermentação.....	135
Gráfico 5	Perdas de matéria seca nas silagens de milho controle e inoculadas com as BAL, no decorrer do período de fermentação.....	136
Gráfico 6	Variação nos valores de pH dos diferentes tratamentos, em função do tempo de fermentação.....	138
Gráfico 7	Variação média das concentrações de ácido lático e etanol dos diferentes tratamentos, em função do tempo de fermentação.....	140

Gráfico 8	Varição média das concentrações dos ácidos propiônico e butírico dos diferentes tratamentos, em função do tempo de fermentação.....	141
Gráfico 9	Varição das concentrações de ácido acético nos diferentes tratamentos, em função do tempo de fermentação	142
Gráfico 10	Varição média na população de microrganismos dos diferentes tratamentos, em função do tempo de fermentação	145
Gráfico 11	Contagens médias de bactérias do ácido láctico nos diferentes tratamentos com silagem de milho, ao longo do processo de fermentação.....	148
Gráfico 12	Varição da temperatura durante a exposição aeróbia das silagens controle e inoculadas com as cepas de BAL	151
Gráfico 13	Temperatura máxima alcançada (T_m) e o tempo necessário para alcançá-la (T) nos diferentes tratamentos, durante 7 dias de exposição aeróbia	152
Gráfico 14	Quebra da estabilidade aeróbia e perdas de matéria seca nos diferentes tratamentos inoculados com cepas de BAL.....	153

CAPÍTULO 3

Figura 1	Comunidade bacteriana nas silagens de milho inoculadas com as cepas 11, 68 e 73, durante o processo de fermentação.....	156
Figura 2	Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 16S de bactérias de silagens de milho inoculadas com as cepas 11, 68 e 73, ao longo do processo fermentativo	158

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Composição química do milho fresco e das silagens inoculadas com as cepas de BAL, após 60 dias de fermentação.....	87
Tabela 2	Características fermentativas do milho fresco e das silagens inoculadas com as cepas de BAL, após 60 dias de fermentação.....	90
Tabela 3	Identificação de <i>Listeria</i> spp. no milho e na silagem, após 60 dias de fermentação.....	97

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Composição química e microbiológica do milho antes da ensilagem.....	129
Tabela 2	Probabilidade dos efeitos (<i>p</i>) na composição química das silagens de milho não inoculadas e inoculadas com as cepas de BAL.....	130
Tabela 3	Composição química das silagens de milho não inoculadas e inoculadas com as cepas de BAL, após 90 dias de fermentação.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AN** – Ágar nutriente
- AGV** – Ácidos graxos voláteis
- BAL** – Bactérias do ácido láctico
- BAP** – Bactérias do ácido propiônico
- BHI** – Brain heart infusion
- CHO** – Carboidratos solúveis
- CO₂** – Dióxido de carbono
- DGGE** – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DRBC** – Dicloran rosa de bengala cloranfenicol
- EMP** – Via de Embden-Meyerhof Parnas
- FF** – Fungo filamentoso
- FDN** – Fibra em detergente neutro
- FDA** – Food and Drug Administration
- H₂O** – Água
- LEV** – Levedura
- MRS** – De man rogosa sharpe
- MS** – Matéria seca
- NaCl** – Cloreto de sódio
- NO₃** – Nitrato
- NO₂** – Nitrito
- NO** – Óxido nítrico
- N₂O** – Óxido nitroso
- O₂** – Oxigênio
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- PB** – Proteína bruta

pH – Potencial hidrogeniônico

pKa – Constante de dissociação ácida

PVC – Cloreto de polivinila

RCA – Reinforced clostridial agar

T – Tempo necessário para alcançar a T_m

T_m – Temperatura máxima

UFC – Unidades formadoras de colônia

VRBG – Violet red bile glucose agar

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	17
	INTRODUÇÃO GERAL	17
1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Silagem	20
2.1.1	Silagem de milho	22
2.2	Microbiota da silagem	24
2.2.1	Bactérias do ácido lático (BAL)	25
2.2.2	Bactérias do ácido propiônico (BAP)	26
2.2.3	Microrganismos indesejáveis presentes na silagem	27
2.3	Inoculantes microbianos	37
2.4	Seleção de cepas para inoculantes	39
2.5	Diversidade microbiana em silagens utilizando técnicas independentes de cultivo	48
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	50
	REFERÊNCIAS	51
	CAPÍTULO 2 Seleção de bactérias do ácido lático com potencial para melhorias do processo fermentativo e inibição de microrganismos patogênicos e deterioradores em silagem de milho	66
1	INTRODUÇÃO	69
2	MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1	Seleção das cepas bacterianas	71
2.2	Avaliação do crescimento e produção dos metabólitos pelas cepas no extrato aquoso da planta de milho	71
2.3	Teste de inibição dos microrganismos patogênicos e deterioradores pelas BAL	72
2.4	Ensilagem de milho em silos experimentais	74
2.4.1	Preparo dos inoculantes para a ensilagem de milho em silos de PVC	74
2.4.2	Preparo do milho para a ensilagem	75
2.4.3	Preparo da silagem de milho e formação dos tratamentos	75
2.5	Avaliação das características químicas e microbiológicas das silagens	76
2.5.1	Análises químico-bromatológicas	76
2.5.2	Análises microbiológicas	77
2.5.3	Avaliação das perdas de MS	79
2.6	Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens	80
2.7	Delineamento experimental e análises estatísticas	80

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.1	Seleção das cepas de BAL.....	81
3.2	Perfil fermentativo das silagens.....	86
3.2.1	Composição química.....	86
3.2.2	População de microrganismos.....	92
3.3	Avaliação da estabilidade aeróbia.....	98
4	CONCLUSÃO.....	102
	REFERÊNCIAS.....	103
	APÊNDICES.....	111
	CAPÍTULO 3 Perfil fermentativo de silagens de milho inoculadas com diferentes cepas de bactérias do ácido lático.....	115
1	INTRODUÇÃO.....	118
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	120
2.1	Cepas bacterianas testadas.....	120
2.1.1	Preparo dos inoculantes para a ensilagem de milho em silos de PVC.....	120
2.2	Ensilagem de milho em silos experimentais.....	120
2.2.1	Preparo da silagem de milho e formação dos tratamentos.....	121
2.3	Avaliação das características químicas e microbiológicas do processo de fermentação.....	121
2.3.1	Análises químico-bromatológicas.....	122
2.3.2	Análises microbiológicas.....	124
2.3.3	Avaliação das perdas de MS.....	124
2.4	Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens.....	125
2.5	Avaliação da diversidade bacteriana.....	125
2.6	Delineamento experimental e análises estatísticas.....	127
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	128
3.1	Perfil fermentativo das silagens.....	128
3.1.1	Composição química.....	128
3.1.2	População de microrganismos.....	144
3.2	Avaliação da estabilidade aeróbia.....	149
3.3	Avaliação da diversidade bacteriana.....	154
4	CONCLUSÃO.....	159
	REFERÊNCIAS.....	160
	APÊNDICE.....	167

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira está evoluindo no sentido de adotar sistemas mais eficientes, com o uso de animais de maior potencial genético que demandam dietas balanceadas, à base de concentrados e volumosos de alto valor nutritivo. Pimentel et al. (1998) relataram que, para a produção de silagem, há, preferencialmente, a necessidade de utilização de uma espécie forrageira que apresente produção elevada de massa por unidade de área e que seja um alimento de alta qualidade para os animais.

Nesse sentido, McDonald, Henderson e Heron (1991) consideram a planta de milho (*Zea mays L.*) ideal para ensilagem, uma vez que, no momento adequado de colheita, ela contém quantidade relativamente alta de matéria seca (MS), baixa capacidade tampão e níveis adequados de carboidratos solúveis em água (CHO) para fermentação. Além disso, apresenta boa aceitação por bovinos, bubalinos, caprinos e ovinos, para a produção de leite e ganhos de peso satisfatórios de animais para corte (OLIVEIRA; SOUZA SOBRINHO; REIS, 2007). No entanto, grandes perdas de nutrientes durante a exposição ao ar são verificadas devido à maior instabilidade aeróbia das silagens de milho que ocorre em virtude da maior concentração de substratos potencialmente oxidáveis por microrganismos oportunistas (SIQUEIRA; BERNARDES; REIS, 2005).

Nesse aspecto, tecnologias microbiológicas, como os inoculantes microbianos específicos para silagens, são selecionados em laboratório e aplicados no campo como forma de reduzir as perdas fermentativas e proporcionar silagens de elevada qualidade. Esses aditivos têm características

distintas em relação às suas funções, e as bactérias do ácido lático (BAL) têm merecido destaque nos processos de seleção de microrganismos para serem utilizados como aditivos em silagem. Alguns inoculantes são adequados para acelerar o processo fermentativo com elevada produção de ácido lático, com rápida e eficiente redução nos valores de pH; outros, no entanto, são benéficos em diminuir a degradação aeróbia das silagens por meio da produção de outros ácidos orgânicos, além do ácido lático, que possuem eficiência comprovada na inibição dos principais microrganismos deterioradores (KUNG JÚNIOR; STOKES; LIN, 2003). Além disso, pesquisas sobre o metabolismo das BAL têm revelado que algumas cepas, além de promover melhorias durante o processo fermentativo, têm atividade antimicrobiana, o que aumenta sua eficiência como inoculante (GOLLOP; ZAKIN; WEINBERG, 2005).

Entretanto, os resultados obtidos com a utilização dos inoculantes são contraditórios, visto que as melhorias no perfil fermentativo das silagens nem sempre são acompanhadas de ganhos no valor nutritivo ou no desempenho animal (KUNG JÚNIOR; STOKES; LIN, 2003).

A obtenção de sucesso no uso de aditivos microbiológicos em silagens depende de vários fatores, como: a habilidade da bactéria inoculada de crescer rapidamente na massa de forragem ensilada e a sua capacidade de promover uma fermentação adequada, com rápida e eficiente queda no pH; a presença de substrato adequado, sendo observado pela compatibilidade entre a bactéria inoculada e a planta forrageira; a população da bactéria inoculada e sua capacidade de competir com a microbiota epifítica da forrageira e também da capacidade de sobreviver durante todo o processo fermentativo, o que proporcionará melhorias durante a exposição aeróbia (SAARISALO et al., 2007).

Além disso, o monitoramento das cepas bacterianas inoculadas ao longo do processo de fermentação por meio de técnicas moleculares também apresenta

real importância, pois resulta na obtenção de novas informações que darão suporte ao entendimento das funções dessas cepas durante a fermentação (LI; NISHINO, 2011a). Contudo, até o momento, nenhum estudo descreveu o uso de técnicas moleculares para monitorar os efeitos das cepas de BAL selecionadas na comunidade bacteriana presente na silagem ao longo do período de fermentação.

Deste modo, esses fatores justificam as investigações dos efeitos dos inoculantes em grande variedade de plantas forrageiras (milho, sorgo, capins, alfafa, dentre outras) para a confecção da silagem, seja sobre o aspecto fermentativo ou nutricional (REIS; JOBIM, 2001). Assim sendo, o processo de seleção e avaliação de diferentes estirpes de BAL para ensilagem de milho se faz necessário e trabalhos nesse intuito são escassos, evidenciando, portanto, a importância do trabalho em questão.

Para organizar a distribuição dos trabalhos desenvolvidos nesta dissertação, foi realizada a redação em forma de capítulos, sendo o capítulo 1 uma revisão de literatura, na qual se abordam os seguintes temas: silagem, silagem de milho, microbiota da silagem, bactérias do ácido láctico, bactérias do ácido propiônico, microrganismos indesejáveis presentes na silagem, inoculantes microbianos; seleção de cepas para inoculantes e diversidade microbiana em silagens, utilizando técnicas independentes de cultivo.

No capítulo 2, objetivou-se selecionar cepas de BAL com potencial para melhorar as características fermentativas e inibir microrganismos patogênicos e deterioradores, além de avaliar os efeitos da inoculação destas cepas no valor nutritivo e na estabilidade aeróbia de silagens de milho. No capítulo 3, foram avaliados os efeitos da inoculação de diferentes BAL nas características fermentativas, no valor nutritivo e na estabilidade aeróbia de silagens de milho, objetivando selecionar cepas que minimizem as perdas decorrentes da ensilagem para serem utilizadas como inoculantes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Silagem

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

Woolford (1984) definiu silagem como o produto obtido quando forrageiras contendo alta umidade, sujeitas à deterioração por microrganismos aeróbicos, são armazenadas anaerobicamente.

A silagem é produzida pelo processo da ensilagem, que é uma técnica de conservação da forragem que consiste no corte, picagem, compactação e na devida alocação do material dentro de um recipiente ou estrutura denominada silo, na qual a combinação entre um ambiente anaeróbico e um pH baixo é fundamental para evitar uma atividade microbiana indesejável (PAHLOW et al., 2003).

Segundo Weinberg e Muck (1996) e Merry, Lowes e Winters (1997), o processo de ensilagem pode ser dividido em quatro fases, conforme descrito a seguir.

A *fase aeróbica*, em geral, tem duração de poucas horas, quando ocorre a redução do oxigênio atmosférico, devido à respiração do material ensilado, juntamente com a ação de microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos, como as leveduras e as enterobactérias. Quanto maior o teor de oxigênio deixado dentro do silo, maior será a respiração celular, aumentando, assim, o tempo em que as bactérias aeróbias estarão presentes no ambiente.

A fase de fermentação inicia-se quando há o esgotamento da maior parte do oxigênio presente. Uma vez que o silo restringe a entrada de oxigênio, o processo de respiração aeróbica das plantas juntamente com o da microbiota epífita é responsável por consumir o oxigênio presente. O ambiente com concentração reduzida de oxigênio cessa a respiração pela planta, inibe o crescimento dos microrganismos aeróbios e cria condições favoráveis para as bactérias lácticas epífitas ou adicionadas como inoculante produzirem ácido láctico. Durante a fase anaeróbica da ensilagem, as bactérias do ácido láctico (BAL) epífitas baixam o pH pela conversão de CHO em ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Na fase de estabilidade, caso não ocorra a entrada de ar no silo, o material ensilado não sofrerá mudanças significativas. Os baixos valores de pH fazem com que a atividade das bactérias anaeróbicas sejam reduzidas e, além disso, alguns microrganismos ácido tolerantes sobrevivem a esta fase em estado de inatividade ou na forma de esporos (ELFERINK et al., 2001).

A fase de deterioração aeróbia, ou fase de alimentação, inicia-se logo que o silo é aberto e o material ensilado fica exposto ao ar. A deterioração do material começa com a degradação dos ácidos orgânicos por leveduras e, ocasionalmente, por bactérias acéticas. A silagem, quando exposta ao ar, pode sofrer aumento de temperatura e de pH, podendo, ainda, ocorrer perdas de CHO e dos produtos finais da fermentação, o que contribui para reduzir a qualidade da silagem e sua digestibilidade pelo animal (WOOLFORD, 1990). O último estágio desta fase inclui a atividade de outros microrganismos aeróbios deterioradores, como fungos filamentosos e enterobactérias (ELFERINK et al., 2001).

A deterioração aeróbia, além de causar perdas de valor nutricional, afeta a qualidade de silagens por meio do crescimento de microrganismos patogênicos e produção de toxinas (BORREANI; TABACCO, 2010). O oxigênio é

prejudicial para a qualidade da silagem, pois permite que microrganismos aeróbios deterioradores, como leveduras, fungos e bactérias aeróbias, cresçam e se multipliquem. Estes microrganismos competem com BAL por nutrientes, causando fermentação indesejável e assimilação do ácido lático, o que resulta na redução da MS (WOOLFORD, 1990). Além disso, alguns fungos interferem na produtividade animal, pela produção de micotoxinas (ZHANG et al., 2009).

Vários fatores no processo de ensilagem podem afetar a qualidade da silagem, incluindo teor de MS, tempo de ensilagem (DAWSON et al., 1999), sistema de ensilagem (MCENIRY et al., 2008), compactação da forragem e infiltração de ar no silo durante a armazenagem (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

2.1.1 Silagem de milho

Conforme Nussio, Campos e Dias (2001), o milho apresenta os requisitos básicos para a confecção de uma boa silagem e tem sido cada vez mais recomendado, devido às suas características de alto rendimento de massa verde por hectare, boa qualidade, relativa facilidade de fermentação no silo, além da boa aceitação por parte dos bovinos e ganhos de peso satisfatórios de animais em confinamento (GOMES et al., 2002).

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

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

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

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

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

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

Siqueira, Bernardes e Reis (2005) afirmam que as silagens de milho podem ser consideradas alimentos nobres, pois são dotadas de alto valor nutritivo e elevado custo de produção de MS. Com isso, considera-se que os cuidados com essas silagens após a abertura dos silos devem ser extremamente criteriosos, devido à maior instabilidade aeróbia que ocorre em virtude da maior concentração de substratos potencialmente oxidáveis por microrganismos oportunistas.

2.2 Microbiota da silagem

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

2.2.1 Bactérias do ácido láctico (BAL)

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

São classificadas como bactérias gram-positivas, usualmente não móveis e não esporulantes. Todas são microaerofílicas, mas algumas têm preferência por condições anaeróbicas (HAMMES; HERTEL, 2003). A característica principal das BAL é a produção de ácido láctico como único ou o principal produto de seu metabolismo.

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

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

Segundo Hammes e Hertel (2003), no decorrer do processo de fermentação da silagem ocorre sucessão de gêneros de bactérias do ácido lático. No estágio inicial, as bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* dominam o processo, sendo substituídas por *Leuconostoc*, depois por *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que são mais resistentes às condições ácidas. Com o decorrer do processo, até as BAL pertencentes ao gênero *Lactobacillus* vão perdendo a viabilidade, entretanto, alguns microrganismos especializados, tais como *Lactobacillus buchneri*, continuam ativos, porém, em um baixo nível (ELFERINK et al., 2001).

As bactérias lácticas da microbiota epífita são essenciais para a fermentação das silagens, sendo detectadas em densidades de 10^1 a 10^5 UFC g⁻¹ em forragem de alfafa; 10^6 em gramíneas perenes e 10^7 em milho e sorgo em clima temperado (PAHLOW et al., 2003). Henderson (1993) relatou que as BAL presentes na forragem fresca estão em estado dormente e que os procedimentos da colheita que laceram a planta culminam com a ativação dessas bactérias. Entretanto, estas bactérias podem também ser adicionadas por meio de inoculantes, com o objetivo de melhorar as características fermentativas.

2.2.2 Bactérias do ácido propiônico (BAP)

As BAP obtêm energia por meio da fermentação tanto de açúcares quanto do ácido lático, produzindo, assim, propionato, acetato e dióxido de carbono (MOON, 1983). O ácido propiônico tem sido utilizado com bastante sucesso para reduzir as perdas associadas com a instabilidade aeróbia em função de sua ação antifúngica, inibindo, assim, os principais microrganismos de deterioração aeróbia que são as leveduras e fungos filamentosos (LINDGREN et al., 1983).

Bolsen et al. (1996) relataram que a inoculação de BAP melhorou a estabilidade aeróbia em silagens de milho, em comparação com as silagens controle e as inoculadas com BAL. Filya, Sucu e Karabulut (2006) também relataram efeitos positivos da inoculação de *Propionibacterium acidipropionici* em silagens de milho e sorgo, em que foram encontrados maiores níveis de ácido acético e propiônico nas silagens inoculadas com *P. acidipropionici* que naquelas inoculadas com *L. plantarum* e a combinação dos microrganismos. Além disso, a inoculação com *P. acidipropionici* conferiu maior estabilidade aeróbia às silagem de milho e sorgo, em função da maior inibição de fungos filamentosos e leveduras.

2.2.3 Microrganismos indesejáveis presentes na silagem

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

As leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares, anaeróbios facultativos e heterotróficos. Sua importância no processo fermentativo da silagem está relacionada com perdas durante a fermentação e a deterioração

aeróbia durante a fase de abertura, pois esse grupo de microrganismo é capaz de exercer sua atividade metabólica tanto na presença quanto na ausência de oxigênio (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Sob condições anaeróbias, as leveduras fermentam os carboidratos disponíveis produzindo etanol e CO₂ (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Esta produção de etanol na silagem não só diminui a quantidade de carboidratos disponíveis para as BAL, como também pode apresentar um efeito negativo no sabor do leite produzido pelos animais alimentados com essas silagens (RANDBY; SELMER-OLSEN; BAEVRE, 1999). Sob condições aeróbias, muitas espécies de leveduras degradam o ácido láctico em CO₂ e H₂O. A degradação do ácido láctico provoca um aumento no pH da massa ensilada, permitindo, desse modo, o crescimento de outros organismos deterioradores (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Assim, o crescimento desses microrganismos durante todas as fases do processo de ensilagem implica em perdas de MS.

As leveduras são os microrganismos responsáveis pelo início da deterioração aeróbia em silagens (WOOLFORD, 1990; PAHLOW et al., 2003), embora as bactérias acéticas (SPOELSTRA; COURTAIN; VAN BEERS, 1988) e outros microrganismos possam determinar a deterioração inicial (LINDGREN; PETTERSSON; KASPERSON, 1985; BERNARDES; REIS; MOREIRA, 2005).

As leveduras envolvidas na deterioração aeróbia podem ser classificadas em dois grupos: as espécies que utilizam ácidos orgânicos (*Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula* e *Pichia*) e as que consomem açúcares, como as espécies que pertencem ao gênero *Torulopsis* (JONSSON; PAHLOW, 1984). Segundo McDonald, Henderson e Heron (1991), as leveduras são capazes de desenvolverem-se em baixas concentrações de oxigênio e em ambientes com pH

muito ácido ($\text{pH} < 4,0$), ocorrendo a sucessão de populações ao longo das etapas de ensilagem.

Durante as primeiras semanas de ensilagem, a população de leveduras pode chegar a 10^7 UFC g^{-1} , ocorrendo um decréscimo gradual durante as etapas subsequentes de armazenagem (JONSSON; PAHLOW, 1984), sendo sua sobrevivência neste período dependente do grau de anaerobiose, do pH e da concentração de ácidos orgânicos. As áreas do silo mais próximas à superfície são, por natureza, mais susceptíveis à infiltração de ar, devido à maior porosidade da massa e aos materiais utilizados na cobertura. Desse modo, a multiplicação das leveduras pode continuar lentamente durante todo o período de estocagem (BORREANI; TABACCO; COLOMBARI, 2002). Em silagens de milho, quando a massa entra em contato com o ar durante o desabastecimento do silo, populações de leveduras superiores a 10^5 UFC g^{-1} podem quebrar a estabilidade em poucas horas, conforme relatado por Muck (2004).

Os principais gêneros de fungos filamentosos que têm sido isolados de silagens são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Absidea*, *Monoascus*, *Scopulariopsis* e *Trichoderma* e seu crescimento em silagens está associado a locais onde há penetração de ar durante a fase de armazenamento, mas, principalmente, durante a fase de abertura do silo, na qual há maior difusão do oxigênio no material ensilado (EL-SHANAWANY; MOSTAFA; BARAKAT, 2005).

A presença de fungos filamentosos não só causa uma redução do valor nutritivo e na palatabilidade da silagem em função da degradação de proteínas, mas também podem ter efeitos negativos na saúde animal e humana (ARCURI; CARNEIRO; LOPES, 2003; MAY, 1993).

Contudo, alguns gêneros, como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, produzem micotoxinas que são produtos orgânicos do metabolismo secundário e podem, quando ingeridas, acarretar danos à saúde e à produtividade dos animais

(MAHANNA, 1994; KOROSTELEVA; SMITH; BOERMANS, 2009; FINK-GREMMELS, 2008). A formação de micotoxinas na forragem é determinada por uma série de fatores, podendo-se destacar a presença de O₂, o estresse da planta, o estágio de desenvolvimento em que a cultura foi cortada, o tipo de solo e as atividades sinérgicas ou antagônicas entre espécies de fungos (WOOLFORD, 1990; FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008).

As principais micotoxinas relatadas em silagens de milho incluem aquelas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* – fumonisina B₁, nivalenol, desoxinivalenol, zearalenona, 15-acetil-desoxinivalenol e eniatina B e B₁, (DRIEHUIS et al., 2008; ECKARD et al., 2011); *Alternaria* – alternariol e éter monometil alternariol (RICHARD et al., 2007); *Aspergillus* - aflatoxina B₁ (GARON et al., 2006); *Penicillium* - andrastina A, toxina-PR, roquefortina A e C, ácido micofenólico e patulina (MÜLLER; AMEND, 1997; MANSFIELD; JONES; KULDAU, 2008).

Os principais sintomas de contaminação por micotoxinas nos animais incluem recusa alimentar, danos ao fígado, rins e pulmão, má formação em fetos, aborto e morte do animal (SCUDAMORE; LIVESEY, 1998). Todavia, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de verificar a presença e identificar compostos antifúngicos produzidos por BAL (MAGNUSSON; SCHNÜRER, 2001; STRÖM et al., 2002).

Outro grupo de microrganismos indesejáveis encontrados em silagens são as enterobactérias, que são bactérias gram-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, imóveis ou móveis por flagelação peritríquia. Os principais gêneros relatados em silagens são *Escherichia*, *Klebsiela*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Proteus* e *Enterobacter*. Embora a maioria das *Enterobactérias* detectadas nas silagens seja considerada não patogênica, seu desenvolvimento é indesejável, visto que competem com as BAL pelos açúcares no início do

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

As enterobactérias também são capazes de degradar proteínas que, além de provocarem redução do valor nutricional da silagem, conduzem à produção de aminas e ácidos graxos ramificados, apresentando efeito negativo na aceitabilidade da silagem. Além disso, a amônia formada por proteólise aumenta a capacidade tampão do material ensilado, retardando a redução rápida do pH da silagem (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Estes microrganismos também promovem a redução de nitrato (NO_3) para nitrito (NO_2) e estes para óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O), que tem um efeito prejudicial nos tecidos do pulmão, causando uma doença com sintomas semelhantes aos da pneumonia (SPOELSTRA, 1987).

Ostling e Lindgren (1995) afirmam que a presença de enterobactérias, por outro lado, pode tornar a silagem mais estável na fase aeróbia por meio da produção de alguns compostos durante a fermentação, que têm atividade inibitória frente a leveduras, durante a exposição aeróbia. Além disso, uma leve redução do nitrato é considerada positiva para a qualidade da silagem, pois o nitrito formado e o óxido nítrico são inibidores eficazes contra *Clostridium* spp. (SPOELSTRA, 1983).

A contaminação de silagens com *Escherichia coli* é um importante fator que afeta a saúde animal e a qualidade higiênica dos alimentos (WILKINSON, 1999), entretanto, *E. coli* constitui uma pequena proporção encontrada em silagens em relação ao número total de enterobactérias (OSTLING; LINDGREN, 1995). Li e Nishino (2011a) identificaram, por meio de métodos independentes de cultivo, espécies de *Erwinia*, *Rahnella*, *Pantoea*, *Morganella* e *Klebsiella* em silagens de azevém (*Lolium multiflorum*), após exposição ao ar. No processo de ensilagem, a presença dessas bactérias pode ser minimizada por fermentações aceleradas em que há uma queda rápida no pH. No entanto, a

presença de oxigênio prolonga sua sobrevivência na silagem (DRIEHUIS; ELFERINK, 2000).

A presença de bactérias do gênero *Listeria* também tem sido relatada em silagens. Trata-se de microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos e sua ocorrência em silagens tem sido associada à deterioração aeróbia (DRIEHUIS; ELFERINK, 2000).

O gênero *Listeria* possui 6 espécies reconhecidas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi* (HIRSH; ZEE, 2004). A espécie *L. monocytogenes* tem maior importância por causa de sua patogenicidade e capacidade de sobrevivência (VILAR et al., 2007), estando associada à surtos de septicemia, abortos, doenças do sistema nervoso central e mastite, afetando, assim, muitos animais ruminantes e também o homem (HIRSH; ZEE, 2004).

O crescimento e a sobrevivência de *Listeria* spp. na silagem são determinados pelo grau de anaerobiose e o pH da mesma. Essas bactérias podem tolerar valores de pH de 3,8 a 4,2 por longos períodos se o oxigênio estiver presente, mesmo que em baixos níveis. No entanto, sob condições estritamente anaeróbicas e a baixos valores de pH, essas bactérias perdem rapidamente a viabilidade. Assim, esses microrganismos estão envolvidos com a deterioração aeróbia das silagens, não se desenvolvendo em silagens bem preservadas (ELFERINK et al., 2001).

Em diversos trabalhos tem sido relatado o isolamento de *L. monocytogenes* em leite de bovinos em rebanhos com problemas reprodutivos. Bemrah et al. (1998) relataram que 16% das amostras de leite procedentes de vacas que abortaram devido à listeriose apresentavam-se contaminadas por *L. monocytogenes*.

Vilar et al. (2007) detectaram *Listeria* spp. em 33,7% das amostras de silagem, sendo que a espécie *L. monocytogenes* estava presente em 6% dessas

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

Konosonoka et al. (2012) isolaram *L. ivanovii*, *L. innocua* e *L. seeligeri* em 9,2% das amostras de silagem avaliadas, no entanto, *L. monocytogenes* foi isolada em 20% das amostras, embora nenhuma espécie tenha sido encontrada nas amostras de leite avaliadas.

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

As espécies do gênero *Clostridium* são bactérias estritamente anaeróbias e o seu desenvolvimento na silagem, durante a fase de fermentação, está ligada a uma lenta e insuficiente acidificação (pH > 4,5), que é atribuída a uma excessiva umidade da forragem, à insuficiência de açúcares fermentescíveis e a uma considerável concentração de nitrogênio na planta (SPOELSTRA, 1983; PAHLOW et al., 2003).

Esses microrganismos fermentam carboidratos, ácido láctico e aminoácidos, produzindo ácido butírico e aminas biogênicas. Esse tipo de fermentação resulta em perdas significativas de MS e os produtos da fermentação clostridiana reduzem a palatabilidade, além de diminuir a estabilidade da silagem (MAHANNA, 1994; ROTZ; MUCK, 1994). O pH no qual a atividade de bactérias do gênero *Clostridium* cessa está relacionado ao teor de MS da silagem. Isto está ligado ao fato de que os clostrídios são sensíveis ao aumento da pressão osmótica (WOOLFORD, 1972).

Segundo Muck (1988) e Mahanna (1994), os clostrídios tornam-se menos tolerantes ao aumento da pressão osmótica com a redução do pH da massa ensilada.

A espécie de *Clostridium* mais conhecida que se desenvolve principalmente durante a fase de fermentação na silagem é *Clostridium tyrobutyricum*. No entanto, em silagens com concentrações de MS acima de 30% e pH reduzido, como na silagem de milho, por exemplo, geralmente não se verificam condições que favoreçam o crescimento durante a fermentação, ficando o desenvolvimento de clostrídios restrito às áreas sujeitas à deterioração aeróbia. A silagem exposta ao ambiente atmosférico permite a entrada de oxigênio na massa e, então, os microrganismos aeróbios consomem os ácidos que foram produzidos durante a fermentação. O consumo destes ácidos e a presença de oxigênio levam à formação de micronichos, nos quais os fatores que inibiam a crescimento dos clostrídios são reduzidos ou ausentes e, nestas condições, estes microrganismos podem se multiplicar (JONSSON, 1991; BORREANI; TABACCO; COLOMBARI, 2002; DRIEHUIS; TE GIFFEL, 2005).

Rossi e Dellaglio (2007), analisando a qualidade de silagens na Itália, identificaram os microrganismos que influenciaram a preservação e a segurança higiênica. Os autores obtiveram maior contagem de células viáveis de *Clostridium* spp. nas silagens de milho (3×10^5 UFC.g⁻¹ silagem), seguida pela silagem de alfafa (1×10^5 UFC.g⁻¹). As espécies isoladas foram identificadas por sequenciamento do DNA e as principais espécies encontradas foram *C. beijerinckii*, *C. baratii*, *C. saccharolyticum*, *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* e *C. perfringens*, sendo esta última identificada somente em silagem de alfafa.

Já Tabacco et al. (2009), ao analisarem a formação de esporos de *Clostridium* spp. em silagens de milho, observaram que, durante a exposição aeróbia, a enumeração de esporos de clostrídios aumentou de cerca de 2 log

NMP.g⁻¹, na abertura, para mais de 6 log NMP.g⁻¹ e esteve associada a uma progressiva deterioração aeróbia e às alterações nos parâmetros químicos da silagem.

A presença de *Clostridium* spp. em silagens está associada à qualidade do leite. Isto se deve ao fato de os esporos de clostrídios serem capazes de sobreviver à passagem através do trato digestivo de uma vaca leiteira, podendo ser transferidos para o leite, via contaminação fecal do úbere (ELFERINK et al., 2001). Quando o leite produzido é destinado à produção de queijos, o problema da contaminação se agrava (DEMARQUILLY, 1998), pois, uma vez presente na matéria-prima, os esporos se mantêm viáveis e o aquecimento promovido durante o processo de produção não é capaz de eliminá-los (BORREANI; TABACCO; COLOMBARI, 2002). Durante a fase de armazenagem dos queijos, os clostrídios podem encontrar novo ambiente favorável à sua multiplicação e representar um grave problema durante a fase de comercialização, pois ocorre produção de gás e ácido butírico, alterando a textura e o odor do produto, diminuindo, assim, a qualidade e o tempo de prateleira (DRIEHUIS; TE GIFFEL, 2005).

Algumas espécies de *Clostridium* podem causar sérios problemas de saúde, sendo *C. botulinum* tóxico e causador do botulismo, que pode levar à morte dos animais. No entanto, esta espécie apresenta limitada tolerância às condições ácidas, não crescendo, portanto, em silagens bem preservadas (ELFERINK et al., 2001).

Outro grupo isolado em silagens são as bactérias do gênero *Bacillus* que são aeróbias ou anaeróbias facultativas. As principais espécies isoladas de silagem incluem *B. cereus*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis* e *B. polymyxa*. A maioria das espécies possui enzimas sacarolíticas e proteolíticas e, por isso, são capazes de fermentar uma grande variedade de carboidratos e ácidos orgânicos, etanol, 2,3-butanodiol e glicerol. Além de esses compostos

não terem efeito na preservação da silagem, essas bactérias competem com as BAL por substratos fermentescíveis e ainda estão envolvidas na deterioração inicial da silagem (GIFFEL et al., 2002).

Em silagens de gramíneas perenes e milho, a presença de *Bacillus* pode variar de 10^3 a 10^9 esporos g^{-1} de silagem. Altos níveis de esporos frequentemente são observados nas camadas superficiais do silo (DRIEHUIS; ELFERINK, 2000; GIFFEL et al., 2002).

Algumas espécies, tais como *B. subtilis* e *B. licheniformis*, têm sido utilizadas para inibir o desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos, dada sua atividade antifúngica, principalmente em silagens de grão úmido, como verificado por Pahlow et al. (2003). No entanto, essas espécies, juntamente com *B. cereus*, têm sido associadas às doenças transmitidas por alimentos e deterioração de diversos produtos lácteos (VAEREWIJCK et al., 2001).

Assim como os clostrídios, os esporos de bacilos sobrevivem à passagem pelo trato digestivo dos ruminantes e sua ocorrência no leite cru tem sido associada com alto número de esporos nas fezes (PAHLOW et al., 2003). Vissers et al. (2007) encontraram correlações significativas entre as concentrações de esporos no leite e as concentrações de esporos nas fezes e na silagem.

A incidência de esporos tem sido objeto de vários estudos, dentre os quais se destaca a ocorrência dos mesmos em silagens oferecidas ao gado leiteiro. Uma grande diversidade de *Bacillus* spp. foi isolada em silagens analisadas na Bélgica. Dentre as espécies isoladas após tratamento, a 80 °C, por 10 minutos, conforme Vaerewijck et al. (2001), foram identificadas *B. subtilis*, *B. pumilis* e *B. clausii*. Ainda foram isolados esporos altamente resistentes ao calor, tendo, após tratamento por 30 minutos, a 100 °C, sido identificadas as espécies *B. subtilis*, *B. sporothermodurans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. oleronius* e *B. palius*. *B. cereus* foi encontrado em todas as silagens amostradas.

2.3 Inoculantes microbianos

Desde a década de 1990, têm sido realizadas pesquisas buscando novas alternativas, com o objetivo de minimizar as perdas decorrentes do processo de ensilagem, otimizar o processo fermentativo, reduzir a deterioração aeróbia e preservar o valor nutritivo das forrageiras ensiladas (HARRISON; BLAUWIEKEL, 1994).

Nesse sentido, a utilização de inoculantes microbianos tem sido uma técnica extensamente difundida em países desenvolvidos. Entretanto, os resultados obtidos com sua utilização são contraditórios, já que as melhorias no perfil fermentativo das silagens nem sempre são acompanhadas de ganhos no valor nutritivo e, portanto, no desempenho animal (KUNG JÚNIOR; STOKES; LIN, 2003).

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

Com o objetivo de criar um balanço positivo entre fermentação, deterioração aeróbia e desempenho animal, algumas alternativas estão sendo estudadas e, entre elas, está a utilização de inoculantes contendo bactérias heterofermentativas, nos quais o microrganismo inoculado possa produzir ácido acético em associação com o ácido lático, com a função de controlar os microrganismos que se desenvolvem na presença de O₂. Nesse sentido,

pesquisas utilizando cepas heterofermentativas, como *Lactobacillus buchneri*, têm revelado resultados promissores no controle da deterioração aeróbia, durante a exposição da silagem ao ar (DRIEHUIS; SPOELSTRA; COLE, 1996).

Segundo Pahlow et al. (2003), as bactérias heteroláticas fermentam glicose, produzindo ácido lático e etanol, sendo a frutose fermentada a ácido lático, acético e manitol.

O ácido acético é considerado um ácido pouco eficiente em reduzir o pH da silagem, no entanto, sua ação ocorre sobre o metabolismo de leveduras e fungos filamentosos (MOON, 1983). Segundo Davidson (2007), este ácido em pH inferior ao seu pKa (4,73) permanece na forma não dissociada. Nesta forma, as membranas de leveduras e fungos filamentosos tornam-se permeáveis a ele, ocorrendo a entrada do ácido na célula via transporte passivo. Dentro da célula, o ácido é dissociado ($\text{RCOO}^- + \text{H}^+$) devido ao pH ser próximo de 7,0, liberando íons H^+ , o que reduz o pH intracelular. Para elevar novamente o pH, o microorganismo tem que expulsar os íons H^+ , implicando em gasto de energia, por se tratar de um processo de transporte ativo, retardando, assim, o crescimento e podendo causar a morte da célula (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Kristensen et al. (2010) concluíram, em seus estudos, que inoculantes homofermentativos não são capazes de competir eficientemente com a microbiota epífita na cultura do milho, quando comparados com inoculantes heterofermentativos que, além de aumentar a contagem de BAL, reduziram a população de leveduras nas silagens amostradas.

Segundo Kung Junior, Stokes e Lin (2003), há controvérsias sobre efeitos da inoculação de bactérias homo e heterofermentativas em silagens e, por isso, os resultados devem ser analisados com cautela, pois algumas condições de estudo variam significativamente quanto à viabilidade do inoculante, a cultura, a espécie de bactéria e a concentração de umidade da forragem. Os autores

relataram, ainda, que a dose de aplicação também é relevante e deve ser de 10^5 - 10^6 UFC g^{-1} de forragem, de modo que as bactérias exógenas possam dominar o processo fermentativo (WEINBERG; MUCK, 1996).

Segundo Elfererink et al. (2001), o *L. buchneri* consegue degradar o ácido láctico em condições de anaerobiose, transformando-o em ácido acético, 1,2 propanodiol e traços de etanol. Além desta observação, Driehuis, Elferink e Spoelstra (1999) verificaram elevadas concentrações de 1-propanol e ácido propiônico (236 e 106 mmol kg^{-1} de MS, respectivamente) quando a silagem de milho foi inoculada com *L. buchneri* (1×10^6 UFC g^{-1} de forragem). No entanto, estes metabólitos não foram observados quando o *L. buchneri* foi isolado em experimentos *in vitro*, sugerindo que o metabolismo destes produtos é de responsabilidade de outros microrganismos. Desse modo, Krooneman et al. (2002), utilizando técnicas envolvendo biotecnologia, aliadas a um meio de cultura contendo 1,2- propanodiol como substrato, provaram que a cepa *Lactobacillus diolivorans* tem a capacidade de degradar 1,2-propanodiol a 1-propanol e ácido propiônico. Segundo Moon (1983), o ácido propiônico, em combinação com o ácido acético, apresenta efeito sinérgico capaz de reduzir o crescimento de leveduras e fungos, elevando, assim, a estabilidade aeróbia da silagem.

2.4 Seleção de cepas para inoculantes

Segundo Lanes e Silveira Neta (2008), um dos fatores que podem comprometer a qualidade da fermentação e o valor nutritivo da silagem de milho é o teor de umidade, ou concentração de MS da planta no momento da colheita. A ensilagem de plantas com baixo teor de MS, além de ser mais propensa à produção de efluentes, sob compactação excessiva, favorece o crescimento de bactérias anaeróbias indesejáveis (*Clostridium* spp.) que produzem, durante a

fermentação, ácido butírico. A presença desse ácido compromete o consumo da silagem pelos animais.

Outro problema associado à silagem de milho corresponde à deterioração aeróbia que está relacionada à ensilagem de plantas com alto teor de MS. O tamanho da partícula após a picagem também pode dificultar a compactação do material e, conseqüentemente, haverá a formação de espaços porosos com oxigênio, que favorecerá o crescimento de microrganismos envolvidos com a deterioração aeróbia. Este fator influenciará negativamente o processo da estabilidade aeróbia (LANES; SILVEIRA NETA, 2008). Além disso, por ser uma silagem bem fermentada, altas concentrações de ácido láctico podem ser substratos para leveduras durante a deterioração aeróbia.

Em função dos fatores que afetam a qualidade da silagem de milho, novas cepas microbianas devem ser selecionadas com base em suas características para o controle das perdas envolvidas no processo de ensilagem.

As BAL são os principais microrganismos utilizados como inoculantes para silagens de diferentes tipos de culturas. Estas bactérias podem ser homofermentativas ou heterofermentativas, sendo que ambas apresentam efeitos positivos para o processo de ensilagem.

Embora os estudos demonstrem que o emprego de inoculantes fornece benefícios para a massa ensilada, os resultados são contraditórios quando diferentes culturas forrageiras são avaliados em condições diversas.

A efetividade dos inoculantes microbianos está vinculada a três fatores: população natural de bactérias lácticas, conteúdo de açúcares da forragem e cepas de bactérias presentes no inoculante. A bactéria que constitui o inoculante deve ser eficiente na competição com os microrganismos epífitos naturais da planta, devendo, ainda, ser efetiva no processo fermentativo, favorecendo, assim, o maior desempenho do animal (MUCK, 1993).

Segundo Muck (2008), um dos fatores importantes para o sucesso da aplicação de inoculantes microbianos em silagens é a compatibilidade entre a planta e os microrganismos utilizados. Segundo o autor, as culturas forrageiras apresentam composições químicas diferentes e podem armazenar diferentes tipos e concentrações de carboidratos. Esses fatores associados ao ambiente onde uma planta cresce podem interferir na adaptação do microrganismo a uma determinada cultura. Entretanto, cepas selecionadas de outros ambientes ou linhagens selecionadas a partir de culturas forrageiras diferentes também podem apresentar resultados positivos no processo de ensilagem. Este fato pode ser observado no trabalho de Ávila et al. (2010), em que foram avaliadas as características de silagens de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) inoculadas com cepas isoladas da própria cultura forrageira e com inoculantes comerciais com BAL isoladas de outros ambientes. Os resultados mostraram que cepas isoladas de cana-de-açúcar nem sempre apresentam os melhores resultados.

Existem inúmeros trabalhos nos quais são relatados os efeitos dos inoculantes na fermentação das silagens, no entanto, são raros aqueles sobre a sistemática de seleção de cepas bacterianas para tais inoculantes (SAARISALO et al., 2007). Com relação aos critérios de seleção de cepas bacterianas sugeridos para se encontrar um inoculante ideal para silagem, os mais comuns incluem o rápido crescimento na forrageira e a habilidade para competir com a microbiota epifítica. Intensiva produção de ácido láctico associada com metabolismo homofermentativo e razoável tolerância à acidez também são requeridos. Um inoculante ideal deverá, ainda, ser capaz de promover uma ampla estabilidade aeróbia da silagem, inibindo o crescimento de microrganismos deterioradores após a abertura dos silos (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). As cepas selecionadas devem ser robustas o suficiente para tolerar condições de estresse variáveis durante os procedimentos de formulação industrial e serem estáveis durante a estocagem. Além disso, o tipo de forrageira (leguminosa,

cereais ou gramíneas) em adição à temperatura e outras condições ambientais também influenciam sobre as qualidades que são importantes em um inoculante (SAARISALO et al., 2007).

Um processo de seleção de cepas geralmente envolve o isolamento dos microrganismos, verificar se estes apresentam as características desejáveis que estejam sendo buscadas e, posteriormente, a inoculação na forragem. O inconveniente é que, muitas vezes, perde-se muito tempo testando cepas que, no final, não proporcionam melhorias ao processo (SAARISALO et al., 2007).

Os métodos de pré-seleção são indicados antes da ensilagem da forrageira em silos de laboratório e somente as cepas com melhores resultados devem ser avaliadas. Porém, os resultados obtidos em escala de laboratório necessitam ser confirmados em condições de fazenda.

Saarisalo et al. (2007) propuseram um método de seleção de cepas para inoculantes, em que aquelas a serem testadas foram inoculadas em um extrato aquoso preparado a partir da cultura forrageira que se desejava estudar. Os autores concluíram que o método desenvolvido para a seleção de potenciais cepas de BAL para inoculantes foi rápido e real, baseado na efetividade daquelas selecionadas nos experimentos de ensilagem. Todas as cepas utilizadas nos experimentos de ensilagem melhoraram a qualidade de fermentação das silagens, em comparação com a silagem sem inoculante.

Muitas espécies ou grupos de microrganismos são considerados indesejáveis durante o processo de ensilagem. Alguns microrganismos, como enterobactérias e bactérias do gênero *Clostridium*, são indesejáveis, pois podem causar degradação de proteínas reduzindo, assim, o valor nutritivo da silagem. Além disso, estes microrganismos podem realizar fermentação secundária, utilizando o ácido lático e produzindo compostos, como os ácidos acético e butírico, prejudicando, dessa forma, a conservação ou reduzindo a aceitabilidade da silagem pelos animais. Outros microrganismos como os fungos filamentosos,

leveduras e *Listeria* spp. estão envolvidos na deterioração aeróbia das silagens. Por outro lado, alguns microrganismos presentes na silagem são considerados patogênicos tanto para os animais como para o homem, como é o caso de *Listeria monocytogenes* e *Clostridium* spp. (ÁVILA et al., 2011).

O aumento do conhecimento relacionado às BAL tem revelado que algumas cepas também possuem atividade antimicrobiana, o que aumenta sua eficiência como inoculante (GOLLOP; ZAKIN; WEINBERG, 2005).

Assim, as cepas de BAL podem ser selecionadas com base na sua capacidade de inibir outros microrganismos, como, por exemplo, os microrganismos de deterioração aeróbia e os patogênicos. A atividade antagonista de BAL sobre outros microrganismos ocorre por diversos mecanismos, como sensibilidade às interações microbianas, competição por nutrientes e sítios de adesão e pela produção de substâncias inibitórias potencialmente letais. As principais substâncias com potencial antimicrobiano produzidas por BAL são ácidos orgânicos (como o láctico, acético e propiônico), dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular e bacteriocinas. Essas substâncias têm efeito bacteriostático e/ou bactericida e podem criar um microambiente desfavorável para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deterioradores (CASTELLANO et al., 2008; ROUSE et al., 2007; ALVES et al., 2006).

Os ácidos orgânicos produzidos pelas BAL são produtos da fermentação de carboidratos e seus efeitos antimicrobianos podem estar relacionados com vários fatores, dentre eles: I) redução do pH do meio; II) redução do pH intracelular por entrada de ácido através da membrana celular, o que resulta em aumento do consumo de ATP celular com a finalidade de bombear para fora da célula os prótons em excesso; III) alteração da permeabilidade celular por interferência das proteínas de membrana responsáveis pelo transporte ativo de

nutrientes e IV) toxicidade celular devido à acumulação de compostos alcalinos no interior da célula (AXELSSON, 2004).

Em decorrência da produção dessas substâncias, as BAL da microbiota epifítica ou presentes nas silagens pela adição de inoculantes podem ser consideradas como importantes fatores de inibição de alguns microrganismos patogênicos, como *Listeria* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., algumas espécies de enterobactérias, leveduras e fungos filamentosos (NERO et al., 2008).

Magnusson e Schnürer (2001) descreveram a produção de compostos proteicos com atividade antifúngica por *Lactobacillus coryniformis*. Estes compostos apresentaram forte atividade inibitória sobre os fungos *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *Penicillium roqueforti*, *Mucor hiemalis*, *Talaromyces flavus*, *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. sporotrichoides*. Uma fraca atividade foi observada contra as leveduras *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*. Ström et al. (2002) isolaram e identificaram os compostos antifúngicos 3-ácido fenilático e os dipeptídeos cíclicos (L-Phe-L-Pro) e (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro), produzidos por *Lactobacillus plantarum* estirpe MiLAB 393. Estes compostos apresentaram ação inibitória sobre *Fusarium sporotrichioides* e *Aspergillus fumigatus* e *Kluyveromyces marxianus* foi a mais sensível dentre as espécies de leveduras.

Segundo Yildirim e Yildirim (2001), o microrganismo *Lactobacillus buchneri* produz um composto denominado buchnericina LB, que tem efeito bacteriostático, principalmente sobre *Listeria monocytogenes*, justificando, assim, os poucos resultados que relatam a presença deste microrganismo em silagens inoculadas com *L. buchneri*.

De acordo com Weinberg et al. (2004), os inoculantes microbianos nas silagens podem apresentar efeitos probióticos sobre o desempenho dos ruminantes, embora o mecanismo responsável por isso ainda não esteja

claramente elucidado. Uma hipótese é a de que a interação das BAL com os microrganismos do rúmen pode melhorar a atividade ruminal, aumentando a degradabilidade da fibra. Outra possibilidade é que as bacteriocinas produzidas pelas BAL na silagem podem inibir os microrganismos prejudiciais, tanto na silagem quanto no rúmen. No entanto, alguns estudos indicam que a inoculação com bactérias podem melhorar não apenas a fermentação da forragem, mas também o desempenho animal, como indicado pelo aumento da produção de leite, ganho de peso e consumo (CONTRERAS-GOVEA et al., 2011; KUNG JÚNIOR; STOKES; LIN, 2003).

É importante ressaltar que o efeito da inoculação não depende somente da espécie, pois, embora os microrganismos da mesma espécie apresentem características semelhantes, existem variações entre as estirpes. Ávila et al. (2010) e Saarisalo et al. (2007) verificaram que a inoculação com diferentes estirpes, embora pertencentes à mesma espécie, resultou em silagens com características diferentes, o que mostra que os estudos devem considerar as estirpes e não apenas as espécies.

Objetivando avaliar os efeitos de BAL sobre a inibição de bactérias do gênero *Clostridium* em silagem de leguminosas, Olt et al. (2009) observaram que *Lactobacillus paracasei*, quando inoculado em combinação com *Clostridium* spp., proporcionou um menor valor de pH, comparado com os tratamentos controle (sem inoculante) e o inoculado com *Clostridium* spp. Os conteúdos de etanol, ácido acético e a proporção de $\text{NH}_3\text{-N}$ também foram inferiores na silagem inoculada com *L. paracasei* em combinação com *Clostridium* spp., o que permitiu aos autores concluir que a inoculação com a espécie *L. paracasei* minimizou a atividade e os efeitos negativos da deterioração de microrganismos prejudiciais à silagem e melhorou a qualidade da fermentação, sugerindo, assim, a utilização desta cepa como inibitória de bactérias do gênero *Clostridium*.

Já Ávila et al. (2009), avaliando os efeitos de inoculantes microbianos com características de alta produção de ácidos, verificaram que as populações de fungos filamentosos foram inferiores ao mínimo detectável ($<2 \log \text{ UFC g}^{-1}$) em silagens de cana-de-açúcar. Resultados semelhantes também foram encontrados por Reich e Kung Júnior (2010), avaliando silagem de milho.

Uma característica muito importante a ser considerada na seleção de cepas para inoculantes é a capacidade de inibir a deterioração aeróbia das silagens. Durante a ensilagem, a escassez de oxigênio e o acúmulo de ácido láctico resultam em baixo pH, inibindo o crescimento de microrganismos e preservando os nutrientes. Entretanto, quando expostos ao ar, certos microrganismos oportunistas tornam-se viáveis, consumindo nutrientes, produzindo calor e danificando o material ensilado (RANJIT; KUNG JÚNIOR, 2000).

Woolford (1990) e Kung Júnior (2001) relataram que as leveduras são os primeiros microrganismos que causam deterioração aeróbia e aquecimento da silagem, sendo *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* e *Saccharomyces* os principais gêneros envolvidos. Sob condições aeróbias, as leveduras degradam o ácido láctico em CO_2 e H_2O . A degradação do ácido láctico provoca um aumento no pH da massa ensilada, permitindo, assim, o crescimento de outros microrganismos deterioradores, como os fungos filamentosos e *Bacillus* spp. (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991), o que resulta em perdas de componentes nutritivos da silagem e que pode, também, comprometer sua qualidade higiênica em função do desenvolvimento de microrganismos patogênicos (DRIEHUIS; ELFERINK; SPOELSTRA, 1999).

Estabilidade aeróbia pode ser definida como sendo a resistência da silagem à degradação, após a abertura do silo (TAYLOR; KUNG JÚNIOR, 2002). Como apresenta alta correlação com o aquecimento da massa, muitos autores definem a estabilidade aeróbia como sendo o número de horas em que a

temperatura da silagem se mantém estável antes de subir mais de 2 °C acima da temperatura de referência para a massa de silagem (MORAN et al., 1996).

Jobim e Gonçalves (2003) afirmam que quanto melhor for a qualidade da silagem, em função dos maiores teores de CHO residuais e de ácido lático, como é o caso da silagem de milho, mais intensa será a deterioração após exposição aeróbia.

Ranjit e Kung Júnior (2000), estudando a deterioração aeróbia em silagens de milho, observaram, até o terceiro dia de exposição ao ar, perdas de 5,3% da MS e 60% dos CHO existentes no dia da abertura do silo. No mesmo período, o pH aumentou de 3,9 para 5,0 e os teores dos ácido lático e acético foram reduzidos de 7,52% para 1,35% e de 1,88% para 0,08% na MS, respectivamente.

Danner et al. (2003) observaram que as silagens de milho inoculadas com BAL homofermentativas (*Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* e *L. plantarum*) apresentaram estabilidade aeróbia menor (26 a 31 horas) que as silagens sem inoculantes (40 horas) e silagens inoculadas com BAL heterofermentativas (274 horas para *L. buchneri* e 72 horas para *L. brevis*).

A estabilidade aeróbia das silagens está diretamente relacionada com a fermentação ocorrida durante a fase anaeróbia. Assim, aditivos utilizados para melhorar o padrão de fermentação das silagens podem afetar de forma positiva ou, até mesmo, negativa na estabilidade aeróbia das silagens. Dessa forma, é muito importante avaliar esta característica em um processo de pré-seleção de cepas.

2.5 Diversidade microbiana em silagens utilizando técnicas independentes de cultivo

Na última década, a análise da comunidade microbiana utilizando métodos independentes de cultivo tem sido utilizada amplamente, sendo empregada em pesquisas com diversos alimentos fermentados (ERCOLINI, 2004). Devido ao fato de muitos microrganismos apresentarem limitações de crescimento utilizando as técnicas convencionais de cultivo, esse método pode fornecer uma visão incompleta da comunidade microbiana. Assim, análises da comunidade microbiana utilizando a técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) têm se mostrado um método rápido e confiável para avaliar a dinâmica da diversidade e da população de comunidades microbianas. A técnica é útil na detecção de mudanças na população microbiana ao longo do tempo e na compreensão de como os inoculantes microbianos podem atuar sob condições de ensilagem diversas (WANG; NISHINO, 2008; PARVIN; NISHINO, 2009; LI; NISHINO, 2011a; LI; NISHINO, 2011b).

Em estudos realizados por Li e Nishino (2011c), avaliando os efeitos da inoculação de *Lactobacillus rhamnosus* e *L. buchneri* em silagens de milho utilizando a técnica de DGGE, os autores observaram que a inoculação não alterou a comunidade indígena bacteriana e também apresentou pouco efeito sobre a comunidade de fungos durante o processo de fermentação. Contudo, alterações acentuadas foram detectadas na comunidade de fungos após a deterioração aeróbia.

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

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os inoculantes microbianos são os aditivos mais utilizados em silagens, contudo, apesar do grande número de estudos relacionados ao uso de inoculantes em silagens, os resultados ainda são contraditórios em relação às melhorias do processo fermentativo e sobre os efeitos inibitórios dos inoculantes microbianos sobre os microrganismos patogênicos e deterioradores.

As cepas microbianas diferem na sua habilidade para fermentar vários substratos e na sua habilidade de crescer em várias condições de umidade e temperatura. Por esta razão, as cepas podem ser selecionadas de diferentes culturas, porém, deve-se observar sua capacidade adaptativa.

Por esse motivo, a seleção de BAL que possuem as características desejáveis para melhorar as características da fermentação e habilidade de produzir substâncias que conferem segurança e qualidade à silagem tem estimulado o desenvolvimento de estudos visando à detecção desses microrganismos e à caracterização de sua atividade antimicrobiana.

Essa utilização atende à crescente demanda por novos inoculantes microbianos, objetivando a produção de silagens de milho de boa qualidade, com alto valor nutritivo e com menores perdas em função da degradação por microrganismos deterioradores e patogênicos.

REFERÊNCIAS

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

ALVES, V. F. et al. Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. **Meat Science**, Barking, v. 74, n. 4, p. 623-627, Dec. 2006.

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

ÁVILA, C. L. S. et al. Chemical and microbiological characteristics of sugar cane silages treated with microbial inoculants. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 1, p. 25-32, Jan. 2010.

ÁVILA, C. L. S. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 384-394, Dec 2009.

ÁVILA, C. L. S. et al. Potential use of native microorganisms strains of forage for silage production. In: DANIEL, J. L. P.; ZOPOLLATTO, M.; NUSSIO, L. G. (Ed.). PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2011. p. 25-44.

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

BEMRAH, N. et al. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 37, n. 1-4, p. 129-145, Dec. 1998.

BERNARDES, T. F.; REIS, R. A.; MOREIRA, A. L. Fermentative and microbiological profile of marandu grass ensiled with citrus pulp pellets. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 3, p. 214-220, May/June 2005.

BOLSEN, K. K. et al. Effect of propionic acid bacterial inoculant on fermentation and aerobic stability of whole-plant corn silage. In: REPORT OF PROGRESS OF KANSAS STATE UNIVERSITY AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION, 1996, Manhattan. **Anais...** Manhattan: Kansas State University, 1996. p. 78-81.

BOLSEN, K. K.; WHITLOCK, L. A.; URIARTE-ARCHUNDIA, M. E. Effect of surface spoilage on the nutritive value of maize silages diets. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13., 2002, Auchincruive. **Proceeding...** Auchincruive: [s.n.], 2002. p. 75-77, 2002.

BORREANI, G.; TABACCO, E. The relationship of silage temperature with the microbiological status of the face of corn silage bunkers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 6, p. 2620-2629, June 2010.

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

CAI, Y. et al. Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 7, p. 2901-2906, 1999.

CASTELLANO, P. et al. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, Barking, v. 79, n. 3, p. 483-499, July 2008.

CONTRERAS-GOVEA, F. E. et al. Microbial inoculant effects on silage and in vitro ruminal fermentation, and microbial biomass estimation for alfalfa, bmr corn, and corn silages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 2-10, Jan. 2011.

DANNER, H. et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 562-567, Jan 2003.

DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTEVILLE, T. J. (Ed.). **Food Microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 2007. p. 713-746

DAWSON, L. E. R. et al. The effects of wilting grass before ensiling on silage intake. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 237-247, Sept. 1999.

DEMARQUILLY, C. Ensilage et contamination du lait par les spores butyriques. **INRA Productions Animales**, French, v. 11, n. 5, p. 359-364, Nov. 1998.

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

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

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

DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S. J. W. H. O.; WIKSELAAR, P. G. V.
Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 56, n. 4, p. 330-343, Dec. 2001.

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

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

ECKARD, S. et al. Incidence of *Fusarium* Species and Mycotoxins in Silage Maize. **Toxins**, Fort Collins, v. 3, p. 949-967, 2011.

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

ELFERINK, S. J. W. H. et al. *Lactobacillus buchneri* can improve the aerobic stability of silage via a novel fermentation pathway: the anaerobic degradation of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE. 12., 1999, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala: Swedwn, 1999. p. 266-267.

EL-SHANAWANY, A. A.; MOSTAFA, M. E.; BARAKAT, A. Fungal populations and Mycotoxins in silage in Assuit and Sohag governorates in Egypt, with special reference to characteristic Asperigilli toxins. **Mycopathologia**, New York, v. 159, n. 2, p. 281-289, Feb. 2005.

ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 297-314, Mar. 2004.

FERREIRA, J. J. Estágio de maturação ideal para ensilagem do milho e do sorgo. In: CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; RODRIGUES, J. A. S. (Ed.). **Produção e utilização de silagem de milho e sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. p. 405-428.

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

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 11, p. 3575-3581, Nov. 2003.

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

FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effects of *Propionibacterium acidipropionici* and *Lactobacillus plantarum*, applied at ensiling, on the fermentation and aerobic stability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 33, n. 5, p. 353-358, May 2006.

FINK-GREMMELS, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. **The Veterinary Journal**, London, v. 176, n. 1, p. 84–92, 2008.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, n. 2, p. 231–240, Feb. 2008.

GARON, D. et al. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 9, p. 3479–3484, May 2006.

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

GOLLOP, N.; ZAKIN, V.; WEINBERG, Z. G. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 3, p. 662-666, Sept. 2005.

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

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

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

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

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

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D. Microbiologia de forragens conservadas. In: JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D. **Volúmosos para produção de ruminantes**: valor alimentício de forragens. Jaboticabal: FUNEP, 2003. p. 1-26.

JONSSON, A. Growth of *Clostridium tyrobutiricum* during fermentation and aerobic deterioration of grass silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 54, n. 3, p. 557-568, Feb. 1991.

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

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

KONOSONOKA, I. H. et al. Incidence of *Listeria* spp. in Dairy Cows Feed and Raw Milk in Latvia. **International Scholarly Research Network: veterinary science**, New York, v. 2012, p. 1-5, 2012.

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

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

KROONEMAN, J. et al. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, n. 2, p. 639-646, Mar. 2002.

KUNG JÚNIOR, L. Silage fermentation and additives. In: ANNUAL SYMPOSIUM SCIENCE AND TECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 17., 2001, Carlisle. **Proceedings...** Carlisle: T.P. Lyons, 2001.

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

LANES, E. C. M.; SILVEIRA, NETA, J. J. Como evitar perdas na ensilagem do milho. **Revista Eletrônica de Veterinária**, Bahia, v. 9, n. 5, p. 1-12, May 2008.

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

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

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

LINDGREN, S. et al. Effects of inoculants, grain, and formic acid on silage fermentation. **Swedish Journal of Agricultural Research**, Stockholm, v. 13, n. 2, p. 91–100, 1983.

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

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

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

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

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

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

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

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **Biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe, 1991.

MCENIRY, J. et al. The microbiological and chemical composition of silage over the course of fermentation in round bales relative to that of silage made from unchopped and precision-chopped herbage in laboratory silos. **Grass Forage Science**, Oxford, v. 63, n. 3, p. 407–420, Sept. 2008.

MERRY, R. J.; LOWES, K. F.; WINTERS, A. Current and future approaches to biocontrol in silage. In: JAMBOR, V. et al. (Ed.). INTERNATIONAL SYMPOSIUM FORAGE CONSERVATION, 8., Brno. **Proceedings...** Brno: Czech Republic, 1997. p. 17-27.

MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 454–460, Mar. 1983.

MORAN, J. P. et al. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE UNIVERSITY OF WALES, 11., 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth: [s.n.], 1996. p.162–163.

MUCK, R. E. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, St. Joseph, v.47, n. 4, p. 1011-1016, 2004.

MUCK, R. E. Factors influencing silage quality and they implications for management. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 11, p. 2992-3002, Nov. 1988.

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

MUCK, R. E. The role of silage additives in making high quality silage. In: SILAGE PRODUCTION FROM SEED TO ANIMAL, 67., 1993, New York. **Proceedings...** New York: NRAES, 1993. p. 106-116.

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

NERO, L. A. et al. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v. 55, n. 6, p. 299-305, 2008.

NEUMANN, M. et al. Effect of particle size and cutting height of corn on the dynamics of the silage fermentation process and feed-out period. **Brazilian Journal of Animal Science**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 1603-1613, Sept./Oct. 2007.

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

OLIVEIRA, J. S.; SOUZA SOBRINHO, F.; REIS, F. A. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho destinados à silagem em bacias leiteiras do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 1, p. 45-50, jan./mar. 2007.

OLT, A. et al. Effect of lactic acid bacteria on inhibition of clostridia development in legume silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE. 15., 2009, Madison. **Proceedings...** Madison: Wisconsin, 2009. p. 289-290.

OSTLING, C.; LINDGREN, S. Influences of enterobacteria on the fermentation and aerobic stability of grass silages. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 50, n. 1, p. 41-47, Mar. 1995.

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

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

PIMENTEL, J. J. O. et al. Efeito da suplementação protéica no valor nutritivo de silagens de milho e sorgo. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 1042-1049, set./out. 1998.

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

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

REICH, L. J.; KUNG JÚNIOR, 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**, Amsterdam, v. 159, n. 3, p. 105-109, Aug. 2010.

REIS, R. A.; JOBIM, C. C. Perfil da fração de carboidratos da planta e adequação de aditivos no processo de ensilagem. In: WORKSHOP SOBRE MILHO PARA SILAGEM, 2., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 27-52.

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

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

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

ROUSE, S. et al. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 4, p. 915-923, Oct. 2007.

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

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

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

SPOELSTRA, S. F. Degradation of nitrite by enterobacterias during silage fermentation of grass. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, Wageningen, v. 35, n. 1, p. 43-54, Mar. 1987.

SPOELSTRA, S. F. Inhibition of clostridial growth by nitrate during the early phase of silage fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 34, n. 2, p. 145-152, Feb. 1983.

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

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

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

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**, Oxford, v. 271, n. 1, p. 1-10, Jan. 2009.

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

TAYLOR, C. C.; KUNG JÚNIOR, L. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 6, p. 1526-1532, June 2002.

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

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

VISSERS, M. M. M. et al. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 7, p. 3286-3293, July 2007.

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

WEINBERG, Z. G. et al. Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Clifton, v. 118, n. 1-3, p. 1-9, 2004.

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

WILKINSON, J. M. Silage and animal health. **Natural Toxins**, New York, v. 7, n. 6, p. 221-232, Dec. 1999.

WOOLFORD, M. K. Some aspects of the microbiology and biochemistry of silage making. **Herbage Abstract**, Wallingford, v. 42, n. 2, p. 105-111, June 1972.

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

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

YILDIRIM, Z.; YILDIRIM, M. Characterization of buchnericin LB, produced by *Lactobacillus buchneri* LB. **Turkey Journal of Biology**, Ankara, v.25, n. 1, p. 73-82, Feb. 2001.

ZHANG, T. et al. Effects of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on fermentation, aerobic stability, bacteria diversity and ruminal degradability of alfalfa silage. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 965–971, June 2009.

ZOPOLLATTO, M. et al. Biometric relations between maturity stage and productivity of corn cultivars for silage production. **Brazilian Journal of Animal Science**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 256-264, Feb. 2009.

CAPÍTULO 2

Seleção de bactérias do ácido láctico com potencial para melhorias do processo fermentativo e inibição de microrganismos patogênicos e deterioradores em silagem de milho

RESUMO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de selecionar cepas de BAL para silagem de milho, com base no perfil de produção de metabólitos e na atividade antimicrobiana e avaliar os efeitos da inoculação destas cepas em silagens de milho. Setenta e cinco cepas de BAL foram inoculadas em extrato aquoso preparado a partir da planta do milho para avaliação da produção de metabólitos. As cepas de BAL que apresentaram as melhores taxas de crescimento e eficiência na redução do pH foram avaliadas conforme sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*) e deterioradores (leveduras) por meio do método de difusão em ágar. Diferenças em relação à produção dos metabólitos entre as cepas foram observadas, no entanto, 9 cepas associadas com o aumento da produção dos ácidos láctico, acético e propiônico e que apresentaram níveis mais baixos de etanol foram escolhidas para serem avaliadas em silos experimentais de PVC. A inoculação das cepas de BAL em silagem de milho não resultou em diferenças nas características químicas e na população da maioria dos microrganismos patogênicos e deterioradores, após 60 dias de fermentação. Entretanto, os tratamentos 11, 68 e 73 foram os que tiveram uma maior população de BAL ao final do processo fermentativo e, nos tratamentos 6, 8 e 51, não foi verificada a presença de *Listeria* spp. Os tratamentos 11, 68 e 70 apresentaram elevada produção dos ácidos láctico e acético, além de altos índices de etanol, o que sugere um caráter heterofermentativo das cepas em estudo. Os tratamentos 11 e 68 foram os que apresentaram os melhores resultados após a exposição aeróbia, indicando menor atividade dos microrganismos deterioradores presentes na silagem de milho, possivelmente em função de seu metabolismo heterolático. Em função do caráter fermentativo e com as melhorias alcançadas após a exposição aeróbia, as cepas 11 e 68 foram consideradas fontes promissoras para serem utilizadas como inoculantes em silagens de milho.

Palavras-chave: Silagem de milho. Seleção. Bactérias do ácido láctico. Patogênico. Fermentação.

ABSTRACT

The aim of this study was to select strains of LAB for corn silage based on the profile of metabolites production and antimicrobial activity and also to evaluate the effects of inoculation of these strains in corn silage. Seventy-five strains of LAB were inoculated in aqueous extract prepared from maize plant in order to evaluate the production of metabolites. The strains of LAB that showed the best growth rates and efficiency in reduction of pH were evaluated according to its ability to inhibit the growth of pathogenic (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*) and spoilage (yeast) microorganisms using the agar diffusion method. Differences in relation to the production of metabolites were observed among strains, however, nine strains associated to the increased production of lactic, acetic and propionic acids and the ones that showed low levels of ethanol were chosen to be evaluated in PVC silos. The inoculation of LAB strains on corn silage did not result in differences on chemical characteristics and in the population of most pathogenic and spoilage microorganisms after 60 days of fermentation; however, treatments 11, 68 and 73 had the greatest population of LAB at the end of fermentation process and in treatments 6, 8 and 51 the presence of *Listeria* spp was not detected. Treatments 11, 68 and 70 showed high production of lactic and acetic acids, as well as high levels of ethanol, suggesting a heterofermentative character of the strains. The treatments 11 and 68 showed the best results after the aerobic exposition, indicating lower activity of spoilage microorganisms present in corn silage, possibly due to its heterolactic metabolism. Because of the fermentative character and the improvements achieved after the aerobic exposition, strains 11 and 68 were considered promising sources to be used as inoculants in corn silage.

Keywords: Corn silage. Selection. Lactic acid bacteria. Pathogenic. Fermentation.

1 INTRODUÇÃO

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

Tradicionalmente, a forragem mais utilizada para a ensilagem é a planta de milho (*Zea mays L.*), cultivado com este propósito em grandes áreas ao redor do mundo. Este fato deve-se, além de sua qualidade nutricional, às suas características desejáveis para ensilagem, como, por exemplo: alta produção de matéria seca (MS) por unidade de área, padrão adequado de fermentação no silo devido ao teor de MS entre 28% a 40%, alta concentração de carboidratos solúveis (CHO) e baixo poder tamponante (NUSSIO; CAMPOS; DIAS, 2001). No entanto, um antagonismo se insere, pois, quanto mais nutritivas, isto é, quanto mais nutrientes forem preservados durante o processo fermentativo, mais susceptíveis à deterioração aeróbia as silagens serão (SIQUEIRA; BERNARDES; REIS, 2005).

Nesse sentido, a utilização de inoculantes microbianos em silagens tem sido recomendada com o objetivo de minimizar as perdas decorrentes da ensilagem, otimizar o processo fermentativo, reduzir a deterioração aeróbia e preservar o valor nutritivo das silagens produzidas (KUNG JÚNIOR; STOKES; LIN, 2003).

Estudos têm revelado que algumas cepas de BAL podem ter atividade antimicrobiana, afetando muitos microrganismos patogênicos e deterioradores que interferem na qualidade higiênico-sanitária das silagens, o que aumenta sua eficiência como inoculante (GOLLOP; ZAKIN; WEINBERG, 2005).

Apesar de inúmeros trabalhos publicados relatarem os efeitos dos inoculantes sobre a fermentação de silagem, há, na literatura, poucas descrições sobre a sistemática da seleção de cepas de BAL para serem utilizadas como inoculantes (SAARISALO et al., 2007).

Em um processo de seleção de cepas para serem utilizadas como inoculantes em silagens, alguns critérios devem ser observados, como a capacidade das cepas de promover uma fermentação adequada, com rápida e eficiente queda no pH, capacidade de competir com a microbiota epifítica da forrageira e ter rápido crescimento. As cepas candidatas devem, ainda, ter capacidade de sobreviver durante todo o processo fermentativo, melhorando a estabilidade aeróbia e inibindo o crescimento de microrganismos deterioradores da silagem após a abertura dos silos (SAARISALO et al., 2007).

Sendo assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de selecionar cepas de BAL com potencial para melhorar as características fermentativas e inibir microrganismos patogênicos e deterioradores, além de avaliar os efeitos da inoculação destas cepas no valor nutritivo e estabilidade aeróbia de silagens de milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção das cepas bacterianas

Foram avaliadas 75 cepas de BAL previamente isoladas de silagens de cana-de-açúcar e pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras.

Os microrganismos foram reativados em meio de man rogosa sharpe – difco (MRS) e, após repicagens sucessivas, as culturas consideradas puras foram confirmadas ao nível de gênero, empregando-se os testes de coloração de Gram, catalase e motilidade (MC FADDIN, 1984) e associando-se estes dados à morfologia das células. Por meio do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (HOLT et al., 1994), bactérias gram-positivas, catalase e motilidade negativas foram separadas em grupos quanto às características semelhantes para identificação do gênero *Lactobacillus*.

2.2 Avaliação do crescimento e produção dos metabólitos pelas cepas no extrato aquoso da planta de milho

O extrato aquoso para a fermentação foi obtido por meio da picagem e trituração da planta inteira de milho, da qual 1 kg foi homogeneizado em 5 L de água destilada e deixado em banho-maria (Braun Biotech International, modelo Thermomix BM), por 2 horas, a 50 °C. O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro (Whatman 40) esterilizado em autoclave, a 121 °C, por 15 minutos e, posteriormente, diluído (proporção 1:2) assepticamente em solução salina (0,85 % NaCl) suplementada com glicose (1%).

As 75 cepas foram cultivadas em caldo MRS, por 24 horas, a 30 °C. Após este período, foi realizada a padronização do inoculo, utilizando-se a

escala Mc Farland 1 (aproximadamente 3×10^8 UFC mL⁻¹). Posteriormente, 400 µL de cada cepa foram inoculados em 200 mL do extrato aquoso da planta de milho, que foi posteriormente incubado, a 30 °C/120 rpm, por 48 horas.

Para avaliação do crescimento do inóculo, queda do pH e produção de metabólitos, foram retiradas amostras imediatamente após a inoculação e após 3, 6, 12, 24 e 48 horas de fermentação. O crescimento foi avaliado por turbidimetria em espectrofotômetro, a 600 nm (Shimadzu, modelo UV-2501); para aferição da queda do pH, foi utilizado potenciômetro digital (Digimed Analítica, modelo DM 20®) e a produção de metabólitos foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência. As análises foram realizadas em cromatógrafo de fase líquida (Shimadzu, modelo LC-10Ai) equipado com detectores de índice de refração (para etanol), modelo RID-10A, e de ultravioleta (para os ácidos láctico, acético e propiônico), modelo SPD-10Ai. A coluna utilizada foi a de troca catiônica, modelo Shim-pack SCR – 101 H de 30 cm de comprimento e 7,9 mm de diâmetro e a temperatura do forno da coluna foi de 30 °C, para leitura de etanol e 50 °C, para leitura dos ácidos. A fase móvel utilizada foi água ultrapura com pH ajustado para 2,1 com ácido perclórico e o fluxo foi de 0,6 mL/minuto.

2.3 Teste de inibição dos microrganismos patogênicos e deterioradores pelas BAL

As cepas de BAL que apresentaram as melhores taxas de crescimento e eficiência na redução do pH foram avaliadas conforme sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores. As cepas patogênicas testadas foram *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Clostridium perfringens* (ATCC 3624), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e *Listeria*

monocytogenes (ATCC 19117) e os deterioradores foram cepas de leveduras isoladas da silagem de cana-de-açúcar.

As cepas dos microrganismos deterioradores e patogênicos foram obtidas da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Os testes de inibição foram realizados utilizando-se o método de difusão em ágar, seguindo a metodologia descrita por Weese e Rousseau (2005), com algumas modificações.

Os microrganismos patogênicos foram reativados em meio *Brain heart infusion* (BHI) e incubados, por 24 horas, a 37 °C, com exceção de *Clostridium perfringens*, que foi incubado sob atmosfera anaeróbia, por um período de 7 dias. As espécies de leveduras e BAL avaliadas foram reativadas, respectivamente, em meio YEPG [0,3% de extrato de levedura (Merck); 0,3% extrato de malte (Merck); 0,5% de peptona (Himedia); 1,0% glucose (Merck); 2,0% ágar (Merck) por litro, contendo 100 mg de cloranfenicol] e MRS, e incubadas, por 24 horas, a 30 °C. Foram preparadas suspensões padronizadas do crescimento dos microrganismos deterioradores e patogênicos avaliados, comparando-se na escala McFarland 0,5 (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹), enquanto o crescimento das BAL foi padronizado comparando-se na escala McFarland 1 (aproximadamente 3×10^8 UFC mL⁻¹).

Após a padronização do crescimento dos microrganismos, em placas contendo o meio Mueller Hinton (Himedia), foi realizado o espalhamento superficial com auxílio de um swab estéril que foi embebido na suspensão contendo o microrganismo patogênico e/ou deteriorador a ser analisado. Posteriormente, com auxílio de uma pinça estéril, discos de papel filtro de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram colocados em triplicata sobre o meio contendo a suspensão, ao qual foram adicionados 50 µL da suspensão da BAL a ser testada para verificar sua capacidade de inibir o crescimento do

microrganismo patogênico e deteriorador. As placas foram incubadas, a 35 °C, por 24 horas, sob aerobiose, com exceção das placas em que se avaliou a inibição de *C. perfringens*, que foram incubadas em estufa de anaerobiose (Thermo Scientific, modelo 1025).

A inibição foi avaliada pela formação de halos ao redor dos discos, não tendo sido verificado o crescimento dos microrganismos patogênicos e deterioradores de referência. As leituras dos halos de inibição foram mensuradas em milímetros, utilizando-se um paquímetro.

2.4 Ensilagem de milho em silos experimentais

As cepas de BAL que apresentaram os melhores resultados, incluindo bom crescimento durante a fermentação, eficiência em reduzir o pH, capacidade de inibir leveduras e os patógenos de referência *E. coli*, *C. perfringens*, *B. cereus* e *L. monocytogenes*, além do melhor perfil de produção de ácidos graxos voláteis e ácido lático e menor produção de etanol, foram selecionadas para avaliação, em silagem de milho, em silos experimentais de PVC.

2.4.1 Preparo dos inoculantes para a ensilagem de milho em silos de PVC

As cepas bacterianas pré-selecionadas foram inicialmente cultivadas em tubos contendo 2 mL de caldo MRS e incubadas, por 24 horas, a 30 °C. Em seguida, foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo MRS e incubadas, por mais 24 horas e, finalmente, transferidas para frascos Erlenmeyers contendo 250 mL de caldo MRS e novamente incubadas, por 24 horas, a 30 °C. Após este período de incubação, foi feita a contagem do número de células, obtendo-se o resultado de 9 log UFC mL⁻¹ do caldo.

2.4.2 Preparo do milho para a ensilagem

O milho foi colhido, na estação chuvosa, com, aproximadamente, 102 a 119 dias de crescimento, quando os grãos apresentaram a linha do leite próxima de 50% e encontravam-se em fase de transição do estado pastoso para o farináceo. A colheita foi feita com colhedora automotriz, com o tamanho de partícula regulado para 10 mm, o que facilita a expulsão do ar quando da compactação, favorecendo o processo de fermentação para a produção da silagem (RANJIT; KUNG JÚNIOR, 2000).

2.4.3 Preparo da silagem de milho e formação dos tratamentos

Os inoculantes preparados anteriormente foram misturados à forragem no momento da ensilagem. Para cada tratamento, foram retirados 3 mL do caldo presente no erlenmeyer, o qual foi, posteriormente, misturado com 80 mL de água destilada e homogeneizado sobre 3 kg de forragem a ser ensilada. Ao final, os inoculantes experimentais foram inoculados em uma concentração de 9 log UFC kg⁻¹ de forragem, o que corresponde a 6 log UFC g⁻¹ de forragem. Teve-se o cuidado de adicionar ao tratamento controle somente água destilada, na mesma quantidade que foi adicionada junto com os inoculantes.

A forragem foi ensilada em silos experimentais de PVC com 10 cm de diâmetro e 80 cm de altura, adaptados com válvulas tipo Bunsen, com capacidade para, aproximadamente, 2,5 a 3 kg de silagem, sendo utilizada uma densidade de compactação dos silos de, aproximadamente, 600 kg de forragem por m³. A forragem foi compactada manualmente nos silos, os quais foram fechados, pesados e armazenados em local coberto.

2.5 Avaliação das características químicas e microbiológicas das silagens

Após 60 dias de fermentação, os silos foram abertos e destes foram retiradas duas amostras de cada tratamento, sendo uma delas pesada e congelada para posterior análise das características bromatológicas e a outra imediatamente encaminhada ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), para avaliação da população de microrganismos.

2.5.1 Análises químico-bromatológicas

As análises bromatológicas da forragem fresca e dos diferentes tratamentos após o período de fermentação foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Ciências dos Alimentos e também no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia, ambos da UFLA.

As amostras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada, a 55 °C, por 72 horas, conforme metodologia recomendada pela Association of Official Agricultural Chemists (1990). Decorrido o tempo de secagem, as amostras foram novamente pesadas e moídas em moinho tipo Willey, com peneira de malha de 1,0 mm e, após o processamento, foram acondicionadas em potes plásticos devidamente identificados para posterior determinação dos teores de proteína bruta (PB), conforme os métodos recomendados pela Association of Official Agricultural Chemists (1990) e fibra em detergente neutro (FDN), segundo as técnicas descritas por Pell e Schofield (1993). Nas amostras pré-secas, foi feita, ainda, a determinação dos teores de matéria seca (MS) definitiva, mantendo-se a amostra em estufa, a 105 °C, por 24 horas (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1990).

Os carboidratos solúveis totais (CHOs) foram determinados pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956), com algumas modificações. A extração etanólica foi realizada tratando-se 100 mg de amostra com 30 mL de etanol 80%, por 30 minutos, a 100 °C, em banho-maria (Nova Ética, modelo 316). Após a extração, foi realizada a filtração e o volume dos extratos foi completado com água destilada, até um volume final de 30 mL. Foram utilizadas alíquotas de 0,5 mL do extrato, às quais foram adicionados 0,5 mL de fenol e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A leitura foi realizada em seguida, por espectrofotometria em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan® FC) a 490 nm. A dosagem de carboidratos totais nos extratos foi feita de acordo com as absorbâncias obtidas por meio de curva padrão de glicose. De acordo com os rendimentos previamente obtidos, calculou-se o conteúdo de CHO totais, em g kg^{-1} de MS da amostra.

O pH foi determinado nos extratos obtidos para a realização das análises microbiológicas, por meio de um potenciômetro digital (Digimed Analítica, modelo DM 20®) e uma porção de 2 mL deste extrato foi acidificada com 10 μL de ácido sulfúrico, na concentração de 50% (v/v), para assegurar um pH final entre 2 e 3 (CANALE; VALENTE; CIOTTI, 1984), tendo sido utilizada, posteriormente, para a mensuração dos teores de etanol, ácido lático e ácidos graxos voláteis, por cromatografia líquida de alta eficiência.

2.5.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas da forragem fresca e das silagens foram realizadas em triplicada, no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da UFLA.

Amostras de 25 g foram colocadas assepticamente em 225 mL de água peptonada estéril (0,1%) e agitadas, durante 20 minutos, a 120 rpm, em agitador

orbital (Shaker). A partir do extrato obtido, foram preparadas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-6} , para se proceder ao plaqueamento.

Foram determinadas as populações de BAL, fungos filamentosos, leveduras, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Listeria* spp. e de microrganismos da família *Enterobacteriaceae* por plaqueamento em superfície, tomando-se 0,1 mL de cada diluição, em duplicata, e realizado o espalhamento em superfície nos respectivos meios de cultivo.

A contagem de BAL foi realizada utilizando-se o meio MRS (De Man Rogosa Sharpe – Difco), acrescido de nistatina (0,4%) e o meio dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) foi utilizado para a contagem de fungos filamentosos e leveduras. As placas foram incubadas, a 28 °C e a contagem total foi efetuada, após 48 horas, para BAL e leveduras e, após 120 horas de incubação, para fungos filamentosos.

A quantificação de *Clostridium* spp. foi realizada no meio *reinforced clostridial agar* (RCA) (Himedia) e as placas foram incubadas, por 7 dias, a 37 °C, em capela de anaerobiose. Para a contagem de *Bacillus* spp., foi utilizado o meio ágar nutriente (NA) (Himedia) e as placas foram incubadas, a 37 °C, por 24 horas, sob aerobiose. As amostras para contagem de *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. passaram por um processamento antes do plaqueamento, no qual foram submetidas a choque térmico em banho-maria (modelo 316, Nova Ética), a 80 °C, por 10 minutos, com o objetivo de induzir a esporulação.

Para avaliar a presença de *Listeria* spp., foi utilizado o meio Oxford (Himedia), após o enriquecimento primário das amostras em caldo de enriquecimento para listeria tamponado e as placas foram incubadas, a 30 °C, por 24 horas. A verificação da presença de *Listeria* spp. foi realizada seguindo os métodos da US Food and Drug Administration (FDA) (HITCHINS; JINNEMAN, 2011) e a confirmação do gênero foi feita empregando-se os testes

preliminares de coloração de Gram, catalase, motilidade e confirmação definitiva, utilizando-se o Kit API Listeria (BioMeriéux).

A contagem de microrganismos da família *Enterobacteriaceae* foi realizada utilizando-se o meio *violet red bile glucose Agar* (VRBG) (Difco) e a quantificação foi efetuada após 24 horas de incubação a 37 °C.

2.5.3 Avaliação das perdas de MS

Os silos foram avaliados quanto às perdas de MS total. Para tanto, o peso dos silos e de seus componentes individuais foram previamente determinados, possibilitando, dessa forma, os cálculos de perdas. Na abertura, foram anotados os pesos dos silos com a forragem. O conjunto do silo laboratorial sem a forragem era constituído por tampa, válvula e borracha de vedação, telas inferior e superior e espaçadores. Para a determinação das perdas de MS, utilizou-se a equação descrita a seguir, segundo Jobim et al. (2007):

$$PMS = 100 - (MFab \times MSab) / (MFfe \times MSfe) * 100$$

em que

PMS = % de perda de matéria seca;

MFab= massa de forragem na abertura;

MSab= teor de MS na abertura;

MFfe = massa de forragem no fechamento;

MSfe = teor de MS da forragem no fechamento.

2.6 Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens

Após a abertura dos silos, uma parte das amostras foi colocada em baldes plásticos e estes foram pesados e armazenados em ambiente fechado, com temperatura controlada, para avaliação da estabilidade aeróbia. As temperaturas das silagens na pós-abertura foram obtidas por meio de Data Logger's (Impac, modelo MI-IN-D-2-L) inseridos nas massas ensiladas contidas nos baldes a uma altura de 10 cm, tendo as temperaturas sido amostradas no momento da abertura e a cada 30 minutos, durante os sete dias de aerobiose. A quebra da estabilidade aeróbia foi calculada como o tempo gasto, em horas, para a massa de silagem elevar, em 2 °C, a temperatura acima daquela do ambiente (KUNG JÚNIOR; STOKES; LIN, 2003).

2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os dados referentes à produção de metabólitos pelas cepas foram submetidos à análise dos componentes principais (*principal component analysis*, PCA), pelo software XLSTAT 7.5. Para a avaliação das características fermentativas e estabilidade aeróbia, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado e blocos ao acaso, respectivamente, com dez tratamentos e três repetições. Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância e suas médias foram comparadas, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção das cepas de BAL

O crescimento das cepas de BAL avaliadas neste estudo variaram entre 0,135 a 0,423 unidades de absorbância. Da mesma forma, a redução nos valores de pH também foi bastante variável (entre 1,18 a 2,37 unidades de pH) ao final do período de fermentação; contudo, algumas cepas de BAL não apresentaram resultado satisfatório para fatores analisados. Foi possível observar, ainda, uma correlação entre os resultados, pré-selecionando assim 65 cepas, que foram avaliadas quanto à produção de metabólitos.

Saarisalo et al. (2007), selecionando cepas de BAL para ensilagem de capim-festuca (*Festuca pratensis*) e timothy (*Phleum pratense*), observaram resultados contrários aos obtidos neste estudo. As cepas que apresentaram rápido crescimento não foram as mais efetivas na redução do pH, embora a taxa de crescimento ao final do período fermentativo tenha sido satisfatória. As cepas identificadas pelos números 4, 5, 19, 20, 23, 25, 27, 44, 74 e 75 foram descartadas do processo de seleção, pois apresentaram os menores índices de crescimento, variando entre 0,135 a 0,196, e as menores reduções nos valores de pH, de 1,18 a 1,55 (APÊNDICE, Tabela 1A).

Do total de 65 cepas de BAL avaliadas para os testes de inibição dos microrganismos deterioradores e patogênicos de referência, apenas 7,70% das cepas apresentaram relação antagonista ao microrganismo *C. perfringens* (cepas 12, 16, 17, 18 e 65), com formação de um pequeno halo de inibição com tamanhos variando entre 3 e 5 mm.

A atividade antimicrobiana das BAL está relacionada com a produção de ácidos orgânicos, particularmente os ácidos lático e acético, dióxido de carbono, etanol e peróxido de hidrogênio, mas também com a produção de bacteriocinas

(HUGAS, 1998). Esta capacidade já foi relatada em diversos trabalhos, mostrando o efeito antagonista de BAL produtoras de bacteriocinas contra diversos microrganismos patogênicos e deterioradores, como, por exemplo, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (BACH et al., 2002) e *E. coli* O157:H7 e F5 (RODRIGUEZ-PALACIOS et al., 2009).

Os ácidos orgânicos produzidos pelas BAL são produtos da fermentação de carboidratos e seus efeitos antimicrobianos podem estar relacionados com vários fatores, dentre eles: I) redução do pH do meio; II) redução do pH intracelular por entrada de ácido através da membrana celular, o que resulta em aumento do consumo de ATP celular com a finalidade de bombear para fora da célula os prótons em excesso; III) alteração da permeabilidade celular por interferência das proteínas de membrana responsáveis pelo transporte ativo de nutrientes e IV) toxicidade celular observada pelo acúmulo de compostos alcalinos no interior da célula (AXELSSON, 2004).

Crandall e Montville (1993) relataram a inibição de *C. botulinum* por cepas de *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* e *Lactobacillus plantarum*. Já Bromberg et al. (2006) relataram a inibição de *C. perfringens* pela bacteriocina isolada de *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae*.

Contudo, os resultados obtidos neste estudo divergem dos encontrados na literatura, pois as cepas de BAL avaliadas não apresentaram atividade antimicrobiana sobre *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli* e leveduras. Hernández, Cardelle e Zárate (2008) relataram que as bacteriocinas produzidas por BAL são ativas apenas contra espécies de bactérias gram-positivas e alguns esporos, dentre eles importantes patógenos de veiculação alimentar, como *L. monocytogenes*, *C. botulinum*, *B. cereus* e *Staphylococcus aureus*, não afetando as gram-negativas, como microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, além de bolores e leveduras.

Em 2007, foi avaliada, por Albano et al., a atividade inibitória de 226 estirpes de BAL contra os agentes *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. coli O157:H7*, *E. fecalis*, *Salmonella typhimurium* e *S. enteritidis*. Deste estudo, concluiu-se que, entre elas, 14 estirpes demonstraram atividade contra *L. innocua* e *L. monocytogenes*. Destas, duas eram também ativas contra *S. aureus* e *Enterococcus faecalis* e outras duas, apenas contra *S. aureus*, evidenciando, assim, que não são todas as estirpes de BAL que têm atividade antagônica frente a microrganismos patogênicos.

Com base nos resultados citados, pode-se concluir que os testes de inibição não foram bons parâmetros para a seleção das cepas. Desse modo, todas as cepas foram avaliadas quanto à produção de metabólitos em extrato aquoso de milho.

Foram observadas diferenças quanto à produção dos metabólitos entre as cepas avaliadas. As cepas apresentaram produções de ácido láctico que variaram entre 0,16 a 0,62 g L⁻¹, enquanto produções de ácido acético variaram entre 0,10 a 0,22 g L⁻¹. Todas as cepas de BAL avaliadas produziram pequenas quantidades de ácido propiônico que variaram de 0,06 a 0,12 g L⁻¹, entretanto, a cepa 06 se destacou pela alta produção de ácido propiônico (0,22 g L⁻¹) e também de ácido acético (0,25 g L⁻¹). Esta combinação apresenta efeito sinérgico capaz de reduzir o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, podendo elevar a estabilidade aeróbia da silagem (MOON, 1983). Com relação à produção de etanol, todas as cepas apresentaram baixa produtividade (0,02 a 0,05 g L⁻¹), com exceção da cepa 65, que apresentou produtividade em torno de 0,81 g L⁻¹ (APÊNDICE, Tabela 1B).

Essas diferenças na produção dos metabólitos entre as cepas são reflexos do metabolismo adotado por elas. As BAL podem ser classificadas como homofermentativas, que produzem quase que exclusivamente ácido láctico e heterofermentativas que, além da produção do ácido láctico, também produzem

ácido acético, etanol e dióxido de carbono como produtos da fermentação de hexoses e pentoses (AXELSSON, 2004).

Na análise de componentes principais (Gráfico 1), os dois primeiros componentes (PC1 e PC2) explicam 54,03% da variância total. No quadrante inferior direito, isolados, como 28, 30, 31, 32, 33, 39, 42, 43, 45, 46, 47, 49, 50 e 53, foram caracterizados pela produção de ácido lático. Os isolados 06, 11, 14, 15, 22, 34, 35, 37, 38, 40, 41 e 51 (quadrante superior esquerdo) foram relacionados com a presença de ácido acético e os isolados 48, 54, 62, 68 e 69 foram caracterizados pela produção de ácido propiônico. No quadrante inferior esquerdo, os isolados 55, 56, 57, 60, 63, 66, 67 e 71 foram relacionados com a presença de etanol, que é indesejada na silagem.

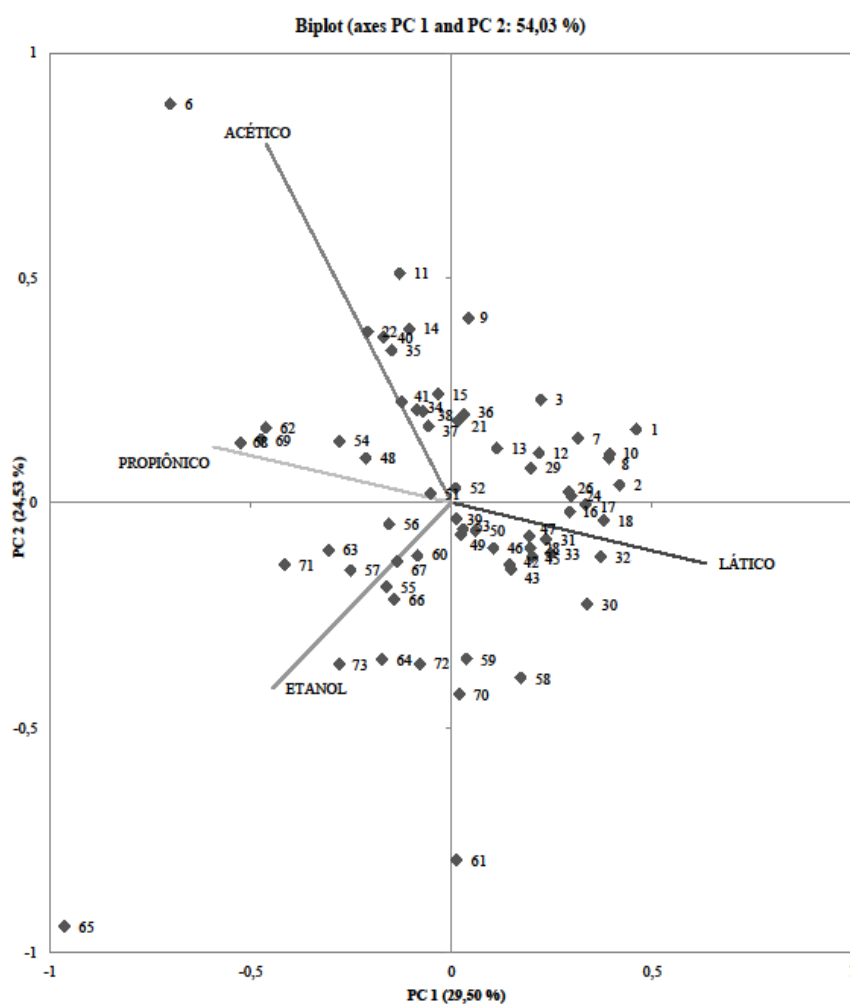


Gráfico 1 Análise de componentes principais dos produtos do metabolismo das BAL avaliadas

Os isolados presentes no quadrante superior direito não se correlacionaram com nenhum dos metabólitos desejáveis na silagem, sendo descartados no processo de seleção de cepas. Maiores concentrações de ácido lático são desejáveis para uma redução mais eficiente do pH das silagens, entretanto, segundo Moon (1983), os ácidos acético e propiônico têm

comprovada eficiência no controle de fungos filamentosos e leveduras, que são os principais microrganismos envolvidos na deterioração aeróbia. Danner et al. (2003), Filya, Sucu e Karabulut (2006) e Filya e Sucu (2010) relataram a eficiência dos ácidos acético e propiônico na inibição dos microrganismos de deterioração aeróbia.

As cepas associadas com o aumento da produção de ácido láctico (8, 47, 52, 70), ácido acético (6, 11 e 68) e ácido propiônico (6, 11, 51, 52, 68, 70 e 73) e aquelas que produziram níveis mais baixos de etanol (8, 52 e 73) foram escolhidas para serem avaliadas em silos experimentais de PVC.

3.2 Perfil fermentativo das silagens

3.2.1 Composição química

Os valores de pH e os teores de MS, PB, CHO, FDN e perda de MS não foram influenciados ($p > 0,05$) pela inoculação das cepas de BAL, apresentando valores semelhantes nas diferentes silagens avaliadas (Tabela 1). Entretanto, essas variáveis apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) com relação às modificações temporais ao final da fermentação, com exceção dos teores de PB, nos quais não foram observadas diferenças significativas entre os tempos de fermentação.

Tabela 1 Composição química do milho fresco e das silagens inoculadas com as cepas de BAL, após 60 dias de fermentação

Variável	Tempo (dias)		Média	P		
	0	60		Trat.	Tempo	Trat. x Tempo
pH	4,19 ^a	4,07 ^b	4,13	0,251	0,043	0,234
Matéria seca (g kg ⁻¹)	355,94 ^a	342,30 ^b	349,12	0,956	0,000	0,983
Concentração (g kg ⁻¹ MS):						
Proteína bruta	69,15	69,87	69,51	0,561	0,625	0,691
Carboidratos solúveis em água	68,17 ^a	6,34 ^b	37,26	0,640	0,000	0,488
Fibra em detergente neutro	569,20 ^b	585,61 ^a	577,41	0,167	0,025	0,546
Perda de MS (% MS)	0,00 ^b	5,53 ^a	2,77	0,872	0,000	0,872

Médias com letras diferentes nas colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-Knott

O teor de MS do milho antes da ensilagem, bem como as concentrações de PB, CHO e FDN, apresentou valores compatíveis com os encontrados na literatura, tendo a composição química do milho indicado que a cultura foi colhida no estágio ideal de maturidade dos grãos ($355,94 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$), conforme relatado por Filya (2004). Os carboidratos solúveis em água são considerados substratos essenciais ao crescimento das BAL, para que se possa obter uma fermentação adequada (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Dessa maneira, baixos níveis de CHO podem restringir o crescimento das BAL. A concentração média de CHO na planta de milho foi de $68,17 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, sendo, portanto, um valor superior ao mínimo necessário ($60 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$) para uma fermentação eficiente (JAAKKOLA; HUHTANEN; HISSA, 1991).

Com o processo fermentativo, houve significativa redução ($p < 0,05$) nos valores médios do pH (de 4,19 para 4,07), MS (de $355,94 \text{ g kg}^{-1}$ para $342,30 \text{ g kg}^{-1}$) e também nos teores de CHO, que reduziram de $68,17 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ para valores próximos de $6 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$. A redução destas variáveis após a fermentação também foi relatada por Filya e Sucu (2010), avaliando o efeito de diferentes cepas de BAL, sozinhas ou combinadas em silagem de milho.

Nas condições deste experimento, os valores iniciais de pH foram considerados baixos quando comparados com os resultados relatados por Muck (2004), Nkosi et al. (2009) e Li e Nishino (2011).

Em contrapartida, os teores de FDN e perda de MS sofreram um significativo aumento ($p < 0,05$) após o período de fermentação, variando, respectivamente, de 569,20 para 585,61 $\text{g kg}^{-1} \text{ MS}$ e de 0% para 5,53%. Os conteúdos de FDN obtidos neste estudo após 60 dias de fermentação concordam com os obtidos por Filya e Sucu (2010), embora os autores tenham relatado uma diminuição após o período fermentativo. Segundo Ávila et al. (2008), aumentos na fração fibrosa do material ensilado em relação ao material original podem ser observados como resultado de perdas de MS na forma de gases, em razão da

fermentação alcoólica por leveduras. Segundo Van Soest (1994), o teor de FDN representa a fração fibrosa da forragem, sendo inversamente proporcional ao consumo de MS, em que altas concentrações de FDN resultam em baixo potencial de consumo pelos animais. Conforme o autor, este fato pode ser minimizado pelo processamento do alimento por meio de uma picagem bem feita.

Para as concentrações de ácido láctico e acético, foram observadas interações significativas entre os fatores tratamento e tempo de fermentação (Tabela 2), em que houve um significativo aumento ($p < 0,05$) nas concentrações destes metabólitos, sendo as silagens inoculadas com as cepas 08, 47 e 70 as que se destacaram pela maior produção de ácido láctico, com, respectivamente, 69,49; 55,11 e 62,99 g kg⁻¹ MS e aquelas inoculadas com as cepas 08, 11, 68 e 73, tiveram destaque pela elevada produção de ácido acético, metabolizando, respectivamente, 7,20; 10,47; 7,29 e 7,07 g kg⁻¹ MS.

Nas condições deste experimento, as concentrações dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico, além do teor de etanol, na forragem fresca estiveram acima dos níveis relatados por Filya (2004).

Tabela 2 Características fermentativas do milho fresco e das silagens inoculadas com as cepas de BAL, após 60 dias de fermentação

Variável (g kg ⁻¹ MS)	Tempo (dias)	Tratamentos										P		
		Controle	6	8	11	47	51	52	68	70	73	Trat.	Tempo	Trat. x Tempo
Ácido lático	0	7,63	10,47	11,10	9,50	7,83	8,71	7,64	7,93	7,59	10,91	0,014	0,000	0,026
	60	29,72 ^b	47,18 ^b	69,49 ^a	41,21 ^b	55,11 ^a	47,37 ^b	50,83 ^b	30,80 ^b	62,99 ^a	44,13 ^b			
Ácido acético	0	1,54	2,73	2,55	2,49	1,55	1,70	1,81	2,09	2,00	2,55	0,001	0,000	0,054
	60	3,25 ^c	5,83 ^c	7,20 ^b	10,47 ^a	5,12 ^c	4,62 ^c	4,95 ^c	7,29 ^b	5,78 ^c	7,07 ^b			
Ácido propiónico	0	3,63	4,26	4,57	3,56	3,69	3,93	4,07	4,20	3,25	4,47	0,297	0,069	0,257
	60	2,61	3,78	6,19	4,49	5,40	4,60	4,50	4,36	5,88	3,79			
Ácido butírico	0	1,67	0,88	1,28	1,28	1,46	1,52	1,51	1,78	0,81	1,52	0,689	0,150	0,489
	60	0,78	0,58	2,22	2,19	1,16	0,44	0,41	0,56	0,84	0,74			
Etanol	0	9,70	9,10	9,67	11,94	9,75	9,80	11,34	9,75	7,99	12,61	0,323	0,000	0,191
	60	18,39	26,60	42,38	27,48	31,84	29,32	33,33	23,12	38,26	25,42			

Médias com letras diferentes diferem ($p < 0,05$) estatisticamente nas colunas, pelo teste de Scott-Knott

Bach et al. (2005), avaliando os efeitos da inoculação de silagem de milho com o microrganismo *L. buchneri* (heterofermentativo), observaram relativo aumento nas concentrações de ácido acético, enquanto a concentração de ácido lático foi reduzida concomitantemente. Essas diferenças nas concentrações dos ácidos acético e lático podem ser atribuídas às altas perdas de MS pela produção de CO₂ e maiores valores de pH nas silagens inoculadas com cepas heterofermentativas (DRIEHUIS; ELFERINK; VAN WIKSELAAR, 1999). As silagens inoculadas com as cepas 11, 68 e 73 produziram elevadas concentrações de ácido acético, entretanto, a concentração de ácido lático não foi significativamente alta, comparando-se com as demais silagens (Tabela 2), o que pode caracterizar estas cepas como heterofermentativas, conforme reportado por Mari et al. (2009), segundo os quais, BAL heterofermentativas apresentam elevadas concentrações dos ácidos lático e acético. Filya e Sucu (2010) e Ranjit, Taylor, Kung Júniorr (2002) relataram que o uso de inoculantes contendo BAL heterofermentativas aumenta a estabilidade aeróbia, em função do incremento na concentração de ácido acético que inibe o crescimento dos principais microrganismos de deterioração aeróbia.

Um aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações médias de ácido propiônico em todos os tratamentos foi observado, entretanto, nos tratamentos controle e inoculados com as cepas 6 e 73, uma redução na concentração deste ácido foi observada após o período de fermentação, embora os valores encontrados sejam superiores aos relatados por Filya (2004) e Filya e Sucu (2010). No entanto, os resultados obtidos assemelham-se aos encontrados por Li e Nishino (2011), em silagem de milho inoculada com *L. buchneri*, após 120 dias de fermentação. Elferink, Krooneman e Gottschal (2001) relataram que as altas concentrações dos ácidos acético e propiônico em silagens estão relacionadas ao metabolismo de *L. buchneri*, que tem capacidade de converter o ácido lático em ácido acético, etanol e 1,2-propanediol, sendo este último

subproduto do metabolismo de *L. buchneri* utilizado por *L. diolivorans* e convertido em ácido propiônico e 1-propanal (KROONEMAN et al., 2002).

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ou entre os tempos de amostragem para a concentração de ácido butírico, entretanto, a média dos valores observados para a forragem fresca (1,37 g kg⁻¹ MS) e após 60 dias de fermentação (1,00 g kg⁻¹ MS) estiveram acima dos valores recomendados por Kung Júnior e Shaver (2001), para se obter silagens bem preservadas. Silagens com concentrações de ácido butírico acima de 0,1 g kg⁻¹ MS indicam que uma possível fermentação clostridiana possa ter ocorrido (NKOSI et al., 2009).

Um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de etanol foi notado ao final de 60 dias de fermentação. Entretanto, não houve diferenças ($p > 0,05$) entre as silagens avaliadas, embora os tratamentos inoculados com as cepas 08, 47, 52 e 70 tenham se destacado em virtude da elevada produção de etanol. Além disso, no tratamento controle, uma menor concentração de etanol foi observada frente aos tratamentos inoculados. Wood e Holzapfel (1995) relataram que cepas heterofermentativas são capazes de fermentar hexoses e pentoses, pela via pentose fosfato, produzindo os ácidos lático e acético, além de etanol e dióxido de carbono. Dessa maneira, as cepas que produziram elevados teores de etanol podem ser BAL heterofermentativas.

3.2.2 População de microrganismos

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos para as contagens de leveduras, fungos filamentosos, enterobactérias, *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. (Gráfico 2), apresentando contagens semelhantes nos diferentes tratamentos avaliados. No entanto, houve efeito significativo ($p < 0,05$) com relação às modificações temporais, apontando

que as populações destes microrganismos sofreram variações ao longo da fermentação. Com o processo fermentativo houve significativa redução nas contagens de leveduras ($p = 0,00$), fungos filamentosos ($p = 0,00$) e enterobactérias ($p = 0,00$), o que, conforme dados reportados por Nishino (2011), se justifica devido ao fato de as concentrações dos ácidos láctico, acético e propiônico encontradas serem superiores às concentrações mínimas inibitórias (CMI) contra estes microrganismos que são indesejáveis na silagem. Nishino (2011) relatou que a CMI de ácido láctico contra leveduras e fungos filamentosos é de 50 g L^{-1} , o que equivale a $115 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, em silagens com conteúdo de matéria seca em torno de 300 g kg^{-1} . Para os ácidos acético e propiônico, a CMI frente aos mesmos microrganismos deterioradores é cerca de 10 a 20 vezes inferior que a do ácido láctico, evidenciando, assim, o maior efeito antagonista dos ácidos acético e propiônico, quando comparados com o ácido láctico. Moon (1983) relataram que, durante o processo de ensilagem, há um efeito sinérgico dos ácidos láctico, acético e propiônico contra leveduras e fungos filamentosos. Segundo Driehuis e Elferink (2000), no processo de ensilagem, a presença de enterobactérias pode ser minimizada por fermentações aceleradas em que há uma queda rápida no pH, o que explica os resultados obtidos.

Um aumento significativo na população de *Bacillus* spp. ($p = 0,00$) e *Clostridium* spp. ($p = 0,002$) foi observado após 60 dias de fermentação, o que, possivelmente, está relacionado ao fato de estes microrganismos serem anaeróbios facultativos e anaeróbios, respectivamente. Sendo assim, as condições anaeróbicas não representam fator limitante ao crescimento destes microrganismos. Além disso, eles têm a capacidade de esporular sob condições adversas. Desse modo, provavelmente, estes microrganismos cresceram no início do processo de fermentação e sobreviveram na forma de esporos.

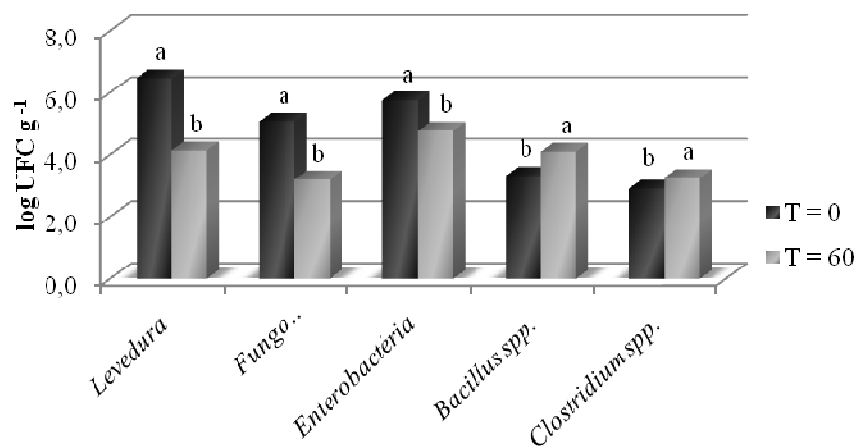


Gráfico 2 Contagem de microrganismos no milho fresco e nos tratamentos inoculados, após 60 dias de fermentação

Médias com letras diferentes dentro de uma mesma variável diferem ($p < 0,05$) estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott.

Microrganismos do gênero *Bacillus* são capazes de fermentar uma grande variedade de carboidratos a ácidos orgânicos, etanol, 2,3-butanodiol e glicerol. Além de esses compostos não terem efeito na preservação da silagem, essas bactérias ainda competem com as BAL pelos carboidratos (GIFFEL et al., 2002). A presença de *Clostridium* spp. nas silagens avaliadas possivelmente ocorreu em áreas com início de deterioração aeróbia, visto que as condições químicas da silagens (MS acima de 30% e pH reduzido) foram desfavoráveis ao crescimento deste microrganismo, conforme reportado por Borreani, Tabacco e Colombari (2002). A presença de *Clostridium* spp. justifica-se, ainda, pela concentração de ácido butírico encontrada ser superior $0,1 \text{ g kg}^{-1}$ MS, conforme reportado por Nkosi et al. (2009).

Rossi e Dellaglio (2007), analisando a qualidade de silagens na Itália, também verificaram a presença de *Clostridium* spp. em silagens de milho e alfafa. No entanto, as maiores contagens foram observadas nas silagens de milho.

A adição dos inoculantes influenciou significativamente ($p < 0,05$) a população de BAL durante o período fermentativo, com interação significativa entre os fatores (Gráfico 3). Analisando-se o desdobramento do fator tratamento dentro do tempo de fermentação, diferenças entre os tratamentos no T = 0 de fermentação (milho fresco) não foram observadas, entretanto, após 60 dias de fermentação (T = 60), a população de BAL diferiu significativamente, sendo maior nas silagens inoculadas com as cepas 6, 11, 68 e 73. Em todas as silagens avaliadas e no tratamento controle, observou-se redução na população de BAL após o período de fermentação, com exceção do tratamento 11, em que o oposto foi verificado. Uma redução na população de BAL, após 120 dias de fermentação, também foi relatada por Li e Nishino (2011), avaliando os efeitos da inoculação de *L. rhamnosus* e de *L. buchneri* em silagens de milho.

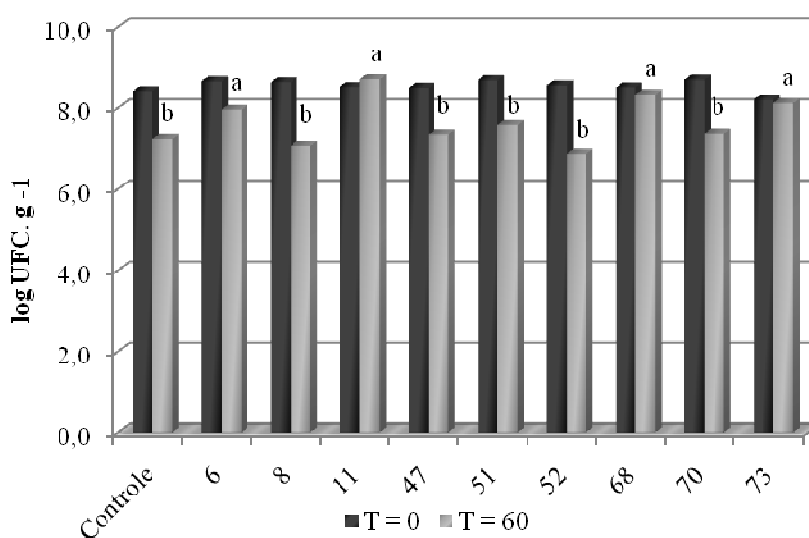


Gráfico 3 Contagens de BAL nos diferentes tratamentos com silagem de milho, em função do tempo de fermentação
Médias com letras diferentes nas colunas diferem ($p < 0,05$) estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott

Foi avaliada a presença ou ausência de *Listeria* spp. conforme recomendações da RDC nº 12 da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). A presença de *Listeria* spp. foi detectada no milho fresco (T = 0) e, após o período de fermentação, nos tratamentos controle e nas silagens inoculadas com as cepas 11, 47, 52, 68, 70 e 73 (Tabela 3).

Segundo Elferink, Krooneman e Gottschal (2001), o crescimento e a sobrevivência de *Listeria* spp. na silagem são determinados pelo grau de anaerobiose e o pH da mesma. Essas bactérias podem tolerar valores de pH de 3,8 a 4,2 por longos períodos se o oxigênio estiver presente, mesmo que em baixos níveis, fato este que pode ter contribuído para a manutenção de *Listeria* spp. nos tratamentos acima citados. Avaliando a presença de *Listeria* spp., Vilar et al. (2007) detectaram este microrganismo em 33,7% das amostras de silagem, sendo que a espécie *L. monocytogenes* estava presente em 6% dessas amostras.

Os resultados deste estudo concordam com os relatados por Konosonoka et al. (2012), que também isolaram *L. ivanovii*, *L. innocua* e *L. seeligeri* em 9,2% das amostras de silagem avaliadas, ao passo que *L. monocytogenes* foi isolada em 20% das amostras.

Tabela 3 Identificação de *Listeria* spp. no milho e na silagem, após 60 dias de fermentação

Tempo	Tratamento	Morfotipo	Catalase	Motilidade	Gram	Identificação API
0	Controle	1	+	+	+	<i>L. monocytogenes/</i> <i>L. innocua</i>
		2	+	+	+	<i>L. seeligeri/L. welshimeri</i>
60	Controle	1	+	+	+	<i>L. monocytogenes/L. innocua</i>
		2	+	+	+	<i>L. monocytogenes/L. innocua</i>
	6	1	+	-	+	NI
		2	+	-	+	NI
	8	1	+	-	-	NI
		2	+	-	-	NI
	11	1	+	+	+	<i>L. monocytogenes/L. innocua</i>
		2	+	+	+	<i>L. monocytogenes/L. innocua</i>
	47	1	+	+	+	<i>L. monocytogenes/L. innocua</i>
		2	+	+	+	<i>L. monocytogenes/L. innocua</i>
	51	1	+	-	+	NI
		2	+	-	+	NI
	52	1	+	+	+	<i>L. monocytogenes/L. innocua</i>
		2	+	+	+	<i>L. seeligeri/L. welshimeri</i>
	68	1	+	+	+	<i>L. monocytogenes/L. innocua</i>
		2	+	+	+	<i>L. monocytogenes/L. innocua</i>
	70	1	+	+	+	<i>L. seeligeri/L. welshimeri</i>
		2	+	+	+	<i>L. seeligeri/L. welshimeri</i>
	73	1	+	+	+	<i>L. monocytogenes/L. innocua</i>
		2	+	+	+	<i>L. ivanovii</i>

NI – Não identificado

3.3 Avaliação da estabilidade aeróbia

A elevação da temperatura da massa da silagem controle e de todos os tratamentos iniciou-se após, aproximadamente, 6 horas de exposição ao ar (Gráfico 4).

Não houve diferenças significativas ($p>0,05$) entre os valores de temperatura máxima (T_m) alcançada e o tempo necessário para atingir a mesma nos diferentes tratamentos. Entretanto, as silagens inoculadas com as cepas 11, 47, 52, 68 e 73 foram os que apresentaram as menores temperaturas (Gráfico 5). Todavia, avaliando-se o tempo necessário para atingir a T_m , constatou-se que os tratamentos controle, 11 e 68 foram os que resistiram por um período maior até que T_m fosse alcançada, aproximadamente 90 horas.

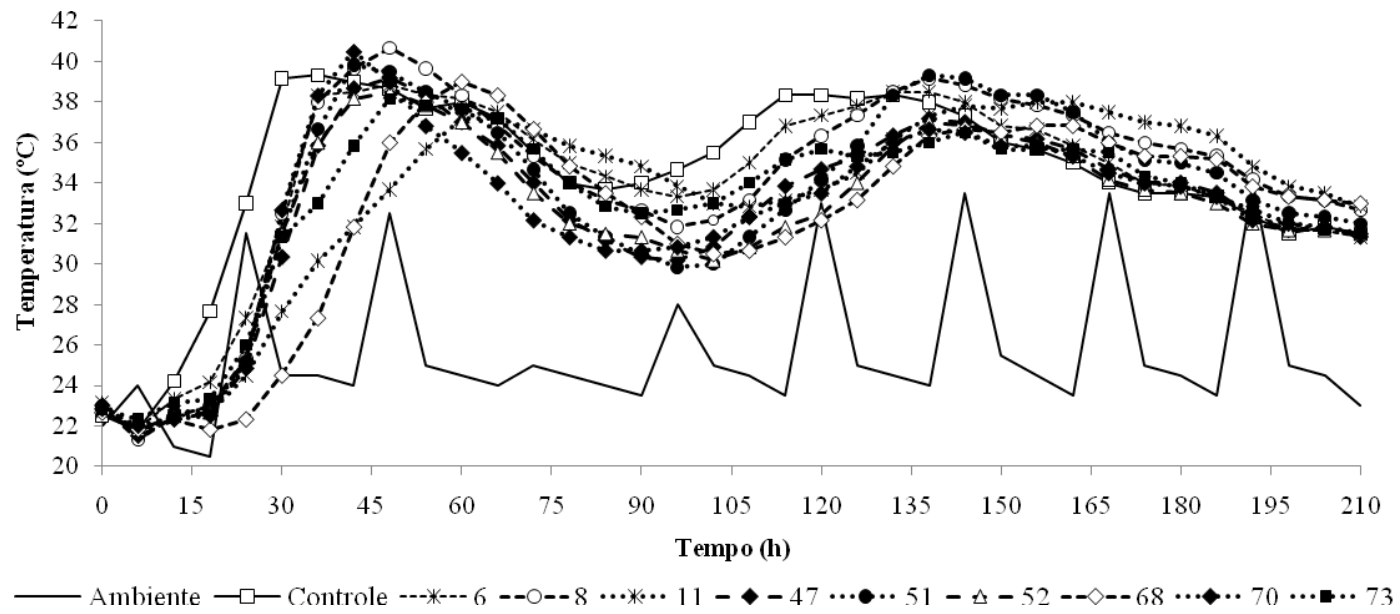


Gráfico 4 Variação da temperatura durante a exposição aeróbia das silagens controle e inoculadas com as cepas de BAL

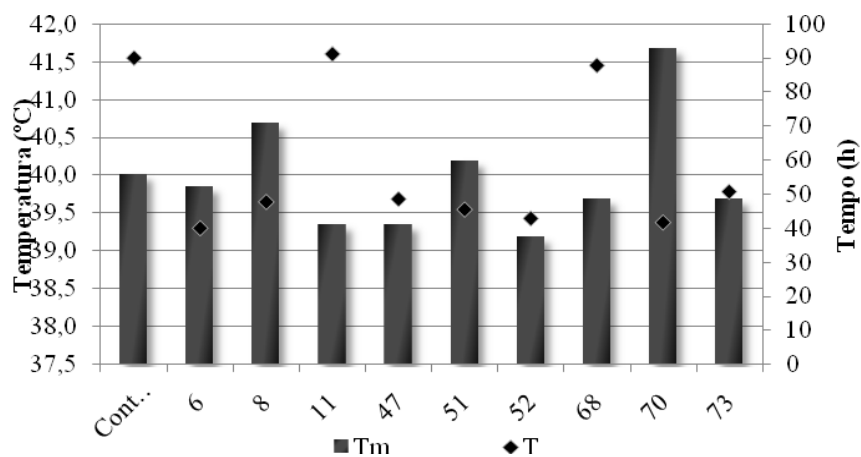


Gráfico 5 Temperatura máxima alcançada (T_m) e o tempo necessário para alcançá-la (T), nos diferentes tratamentos, após 7 dias de exposição aeróbia

Diferenças significativas ($p > 0,05$) para os dados de quebra da estabilidade aeróbia não foram observadas, porém, os tratamentos inoculados com as cepas de BAL obtiveram melhores resultados que aquele observado no controle (Gráfico 6), ressaltando, assim, a importância da inoculação com BAL em silagens de milho. Ranjit e Kung Júnior (2000), avaliando a deterioração aeróbia de silagem de milho, observaram quebra da estabilidade com 26,5 e 33 horas na silagem controle e inoculada com *L. plantarum*, respectivamente. Todavia, os tratamentos 11, 68 e 70 tiveram destaque, pois foram necessárias, respectivamente, 28, 31 e 24 horas para que a temperatura da massa ensilada atingisse 2 °C acima da temperatura ambiente.

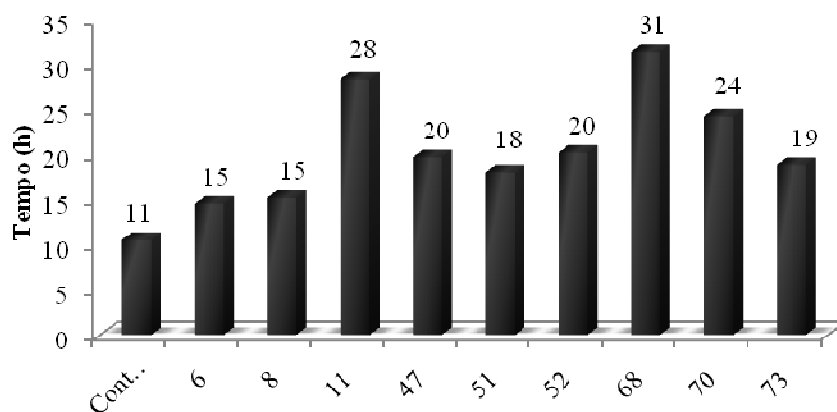


Gráfico 6 Quebra da estabilidade aeróbia dos diferentes tratamentos inoculados com cepas de BAL

Sendo assim, as silagens inoculadas com as cepas 11 e 68 foram as que apresentaram os melhores resultados após o tempo de exposição aeróbia, indicando menor deterioração aeróbia por microrganismos em função das menores T_m alcançadas, pois, segundo Taylor e Kung Júnior (2002), o desenvolvimento de microrganismos de deterioração aeróbia, como fungos e leveduras, leva a um aumento na temperatura da massa ensilada.

Ranjit e Kung Júnior (2000) realizaram um experimento com a inoculação de silagem de milho com cepas de BAL homofermentativas (*L. plantarum*) e homofermentativas mais heterofermentativas (*L. buchneri*), concluindo que, para essa silagem, a adição de cepas de *L. buchneri* determinou a melhor estabilidade aeróbia.

4 CONCLUSÃO

Com o método de pré-seleção empregado neste estudo foi possível selecionar rapidamente cepas de BAL que melhor se adaptaram à cultura do milho e apresentaram elevadas taxas de crescimento, eficiência na queda dos valores do pH do meio e um melhor perfil fermentativo.

A inibição de microrganismos patogênicos não correspondeu a um bom parâmetro para selecionar as BAL, entretanto, as características fermentativas das cepas, quando inoculadas em extrato aquoso, mostrou ser um bom método para ser utilizado em processos de seleção de BAL para ensilagem.

A inoculação das cepas de BAL em silagem de milho não resultou em diferenças no valor nutritivo e na população dos microrganismos patogênicos e deterioradores. Entretanto, em função do caráter fermentativo e com as melhorias alcançadas após a exposição aeróbia, as cepas 11 e 68 são consideradas fontes promissoras para serem utilizadas como inoculantes em silagem de milho e estudos posteriores para identificar e avaliar a eficiência dessas cepas em silos de grande escala são necessários.

REFERÊNCIAS

ALBANO, H. et al. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from Alheiras (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays. **Meat Science**, Barking, v. 76, n. 4, p. 796–800, Aug. 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**: volume 1. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990.

ÁVILA, C. S. et al. Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 255-261, Mar. 2008.

AXELSSON, L. T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Ed.). **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 2004.

BACH, A. et al. Effectiveness of *Lactobacillus buchneri* to improve aerobic stability and reducing mycotoxin levels in maize silages under field conditions. In: PARK, R. S.; STRONGE, M. D. (Ed.). **SILAGE PRODUCTION AND UTILIZATION PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE**, 19., 2005, Belfast. **Anais...** Belfast: Northern Ireland, 2005.

BACH, S. J. et al. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in barley silage: effect of a bacterial inoculant. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 288–294, Aug. 2002.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 1-54, jan. 2001.

BROMBERG, R. et al. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis ssp. hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 135-144, jan./mar. 2006.

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

CRANDALL, A. D.; MONTVILLE, T. J. Inhibition of *Clostridium botulinum* growth and toxigenesis in a model gravy system by co inoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 6, p. 485-488, June 1993.

DANNER, H. et al. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 562-567, Jan. 2003.

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

DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S. W. J. H. O.; VAN WIKSELAAR, P. G. *Lactobacillus buchneri* improves aerobic stability of laboratory and farm scale whole crop maize silage but does not affect feed intake and milk production of dairy cows. In: PAULY, T. et al. (Ed.). PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 12., 1999, Swedish. **Anais...** Sweden: University of Agricultural Sciences, 1999. p. 264-265.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 350-356, Mar. 1956.

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

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, jul./dez. 2008.

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

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

FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effects of *Propionibacterium acidipropionici* and *Lactobacillus plantarum*, applied at ensiling, on the fermentation and aerobic stability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 33, n. 5, p. 353-358, May 2006.

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

GOLLOP, N.; ZAKIN, V.; WEINBERG, Z. G. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 3, p. 662-666, Sept. 2005.

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

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

HERNÁNDEZ, D.; CARDELLE, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bactriocin-like. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 120-127, July 2008.

HITCHINS, A. D.; JINNEMAN, K. BAM: detection and enumeration of *listeria monocytogenes* in foods. **Bacteriological Analytical Manual**, Chapter, n. 10, Apr. 2011.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HUGAS, M. Bacteriogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, Barking, v. 49, n. 1, p. 139-150, Mar. 1998.

JAAKKOLA, S.; HUHTANEN, P.; HISSA, K. The effect of cell wall degrading enzymes or formic acid fermentation quality on digestion of grass silage by cattle. **Grass Forage Science**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 75-87, Mar. 1991.

JOBIM, C. C. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, supl., p. 101-119, jul. 2007.

KANG, D. H.; FUNG, D. Y. Effect of diacetyl on controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. **Journal of food Protection**, Des Moines, v. 62, n. 9, p. 975-979, Sept. 1999.

KONOSONOKA, I. H. et al. Incidence of *Listeria* spp. in Dairy Cows Feed and Raw Milk in Latvia. **International Scholarly Research Network: veterinary science**, New York, v. 2012, p. 1-5, 2012.

KROONEMAN, J. et al. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, n. 2, p. 639-646, Mar. 2002.

KUNG JÚNIOR, L.; SHAVER, R. Interpretation of silage fermentation analysis report. University of Wisconsin, Madison. **Focus on Forage, Wisconsin**, v. 3, n. 1, p. 1-5, Jan. 2001.

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

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

MARI, L. J. et al. An evaluation of the effectiveness of *Lactobacillus buchneri* 40788 to alter fermentation and improve the aerobic stability of corn silage in farm silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 3, p. 1174-1176, Mar. 2009.

MC FADDIN, J. F. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. Buenos Aires: Panamericana, 1984.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **Biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe, 1991.

MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 454–460, Mar. 1983.

MUCK, R. E. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, St. Joseph, v.47, n. 4, p. 1011-1016, 2004.

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 1, p. 183-191, Jan. 2010.

NISHINO, N. Aerobic stability and instability of silages caused by bacteria. In: DANIEL, J. L. P.; ZOPOLLATTO, M.; NUSSIO, L. G. (Ed.). **PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION**, 2., 2011, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2011. p. 127-141.

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

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

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

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 4, p. 1063-1073, Apr. 1993.

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

RANJIT, N. K.; TAYLOR, C. C.; KUNG JÚNIOR, L. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 73-81, June 2002.

RODRIGUEZ-PALACIOS, A. et al. Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157 and F5. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, n. 2, p. 393-401, Feb. 2009.

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

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

SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F.; REIS, R. A. Instabilidade Aeróbia de Silagens: Efeitos e Possibilidades de Prevenção. In: REIS, R. A.; SIQUEIRA, G. R.; BERTIPAGLIA, L. M. A. (Ed.). **Volumosos na produção de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2005. p. 25-60.

TAYLOR, C. C.; KUNG JÚNIOR, L. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 6, p. 1526-1532, June 2002.

VAN SOEST, P. J. **Nutrition ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994.

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

WEESE, J. S.; ROUSSEAU, J. Evaluation of *Lactobacillus pentosus* WE7 for prevention of diarrhea in neonatal foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 226, n. 12, p. 2031–2034, June 2005.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1995.

ZOPOLLATTO, M. et al. Biometric relations between maturity stage and productivity of corn cultivars for silage production. **Brazilian Journal of Animal Science**, Amsterdam, v. 38, n. 2, p. 256-264, Feb. 2009.

APÊNDICES

Tabela 1A Avaliação do crescimento das cepas de BAL inoculadas no extrato aquoso e redução nos valores de pH

Identificação das cepas de BAL	Codificação	Crescimento (absorbância)	Redução do pH
1	UFLA SLM 01	0,343	2,37
2	UFLA SLM 02	0,308	2,23
3	UFLA SLM 03	0,215	1,77
4	UFLA SLM 04	0,182	1,53
5	UFLA SLM 05	0,168	1,49
6	UFLA SLM 06	0,149	1,78
7	UFLA SLM 07	0,313	2,21
8	UFLA SLM 08	0,314	2,32
9	UFLA SLM 09	0,280	2,03
10	UFLA SLM 10	0,315	2,22
11	UFLA SLM 11	0,217	1,55
12	UFLA SLM 12	0,350	2,26
13	UFLA SLM 13	0,214	1,71
14	UFLA SLM 14	0,406	2,06
15	UFLA SLM 15	0,263	1,69
16	UFLA SLM 16	0,357	2,12
17	UFLA SLM 17	0,360	2,20
18	UFLA SLM 18	0,351	2,27
19	UFLA SLM 19	0,135	1,52
20	UFLA SLM 20	0,195	1,46
21	UFLA SLM 21	0,251	1,65
22	UFLA SLM 22	0,218	1,56
23	UFLA SLM 23	0,196	1,51
24	UFLA SLM 24	0,265	2,14
25	UFLA SLM 25	0,170	1,55
26	UFLA SLM 26	0,333	2,18
27	UFLA SLM 27	0,143	1,51
28	UFLA SLM 28	0,351	2,25
29	UFLA SLM 29	0,297	2,20
30	UFLA SLM 30	0,321	2,22
31	UFLA SLM 31	0,288	2,17
32	UFLA SLM 32	0,315	2,28
33	UFLA SLM 33	0,347	2,20
34	UFLA SLM 34	0,306	2,12
35	UFLA SLM 35	0,237	1,89
36	UFLA SLM 36	0,249	1,97
37	UFLA SLM 37	0,326	2,13
38	UFLA SLM 38	0,273	1,93
39	UFLA SLM 39	0,290	2,00

Tabela 1A, continuação

40	UFLA SLM 40	0,239	1,79
41	UFLA SLM 41	0,203	1,75
42	UFLA SLM 42	0,334	2,21
43	UFLA SLM 43	0,371	2,13
44	UFLA SLM 44	0,143	1,55
45	UFLA SLM 45	0,295	2,24
46	UFLA SLM 46	0,363	2,20
47	UFLA SLM 47	0,353	2,22
48	UFLA SLM 48	0,348	2,19
49	UFLA SLM 49	0,331	2,17
50	UFLA SLM 50	0,423	2,17
51	UFLA SLM 51	0,383	2,19
52	UFLA SLM 52	0,326	2,15
53	UFLA SLM 53	0,395	1,85
54	UFLA SLM 54	0,391	1,84
55	UFLA SLM 55	0,293	2,05
56	UFLA SLM 56	0,359	2,02
57	UFLA SLM 57	0,383	2,10
58	UFLA SLM 58	0,353	2,19
59	UFLA SLM 59	0,368	2,17
60	UFLA SLM 60	0,335	2,16
61	UFLA SLM 61	0,400	2,03
62	UFLA SLM 62	0,335	1,96
63	UFLA SLM 63	0,380	1,99
64	UFLA SLM 64	0,357	2,04
65	UFLA SLM 65	0,397	1,93
66	UFLA SLM 66	0,373	1,89
67	UFLA SLM 67	0,338	1,61
68	UFLA SLM 68	0,404	2,06
69	UFLA SLM 69	0,383	2,02
70	UFLA SLM 70	0,412	2,21
71	UFLA SLM 71	0,369	2,09
72	UFLA SLM 72	0,391	2,14
73	UFLA SLM 73	0,393	2,09
74	UFLA SLM 74	0,159	1,28
75	UFLA SLM 75	0,143	1,18

Tabela 1B Produção de metabólitos pelas cepas de BAL inoculadas no extrato aquoso

Identificação das cepas de BAL	Codificação	Concentração (g L ⁻¹)			
		Ácido láctico	Ácido acético	Ácido propiônico	Etanol
1	UFLA SLM 01	0,55	0,19	0,06	0,03
2	UFLA SLM 02	0,54	0,17	0,08	0,03
3	UFLA SLM 03	0,36	0,19	0,08	0,03
6	UFLA SLM 06	0,47	0,25	0,22	0,05
7	UFLA SLM 07	0,51	0,18	0,09	0,03
8	UFLA SLM 08	0,56	0,18	0,09	0,03
9	UFLA SLM 09	0,24	0,21	0,08	0,03
10	UFLA SLM 10	0,55	0,18	0,08	0,02
11	UFLA SLM 11	0,30	0,21	0,11	0,03
12	UFLA SLM 12	0,42	0,18	0,09	0,03
13	UFLA SLM 13	0,40	0,17	0,11	0,03
14	UFLA SLM 14	0,25	0,20	0,11	0,03
15	UFLA SLM 15	0,25	0,19	0,10	0,03
16	UFLA SLM 16	0,42	0,16	0,08	0,03
17	UFLA SLM 17	0,49	0,17	0,08	0,03
18	UFLA SLM 18	0,50	0,17	0,08	0,03
21	UFLA SLM 21	0,28	0,18	0,10	0,02
22	UFLA SLM 22	0,17	0,20	0,11	0,03
24	UFLA SLM 24	0,50	0,17	0,08	0,02
26	UFLA SLM 26	0,49	0,18	0,08	0,03
28	UFLA SLM 28	0,36	0,17	0,08	0,03
29	UFLA SLM 29	0,49	0,19	0,08	0,03
30	UFLA SLM 30	0,48	0,15	0,08	0,03
31	UFLA SLM 31	0,48	0,17	0,09	0,03
32	UFLA SLM 32	0,53	0,17	0,07	0,03
33	UFLA SLM 33	0,50	0,17	0,08	0,05
34	UFLA SLM 34	0,22	0,20	0,08	0,04
35	UFLA SLM 35	0,20	0,22	0,08	0,03
36	UFLA SLM 36	0,34	0,20	0,07	0,03
37	UFLA SLM 37	0,22	0,20	0,08	0,03
38	UFLA SLM 38	0,24	0,20	0,08	0,03
39	UFLA SLM 39	0,19	0,17	0,08	0,03
40	UFLA SLM 40	0,18	0,22	0,07	0,03
41	UFLA SLM 41	0,20	0,21	0,08	0,04
42	UFLA SLM 42	0,38	0,17	0,08	0,03
43	UFLA SLM 43	0,38	0,17	0,08	0,03

Tabela 1B, continuação

45	UFLA SLM 45	0,47	0,18	0,08	0,03
46	UFLA SLM 46	0,53	0,17	0,11	0,03
47	UFLA SLM 47	0,62	0,18	0,10	0,03
48	UFLA SLM 48	0,30	0,19	0,12	0,03
49	UFLA SLM 49	0,49	0,18	0,11	0,04
50	UFLA SLM 50	0,55	0,18	0,11	0,03
51	UFLA SLM 51	0,51	0,19	0,12	0,03
52	UFLA SLM 52	0,55	0,19	0,11	0,03
53	UFLA SLM 53	0,46	0,18	0,10	0,03
54	UFLA SLM 54	0,21	0,20	0,11	0,03
55	UFLA SLM 55	0,18	0,16	0,11	0,03
56	UFLA SLM 56	0,29	0,18	0,11	0,03
57	UFLA SLM 57	0,17	0,17	0,11	0,03
58	UFLA SLM 58	0,53	0,16	0,09	0,03
59	UFLA SLM 59	0,53	0,16	0,11	0,03
60	UFLA SLM 60	0,51	0,19	0,11	0,03
61	UFLA SLM 61	0,16	0,10	0,11	0,03
62	UFLA SLM 62	0,18	0,21	0,11	0,03
63	UFLA SLM 63	0,16	0,18	0,10	0,03
64	UFLA SLM 64	0,21	0,16	0,10	0,03
65	UFLA SLM 65	0,20	0,18	0,11	0,81
66	UFLA SLM 66	0,30	0,18	0,09	0,03
67	UFLA SLM 67	0,52	0,19	0,11	0,03
68	UFLA SLM 68	0,20	0,21	0,12	0,03
69	UFLA SLM 69	0,16	0,22	0,10	0,03
70	UFLA SLM 70	0,61	0,17	0,11	0,03
71	UFLA SLM 71	0,22	0,19	0,11	0,03
72	UFLA SLM 72	0,55	0,17	0,11	0,03
73	UFLA SLM 73	0,34	0,17	0,12	0,03

CAPÍTULO 3

Perfil fermentativo de silagens de milho inoculadas com diferentes cepas de bactérias do ácido láctico

RESUMO

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da inoculação de nove cepas de bactérias do ácido lático nas características fermentativas, no valor nutritivo e na estabilidade aeróbia de silagens de milho. Para a avaliação do perfil bromatológico e microbiológico das silagens, os silos experimentais de PVC foram abertos com 10, 30, 60 e 90 dias de fermentação. Retiraram-se amostras para a determinação dos valores de pH e teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos solúveis totais (CHO), perdas de MS, ácido graxos voláteis (AGV), ácido lático e etanol, e também para avaliação da população de bactérias do ácido lático (BAL), fungos filamentosos e leveduras. A diversidade bacteriana nos tratamentos que apresentaram o melhor perfil fermentativo foi determinada pela técnica de PCR-DGGE e, após 90 dias de fermentação, as silagens foram submetidas à avaliação da estabilidade aeróbia e perdas de MS durante a exposição ao ar. A inoculação das cepas de BAL não influenciou a composição química das silagens, as quais apresentaram valores semelhantes para as concentrações de MS, PB, CHO, FDN e perdas de MS. Entretanto, os tratamentos 11, 68 e 73 apresentaram a maior relação entre a proporção dos ácidos lático e acético, ressaltando o caráter heterofermentativo destas cepas. Além disso, os tratamentos 11 e 73 foram os que apresentaram as menores contagens de leveduras e fungos filamentosos, tendo sido observada, no tratamento 11, menor diversidade bacteriana durante o processo fermentativo. Os tratamentos 11, 47, 68 e 73 foram os que apresentaram os melhores resultados na avaliação da estabilidade aeróbia, contudo, o tratamento 11 se destacou dos demais devido ao maior tempo necessário para atingir a temperatura máxima e também pelas menores perdas de MS observadas. Assim, a BAL inoculada no tratamento 11 é considerada fonte promissora para ser utilizada como inoculante em silagens de milho, em função das menores perdas e da maior estabilidade aeróbia que esta cepa conferiu à silagem.

Palavras-chave: Silagem de milho. Bactéria do ácido lático. Valor nutritivo. Estabilidade aeróbia.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of inoculation of nine strains of lactic acid bacteria in fermentation characteristics, nutritive value and aerobic stability of corn silage. To evaluate the microbiological and bromatological profile of silages, the experimental PVC silos were opened with 10, 30, 60 and 90 days of fermentation. Samples were taken for determination of pH values, dry matter (DM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), total soluble carbohydrates (CHO), DM losses, volatile fatty acid (VFA), lactic acid and ethanol and for the evaluation of LAB population, molds and yeasts were taken. Bacterial diversity in treatments that presented the best fermentative profile was determined by PCR-DGGE and after 90 days of fermentation the silages were subjected to evaluation of aerobic stability and DM losses during exposure to air. Inoculation of LAB strains did not influence the chemical composition of silage, which showed similar values for concentrations of DM, CP, CHO, NDF and DM losses. However, treatments 11, 68 and 73 had the highest ratio between the proportion of lactic and acetic acids, emphasizing the heterofermentative character of these strains. In addition, treatments 11 and 73 had the lowest counts of yeast and molds, whereas in treatment 11 a lower bacterial diversity was observed during the fermentation process. Treatments 11, 47, 68 and 73 presented the best results in the evaluation of aerobic stability, however, treatment 11 highlighted from others due to the longer time required to reach the maximum temperature and also by the lower DM losses observed. Therefore, the LAB inoculated in the treatment 11 were considered a promising source to be used as silage inoculant in corn silages due to the reduced losses and increased aerobic stability provided by this strain to the silage.

Keywords: Corn silage. Lactic acid bacteria. Nutritive value. Aerobic stability.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays L.*) é a planta forrageira de maior expressão para ensilagem (OLIVEIRA; SOUZA SOBRINHO; REIS, 2007). Esta cultura apresenta características adequadas para uma boa fermentação no silo, uma vez que, no momento adequado de colheita, contém quantidade relativamente alta de matéria seca (MS), baixa capacidade tampão e níveis adequados de carboidratos solúveis (CHO) para fermentação (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Apesar das características adequadas, grandes perdas de nutrientes durante a exposição ao ar são verificadas em decorrência da maior instabilidade aeróbia das silagens de milho, que ocorre em virtude da maior concentração de substratos potencialmente oxidáveis por microrganismos oportunistas (SIQUEIRA; BERNARDES; REIS, 2005). Essas perdas podem ocorrer durante todo o período de fermentação, entretanto, são mais expressivas quando o silo é aberto para fornecimento da silagem aos animais. Assim, a utilização de boas práticas de manejo e emprego de aditivos tem propiciado uma redução nas perdas de MS e do valor nutritivo das silagens (HARRISON; BLAUWIEKEL, 1994).

A utilização de inoculantes microbianos em silagens tem sido recomendada com o objetivo de aumentar a eficiência da fermentação (KUNG JÚNIOR; STOKES; LIN, 2003), proporcionando o domínio desta por bactérias do ácido lático (BAL) de grande importância na redução do pH, o que inibe o crescimento de microrganismos deterioradores (SAARISALO et al., 2007).

Pesquisas com inoculantes microbianos revelaram que o emprego de linhagens heterofermentativas em silagens têm se mostrado uma alternativa no controle da deterioração aeróbia, devido à produção de ácido acético durante a fermentação, composto este capaz de inibir o crescimento de leveduras e fungos

filamentosos, aumentando, assim, a estabilidade aeróbia das silagens inoculadas (DRIEHUIS; SPOELSTRA; COLE, 1996).

Conforme Muck (2008), um dos fatores que contribuem para uma aplicação bem sucedida dos inoculante microbianos em silagens é a compatibilidade entre a cultura forrageira e o microrganismo. Além disso, o número de células viáveis no inoculante e sua interação com a microbiota epifítica também são fatores importantes que, provavelmente, explicam a grande variação entre os resultados experimentais que resultaram da inoculação de BAL. Esta variação nos resultados de experimentos com inoculantes mostram que é importante fazer uma seleção adequada desses produtos, focando nas características da cultura a ser ensilada. Desse modo, o uso de inoculantes microbianos para ensilagem tem sido pesquisado com o objetivo de minimizar as perdas, otimizar o processo fermentativo, reduzir a deterioração aeróbia e preservar o valor nutritivo da forragem ensilada (HARRISON; BLAUWIEKEL; STOKES, 1994).

O estudo da adição destes inoculantes deve ir além da avaliação das silagens somente após um período maior de fermentação, mas também deve ser conduzido avaliando-se todo o perfil fermentativo, para, assim, conhecer as principais modificações que ocorrem durante a ensilagem. Dessa forma, é importante conhecer a diversidade de microrganismos envolvidos neste processo, pois somente dessa forma é possível intervir, com o objetivo de melhorar a qualidade da fermentação.

Sendo assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da inoculação de diferentes cepas de BAL nas características fermentativas, no valor nutritivo e estabilidade aeróbia de silagens de milho, visando selecionar aquelas que minimizem as perdas decorrentes da ensilagem para serem utilizadas como inoculantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas testadas

Para este estudo foram utilizadas nove cepas de bactérias do ácido lático (BAL), selecionadas a partir de 75 cepas previamente isoladas de silagens de cana-de-açúcar confeccionadas na região de Lavras, MG e pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras (APÊNDICE Tabela 1A). Em estudos anteriores, estas BAL apresentaram perfis indicados ao processo de ensilagem, sendo eles bom crescimento durante a fermentação, eficiência em reduzir o pH, resistência a condições ácidas, além do melhor perfil de produção de ácidos graxos voláteis e ácido lático e menor produção de etanol.

2.1.1 Preparo dos inoculantes para a ensilagem de milho em silos de PVC

As cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas em tubos contendo 2 mL de caldo MRS e incubadas, por 24 horas, a 30 °C. Em seguida, foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo MRS e incubadas, por mais 24 horas e, finalmente, transferidas para frascos Erlenmeyers contendo 250 mL de caldo MRS e novamente incubadas, por 24 horas, a 30 °C. Após este período de incubação, foi feita a contagem do número de células, obtendo-se um resultado de 9 log UFC mL⁻¹ do caldo.

2.2 Ensilagem de milho em silos experimentais

O milho foi colhido na estação chuvosa, com aproximadamente 102 a 119 dias de crescimento, quando os grãos apresentavam a linha do leite próxima

de 50% e encontravam-se em fase de transição do estado pastoso para o farináceo. A colheita foi feita com colhedora automotriz, com o tamanho de partícula regulado para 10 mm, o que facilita a expulsão do ar quando da compactação, favorecendo o processo de fermentação para a produção da silagem (RANJIT; KUNG JÚNIOR, 2000).

2.2.1 Preparo da silagem de milho e formação dos tratamentos

Os inoculantes preparados foram misturados à forragem no momento da ensilagem. Para cada tratamento, foram retirados 3 mL do caldo presente no erlenmeyer, o qual foi, posteriormente, misturado com 80 mL de água destilada e homogeneizado sobre 3 kg de forragem a ser ensilada. Ao final, os inoculantes experimentais foram inoculados em uma concentração de $9 \log \text{ UFC kg}^{-1}$ de forragem, que corresponde a $6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de forragem. Teve-se o cuidado de adicionar ao tratamento controle somente água destilada, na mesma quantidade que foi adicionada junto com os inoculantes.

A forragem foi ensilada em silos experimentais de PVC com 10 cm de diâmetro e 80 cm de altura, adaptados com válvulas tipo Bunsen, com capacidade para, aproximadamente, 2,5 a 3 kg de silagem, sendo utilizada uma densidade de compactação dos silos de, aproximadamente, 600 kg de forragem por m^3 . A forragem foi compactada manualmente nos silos, os quais foram fechados, pesados e armazenados em local coberto.

2.3 Avaliação das características químicas e microbiológicas do processo de fermentação

Para avaliação dos perfis bromatológico e microbiológico das silagens, as amostras foram retiradas antes do início da fermentação e após a abertura dos

silos. Para este estudo, os silos foram abertos com 10, 30, 60 e 90 dias de fermentação. Foram retiradas duas amostras de cada tratamento, sendo uma pesada e congelada para posterior análise das características bromatológicas e a outra imediatamente encaminhada ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), para avaliação da população de microrganismos.

2.3.1 Análises químico-bromatológicas

As análises bromatológicas da forragem fresca e dos diferentes tratamentos após o período de fermentação foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Ciências dos Alimentos e também no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia, ambos na UFLA.

As amostras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada, a 55 °C, por 72 horas, conforme metodologia recomendada pela Association of Official Agricultural Chemists (1990). Decorrido o tempo de secagem, as amostras foram novamente pesadas e moídas em moinho tipo Willey com peneira de malha de 1,0 mm e, após o processamento, foram acondicionadas em potes plásticos devidamente identificados para posterior determinação dos teores de proteína bruta (PB), conforme os métodos recomendados pela Association of Official Agricultural Chemists (1990) e fibra em detergente neutro (FDN), segundo as técnicas descritas por Pell e Schofield (1993). Nas amostras secas foi feita, ainda, a determinação dos teores de matéria seca (MS) definitiva, mantendo-se a amostra em estufa, a 105 °C, por 24 horas (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1990).

Os carboidratos solúveis totais (CHOs) foram determinados pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956) com algumas modificações. A extração etanólica foi realizada tratando-se 100 mg de amostra com 30 mL de

etanol 80%, por 30 minutos, a 100 °C, em banho-maria (modelo 316, Nova Ética). Após a extração, foi realizada a filtração e o volume dos extratos foi completado com água destilada, até um volume final de 30 mL. Foram utilizadas alíquotas de 0,5 mL do extrato, às quais foram adicionados 0,5 mL de fenol e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A leitura foi realizada em seguida por espectrofotometria em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan® FC) a 490 nm. A dosagem de carboidratos totais nos extratos foi feita de acordo com as absorbâncias obtidas por meio de curva padrão de glicose. De acordo com os rendimentos previamente obtidos, calculou-se o conteúdo de CHO totais em g kg^{-1} de MS da amostra.

O pH foi determinado nos extratos obtidos para a realização das análises microbiológicas, com auxílio de um potenciômetro digital (Digimed Analítica, modelo DM 20®) e uma porção de 2 mL deste extrato foi acidificada com 10 μL de ácido sulfúrico na concentração de 50% (v/v), para assegurar um pH final entre 2 e 3 (CANALE; VALENTE; CIOTTI, 1984), sendo esta utilizada posteriormente para mensuração dos teores de etanol, ácido lático e ácidos graxos voláteis por cromatografia líquida de alta precisão. As análises foram realizadas em cromatógrafo de fase líquida (Shimadzu, modelo LC-10Ai) equipado com detectores de índice de refração (para etanol), modelo RID-10Ai, e de ultravioleta (para os ácidos lático, acético e propiônico), modelo SPD-10Ai. A coluna utilizada foi a de troca catiônica, modelo Shim-pack SCR – 101 H de 30 cm de comprimento e 7,9 mm de diâmetro e a temperatura do forno da coluna foi de 30 °C, para leitura de etanol e 50 °C, para leitura dos ácidos. A fase móvel utilizada foi água ultrapura, com pH ajustado para 2,1 com ácido perclórico e o fluxo foi de 0,6 mL/minuto.

2.3.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas da forragem fresca e das silagens foram realizadas em triplicata, no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Amostras de 25 g foram colocadas, assepticamente, em 225 mL de água peptonada estéril (0,1%) e agitadas, durante 20 minutos, a 120 rpm, em agitador orbital (Shaker). A partir do extrato obtido, foram preparadas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-6} , para se proceder ao plaqueamento.

Foram determinadas as populações de BAL, fungos filamentosos e leveduras por plaqueamento em superfície, tomando-se 0,1 mL de cada diluição, em duplicata e realizado o espalhamento em superfície nos respectivos meios de cultivo. A contagem de BAL foi realizada utilizando-se o meio de man rogosa Sharpe (MRS) (Difco), acrescido de nistatina (0,4%) e o meio dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (Himedia) foi utilizado para a contagem de fungos filamentosos e leveduras. As placas foram incubadas a 28 °C e a contagem total foi efetuada após 48 horas, para BAL e leveduras e após 120 horas de incubação, para fungos filamentosos.

2.3.3 Avaliação das perdas de MS

Os silos foram avaliados quanto às perdas de MS total. Para tanto, o peso dos silos e de seus componentes individuais foram previamente pesados, possibilitando, dessa forma, os cálculos de perdas. Na abertura, foram anotados os pesos dos silos com a forragem. O conjunto do silo laboratorial sem a forragem era constituído pela tampa, válvula e borracha de vedação, telas inferior e superior e espaçadores. Para a determinação das perdas de MS, utilizou-se a equação descrita a seguir, segundo Jobim et al. (2007):

$$PMS = 100 - (MFab \times MSab) / (MFfe \times MSfe) * 100$$

em que

PMS = % de perda de matéria seca;

MFab= massa de forragem na abertura;

MSab= teor de MS na abertura;

MFfe = massa de forragem no fechamento;

MSfe = teor de MS da forragem no fechamento.

2.4 Avaliação da estabilidade aeróbia das silagens

Após 90 dias de fermentação, os silos foram abertos e aproximadamente 2 kg das amostras foram colocados em baldes plásticos e estes foram pesados e armazenados em ambiente fechado com temperatura controlada, para avaliação da estabilidade aeróbia. As temperaturas das silagens na pós-abertura foram obtidas utilizando DataLogger's (Impac, modelo MI-IN-D-2-L) inseridos nas massas ensiladas contidas nos baldes a uma altura de 10 cm do fundo dos baldes, tendo as temperaturas sido amostradas no momento da abertura e a cada 30 minutos, durante os 7 dias de aerobiose. A quebra da estabilidade aeróbia foi calculada como o tempo gasto, em horas, para a massa de silagem elevar em 2 °C a temperatura acima daquela do ambiente (KUNG JÚNIOR; STOKES; LIN, 2003).

2.5 Avaliação da diversidade bacteriana

Nas amostras encaminhadas para o estudo microbiológico também foi avaliada a diversidade bacteriana durante todo o processo de fermentação das

silagens inoculadas com cepas que mostraram os melhores padrões fermentativos.

Para a extração do DNA, as amostras foram centrifugadas, a 14.000 rpm, por 3 minutos. A purificação do DNA total foi realizada utilizando-se o kit *DNA purification from tissues* (QiAamp DNA Mini Kit - Qiagen, Chatsworth, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

As amostras de DNA, após serem purificadas e verificada a eficiência da extração em gel de agarose 1%, foram amplificadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações para amplificação do DNA da comunidade bacteriana utilizaram os *primers* universais rRNA 16S, seguindo o protocolo estabelecido por Muyzer e Smalla (1998). A reação de PCR teve volume final de 25 µl: 8,5 µl de água MilliQ estéril; 12,5 µl de Mixtaq 2x (TapTaq™ Master Mix Kit – Qiagen, São Paulo, Brasil); 1 µl de cada *primer* 968r GC (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGGCACGGGGGACGCGA AGAACCTTAC-3') e 1401f (5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3') e 2 µl de DNA.

O termociclador foi programado da seguinte maneira: desnaturação inicial a 95 °C, por 5 minutos; 35 etapas de desnaturação, a 95 °C, por 1 minuto; anelamento dos *primers* a, 55 °C, por 1 minuto e extensão da fita de DNA, a 72 °C, por 1 minuto; extensão final, a 72 °C, por 7 minutos e 4 °C como temperatura de armazenamento.

Os amplicons do rDNA 16S foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE). Os géis de acrilamida: bisacrilamida foram preparados com gradiente desnaturante variando 20% a 50% e a eletroforese foi realizada, a 60 °C e 120 V constantes, por 16 horas, em um sistema de eletroforese vertical DCode (BioRad), utilizando solução tampão 0,5X TAE. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de SYBR-Green I

(Invitrogen, Foster City, CA, USA) (1:10.000 (v/v)), por 30 minutos. A imagem foi capturada, visualizada e fotografada em transluminador, utilizando luz ultravioleta.

A similaridade entre as estruturas de comunidades bacterianas foi determinada com base na presença ou na ausência das bandas detectadas no gel. A análise de agrupamento hierárquico foi realizada utilizando-se o programa Systat 13.0, empregando matrizes de similaridade geradas pelo método de concordância simples, algoritmo de Ward e a distância euclidiana como unidade de medida.

2.6 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento para avaliação do perfil de fermentação das silagens de milho foi conduzido obedecendo a um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições, e os tratamentos foram dispostos em um esquema fatorial 10 x 5, sendo 10 o número de diferentes silagens, 1 sem inoculante e 9 inoculadas com as cepas testadas e 5 os tempos de abertura dos silos (0, 10, 30, 60 e 90 dias de fermentação). Para avaliação dos dados de temperatura referente à avaliação da estabilidade aeróbia, empregou-se o delineamento de blocos ao acaso (DBC), sendo os blocos a localização dos baldes na sala de avaliação.

Os dados experimentais de natureza qualitativa foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade e aqueles de natureza quantitativa foram submetidos ao estudo de regressão, utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil fermentativo das silagens

3.1.1 Composição química

O teor de MS do milho antes da ensilagem, bem como as concentrações de proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN), apresentou valores compatíveis aos encontrados na literatura (FILYA; SUCU, 2010; LI; NISHINO, 2011) (Tabela 1). A composição química do milho indicou que a cultura foi colhida no estágio ideal de maturidade dos grãos ($355,94 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$), conforme relatado por Filya (2004). McDonald, Henderson e Heron (1991) relataram que os carboidratos solúveis em água (CHO) são considerados substratos essenciais ao crescimento das BAL para que se possa obter uma fermentação adequada. Desse modo, baixos níveis de CHO podem restringir o crescimento das BAL. No entanto, a concentração de CHO na planta de milho foi, em média, $68,17 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, sendo, portanto, um valor superior ao mínimo recomendado ($60 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$) para uma fermentação eficiente (JAAKKOLA; HUHTANEN; HISSA, 1991). Os valores de CHO encontrados no presente estudo foram inferiores aos relatados por Filya e Sucu (2010) e Nkosi et al. (2009).

Nas condições deste experimento, os valores de pH foram considerados baixos quando comparados com os resultados relatados por Li e Nishino (2011), Muck (2004) e Nkosi et al. (2009).

Tabela 1 Composição química e microbiológica do milho antes da ensilagem

Variável	Média	Desvio padrão
pH	4,19	0,20
Matéria seca (g kg ⁻¹)	355,94	2,73
Concentração (g kg ⁻¹ MS):		
Proteína bruta	69,15	1,55
Carboidratos solúveis em água	68,17	4,54
Fibra em detergente neutro	569,20	14,97
Contagem (log UFC g ⁻¹):		
BAL	8,55	0,15
Leveduras	6,47	0,00
Fungos filamentosos	5,08	0,00

As populações de bactérias do ácido lático (BAL), leveduras e fungos filamentosos na forragem fresca estiveram acima dos valores reportados por Filya (2004) e Filya, Sucu e Karabulut (2004), embora as taxas de inoculação de BAL tenham sido semelhantes nos trabalhos avaliados, sugerindo, assim, que a população da microbiota epifítica na forragem em estudo era maior que naquelas relatadas pelos autores acima citados. De certa forma, a população de leveduras foi semelhante àquelas relatadas por Filya e Sucu (2010) e Li e Nishino (2011).

A inoculação das cepas de BAL não exerceu influência significativa ($p > 0,05$) sobre a composição química das silagens, as quais apresentaram valores semelhantes para as concentrações de MS, PB, CHO, FDN e perdas de MS (Tabelas 2 e 3). Entretanto, foram observadas modificações significativas destas variáveis ($p < 0,05$) durante a fermentação.

Tabela 2 Probabilidade dos efeitos (*p*) na composição química das silagens de milho não inoculadas e inoculadas com as cepas de BAL

Variável	<i>p</i>		
	Trat.	Tempo	Trat. x Tempo
pH	NS	***	**
Matéria seca (g kg ⁻¹)	NS	***	NS
Concentração (g kg ⁻¹ MS):			
Proteína bruta	NS	*	NS
Carboidratos solúveis em água	NS	***	NS
Fibra em detergente neutro	NS	***	NS
Ácido lático	NS	***	NS
Ácido acético	***	***	*
Ácido propiônico	NS	***	NS
Ácido butírico	NS	*	NS
Etanol	NS	***	NS
Perdas de MS (%)	NS	***	NS

NS, não significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Tabela 3 Composição química das silagens de milho não inoculadas e inoculadas com as cepas de BAL, após 90 dias de fermentação

Variável	Controle	Tratamentos									Desvio padrão
		6	8	11	47	51	52	68	70	73	
pH	4,20	4,17	4,21	4,30	4,18	4,10	4,19	4,19	4,12	4,21	0,05
Matéria seca (g kg ⁻¹)	341,71	346,01	336,50	339,58	337,03	348,18	341,19	334,08	336,95	342,86	4,47
Concentração (g kg ⁻¹ MS):											
Proteína bruta	76,91	73,84	70,11	69,50	70,57	78,33	69,33	72,72	69,84	78,92	3,79
Carboidratos solúveis em água	8,03	7,40	7,28	7,41	9,43	8,89	7,74	7,40	9,19	7,21	0,85
Fibra em detergente neutro	564,32	557,22	547,38	545,32	547,89	558,73	529,42	567,43	555,52	552,97	10,88
Ácido lático	49,24	42,97	39,23	27,68	45,68	40,72	50,14	38,52	48,05	48,14	6,86
Ácido acético	5,42 ^b	5,68 ^b	3,64 ^b	7,63 ^a	5,41 ^b	2,57 ^b	5,31 ^b	8,55 ^a	4,87 ^b	9,03 ^a	2,05
Ácido propiônico	4,58	4,26	4,68	4,09	4,72	4,50	4,84	5,47	5,22	5,07	0,42
Ácido butírico	0,94	0,74	0,91	0,13	0,59	0,56	0,41	0,61	1,18	0,16	0,34
Etanol	31,09	24,83	28,31	24,11	28,36	23,80	33,38	28,36	29,94	28,41	3,08
Perda de MS (%)	6,03	3,74	6,88	6,19	6,6	4,21	5,21	7,72	8,23	6,72	1,43

Médias com letras diferentes diferem ($p < 0,05$) estatisticamente nas colunas, pelo teste de Scott-Knott.

Com o processo fermentativo, houve uma redução significativa ($p < 0,05$) nos teores médios de MS (de 355,94 para 340,41 g kg⁻¹) (Gráfico 1) e também nos teores de CHO, que reduziram de 68,17 g kg⁻¹ MS para valores próximos de 8 g kg⁻¹ MS (Gráfico 2). Uma redução acentuada destes valores foi observada nos primeiros 10 dias de fermentação e grandes reduções não foram observadas após este período. As reduções nos teores de MS e CHO são decorrentes do processo fermentativo, pela respiração das células vegetais e metabolismo dos microrganismos durante a ensilagem. Esses microrganismos, principalmente as BAL, são responsáveis pelo consumo dos carboidratos com produção, sobretudo de ácido lático, o qual contribui para a queda nos valores de pH, além da produção de CO₂ e água (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

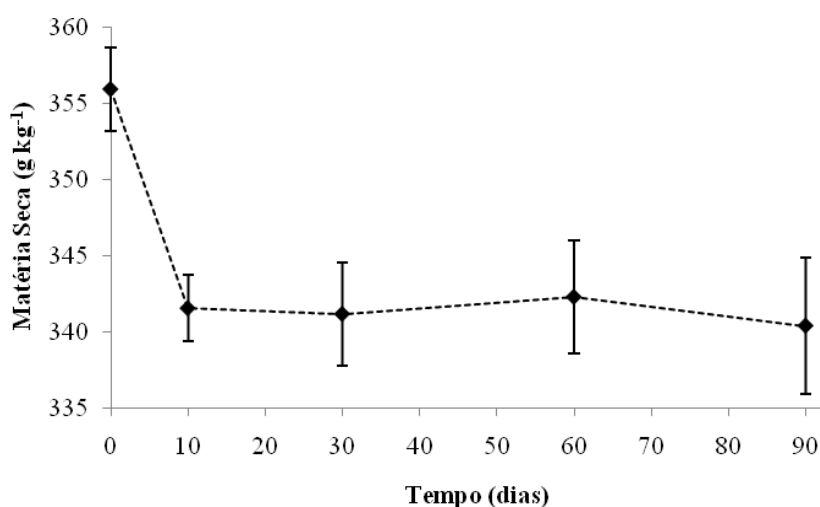


Gráfico 1 Teores médios de matéria seca nas silagens de milho controle e inoculadas com as BAL, no decorrer do período de fermentação

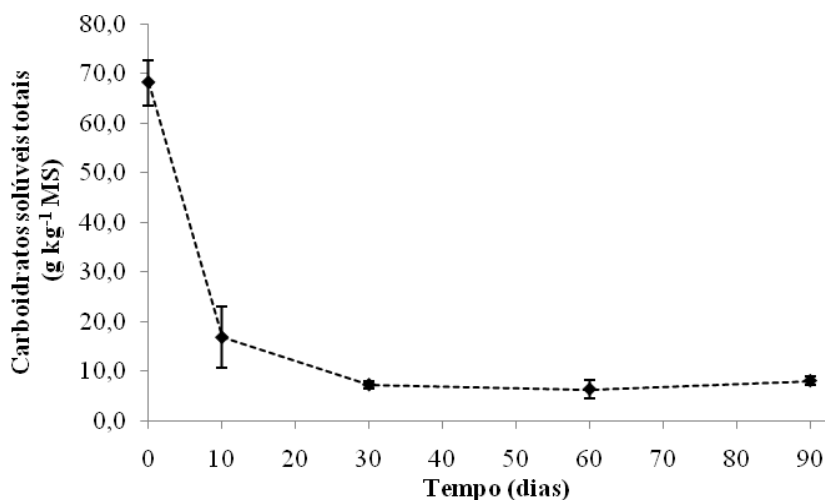


Gráfico 2 Concentrações de carboidratos solúveis totais nas silagens de milho controle e inoculadas com as BAL, no decorrer do período de fermentação

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos, é possível notar que a concentração de CHO, ao final do processo fermentativo, nos tratamentos controle e nas silagens inoculadas com as cepas 47, 51 e 70, foi mais elevada que a média de todos os tratamentos (Tabela 3). Gimenes et al. (2006) relataram que silagens ricas em CHO e amido, como é o caso do milho, após o processo fermentativo, apresentam maior susceptibilidade à deterioração aeróbia em função da maior concentração de substratos para serem utilizados por microrganismos deterioradores, como os fungos filamentosos e leveduras.

Os teores médios de FDN sofreram redução significativa ($p < 0,05$), declinando de 569,20 para 552,63 g kg⁻¹, durante todo o período de fermentação (Gráfico 3). Observou-se que, durante os primeiros dez dias de fermentação, ocorreu elevação nos teores médios de FDN, seguido por uma redução até o 30º dia. Com 60 dias, observou-se novo aumento, seguido de queda até os 90 dias de fermentação.

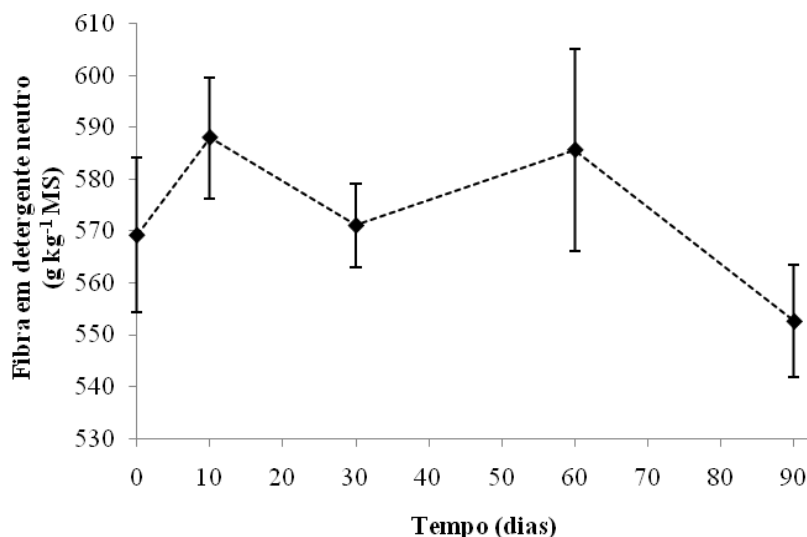


Gráfico 3 Teores de fibra em detergente neutro nas silagens de milho controle e inoculadas com as BAL, no decorrer do período de fermentação

Segundo Ávila et al. (2008), aumentos na fração fibrosa do material ensilado em relação ao material original podem ser observados como resultado de perdas de MS na forma de gases, em razão da fermentação alcoólica por leveduras. Entretanto, reduções no conteúdo de FDN indicam que parte da fibra foi solubilizada, provavelmente a fração hemicelulose, conforme relatado por Van Soest, Ferreira e Hartley (1984) e Reis, Garcia e Queiroz (1991). Esse efeito pode ser considerado positivo ao processo, por fornecer carboidratos solúveis aos microrganismos e elevar o consumo da silagem pelos animais. Devido a isso, podem ser observados esses padrões inconsistentes de variação dos teores de fibra nas silagens ao longo da fermentação, conforme relatado por Filya e Sucu (2010).

A redução desta variável após a fermentação também foi relatada por Filya e Sucu (2010) e por Nkosi et al. (2009), avaliando o efeito de diferentes

cepas de BAL inoculadas em silagem de milho. De acordo com Van Soest (1994), o teor de FDN representa a fração fibrosa da forragem, sendo inversamente proporcional ao consumo de MS, em que altas concentrações de FDN resultam em baixo potencial de consumo pelos animais. Desse modo, reduções significativas nos teores de FDN com a fermentação são de caráter positivo à silagem.

Os teores médios de PB aumentaram significativamente ($p < 0,05$) durante o período de fermentação (Gráfico 4). A partir do 10º dia de fermentação, foi verificado um aumento nos teores proteicos, o que pode estar associado à síntese de proteína microbiana. Entretanto, redução nos teores de proteína, seguido de aumento no decorrer do processo fermentativo, foi observada após, respectivamente, 30 e 60 dias de fermentação. Essa redução pode ser resultado da degradação da mesma por microrganismos indesejáveis, como *Clostridium* spp. ou por enzimas vegetais, com conseqüente produção de aminas e amônia (BOLSEN, 1995).

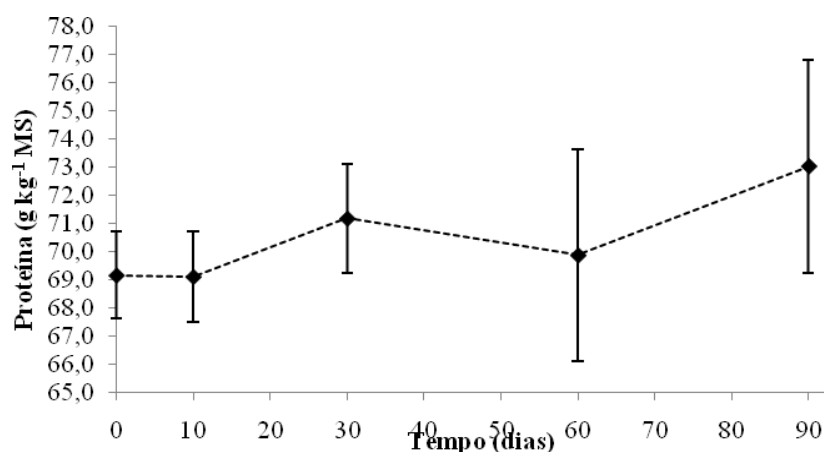


Gráfico 4 Teores de proteína bruta nas silagens de milho controle e inoculadas com as BAL, no decorrer do período de fermentação

Para perdas de MS, observou-se aumento ao longo de toda a fermentação (Gráfico 5), sendo estas mais expressivas até o décimo dia de fermentação. A partir daí, tendeu-se a uma estabilização. As perdas de MS durante a ensilagem ocorrem, principalmente, em razão da utilização de CHO pelos microrganismos. Como pode ser observado no Gráfico 2, a utilização de CHO também foi mais intensa nos primeiros 10 dias de fermentação.

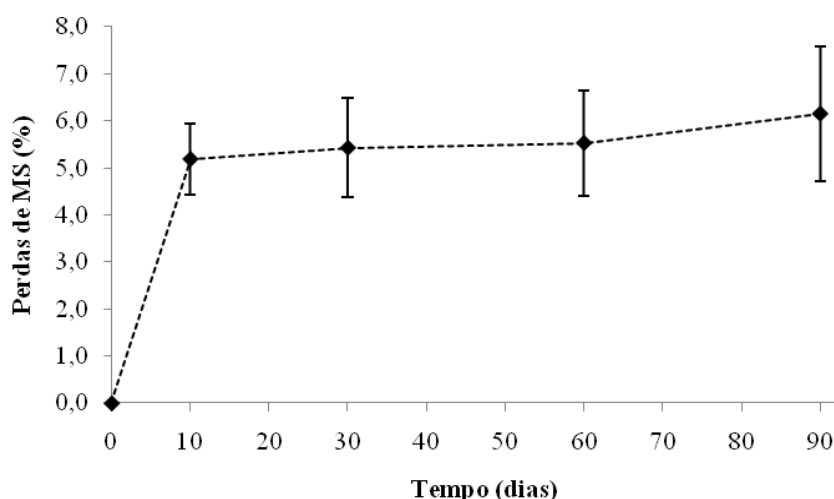


Gráfico 5 Perdas de matéria seca nas silagens de milho controle e inoculadas com as BAL, no decorrer do período de fermentação

Segundo Ávila et al. (2009a), aumentos marginais nas concentrações de PB, com conseqüente redução no conteúdo de MS das silagens, são indicativos de perdas de MS, confirmando, assim, os resultados encontrados. Nota-se que, na medida em que aumentavam os teores de proteína, maiores perdas no conteúdo de matéria seca foram observadas ao longo do processo fermentativo. A avaliação das perdas de MS durante a ensilagem é uma característica muito importante a ser avaliada. Neste estudo, embora não tenham sido encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos, ressalta-se que as

menores perdas de MS foram encontradas nas silagens inoculadas com as cepas 6, 51 e 52, com, respectivamente, 3,74%, 4,21% e 5,21% (Tabela 3). Em contrapartida, as maiores perdas de MS foram observadas nas silagens inoculadas com as cepas 8, 68 e 70, com, respectivamente, 6,88%, 7,72% e 8,23%.

Neste estudo foram observadas perdas de MS inferiores àquelas relatadas por Jatkauskas e Vrotniakiene (2005), que observaram perdas de 10,23% na silagem de milho sem inoculante e 9,89% nas inoculadas com *Pediococcus acidilacticci* e *Lactobacillus plantarum*. Os resultados obtidos neste estudo concordam com os relatados por Ashbell e Lisker (1988) que observaram perdas entre 3,9% e 7,4%.

Elferink, Driehuis e Spoelstra (1997) relataram perdas de MS de apenas 1,4%, após 102 dias de fermentação de seis silagens de milho inoculadas com diferentes cepas de *L. buchneri* e armazenadas em silos laboratoriais.

As estimativas de perdas de MS em silos laboratoriais podem não refletir com precisão as perdas que ocorrem em silos de fazenda, devido ao fato de as condições laboratoriais serem mais controladas e pela pequena quantidade de forragem ensilada (RANJIT; TAYLOR; KUNG JÚNIOR, 2002).

Foi observada interação significativa ($p < 0,05$) entre os efeitos dos inoculantes e os tempos de fermentação para os valores de pH. Dessa forma, a queda do pH aconteceu de forma diferente para cada silagem. Analisando o desdobramento dos tratamentos dentro de cada tempo de fermentação, notou-se que os valores de pH nos tempos 10, 30, 60 e 90 dias foram semelhantes em todas as silagens ($p > 0,05$). Contudo, no tempo 0, as silagens inoculadas com as cepas 51, 52 e 70 apresentaram maiores valores de pH em relação aos demais tratamentos (Gráfico 6). Essa variação nos valores de pH da forragem fresca pode ser explicada em função do metabolismo da microbiota epifítica e das BAL inoculadas que, possivelmente, foi ativado em alguns tratamentos. No entanto,

nos tratamentos inoculados com as cepas 51, 52 e 70, as células, provavelmente, permaneceram em estado de latência por um período maior que nos demais tratamentos, resultando, assim, em maiores valores de pH em consequência da baixa produção de ácido lático pelas BAL.

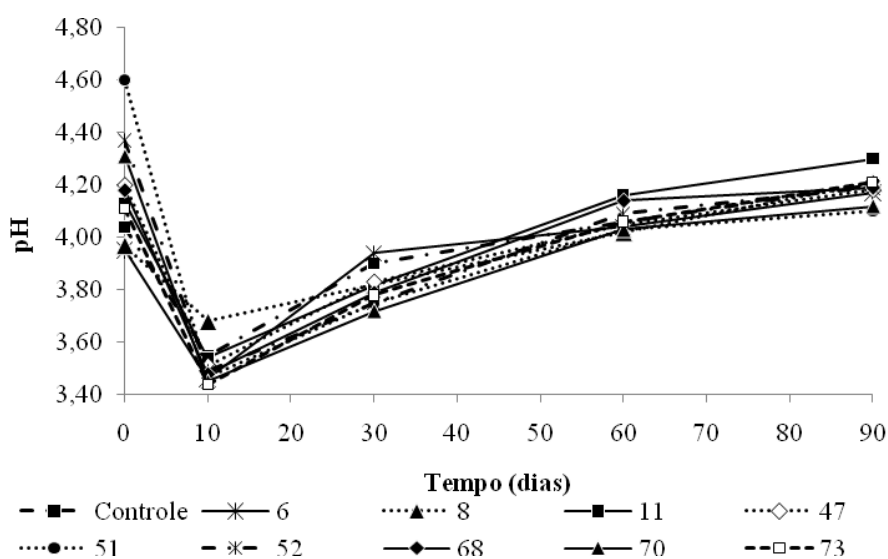


Gráfico 6 Variação nos valores de pH dos diferentes tratamentos, em função do tempo de fermentação

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para as concentrações dos ácidos lático, propiônico e butírico, além dos teores de etanol entre as silagens. No entanto, diferenças significativas ($p < 0,05$) com relação às modificações temporais na concentração destes ácidos foram encontradas ao longo da fermentação. Notou-se que, com o processo fermentativo, houve um aumento ($p < 0,05$) nas concentrações médias de ácido lático, sendo possível ressaltar uma elevação na concentração deste ácido até 30 dias de fermentação, seguido de uma pequena redução após esse período, porém, com tendência à

estabilização até o final do processo fermentativo, quando se observou uma concentração média de, aproximadamente, 43 g kg⁻¹ MS (Gráfico 7).

As concentrações médias de etanol apresentaram comportamento semelhante ao da concentração de ácido láctico, com aumento significativo ($p < 0,05$) até os primeiros 10 dias de fermentação. A partir daí, notou-se uma tendência à estabilização até a abertura dos silos, aos 90 dias, quando a concentração média de etanol foi de 28,06 g kg⁻¹ MS (Gráfico 7).

Estes resultados concordam com os obtidos por Li e Nishino (2011), avaliando os efeitos da inoculação de *L. rhamnosus* e *L. buchneri*, após 120 dias de fermentação. Resultados semelhantes para a concentração de ácido láctico foram obtidos por Filya e Sucu (2010) nos tratamentos sem inoculação. Contudo, nos tratamentos inoculados com aditivo comercial contendo o microrganismo *L. plantarum*, uma menor concentração deste ácido foi observada. Os mesmos autores relataram concentrações de etanol variando entre 1,08 a 1,77 g kg⁻¹ MS, nos tratamentos controle e inoculados, valores estes inferiores aos obtidos neste estudo.

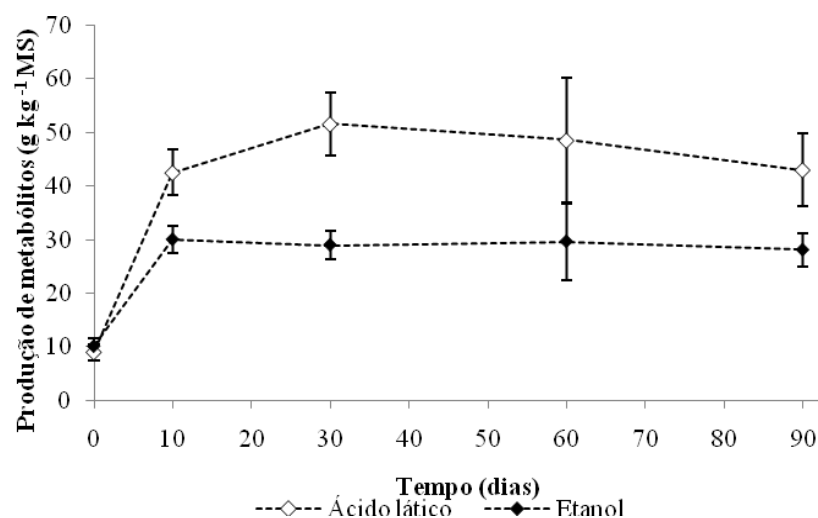


Gráfico 7 Variação média das concentrações de ácido láctico e etanol dos diferentes tratamentos, em função do tempo de fermentação

Um aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações médias de ácido propiônico em função dos tempos de fermentação foi observado (Gráfico 8). Ao final do processo fermentativo, os resultados encontrados, aproximadamente $4,74 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, foram superiores aos relatados por Filya (2004) e Filya e Sucu (2010). Por outro lado, esses valores assemelharam-se aos encontrados por Li e Nishino (2011) em silagem de milho inoculada com *L. buchneri*, após 120 dias de fermentação.

Houve redução significativa ($p < 0,05$) nas concentrações médias de ácido butírico em função dos tempos de fermentação (Gráfico 8). Apesar disso, os valores obtidos ($0,62 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$) ainda estiveram acima dos recomendados por Kung Júnior e Shaver (2001), para se obter silagens bem preservadas. Segundo Nkosi et al. (2009), concentrações de ácido butírico acima de $0,1 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ refletem a extensão da atividade clostridiana sobre a forragem ensilada e está relacionada a menores taxas de decréscimo e maiores valores finais de pH nas silagens. Além disso, a presença de *Clostridium* spp. em silagens é indesejável,

pois este microrganismo está envolvido na degradação de proteínas e ácido láctico, produzindo ácido butírico. Apesar de não haver diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os tratamentos avaliados, é possível observar, ao final do processo fermentativo, que as silagens inoculadas com as cepas 11 e 73 foram as que apresentaram os valores mais próximos aos recomendados para se obter silagens bem preservadas, 0,13 e 0,16 g kg⁻¹ MS (Tabela 3), respectivamente, evidenciando, assim, a melhor qualidade das silagens em estudo.

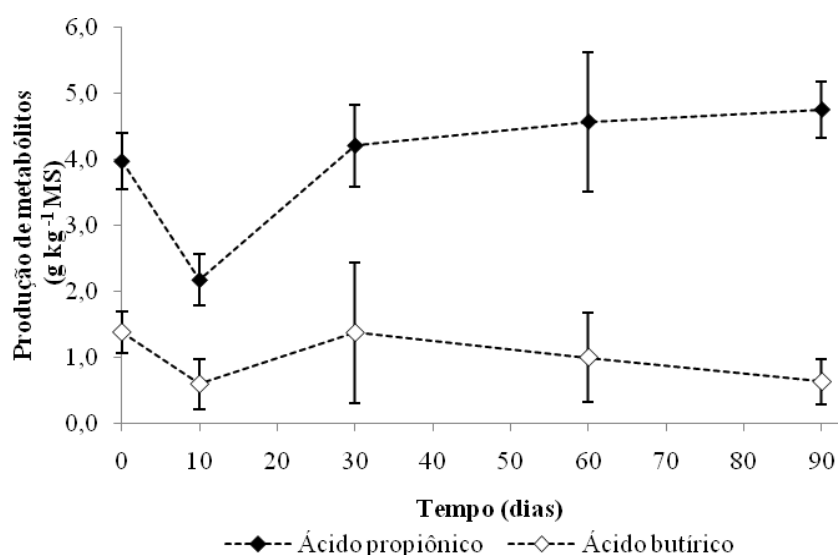


Gráfico 8 Variação média das concentrações dos ácidos propiônico e butírico dos diferentes tratamentos, em função do tempo de fermentação

Para os teores de ácido acético, foi observada interação significativa ($p < 0,05$) entre os fatores tratamento e tempo de fermentação (Gráfico 9). Analisando-se o desdobramento dos tratamentos dentro de cada tempo de fermentação, notou-se que, até os primeiros 10 dias de fermentação, todos os tratamentos apresentaram comportamento semelhante, com significativo aumento ($p < 0,05$) nas concentrações de ácido acético. Após 30 dias de

fermentação, um relativo aumento para algumas silagens ainda foi percebido, tendo as silagens inoculadas com as cepas 11 e 68 se destacado em relação às demais em função das maiores produções com, respectivamente, 8,09 e 9,72 g kg⁻¹ MS. Uma significativa redução ($p<0,05$) foi observada a partir do 30º dia de fermentação, todavia, notou-se que, nas silagens inoculadas com as cepas 6, 8, 11, 70 e 73, um aumento nas concentrações deste ácido ainda persistiu até o 60º dia. Após 60 dias, foi possível observar que as silagens inoculadas com as cepas 8, 11, 68 e 73 apresentaram concentrações de ácido acético superiores aos demais tratamentos. Entretanto, ao final de 90 dias de fermentação, foram os tratamentos inoculados com as cepas 11, 68 e 73 que se destacaram pelas maiores concentrações deste ácido.

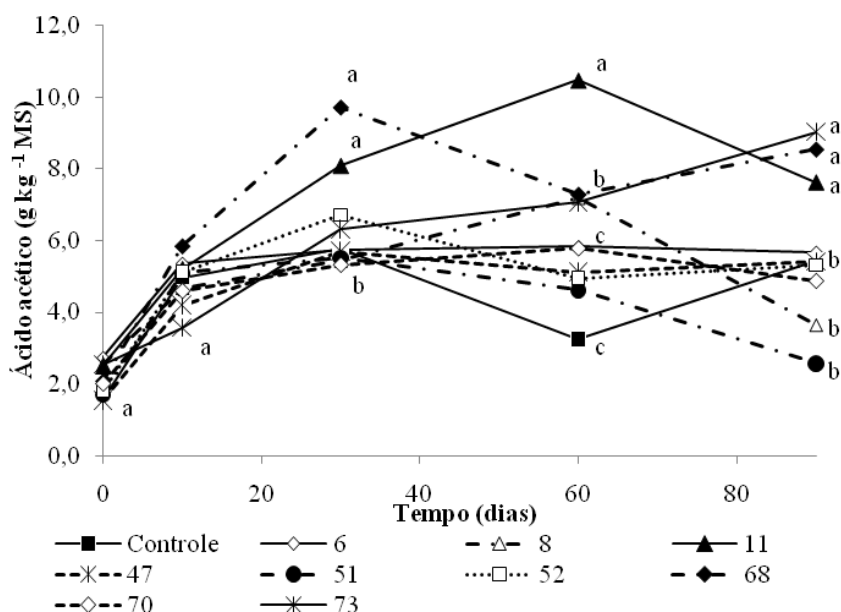


Gráfico 9 Variação das concentrações de ácido acético nos diferentes tratamentos, em função do tempo de fermentação

Médias com letras diferentes dentro do mesmo tempo de fermentação diferem ($p<0,05$) estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott

As diferenças nas concentrações de ácido acético das silagens inoculadas com as diferentes cepas não foi suficiente para causar diferenças nos valores de pH, que foram semelhantes entre as cepas. Segundo Filya e Sucu (2010), a inoculação de silagem de milho com BAL heterofermentativas aumenta a estabilidade aeróbia, em função do incremento na concentração de ácido acético que inibe o crescimento dos principais microrganismos de deterioração aeróbia.

Os tratamentos inoculados com as cepas 11, 68 e 73 foram os que produziram elevadas concentrações de ácido acético, entretanto, a concentração de ácido láctico não foi significativamente alta, comparando-se com os demais tratamentos. Essas características são semelhantes às encontradas em silagens de milho inoculadas com cepas de BAL heterofermentativas, o que sugere o metabolismo heterolático das cepas em questão. Bach et al. (2005), avaliando os efeitos da inoculação de cepas heterofermentativas de silagem de milho, observaram um relativo aumento nas concentrações de ácido acético, enquanto a concentração de ácido láctico foi reduzida concomitantemente.

Elferink, Krooneman e Gottschal (2001) relataram que as altas concentrações dos ácidos acético e propiônico em silagens estão relacionadas ao metabolismo de *L. buchneri* que tem capacidade de converter o ácido láctico em ácido acético, etanol e 1,2-propanediol, sendo este último subproduto do metabolismo de *L. buchneri* utilizado por *L. diolivorans* e convertido em ácido propiônico e 1-propanal (KROONEMAN et al., 2002). Microrganismos da família *Enterobacteriaceae* também têm a capacidade de fermentar os CHO presentes na massa ensilada, produzindo ácido láctico, acético e etanol, da mesma maneira que as BAL. Contudo, o principal metabólito é o ácido acético (ELFERINK; KROONEMAN; GOTTSCHAL, 2001). Esses microrganismos requerem condições ótimas de pH para seu crescimento, que variam de 6,0 a 7,0, e a maioria não é capaz de crescer em pH inferior a 5,0 (BOLSEN, 1995). Desse

modo, a produção de ácido acético nos diferentes tratamentos analisados possivelmente não está relacionada ao metabolismo de enterobactérias, pois os valores médios de pH encontrados ficaram em torno de 4,19, sendo, portanto, reflexos da acidificação do meio, característica esta que inibe o crescimento de enterobactérias, reforçando, assim, o caráter heterofermentativo das cepas 11, 68 e 73.

O metabolismo de produção do ácido acético por BAL resulta em maiores perdas de MS. Neste estudo, porém, as perdas foram semelhantes entre os tratamentos, embora a silagem inoculada com a cepa 68 tenha apresentado alto índice de perda de MS, podendo ser explicado pela elevada produção de ácido acético.

Segundo McDonald, Henderson e Heron (1991), apesar de a fermentação heterolática proporcionar efeitos positivos na estabilidade aeróbia, ela pode ser considerada desvantajosa, em face da possibilidade de maiores perdas de MS durante o processo fermentativo e também porque elevadas concentrações de ácido acético na massa ensilada podem reduzir o consumo voluntário por parte dos animais (CHARMLEY, 2001).

3.1.2 População de microrganismos

Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos inoculados para as contagens de leveduras e fungos filamentosos, apresentando contagens semelhantes nas diferentes silagens avaliadas; no entanto, houve efeito significativo ($p<0,05$) com relação às modificações temporais, apontando que a população de microrganismos em todas as silagens variou ao longo da fermentação (Gráfico 10).

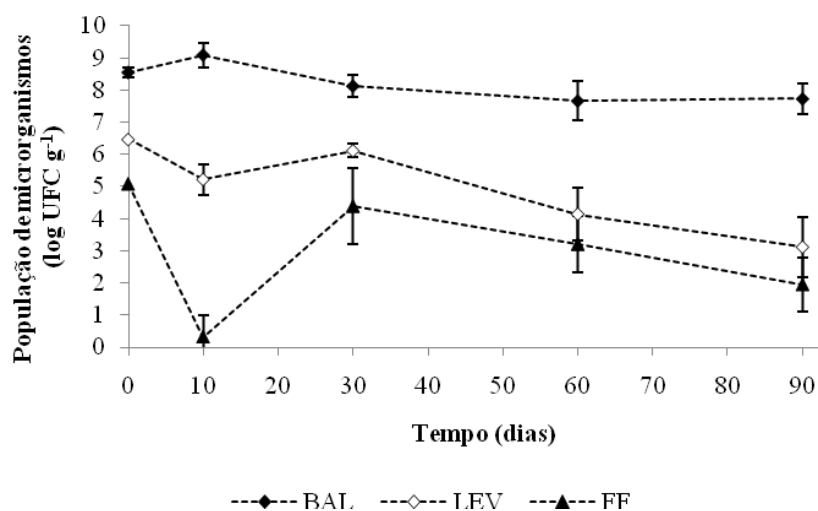


Gráfico 10 Variação média na população de microrganismos dos diferentes tratamentos, em função do tempo de fermentação
BAL – bactérias do ácido lático; LEV – leveduras; FF – fungos filamentosos

Com o processo fermentativo, houve redução na contagem de leveduras de 6,47 para 3 log UFC g⁻¹, ao final da fermentação. Apesar de não ter sido verificada diferença estatística com relação à contagem, após 90 dias de fermentação, foi possível observar que os tratamentos inoculados com as cepas 11 e 73 apresentaram as menores contagens de leveduras, sendo, respectivamente, log 1,52 e log 1,27 UFC g⁻¹.

Uma redução significativa ($p < 0,05$) também foi observada para a população de fungos filamentosos, de 5,07 para 1,95 log UFC g⁻¹. Para estes microrganismos, observou-se queda na população aos 10 dias de fermentação, com aumento aos 30 dias, seguido de redução até os 90 dias. Essa redução aos 10 dias de fermentação possivelmente ocorreu em função da produção de ácidos que inibem seu crescimento. Embora não tenha sido verificada diferença estatística entre as cepas, notou-se que os tratamentos inoculados com as cepas

6, 8, 11 e 73 apresentaram contagens de fungos filamentosos abaixo de $\log 2$ UFC g^{-1} .

Muck (2004), avaliando os efeitos de diferentes inoculantes em silagens de milho, obteve, em silagens inoculadas com *L. buchneri*, as seguintes contagens para leveduras e fungos filamentosos, $\log 1,55$ e $1,18$ UFC g^{-1} , respectivamente. Já para as silagens inoculadas com *L. plantarum*, a população destes microrganismos foi mais elevada ($\log 4,13$ e $4,04$ UFC g^{-1} , respectivamente). O autor concluiu que as menores contagens para as populações de leveduras e fungos filamentosos nas silagens inoculadas com *L. buchneri* se atribuíram à característica heterofermentativa da cepa, sendo o ácido acético o principal composto inibidor.

As reduções nas populações de leveduras e fungos filamentosos ao longo do processo de fermentação justificam-se em razão das concentrações dos ácidos láctico, acético e propiônico encontradas serem superiores às concentrações mínimas inibitórias (CMI) contra estes microrganismos que são indesejáveis na silagem. Nishino (2011) relata que a CMI de ácido láctico contra leveduras e fungos filamentosos é de 50 g L^{-1} , o que equivale a 115 g kg^{-1} MS em silagens com conteúdo de MS em torno de 300 g kg^{-1} . Para os ácidos acético e propiônico, as CMI frente aos mesmos microrganismos deterioradores são cerca de 10 a 20 vezes inferiores que a do ácido láctico, evidenciando, assim, o maior efeito antagonista dos ácidos acético e propiônico, quando comparados com o ácido láctico.

Moon (1983) relatou que, durante o processo de ensilagem, há um efeito sinérgico dos ácidos láctico, acético e propiônico contra leveduras e fungos filamentosos. Nesse sentido, os resultados obtidos confirmam os dados deste autor, pois, nas cepas 11, 68 e 73, que se relacionaram com elevada produção de ácido acético, foram observadas as menores contagens de fungos filamentosos e leveduras.

Segundo McDonald, Henderson e Heron (1991), sob condições anaeróbias, as leveduras fermentam os carboidratos disponíveis, produzindo etanol e CO₂. Desse modo, é possível observar que as silagens controle e inoculadas com as cepas 52 e 70, nas quais foram encontradas as maiores contagens de leveduras, foram aquelas que apresentaram as maiores concentrações de etanol. Esta produção de etanol na silagem não só diminui a quantidade de carboidratos disponíveis para as BAL como também apresenta um efeito negativo no sabor do leite produzido pelos animais alimentados com essas silagens (RANDBY; SELMER-OLSEN; BAEVRE, 1999)

A adição dos inoculantes influenciou significativamente ($p < 0,05$) a população de BAL durante o período fermentativo, apresentando diferenças significativas entre os tratamentos e também no decorrer do processo de fermentação, entretanto, sem interação significativa entre os fatores. Analisando-se a média de todos os tratamentos ao longo da fermentação (Gráfico 11), foi possível observar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as silagens, com destaque para aquelas inoculadas com as cepas 11 e 68, que apresentaram as maiores populações de BAL com, respectivamente, log 8,77 e 8,63 UFC g⁻¹. Uma menor população de BAL foi encontrada no tratamento controle, como era esperado, visto que este tratamento não foi inoculado.

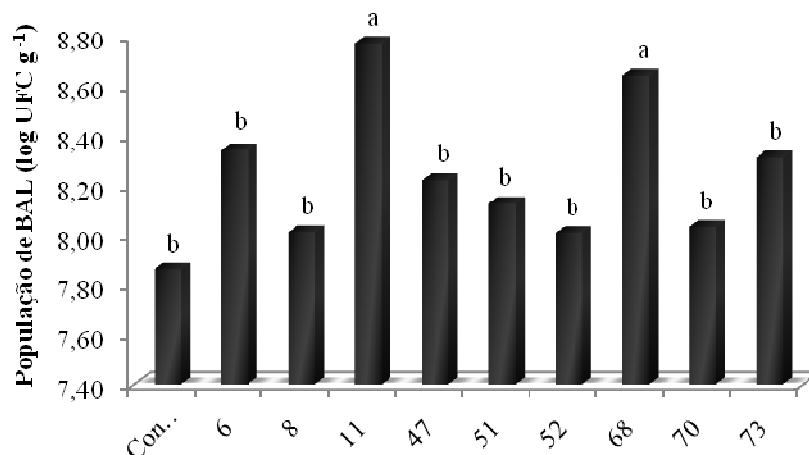


Gráfico 11 Contagens médias de bactérias do ácido láctico nos diferentes tratamentos com silagem de milho, ao longo do processo de fermentação

Médias com letras diferentes nas colunas diferem ($p < 0,05$) estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott.

Com relação às modificações temporais, houve pequeno aumento aos 10 dias e, a partir daí, redução na população de BAL com o processo fermentativo, de log 8,55 para log 7,73 UFC g⁻¹ (Gráfico 10). Uma redução na população de BAL após 120 dias de fermentação também foi relatada por Li e Nishino (2011), avaliando os efeitos da inoculação de *L. rhamnosus* e de *L. buchneri*, em silagens de milho.

Segundo Hammes e Hertel (2003), no decorrer do processo de fermentação das silagens ocorre sucessão de gêneros de BAL. No estágio inicial, as bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* dominam o processo, sendo substituídas por *Leuconostoc*, depois por *Lactobacillus* e *Pediococcus*, que são mais resistentes às condições ácidas. Com o decorrer do processo, até as BAL pertencentes ao gênero *Lactobacillus* vão perdendo a viabilidade, entretanto, alguns microrganismos especializados, tais como *Lactobacillus buchneri*,

continuam ativos, porém, em um baixo nível (ELFERINK; KROONEMAN; GOTTSCHAL, 2001).

3.2 Avaliação da estabilidade aeróbia

A estabilidade aeróbia da silagem está associada, principalmente, à inibição do crescimento de microrganismos capazes de crescer na silagem na presença do ar, sendo os fungos filamentosos e leveduras os principais microrganismos envolvidos na deterioração aeróbia de silagens (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Segundo Taylor e Kung Júnior (2002), o desenvolvimento desses microrganismos leva a um aumento na temperatura da massa ensilada. Desse modo, a medida da temperatura das silagens é uma forma indireta de avaliar a deterioração da mesma.

Os valores de temperatura das silagens de milho com as diferentes cepas mostraram que a elevação da temperatura na silagem controle e em todos os tratamentos iniciou-se após, aproximadamente, 6 horas de exposição ao ar. Foi possível notar grande variação nas diferentes silagens ao longo do período de avaliação. Nos tratamentos inoculados com as cepas 11, 47, 68 e 73, um aumento acentuado na temperatura foi ocorrer somente após, aproximadamente, 25 horas de exposição aeróbia, tendo a silagem inoculada com a cepa 11 mostrado aquecimento mais lento durante todo o período, mantendo temperaturas mais próximas da temperatura do ambiente, apresentando, assim, maior estabilidade aeróbia. Silagens inoculadas com as cepas 8, 52 e 70 aqueceram mais rapidamente do que a silagem controle durante o período inicial de avaliação (Gráfico 12)

A partir dos valores de temperatura obtidos com os datta loggers, foram calculadas as temperaturas máximas (T_m) e o tempo necessário para alcançar esta temperatura para todas as silagens. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre

os dados de temperatura máxima (T_m) alcançada e o tempo necessário para atingir a T_m nas diferentes silagens de milho foram observadas. Nesse sentido, o tratamento inoculado com a cepa 11 foi o que apresentou os melhores resultados, sendo sua T_m alcançada a 31 °C e o tempo necessário para atingir a T_m de, aproximadamente, 153 horas (Gráfico 13).

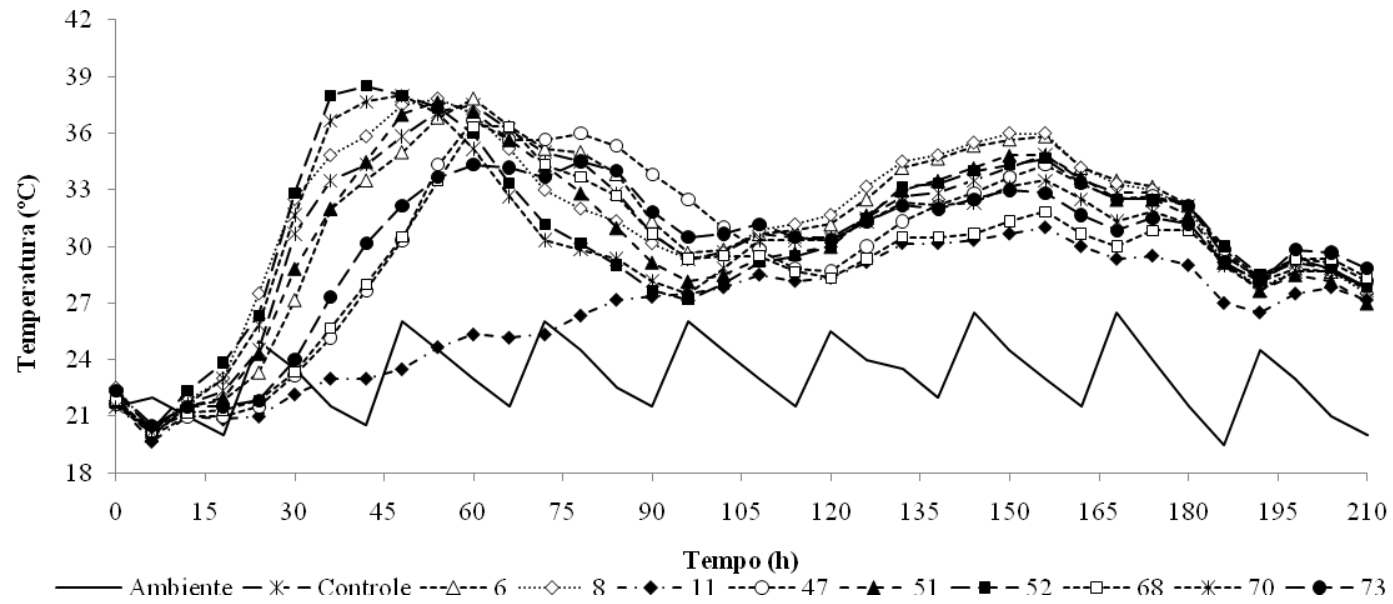


Gráfico 12 Variação da temperatura durante a exposição aeróbia das silagens controle e inoculadas com as cepas de BAL

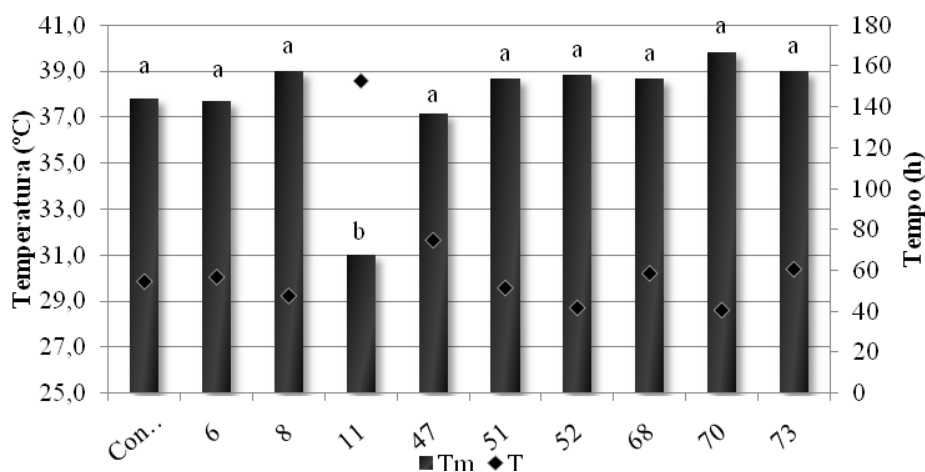


Gráfico 13 Temperatura máxima alcançada (T_m) e o tempo necessário para alcançá-la (T) nos diferentes tratamentos, durante 7 dias de exposição aeróbia

Médias com letras diferentes nas colunas diferem ($p < 0,05$) estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott.

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) tanto para os dados de perda de estabilidade aeróbia, considerando este como sendo $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ acima da temperatura do ambiente, quanto para os dados de perda de MS após abertura dos silos. Entretanto, observou-se que as silagens inoculadas com as cepas 11 e 47, seguidas dos tratamentos inoculados com as cepas 68 e 73, foram os que necessitaram de um período mais prolongado para que a temperatura da massa ensilada atingisse $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ acima da temperatura do ambiente. Ranjit e Kung Júnior (2000), avaliando a deterioração aeróbia de silagens de milho, observaram quebra da estabilidade com 26,5 e 33 horas nas silagens controle e inoculada com *L. plantarum*, respectivamente. Houve uma correlação entre os dados de quebra da estabilidade aeróbia e as perdas de MS (Gráfico 14), em que as menores perdas de MS observadas ocorreram nos tratamentos que apresentaram maior estabilidade aeróbia. As perdas de MS apresentadas neste estudo são superiores às aquelas relatadas por Ranjit e Kung Júnior (2000), que

observaram perdas de 5,3% de MS. Segundo Lindgren, Oldenburg e Pahlow (2002), a presença de oxigênio desencadeia a proliferação de leveduras, fungos filamentosos e bactérias aeróbias, levando ao consumo de nutrientes, o que acarreta redução no valor nutritivo das silagens, além de comprometer o consumo pelos animais, em razão da multiplicação de microrganismos indesejáveis. A presença de microrganismos que causam a deterioração aeróbia em silagens pode levar à produção de compostos indesejáveis, como as micotoxinas e também metabólitos, que tornam a silagem impalatável para os animais (OLDENBURG, 1991).

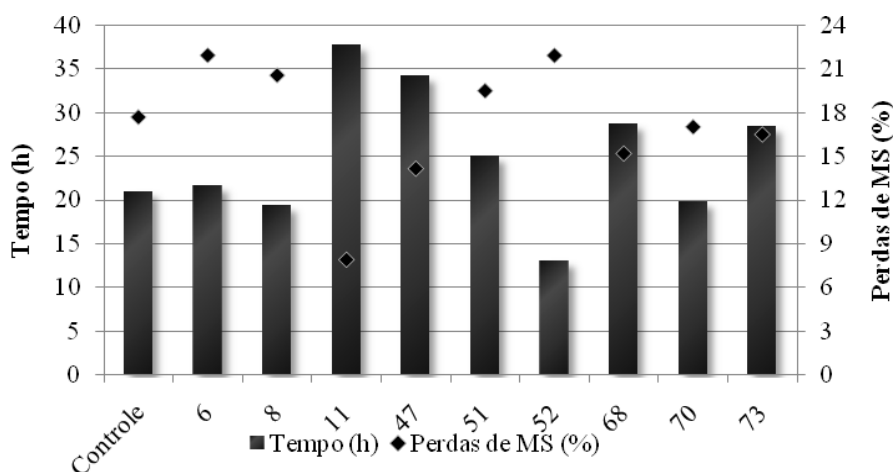


Gráfico 14 Quebra da estabilidade aeróbia e perdas de matéria seca nos diferentes tratamentos inoculados com cepas de BAL

Assim, os tratamentos inoculados com as cepas 11, 47, 68 e 73 foram os que apresentaram os melhores resultados após o tempo de exposição aeróbia, indicando menor atividade metabólica por microrganismos deterioradores. Entretanto, o tratamento 11 destacou-se dos demais, em razão do maior tempo

necessário para haver a quebra da estabilidade e, conseqüentemente, menores perdas de MS.

Segundo Driehuis, Elferink e Spoelstra (1999), a aplicação de *L. buchneri*, isoladamente ou associado a bactérias lácticas, eleva a estabilidade aeróbia da silagem de milho, reduzindo as populações de leveduras e fungos filamentosos. Ranjit e Kung Júnior (2000) realizaram um experimento com a inoculação de silagem de milho com cepas de BAL homofermentativas (*L. plantarum*) e homofermentativas mais heterofermentativas (*L. buchneri*) e concluíram que, para essa silagem, a adição de cepas de *L. buchneri* determinou a melhor estabilidade aeróbia.

Em outro estudo, Taylor e Kung Júnior (2002) testaram níveis de aplicação de *L. buchneri* em concentrações na ordem de 10^5 a 10^6 UFC g^{-1} de forragem. Estes autores constataram que níveis iguais ou superiores a 5×10^5 UFC g^{-1} foram eficientes no controle do desenvolvimento de leveduras e no aumento da estabilidade aeróbia, de silagens de grãos úmidos de milho, observando, no entanto, que houve aumento na concentração de etanol.

3.3 Avaliação da diversidade bacteriana

Baseado nos resultados das análises químico-bromatológicas, microbiológicas e com os dados de estabilidade aeróbia foi possível correlacionar os resultados que apresentaram as características desejáveis para uma cepa de BAL, para ser utilizada como inoculante. As silagens inoculadas com as cepas 11 e 73 apresentaram elevadas produções de ácido acético e nelas também foram observadas as menores contagens de leveduras e fungos filamentosos, evidenciando, assim, a atividade antifúngica deste ácido, conforme relatado por Moon (1983). Além disso, nos tratamentos inoculados com as cepas 11 e 68, foram observadas as maiores contagens de BAL e também alta

produção de ácido acético e, nos tratamentos inoculados com as cepas 11 e 73, foram observadas as menores concentrações de ácido butírico, refletindo, assim, mínima atividade clostridiana. Além disso, as silagens inoculadas com as cepas 11, 68 e 73 apresentaram os melhores resultados após a exposição aeróbia e, por isso, foram escolhidas para serem avaliadas quanto à estrutura da comunidade bacteriana, ao longo do processo de fermentação.

De acordo com o perfil da estrutura da comunidade bacteriana obtida por meio da utilização da técnica de PCR-DGGE, pode-se observar que o perfil de amplicons no DGGE mostrou pequena variação na estrutura da comunidade microbiana no decorrer do processo fermentativo para o tratamento inoculado com a cepa 11. Entretanto, nos tratamentos inoculados com as cepas 68 e 73 foi possível observar uma maior riqueza de amplicons após 30 dias de fermentação (Figura 1). Foi notada similaridade entre alguns perfis de bandas nos tratamentos avaliados e sua persistência durante todo o período de fermentação, representando, possivelmente, a população bacteriana da microbiota epifítica na forragem.

Li e Nishino (2011), analisando a comunidade bacteriana em silagens de milho, relataram que a inoculação com *L. rhamnosuse* *L. buchneri* não afetou a microbiota epifítica da silagem, tendo sido observadas poucas diferenças ao longo do processo fermentativo.

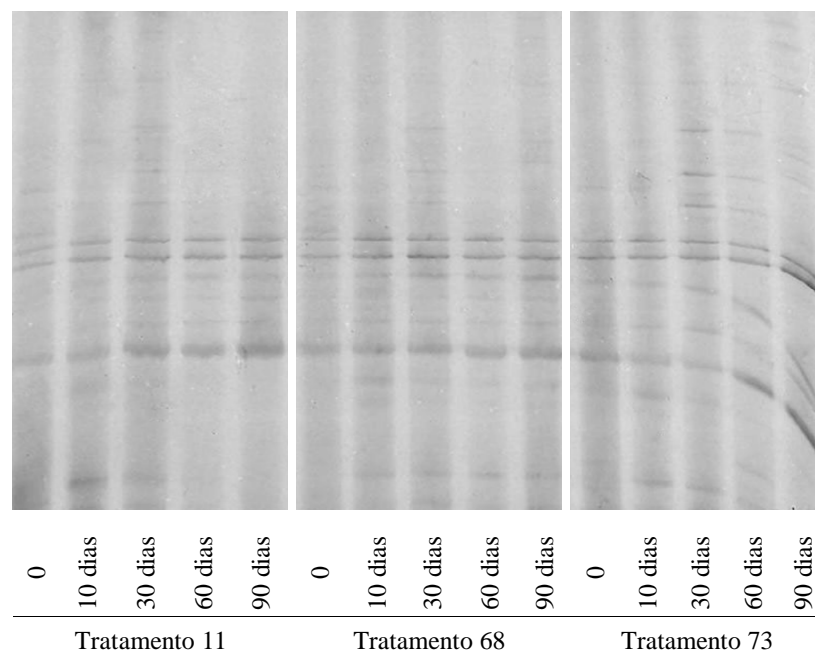


Figura 1 Comunidade bacteriana nas silagens de milho inoculadas com as cepas 11, 68 e 73, durante o processo de fermentação

Contudo, analisando-se o agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 16S de bactérias ao longo do processo fermentativo (Figura 2), é possível observar que a comunidade bacteriana na forragem fresca (T0) foi similar nos três tratamentos inoculados com as BAL. Após 10 dias de fermentação (T10), nota-se que os perfis de amplicons para os tratamentos avaliados também apresentaram 100% de similaridade, embora uma discriminação em relação ao T0 tenha sido observada. Com base nestes dados, é possível relatar que a presença dos diferentes inoculantes não alterou a comunidade bacteriana após este período de fermentação. No entanto, essas diferenças podem não ter sido observadas em função da baixa população de bactérias de uma determinada espécie, visto que a técnica de PCR-DGGE apresenta um limite mínimo de células para a detecção da população microbiana.

No decorrer do processo fermentativo, houve discriminação entre as silagens avaliadas, embora similaridades entre os perfis de amplicons tenham sido observadas dentro de um mesmo tratamento, em diferentes tempos de fermentação. O processo fermentativo após 30 dias não exerceu influência sobre a população bacteriana na silagem inoculada com a cepa 68 em função da similaridade encontrada entre os perfis de amplicons nos tempos T30 e T60. O mesmo pode ser observado para o tratamento inoculado com a cepa 73, em que os perfis de bandas nos tempos T60 e T90 foram agrupadas com aproximadamente 75% de similaridade. No entanto, estes dois tratamentos não apresentaram muitas diferenças, pois foram agrupados próximos, apresentando 60% de similaridade entre os perfis de amplicons das populações.

Ao final do processo fermentativo (90 dias), não houve discriminação entre os perfis apresentados na silagem inoculada com a cepa 11 para os tempos T60 e T90 de fermentação (100% de similaridade), revelando que a população bacteriana permaneceu estável. Uma grande diversidade foi observada nos tratamentos inoculados com as cepas 68 e 73, após 90 dias de fermentação. Por esse motivo, estes tratamentos foram agrupados isoladamente dos demais, no decorrer do processo fermentativo.

Assim, foi possível concluir que a silagem inoculada com a cepa 11 foi melhor adaptada à silagem de milho e ao processo fermentativo, em virtude da menor diversidade de bactérias encontradas neste tratamento. Além disso, é possível ressaltar a capacidade competitiva desta cepa em relação às demais.

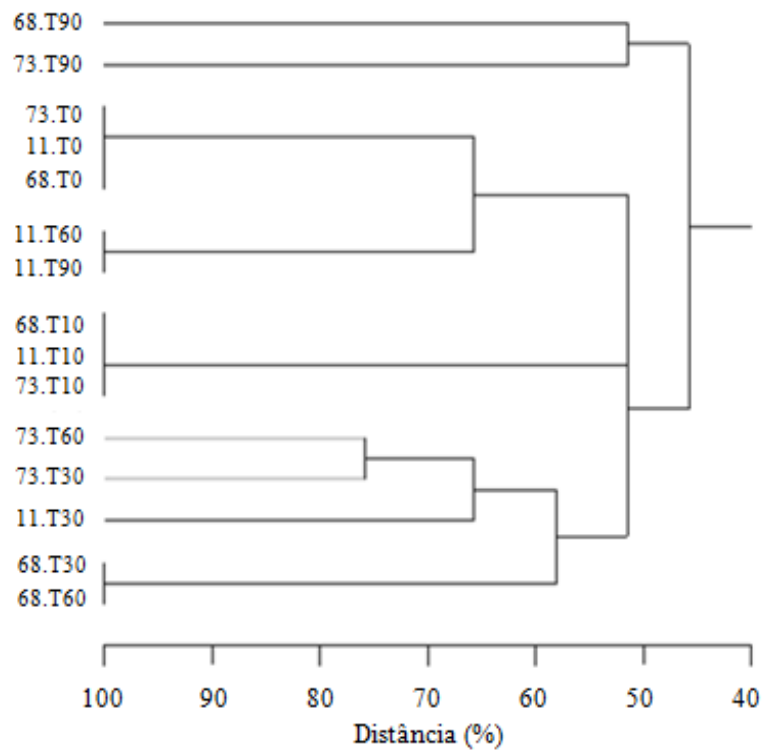


Figura 2 Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 16S de bactérias de silagens de milho inoculadas com as cepas 11, 68 e 73, ao longo do processo fermentativo

T0 – forragem fresca; T10 – silagem após 10 dias de fermentação; T30 – 30 dias; T60 – 60 dias e T90 – 90 dias.

4 CONCLUSÃO

A inoculação de diferentes cepas de BAL alterou de forma similar as características bromatológicas sem apresentar, no entanto, diferenças no valor nutritivo das silagens de milho avaliadas após o período de fermentação. Entretanto, é possível ressaltar que as silagens inoculadas com as cepas 11, 68 e 73 apresentaram características de produção de metabólitos que se assemelharam aos resultados encontrados em cepas heterofermentativas, com elevadas produções dos ácidos acético e lático. Contudo, as maiores perdas de matéria seca foram observadas nestes tratamentos.

Os tratamentos inoculados com as cepas 11, 47, 68 e 73 foram os que apresentaram os melhores resultados após o tempo de exposição ao ar, indicando menor atividade dos microrganismos de deterioração aeróbia presentes nas silagens de milho.

Por meio da técnica de PCR-DGGE, foi possível identificar uma maior diversidade bacteriana nas silagens inoculadas com as cepas 68 e 73, ao longo do processo fermentativo. Todavia, avaliando o tratamento inoculado com a cepa 11, notou-se que a BAL inoculada foi mais competitiva em função da menor diversidade encontrada neste tratamento.

Em função do caráter fermentativo e com as melhorias alcançadas após a exposição aeróbia, a BAL inoculada no tratamento 11 é considerada fonte promissora para ser utilizada como inoculante em silagens de milho. Estudos posteriores para identificar e avaliar a eficiência desta cepa em silos de grande escala são necessários.

REFERÊNCIAS

ASHBELL, G.; LISKER, N. Aerobic deterioration in maize silage stored in a bunker silo under farm conditions in a subtropical climate. **Journal of the Science of Food Agriculture**, Amsterdam, v. 45, n. 4, p. 307-315, 1988.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**: volume 1. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990.

ÁVILA, C. L. S. et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 384-394, Dec 2009.

ÁVILA, C. L. S. et al. Estabilidade aeróbia de silagens de capim-mombaça tratadas com *Lactobacillusbuchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 5, p. 779-787, Mai. 2009 a.

ÁVILA, C. L. S., et al. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 384-394, Dec. 2009b.

ÁVILA, C. S. et al. Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 255-261, Mar. 2008.

BACH, A. et al. Effectiveness of *Lactobacillus buchneri* to improve aerobic stability and reducing mycotoxin levels in maize silages under field conditions. In: PARK, R. S.; STRONGE, M. D. (Ed.). **SILAGE PRODUCTION AND UTILIZATION PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE**, 19., 2005, Belfast. **Anais...** Belfast: Northern Ireland, 2005.

BOLSEN, K. K. Silage: basic principles. In: BARNES, R. F.; MILLER, D. A.; NELSON, C. J. (Eds.). **Forages**. 5. ed. Ames: Iowa State University, 1995. p. 163-176.

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

CHARMLEY, E. Towards improved silage quality: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 81, n. 2, p. 157-168, Feb. 2001.

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

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

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 350-356, Mar. 1956.

ELFERINK, S. J. W. H. O.; DRIEHUIS, F.; SPOELSTRA, S. F. Improving aerobic stability of maize silage with heterofermentative lactic acid bacteria as inoculants. of the VIII In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE CONSERVATION, 8., 1997, Brno. **Proceedings...** Brno: Czech Republic, 1997.

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

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, jul./dez. 2008.

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

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

FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effects of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum* on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 4, p. 818-826, Oct. 2004.

GIMENES, A. L. G. et al. Composição química e estabilidade aeróbia em silagem de milho preparadas com inoculante bacteriano e/ou enzimático. **Acta Scientiarum Animal Science**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 153-158, 2006.

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

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

JAANKOLA, S.; HUHTANEN, P.; HISSA, K. The effect of cell wall degrading enzymes or formic acid fermentation quality on digestion of grass silage by cattle. **Grass Forage Science**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 75-87, Mar. 1991.

JATKAUSKAS, J.; VROTNIAKIENE, V. Performance of dairy cows fed with high moisture whole plant maize silage inoculated with *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum*. **Archiva Zootechnica**, România, v. 8, p. 57-64, 2005.

JOBIM, C. C. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, supl., p. 101-119, jul. 2007.

KROONEMAN, J. et al. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, n. 2, p. 639-646, Mar. 2002.

KUNG JÚNIOR, L.; SHAVER, R. Interpretation of silage fermentation analysis report. University of Wisconsin, Madison. **Focus on Forage**, Wisconsin, v. 3, n. 1, p. 1-5, Jan. 2001.

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

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

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

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **Biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe, 1991.

MOON, N. J. et al. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 55, n. 3, p. 454–460, Mar. 1983.

MUCK, R. E. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, St. Joseph, v.47, n. 4, p. 1011-1016, 2004.

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

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Mini review. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 127-141, 1998.

NISHINO, N. Aerobic stability and instability of silages caused by bacteria. In: DANIEL, J. L. P.; ZOPOLLATTO, M.; NUSSIO, L. G. (Ed.). PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2011. p. 127-141.

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

OLDENBURG, E. Mycotoxins in conserved forage. In: PAHLOW, G.; HONIG, H. (Ed.). **Forage conservation towards 2000**. Braunschweig: European Grassland Federation, 1991. p. 191-205.

OLIVEIRA, J. S.; SOUZA SOBRINHO, F.; REIS, F. A. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho destinados à silagem em bacias leiteiras do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 1, p. 45-50, jan./mar. 2007.

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 4, p. 1063-1073, Apr. 1993.

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

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

RANJIT, N. K.; TAYLOR, C. C.; KUNG JÚNIOR, L. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. **Grass Forage Science**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 73-81, June 2002.

REIS, R. A.; GARCIA, R.; QUEIROZ, A. C. Efeitos da amonização sobre a qualidade do feno de gramíneas tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 8, p. 1183-1191, ago. 1991.

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

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

TAYLOR, C. C.; KUNG JÚNIOR, L. The effect of *Lactobacillus buchneri*40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 6, p. 1526-1532, June 2002.

VAN SOEST, P. J. **Nutrition ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994.

VAN SOEST, P. J., FERREIRA, A. M., HARTLEY, R. D. Chemical properties of fibre in relation to nutritive quality of ammonia-treated forages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 155-164, June 1984.

APÊNDICE**Tabela 1A Identificação das cepas de BAL inoculadas nas silagens de milho**

Identificação das cepas de BAL	Codificação
6	UFLA SLM 06
8	UFLA SLM 08
11	UFLA SLM 11
47	UFLA SLM 47
51	UFLA SLM 51
52	UFLA SLM 52
68	UFLA SLM 68
70	UFLA SLM 70
73	UFLA SLM 73