

VANESSA PAULA DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E UTILIZAÇÃO DE
ISOLADOS BACTERIOCINOGENICOS COMO INOCULANTE EM
SILAGEM DE ALFAFA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586b Silva, Vanessa Paula da, 1988-
2014 Bioprospecção de bactérias lácticas e utilização de isolados
bacteriocinogênicos como inoculante em silagem de alfafa / Vanessa
Paula da Silva. - Viçosa, MG, 2014.
xiv, 49f. : il. : 29 cm.

Orientador: Odilon Gomes Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 42-49.

1. Alfafa. 2. Silagem. 3. Fermentação. 4. Bactéria do ácido lático.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Mestrado em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.31

VANESSA PAULA DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E UTILIZAÇÃO DE
ISOLADOS BACTERIOCINOGENICOS COMO INOCULANTE EM
SILAGEM DE ALFAFA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 25 de julho de 2014.

Prof^a. Karina Guimarães Ribeiro
(Coorientadora)

Prof^a. Stefanie Alvarenga Santos

Prof. Odilon Gomes Pereira
(Orientador)

À minha amada mãe Aparecida,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, força e amor.

À minha mãe, exemplo de força, coragem e pelo apoio e amor incondicional.

À minha família por sempre acreditarem em mim e não me deixarem desistir.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Zootecnia, ao Laboratório de Forragicultura e a todos os professores pelos conhecimentos ministrados.

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

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao INCT-CA pelo financiamento parcial desta pesquisa.

Ao professor Odilon Gomes Pereira pela orientação, confiança e apoio para a realização deste trabalho.

Aos professores Karina Guimarães Ribeiro, Hilário Cuquetto Mantovani e Stefanie Alvarenga Santos pelas colaborações.

Aos irmãos científicos que estiveram presente a todo o momento, demonstrando que somos uma equipe e acima de tudo, grandes amigos: Juliana, Mariele, Leidy, Thiago, Wender e Leandro.

Aos estagiários e amigos Aline, Rafael, Felipe, Paula e Augusto pela ajuda e risadas que fizeram dos meus dias mais felizes.

Às mães científicas Eliana e Néia, que iluminaram meu caminho. Pela força, conhecimentos ministrados, amizade e carinho.

Aos meus amigos Jarbas e Gercino pela amizade e companheirismo nas horas alegres e nos perrengues.

Aos Funcionários do Departamento de Zootecnia Faustino Monteiro, Raimundo, Valdir e Mário pela colaboração e auxílio sempre que necessário.

À república 7 Léguas (Isabela, Lorena, Fernanda, Bruna, Paola e Camila Delveaux) que mesmo distante se fazem presente em minha vida, as irmãs que escolhi.

BIOGRAFIA

Vanessa Paula da Silva, Filha de Aparecida Natal da Costa e Ulisses Gonzaga da Silva, nasceu em 09 de agosto de 1988, em Ribeirão Pires – SP.

Em março de 2007 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, concluindo em janeiro de 2012. Em agosto de 2012 ingressou no mestrado em zootecnia, no curso de Pós-Graduação em Zootecnia, pela Universidade Federal de Viçosa-MG.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1 Local do experimento e condições climáticas.....	6
2.2 Ensilagem e delineamento experimental	6
2.3 Quantificação das populações microbianas.....	7
2.4 Perfil fermentativo e composição química.....	7
2.5 Caracterização de bactérias lácticas	8
2.6 Identificação dos isolados.....	10
2.7 Filogenia molecular	11
2.8 Análises estatísticas	11
RESULTADOS.....	13
3.1 Composição e populações microbianas da planta antes da ensilagem	13
3.2 Perfil fermentativo	13
3.3 Populações microbianas.....	21
3.4 Composição química das silagens	23
3.5 Caracterização dos isolados.....	24
3.6 Identificação e análise filogenética	28
DISCUSSÃO	35
4.1 Composição química	35
4.2 Perfil fermentativo	35
4.3 Composição química das silagens	38
4.4 Populações microbianas.....	38

4.5 Identificação dos isolados.....	39
CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS.....	41

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1	Tabela 1. Composição química e população microbiana da alfafa antes da ensilagem.	13
Tabela 2	P-valor e erro padrão da média (EPM) das variáveis do perfil fermentativo de silagens de alfafa tratadas com inoculantes em diferentes dias de fermentação.	14
Figura 1	Teores de MS (a) e PB (b) de silagens de alfafa em função de inoculantes e período de fermentação.	15
Figura 2	Comportamento do teor de matéria seca (a), proteína bruta (b) e nitrogênio amoniacal (c) das silagens em função de período de fermentação.	16
Figura 3	Valores de pH (a) e nitrogênio amoniacal (b) de silagens de alfafa em função de inoculantes e período de fermentação.	17
Figura 4	Comportamento do pH das silagens em função de período de fermentação.	18
Figura 5	Concentrações de ácido láctico (a) e ácido acético (b) de silagens de alfafa em função de inoculantes e período de fermentação.	19
Figura 6	Concentrações de ácido butírico (a) e ácido propiônico (b) de silagens de alfafa em função de inoculantes e período de fermentação.	20
Figura 7	Comportamento dos teores de ácido láctico (a), acético (b), butírico (c) e propiônico (d) das silagens em função de período de fermentação.	21
Tabela 3	Populações microbianas médias em silagens de alfafa.	22

Figura 8	Contagem da população de enterobactérias em silagens de alfafa em função de período de fermentação.	22
Figura 9	Contagem das populações de BAL, mofos e levedura em silagens de alfafa em função de período de fermentação.	23
Tabela 4	Composição química (g/Kg MS) de silagens de alfafa tratadas com inoculantes aos 56 dias de fermentação.	23
Tabela 5	Caracterização dos isolados de bactérias lácticas isoladas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação.	24
Tabela 6	Atividade antagonista dos isolados de bactérias lácticas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação.	26
Tabela 7	Informações sobre as sequências obtidas do produto PCR do 16S rDNA dos isolados obtidos.	29
Figura 10	Árvore filogenética baseada na sequência do gene DNA ribossomal 16 S de estirpes de <i>Lactobacillus plantarum</i> , mostrando a relação dessas estirpes com outras estirpes relatadas (número de acesso no parêntese). <i>Salmonella</i> entérica subsp. entérica serovar Typhi foi utilizado como grupo externo. A árvore foi reconstruída pelo método Neighbor-joining, e os números nos nós das ramificações da árvore referem aos valores de bootstrap (expresso como porcentagem de 1000 réplicas).	32
Figura 11	Árvore filogenética baseada na sequência do gene DNA ribossomal 16 S de bactérias do gênero <i>Pediococcus</i> , mostrando a relação dessas estirpes com outras estirpes relatadas (número de acesso no parêntese). <i>Salmonella</i> entérica subsp. entérica serovar Typhi foi utilizado como grupo externo. A árvore foi reconstruída pelo método Neighbor-joining, e os números nos nós das ramificações da árvore referem aos valores de bootstrap (expresso como porcentagem de 1000 réplicas).	33

Figura 12 Árvore filogenética baseada na sequência do gene DNA 34
ribossomal 16 S de *Weissella cibaria*, mostrando a relação
dessas estirpes com outras estirpes relatadas (número de
acesso no parêntese). *Salmonella* entérica subsp. entérica
serovar Typhi foi utilizado como grupo externo. A árvore foi
reconstruída pelo método Neighbor-joining, e os números nos
nós das ramificações da árvore referem aos valores de
bootstrap (expresso como porcentagem de 1000 réplicas).

LISTA DE ABREVIATURAS

- BAL, bactéria ácido láctica
- EE, extrato etéreo
- ENT, enterobactérias
- FDA, fibra insolúvel em detergente ácido
- FDNcp, fibra insolúvel e detergente neutro corrigida para cinzas e proteína
- MM, matéria mineral
- MS, matéria seca
- NH_3/NT MS, nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total na matéria seca
- NIDA, nitrogênio insolúvel em detergente ácido
- PB, proteína bruta
- UFC, unidades formadoras de colônias

RESUMO

SILVA, Vanessa Paula da, M.Sc, Universidade federal de Viçosa, julho de 2014.
Bioprospecção de bactérias lácticas e utilização de isolados bacteriocinogênicos como inoculante em silagens de alfafa. Orientador: Odilon Gomes Pereira.
Coorientadores: Karina Guimarães Ribeiro e Hilário Cuquetto Mantovani.

Avaliou-se o perfil fermentativo, a composição química e as populações microbianas de silagens de alfafa (*Medicago sativa*) tratadas com inoculantes microbianos (I) em diferentes períodos de fermentação (P), bem como a diversidade de bactérias lácticas da silagem controle, sob condições tropicais. Foi usado um arranjo fatorial 4 x 6, no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os inoculantes avaliados foram: controle (sem tratamento), comercial - Sil All (Alltech, Brasil) e duas estirpes de bactérias lácticas com atividade antimicrobiana comprovada (*Pediococcus acidilactici* (10.6) e *Pediococcus pentosaceus* (6.16)), isoladas de silagem de estilosantes (*Stylosanthes macrocephala* x *S. capitata* cv. Campo Grande), uma leguminosa tropical. Os períodos de fermentação foram 1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias. A alfafa foi colhida aos 82 dias após a semeadura, no início do estágio de florescimento, e picada em partículas de 1,5 cm. O material foi ensilado em sacos plásticos de 25 cm x 35 cm e selados a vácuo. Foram registradas na forragem, antes da ensilagem, populações de bactérias do ácido láctico, enterobactérias, mofos e leveduras de 5,42, 5,58, 4,82 e 4,8 log UFC/g de forragem, respectivamente. A composição química das silagens foi avaliada apenas aos 56 dias de fermentação. As variáveis ácido láctico e ácido propiônico não foram afetadas ($P>0,05$) pela interação I x P. Foi observado efeito de período ($P<0,05$) para todas as variáveis e de inoculante ($P<0,05$) para matéria seca, pH, amônia, ácido láctico e ácido acético. As silagens tratadas com inoculantes apresentaram menores ($P<0,05$) valores de pH e amônia, no último dia de fermentação, em relação à silagem controle. Para o ácido láctico, foram registrados maiores valores para a silagem tratada com o isolado 6.16, seguido do 10.6. As populações microbianas não foram influenciadas pelos inoculantes e apenas o grupo de enterobactérias foi afetado pelos períodos de fermentação, com menor contagem deste no 14º dia. Não foi observado efeito ($P>0,05$) de inoculantes sobre os teores de FDNcp, NIDA, PB e lignina, no último dia de fermentação. Porém, foi observado efeito ($P<0,05$) de inoculante sobre o conteúdo de EE. Os isolados avaliados aumentam as concentrações de ácido láctico e

reduzem os teores de nitrogênio amoniacal e pH das silagens, demonstrando potencial para uso como inoculante para silagem. *Weissella cibaria*, *Lactobacillus plantarum* e espécies do gênero *Pediococcus* predominam em silagens de alfafa, sendo que a primeira se relacionou com estirpes que possuem atividade antifúngica. A relação filogenética dos isolados 14.3 e 56.20 com a sequência parcial do gene 16S rDNA de *Lactobacillus plantarum* bacteriocinogênico despertam interesse para o uso em silagens.

ABSTRACT

SILVA, Vanessa Paula da, M.Sc, Universidade federal de Viçosa, July, 2014. **Screening of lactic acid bacteria and use of bacteriocinogenic strains as inoculant on alfalfa silage.** Adviser: Odilon Gomes Pereira. Co-Advisers: Karina Guimarães Ribeiro e Hilário Cuquetto Mantovani.

It was evaluated the fermentation characteristics, chemical composition and microbial populations of alfalfa (*Medicago sativa*) silage treated with microbial inoculants (I) in different fermentation periods (P), as well as the diversity of lactic acid bacteria in the control silage under tropical conditions. Data were analyzed as a 4 x 6 factorial in a completely randomized design with three replications. The inoculants were: control (no treatment), Commercial – Sil All (Alltech, Brazil) and two strains of lactic acid bacteria with antimicrobial activity (*Pediococcus acidilactici* (10.6) and *Pediococcus pentosaceus* (6:16)), isolated from *Stylosanthes* (*Stylosanthes macrocephala* x *S. capitata* cv. Campo Grande) silage, a tropical legume. The fermentation periods were 1, 3, 7, 14, 28 and 56 days. The alfalfa was harvested at 82 days after sowing and chopped into particles of 1.5 cm. The material was ensiled in plastic bags of 25 cm x 35 cm, sealed under vacuum. The population of lactic acid bacteria, enterobacteria, mold and yeasts before ensiling were 5.42, 5.58, 4.82 and 4.8 log CFU/g, respectively. The chemical composition of the silages was evaluated only on the 56 days of fermentation. The concentrations of lactic acid and propionic acid were not affected by the I x P interaction ($P > 0.05$). It was observed effect of fermentation period on all variables ($P < 0.05$) and effect ($P < 0.05$) of inoculant was observed on dry matter, pH, ammonia nitrogen, lactic acid and acetic acid. Silage treated with inoculant had lower ($P < 0.05$) pH and ammonia nitrogen on the last day of fermentation compared with the control treatment. For lactic acid, higher values were observed for silage treated with strain 6.16 followed strain 10.6. Microbial populations were not influenced by inoculant. Only the group of enterobacterias was affected by fermentation periods ($P < 0.05$) and showed the lowest count in the 14th day of fermentation. No effect was observed for inoculant ($P > 0.05$) on the levels of NDF, ADIN, CP and lignin for the last day of fermentation. However, an effect ($P < 0.05$) of inoculant was observed over the content of EE. The strains evaluated increase concentrations of lactic acid and decrease the levels of ammonia nitrogen and pH of silages, demonstrating potential for use as silage inoculant on alfalfa silage. *Weissella cibaria*, *Lactobacillus plantarum* and species

from the *Pediococcus* genus predominate in alfalfa silages, and the first related to strains that have antifungal activity. The *Weissella cibaria* specie was related to strains that have antifungal activity. The phylogenetic relationship of the isolates 14.3 and 56.20 with the partial sequence of 16S rDNA of *Lactobacillus plantarum* bacteriocinogenic encourages interest for use in silage.

INTRODUÇÃO

O planejamento alimentar nos sistemas de produção animal é ponto chave para que estes sejam eficientes, pois o Brasil apresenta oscilações na produção de alimentos ao longo do ano ocasionadas pela estacionalidade da produção de forragem, com elevadas produtividades de forragem de boa qualidade em determinada época do ano (águas) e escassez em outra (secas) sendo esta de má qualidade. As estratégias para contornar tal problema visam à uniformidade da produção animal, de forma que não haja limitação na disponibilidade de alimentos. Nesse sentido a conservação de forragens úmidas na forma de silagem se torna alternativa atrativa, pois quando bem sucedida, garante o fornecimento de alimento de boa qualidade.

Silagens são produtos da fermentação anaeróbia de carboidratos solúveis de forragens úmidas em ácidos orgânicos de cadeia curta por um complexo de micro-organismos, predominantemente as bactérias lácticas (Klocke et al., 2006).

Para êxito no processo de produção de silagem, algumas características da planta bem como o adequado processo de ensilagem devem ser considerados. As características inerentes à planta incluem: Adequado teor de matéria seca (30-35%), pois favorece a compactação e expulsão do oxigênio; teor de 8% na matéria seca de carboidratos solúveis em água (McDonald, 1981); e baixo poder tampão, a planta não deve oferecer resistência a redução do pH para valores entre 3,8 e 4,0 (McCullough, 1977). Aliada a essas características, a realização correta de todo o processo de ensilagem, desde a colheita até o enchimento e fechamento do silo, está diretamente relacionada à qualidade final da silagem.

As culturas tradicionalmente utilizadas para produção de silagem são o milho e o sorgo, fato explicado por apresentarem características atrativas ao processo tais como, alta produtividade, alto valor energético, boa aceitabilidade pelos animais e boa qualidade da silagem produzida. Entretanto, segundo Evangelista et al. (1984) e Vilela (1998) as silagens destas culturas possuem baixo valor proteico, impossibilitando seu uso de forma exclusiva na alimentação animal, principalmente para animais de alta exigência nutricional.

Diante desse cenário, a utilização de silagem de leguminosa apresenta-se como uma boa opção para aumentar o valor proteico da dieta, além de fornecer maior

quantidade de cálcio e fósforo, podendo reduzir o custo de produção por meio da redução no uso de concentrado proteico (Baxter, 1984). Além disso, as leguminosas são fixadoras de nitrogênio no solo, podendo diminuir os custos com adubo nitrogenado e contribuir para preservação do meio ambiente.

A alfafa (*Medicago sativa*) é uma planta de interesse mundial e considerada uma das mais importantes forrageiras, haja vista à abrangência da área explorada, utilização em todo o mundo, alto valor nutricional, alta produtividade, elevado teor de proteína, alta digestibilidade e grande potencial de consumo animal (Carvalho e Vilela, 1994; Vilela, 2001). Apresenta altas concentrações de vitaminas A, E e K e de minerais (principalmente cálcio, fósforo, potássio e magnésio) além de apresentar grande capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio no solo. É a planta forrageira mais antiga que se tem conhecimento e a espécie mais utilizada nos Estados Unidos e Argentina para alimentação de vacas leiteiras.

No Brasil, seu cultivo se concentra na região sul, sendo limitado em outras regiões do país devido a fatores tais como, a pequena disponibilidade de informações tecnológicas sobre sua exploração em condições tropicais e a falta de cultivares adaptado a diferentes condições edafoclimáticas no Brasil (Lédo et al., 2010).

Apesar de apresentar-se atrativa devido ao alto valor nutritivo, a alfafa bem como as demais leguminosas possuem algumas limitações à sua ensilagem como, baixos teores de matéria seca e de carboidratos solúveis em água (Dewhurst et al., 2003) e alta capacidade tampão (McDonald and Henderson, 1962).

Frente às limitações citadas e visando êxito na produção de silagens de leguminosas com boa qualidade, algumas estratégias de manejo devem ser adotadas. Em silagens de alfafa geralmente é realizado o emurchecimento após o corte para elevar seu teor de matéria seca a valores acima 30%, pois é uma cultura considerada vulnerável a fermentações clostrídicas principalmente quando ensilada com umidade $\geq 70\%$ (Muck e Kung, 2007).

Diversos tipos de aditivos também são utilizados para manipular a fermentação e garantir que a forragem seja preservada de forma adequada. Os inoculantes microbianos são muito utilizados e têm se mostrado eficiente para promover adequada fermentação na ensilagem de forragens em condições de clima temperado com pesquisas desde os anos 70 (Ohya et al., 1975; Wyss e Vogel, 1994; Addah et al., 2011).

As bactérias lácticas são utilizadas como aditivo para garantir a preservação do valor nutritivo da forragem através da redução da respiração da planta e atividade enzimática e por meio da inibição de micro-organismos indesejáveis da flora epifítica. (Contreras-Govea et al., 2013). Em um adequado processo fermentativo, as bactérias do ácido láctico dominam a fermentação proporcionando a rápida queda do pH a valores que permitam a preservação da forragem conservada. Ainda assim, o sucesso do seu uso em silagens depende da habilidade da bactéria em crescer rapidamente, da presença de substrato adequado e da população de bactéria inoculada em relação à população epifítica da forragem (Muck, 1988).

O principal ácido orgânico produzido pelas bactérias lácticas da forragem é o ácido láctico, mas outros ácidos orgânicos de cadeia curta também são produzidos e devido ao efeito combinado do baixo pH e a atividade antimicrobiana, a forragem é conservada por longos períodos (Amado et al., 2012). Apesar dos ácidos orgânicos serem capazes de inibir o crescimento de micro-organismos indesejáveis, essa atribuição não pode ser relacionado apenas a estes, pois outros compostos são produzidos dentre eles o, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil e bacteriocinas, que possuem ação antagonista com outros micro-organismos (Piard e Desmazeaud, 1992; Ammor et al., 2006).

Grande interesse tem sido despertado com relação à atividade antimicrobiana das bactérias do ácido láctico na sua capacidade de produzir bacteriocinas que são definidas como compostos proteínáceos produzidos por bactérias que inibem (efeito bacteriostático) ou destroem (efeito bactericida) espécies relacionadas (TAGG et al., 1976). O objetivo de se utilizar estirpes de bactérias lácticas bacteriocinogênicas na ensilagem se deve ao controle de micro-organismos patogênicos e deterioradores, visto que estes podem competir com as bactérias do ácido láctico por substrato (McDonald et al., 1991).

Algumas das bactérias lácticas homofermentativas comumente utilizadas em inoculantes são culturas viáveis das seguintes espécies: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici* e *Enterococcus faecium* (Pang et al., 2011). Bactérias heterofermentativas também são utilizadas e encontradas em formulações de inoculantes comerciais, como o *Lactobacillus buchneri*. Quando a fermentação cessa, essas bactérias convertem o ácido láctico a ácido acético, reduzindo o número de leveduras na silagem (Muck, 2008).

Trabalhos conduzidos no exterior trazem estudos sobre a população de bactérias existentes na cultura da alfafa assim como a identificação e caracterização destas. Na China, estirpes de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kimchii*, *Lactobacillus farciminis* e *Lactobacillus pentosus* foram encontradas em alfafa e utilizadas como inoculantes em suas silagens proporcionando rápido declínio no pH e maior produção de lactato em relação a silagem controle (Wang et al., 2006). Outro trabalho realizado na China com silagem de milho, sorgo, arroz e alfafa, 110 isolados foram agrupados e caracterizados como bactérias lácticas através de testes morfológicos, coloração diferencial de gram, catalase e produção de ácido, sendo o gênero *Lactobacillus* o predominante em silagens de alfafa, o qual foi detectado através de técnicas moleculares (Pang et al., 2011). Aumento da espécie *Lactobacillus plantarum* e declínio da espécie *Lactobacillus buchneri* foi observado na avaliação de silagens de alfafa 96 horas após a ensilagem com quatro inoculantes comerciais através da técnica de RT-PCR em Wisconsin, EUA (Stevenson et al., 2006). Em estudo da dinâmica da população bacteriana em alfafa emurchecida, silagem de alfafa emurchecida e silagem de alfafa exposta ao ar, desenvolvido na Califórnia, a ordem *Lactobacillales* foi composta principalmente de membros da família *Streptococcaceae* e menor quantidade da *Leuconostocaceae*, *Lactobacillaceae* e *Enterococcaceae* (McGarvey et al., 2013). Estes trabalhos evidenciam a grande exploração das pesquisas com inoculantes, bem como a utilização e evolução de técnicas mais precisas na avaliação de silagens em regiões de clima temperado.

O conhecimento, disponibilidade e aplicação de inoculantes ainda são limitados em muitas áreas nos trópicos, sendo a maioria, se não todos, compostos por estirpes de bactérias isoladas de forragens de clima temperado (Heinritz et al., 2012) com resultados variáveis, sendo, portanto objeto de muitos estudos com intuito de entender melhor a interação das bactérias inoculadas com outros micro-organismos e como essa interação direciona a fermentação e afeta a utilização da silagem pelos animais (Weinberg and Muck, 1996).

Rangrab et al. (2000) avaliaram a utilização do inoculante Sil All em silagens de alfafa emurchecidas ou não e observaram diminuição da FDN em silagens não emurchecidas e menor pH e concentração de amônia em todas as silagens. Ao trabalharem com o inoculante Silobac em silagens de alfafa emurchecidas Magalhães et al. (2003) não observaram alteração no consumo, produção e composição do leite de vacas da raça holandesa. Manginelli et al. (2005) utilizando Silobac em silagens

de alfafa emurhecidas na alimentação de vacas não lactantes e não gestantes não encontraram efeito para digestibilidade da matéria seca e demais frações e consumo de matéria seca.

Os trabalhos realizados com silagem de alfafa no Brasil envolvendo inoculantes comerciais se limitaram a avaliações do perfil fermentativo, desempenho de animais e avaliações químico-bromatológicas sem, contudo, caracterizar e identificar as bactérias lácticas predominante na cultura. A relevância do ultimo é evidenciada, pois, a capacidade de estirpes bacterianas específicas em suportar uma multiplicidade de fatores de estresse pode ser um fator determinante para um inoculante de sucesso (Broderick et al., 2009).

Frente ao exposto, conduziu-se o presente trabalho com o objetivo de isolar, caracterizar e identificar bactérias lácticas de silagens de alfafa; quantificar as populações microbianas e acompanhar as alterações no perfil fermentativo de silagens de alfafa inoculadas com estirpes de *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* e com inoculante microbiano comercial em diferentes períodos de fermentação.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento e condições climáticas

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizada no município de Viçosa, Minas Gerais, entre os meses de maio e julho de 2013. A cidade de Viçosa está situada a 20° e 45' de latitude sul, 42° e 51' de longitude oeste e 657 metros de altitude, com precipitação média anual de 1341 mm.

2.2 Ensilagem e delineamento experimental

A alfafa cv. crioula foi cultivada em uma área de 1000 m², no Setor de Forragicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa e colhida com uma segadora costal, 82 dias após a semeadura, no início do estágio de florescimento. Após o corte, a alfafa foi emurchecida por 6 horas no campo e em seguida, a forragem foi picada em máquina forrageira estacionária e ensilada em bags com medidas 25 cm x 35 cm (Doug Care Equipment, Springville, CA). Em cada bag, foram adicionados 500 g de forragem e a condição de anaerobiose no interior do mini-silo foi estabelecida utilizando seladora a vácuo (Eco vacuum 1040, Orved, Italy).

Foi usado um esquema fatorial 4 x 6 (quatro inoculantes x seis períodos de fermentação) no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os períodos de fermentação avaliados foram: 1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias. Os inoculantes avaliados foram: 1: Controle (sem inoculante); 2: Inoculante comercial; 3: *Pediococcus acidilactici* (Isolado 1: 10.6); 4: *Pediococcus pentosaceus* (Isolado 2: 6.16). O inoculante comercial utilizado foi o Sil-All® 4x4 W.S. (Alltech, Brasil) que apresenta em sua composição sacarose, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus salivarius* subesp. *Salivarius*, dióxido de silício, amilase, celulase, enzima hemicelulolítica e xilanase.

Como a planta no momento da ensilagem apresentava uma população de bactérias lácticas de 10⁵ UFC/g de forragem, foi adotada uma taxa de aplicação de inoculantes de 10⁶ UFC/g de forragem. Para isso foi utilizada 1,89 gramas de inoculante comercial em 10 kg de forragem (189 g/t). Os inoculantes foram diluídos em água destilada e a mesma quantidade utilizada para a diluição destes foi aplicada à silagem controle.

As estirpes de *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentosaceus* usadas nos tratamentos 3 e 4, respectivamente, com atividade antimicrobiana comprovada (Silva, 2011), foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa.

2.3 Quantificação das populações microbianas

As populações microbianas foram quantificadas na forragem e nas silagens em todos os períodos de fermentação.

O extrato aquoso da silagem e da forragem foi preparado a partir de 25 g de amostra de silagem de cada mini-silo, nos diferentes períodos de fermentação, e da forragem antes da ensilagem, homogeneizados em 225 mL de solução estéril (Ring Solution®, Oxoid, England, Hampshire) em liquidificador industrial por 1 minuto. Posteriormente, foi mensurado o pH desse extrato com potenciômetro. O extrato aquoso foi dividido em duas porções. Uma foi submetida a diluições seriadas variando de 10^{-1} a 10^{-10} e o cultivo foi realizado em placas de petri estéreis, em meio MRS ágar (Difco™ Lactobacilli MRS Agar®), para bactérias do ácido láctico (BAL), meio VRB ágar (Violet Red Bile Ágar®), para enterobactérias, ambas incubadas a 37°C por 48 horas, e meio BDA (Batata Dextrose Ágar® com 1,5% de ácido tartárico 10% (pH3,5%)), para leveduras e mofos, incubadas a 25°C por 4 dias.

Foram consideradas passíveis de contagem as placas com valores entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias (UFC).

2.4 Perfil fermentativo e composição química

Outra parte do extrato aquoso foi filtrada em papel filtro quantitativo (Whatman® 54), acidificados com solução de ácido metafosfórico 20% e centrifugados a 15000 rpm por 15 minutos, para a determinação dos ácidos orgânicos (lático, acético, butírico e propiônico), como descrito por Kung Jr. e Ranjit (2001). A análise foi realizada em Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC) (THERMO, modelo ACCELLA PDA) acoplado ao detector Ultra Violêta (UV), utilizando-se um comprimento de ondas de 210 nm. A identificação e quantificação dos ácidos lático, acético, butírico e propiônico foram efetuadas utilizando-se a coluna C18 (Fase Reversa) com pressão de 400 PSI e fluxo de 0,8 mL/minuto.

Para determinação do teor de nitrogênio amoniacal, 25 g de amostra dos mini-silos em todos os tempos de abertura, foram acondicionadas em frascos plásticos

com 200 mL de H₂SO₄ 0,2 N (5,61 ml/L) por 48h em refrigeração. Após, o extrato foi filtrado em gaze e congelado a -20°C para posterior análise pelo método de destilação como descrito por Bolsen et al., (1992).

Amostras da forragem na ocasião da ensilagem e das silagens em cada período de fermentação foram submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada de ar a 55°C, por 72 h, e moídas em moinho tipo “willey”, com peneira de 1 mm, para determinação dos teores de matéria seca (MS) pelo método 934,01 e proteína pelo método 984,13 como descrito pela AOAC (1990). Nas amostras da forragem e das silagens correspondentes ao 56º dia de abertura, foram realizadas as análises de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp) (Mertens 2002; Licitra et al. 1996), lignina pelo método do ácido sulfúrico (Van Soest, 1991), carboidratos não estruturais (CNF) pela equação $CNF = 100 - (\%PB + \%FDNcp + \%EE + \%MM)$, extrato etéreo pelo método 920,39 e matéria mineral pelo método 942,05 (AOAC, 1990). Na amostra da forragem foi realizada a análise de carboidratos solúveis em água (Valadares Filho, 1981).

2.5 Caracterização de bactérias lácticas

Amostras de 25 g de silagem (controle) de cada mini-silo nos diferentes períodos de fermentação, e da forragem na ocasião da ensilagem, foram homogeneizados em 225 mL de solução Ring Solution® (Oxoid, England, Hampshire). As amostras foram submetidas a diluições seriadas e em seguida plaqueadas nos diferentes meios de culturas para determinação da população microbiana. A população de BAL foi determinada em meio ágar MRS (Difco™ Lactobacilli MRS Agar), e, imediatamente incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, colônias apresentando diferenças culturais foram escolhidas nas diluições mais elevadas em que houve crescimento e uma quantidade de colônias equivalente à raiz quadrada do valor total de unidades formadoras de colônias (UFC) presente nas placas foi retirada, seguindo as recomendações do BERGEY'S MANUAL FOR SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (1986). As culturas escolhidas foram estriadas em meio ágar MRS (Difco™ Lactobacilli MRS Agar®) acrescido de 0,04 gL⁻¹ púrpura de bromocresol e 5,0 gL⁻¹ de carbonato de cálcio. As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas em jarras de anaerobiose (GasPak™ Plus

Anaerobic System, BBL, Franklin Lakes, NJ). As colônias isoladas foram cultivadas em caldo MRS (De Man, Rogosa e Sharpe, 1960), a 37°C por 48h. O estoque das culturas foi preparado a partir desta cultura ativa, e a suspensão de células foi adicionada de glicerol 20% e estocada a – 20°C. Os isolados foram preliminarmente avaliados quanto à coloração de gram, teste de catalase e produção de ácido em meio ágar MRS adicionado de púrpura de bromocresol. Os isolados caracterizados como gram positivos, catalase negativos e com capacidade de produção de ácido foram selecionados para realização dos demais testes de caracterização.

Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de crescimento em caldo MRS em diferentes temperaturas (15°C e 45°C), concentrações de NaCl (4,0% e 6,5%) e pH (3,5, 4,0, 4,5 e 8,0) (Liu et al., 2012). Os isolados inoculados em meio MRS contendo diferentes concentrações de NaCl e com diferentes pH foram incubados a 37°C. O ajuste do pH foi realizado utilizando-se soluções de NaOH (50%) e de HCl (50%). Para a avaliação da produção de CO₂, os isolados foram cultivados em caldo MRS, contendo tubos de Durham invertidos, e incubados a 37°C por 24 horas. Foram considerados positivos os tubos de Durham com gás em seu interior (presença de bolha) e negativo os que não possuíam gás (Drosinos et al., 2007), caracterizando assim os isolados como hetero e homofermentativo, respectivamente. A avaliação do crescimento dos isolados, nas diferentes condições de cultivo, e a avaliação da produção de CO₂ foram realizadas após 24 horas pela medida da absorbância a 630 nm, em espectrofotômetro (Thermo Scientific®).

A atividade antimicrobiana de cada cultura láctica sobre as bactérias indicadoras foi realizada conforme o método de atividade diferida proposto por TAGG et al. (1976).

Os micro-organismos indicadores utilizados para o teste foram: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Após três ativações consecutivas, foi ajustada a densidade ótica dos isolados crescidos para 0,5 a 630 nm, e, na sequência, foram aplicados às placas de ágar MRS. Em cada placa foram aplicadas microgotas de 5 µl, equidistantes entre si, e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em jaras de anaerobiose (GasPak TM Plus Anaerobic System, BBL, Franklin Lakes, NJ). Após o crescimento nas placas, foi vertida uma sobrecamada de 6 mL de BHI ágar semi-sólido, mantido em banho maria a 47°C, contendo 300 µl da cultura indicadora. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em aerobiose, e após esse

período foram analisadas quanto à formação de halos de inibição ao redor das microgotas. Os halos foram medidos e a zona de inibição correspondeu à medida do diâmetro externo do halo de inibição da colônia subtraído do diâmetro da colônia. A análise foi conduzida em duplicata e a medida do halo de inibição é uma média resultante dos halos.

2.6 Identificação dos isolados

O DNA dos isolados, obtidos da planta forrageira (alfafa) e suas silagens, nos diferentes períodos de fermentação, foi extraído com a utilização do kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification kit, Promega), com modificações em alguns passos no protocolo. Os isolados foram cultivados em 5 mL de caldo MRS e incubados a 37°C por 14 horas. A cultura crescida foi centrifugada (Mikro 200 R) a 10.000 g por 5 minutos, e, em seguida, lavada uma vez com solução salina 0,85%. O sedimento de células obtido foi ressuspensionado em 480 µL de EDTA (50 mM) e imediatamente foram adicionados 50 µL de lisozima a 50 mg mL⁻¹. A partir desta etapa, o procedimento de extração de DNA foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de DNA extraído foi avaliada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific 2000) e estocado a – 20°C.

As sequências do gene 16S rDNA foi amplificada por PCR. Os primers utilizados na PCR para amplificar a sequência do 16S rDNA foram p027F (GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT) (Heuer et al., 1997). A reação PCR foi realizada em tubos microcentrífuga de capacidade de 0,2 mL contendo 50 µL da mistura de reação: DNA (aproximadamente 60 ng); tampão 10X (Tris-HCl 0,1 mol l⁻¹, pH 8,0, KCl 0,5 mol l⁻¹; MgCl₂ 1,5 mmol l⁻¹, pH8,0); dNTP mix (Promega, Madison WI USA); Taq polimerase (Promega) (1 U); primer p027f (0,6 µmol l⁻¹) e 1492 (0,6 µmol l⁻¹). O volume da mistura de reação foi completado para 50 µL com água milli-Q autoclavada. A PCR foi realizada em termociclador (Eppendorff®) e as condições de reações empregadas foram: 94°C/5 minutos; 30 ciclos (desnaturação: 94°C/30 segundos; 60°C por 30 segundos); polimerização: 72°C/2 minutos; extensão final: 72°C/5 minutos. Uma alíquota de 4 µL da mistura de reação PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose (1,4 %) em tampão de Tris Borato EDTA (TBE). O gel foi corado com 0,5 µg ml⁻¹ de brometo de etídio e as bandas foram visualizadas

sobre iluminação UV. O produto PCR obtido foi encaminhado à empresa Macrogen, na Korea, para purificação e sequenciamento das amostras.

As sequências dos isolados foram comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados do GenBank, e alinhadas usando o algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para nucleotídeos. As sequências do gene 16S rRNA que apresentaram similaridade igual ou maior que 97% foram consideradas como pertencentes a uma mesma Unidade Taxonômica Operacional (UTO) (ALTSCHUL et al., 1990).

2.7 Filogenia molecular

Os alinhamentos múltiplos das sequências do gene 16S rRNA dos isolados foram realizados com sequências depositadas no banco de dados do GenBank. Este alinhamento foi criado com a utilização do programa CLUSTALW e MEGA 6.0[®] (TAMURA et al., 2013). O método de Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) foi utilizado para reconstrução da árvore filogenética. Os nós dos ramos individuais foram estimados com valor de bootstrapping com 1000 repetições.

2.8 Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados por intermédio do procedimento MIXED do SAS (versão 9.1). Os inoculantes, os períodos de fermentação, bem como, a interação entre os fatores, foram considerados efeitos fixos no modelo. Foi utilizado um esquema de medidas repetidas no tempo (Littell et al., 1998), sendo os períodos de fermentação (1, 3, 7, 14, 28 e 56 dias após ensilagem) repetidos dentro de cada unidade experimental (silo). As comparações entre os períodos de fermentação seguiram a decomposição ortogonal da soma de quadrados associada às fontes de variação em efeitos linear, quadrático e cúbico e foram conduzidas utilizando o PROC MIXED do SAS (versão 9.1). Assumiu-se a homogeneidade das variâncias entre tratamentos e os graus liberdade foram estimados pelo método de Kenward-Roger. Os modelos de regressão para avaliação dos períodos de fermentação, foram ajustados de acordo com a significância dos parâmetros β_1 , β_2 e β_3 , utilizando o método da máxima verossimilhança restrita através do PROC MIXED e as estimativas dos mesmos foram obtidas através do PROC REG dos SAS (versão 9.1). Para comparação entre inoculantes, as diferenças entre as médias de mínimos quadrados estimadas foram determinadas utilizando-se a opção Diferença Predita

(DIFF) do PROC MIXED do SAS (versão 9.0), sendo considerado 0,05 como o nível de probabilidade máximo tolerado para ocorrência do erro tipo I. A composição química das silagens, avaliada apenas aos 56 dias de fermentação, também foi comparada entre inoculantes, utilizando-se as diferenças entre as médias de mínimos quadrados estimadas. Para o caso de interação significativa entre os fatores, os mesmos foram desdobrados e as médias foram comparadas dentro de cada fator, conforme descrito acima.

Para as variáveis microbiológicas, foi utilizada a transformação dos dados para a base logarítima (Log_{10} UFC), pois variáveis discretas como a contagem em placa, por natureza, não apresentam distribuição normal. Em seguida, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-wilk, utilizando-se 0,05 como nível crítico para ocorrência do erro tipo I, para verificar a adequação. Em caso de adequação, os dados seguiram os procedimentos descritos acima para as demais variáveis. Em caso de não ajustamento à distribuição normal, o modelo avaliado incluiu os efeitos de inoculante, período de fermentação e interação entre os mesmos, atribuindo-se aos dados a distribuição de Poisson, por intermédio do PROC GENMOD dos SAS (versão 9.1). A função de ligação utilizada para o modelo foi a canônica (função natural). As variáveis que apresentaram efeito significativo foram comparadas pela opção Diferença Predita (DIFF) do PROC MIXED do SAS utilizando-se 0,05 como nível crítico para ocorrência do erro tipo I, por se tratarem de variáveis discretas.

RESULTADOS

3.1 Composição e populações microbianas da planta antes da ensilagem

A composição química e a população de micro-organismos antes da ensilagem são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química e população microbiana da alfafa antes da ensilagem.

Item ¹	
MS (g/kg)	313
PB (g/kg MS)	197,3
FDN (g/kg MS)	374,3
CNF (g/kg)	257,1
Lignina (g/k MS)	59,7
EE (g/kg MS)	14,5
MM (g/kg MS)	156,8
NIDA (% NT)	5,78
CHOs solúveis (g/kg)	51,9
BAL (log ufc/g)	5,42
ENT (log ufc/g)	5,68
Mofos (log ufc/g)	4,82
Leveduras (log ufc/g)	4,8
pH	6,07

¹ MS = Matéria seca; PB = Proteína bruta; FDN = Fibra em detergente neutro; FDA = Fibra em detergente ácido; CNF = Carboidratos não fibrosos; EE = Extrato estéreo; MM = Matéria mineral; NIDA = Nitrogênio insolúvel em detergente ácido; CHOs solúveis = Carboidratos solúveis; BAL = Bactéria do ácido lático; ENT = Enterobactérias.

3.2 Perfil fermentativo

Apenas as variáveis ácido lático e ácido propiônico não foram afetadas ($P>0,05$) pela interação inoculante x período de fermentação (Tabela 2).

Tabela 2. P-valor e erro padrão da média (EPM) das variáveis do perfil fermentativo de silagens de alfafa tratadas com inoculantes em diferentes dias de fermentação.

Itens ¹	P-valor			EPM
	Inoculante	Período	Inoculante*Período	
MS	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,27
PB	0,37	< 0,01	< 0,01	0,31
pH	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,03
Amônia	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,19
Ácido Lático	< 0,01	< 0,01	0,06	0,27
Ácido acético	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,11
Ácido butírico	0,08	< 0,01	< 0,01	0,52
Ácido propiônico	0,24	< 0,01	0,06	0,28

¹ MS = Matéria seca; PB = Proteína bruta.

No décimo quarto dia de fermentação, o teor de matéria seca das silagens diferiu ($P<0,05$) entre os inoculantes, sendo registrados maiores valores para as silagens tratadas com os isolados 1 (*Pediococcus acidilactici*) e 2 (*Pediococcus pentosaceus*). Foi observado efeito ($P<0,05$) de inoculante sobre os teores de proteína bruta das silagens somente nos dias 3 e 56 de fermentação (Figura 1). O teor de matéria seca em função de período de fermentação seguiu comportamento quadrático ($P<0,05$) para o isolado 2, com ausência de significância dos parâmetros β_1 , β_2 e β_3 para os demais inoculantes, não ajustando-se nenhum modelo estatístico ($P>0,05$). Para o teor de proteína bruta os inoculantes comercial e isolado 1 seguiram comportamento quadrático ($P<0,05$), enquanto o controle e o isolado 2 seguiram comportamento cúbico ($P<0,05$). As concentrações de nitrogênio amoniacal das silagens em função de período de fermentação apresentou comportamento quadrático ($P<0,05$) para o controle e isolado 2, e, linear e cúbico ($P<0,05$) para o comercial e isolado 1, respectivamente ($P<0,05$) (Figura 2).

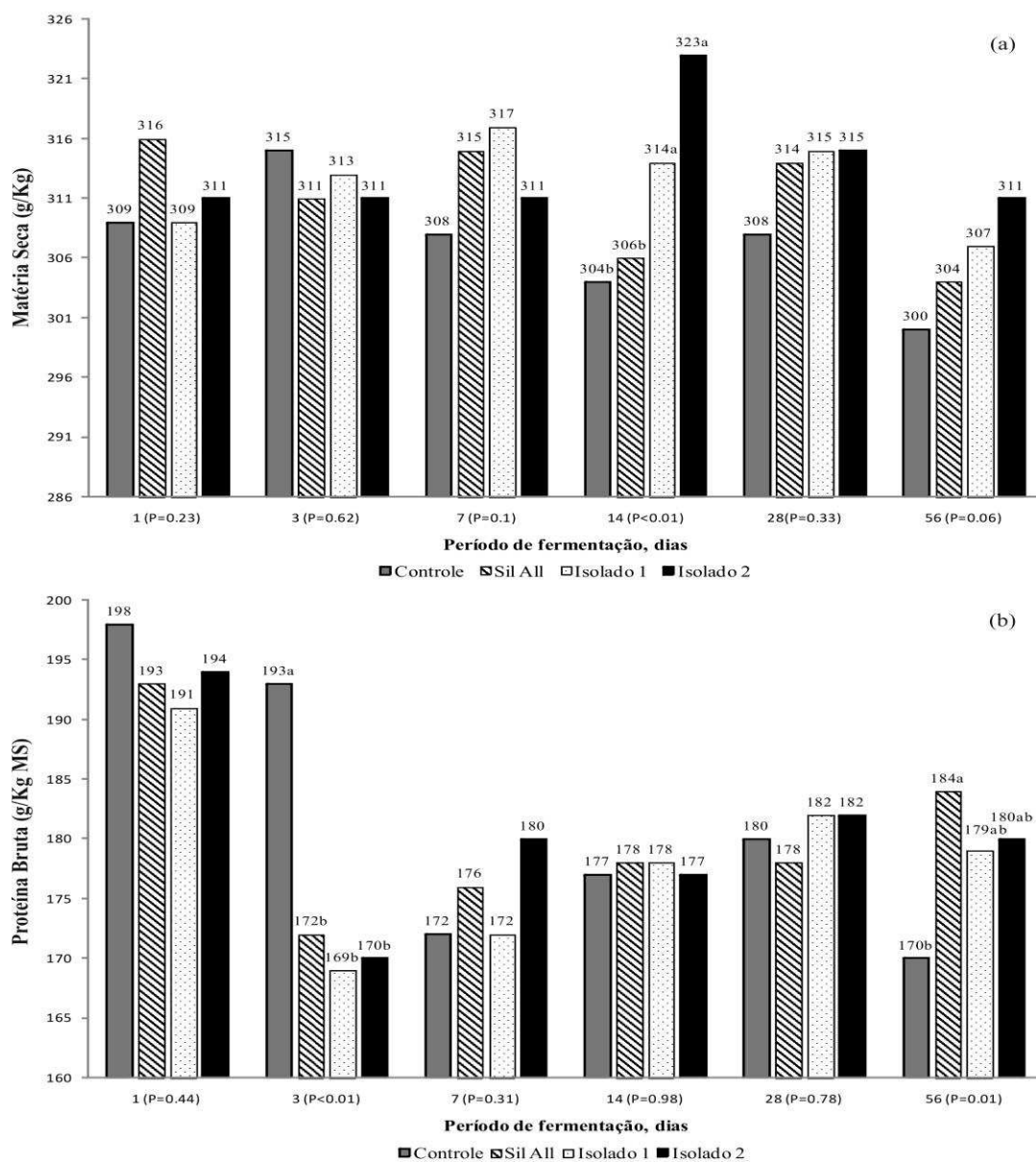


Figura 1. Teores de MS (a) e PB (b) de silagens de alfafa em função dos efeitos dos inoculantes dentro de cada período de fermentação.

*Médias seguidas por letras diferentes nas barras diferem por meio da Diferença Predita ao nível de 0,05.

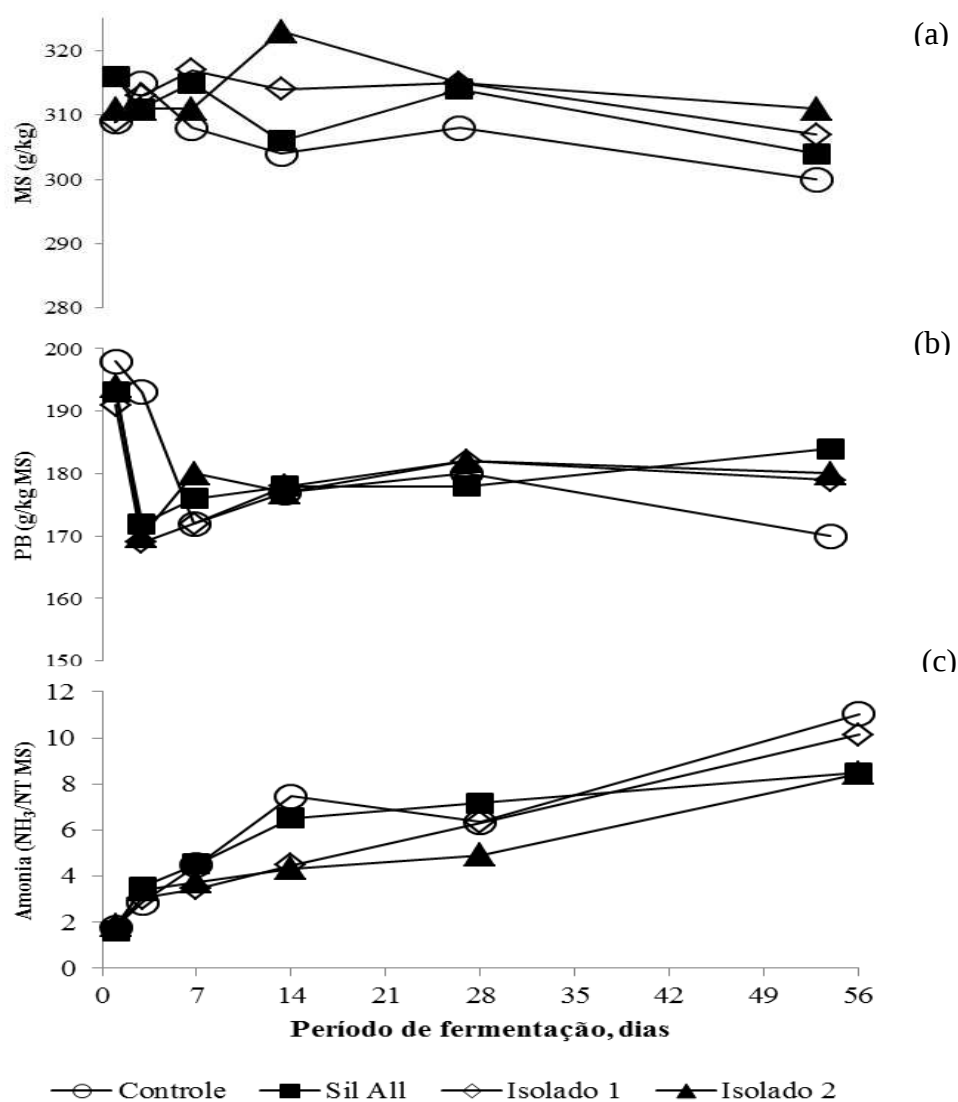


Figura 2. Comportamento do teor de matéria seca (a), proteína bruta (b) e nitrogênio amoniacal (c) das silagens em função de período de fermentação.

Na Figura 3 é apresentado o comportamento das variáveis pH e nitrogênio amoniacal das silagens dentro de cada período de fermentação. Foi observado menor pH nas silagens tratadas com os isolados 1 e 2 no primeiro dia de fermentação, enquanto que no último dia não foi detectada diferença entre os inoculantes ($P > 0,05$) no pH das silagens, cujos valores foram inferiores ao da silagem controle. O teor de nitrogênio amoniacal foi influenciado ($P < 0,05$) pelos inoculantes nos dias 7, 14, 28 e 56 de fermentação. No último dia de fermentação, foi registrado menor ($P < 0,05$) teor de nitrogênio amoniacal nas silagens tratadas com os inoculantes Sil All e isolado 1, que por sua vez não diferiram entre si. Foi observado efeito quadrático ($P < 0,05$) para

o comportamento do pH das silagens em função de período de fermentação (Figura 4).

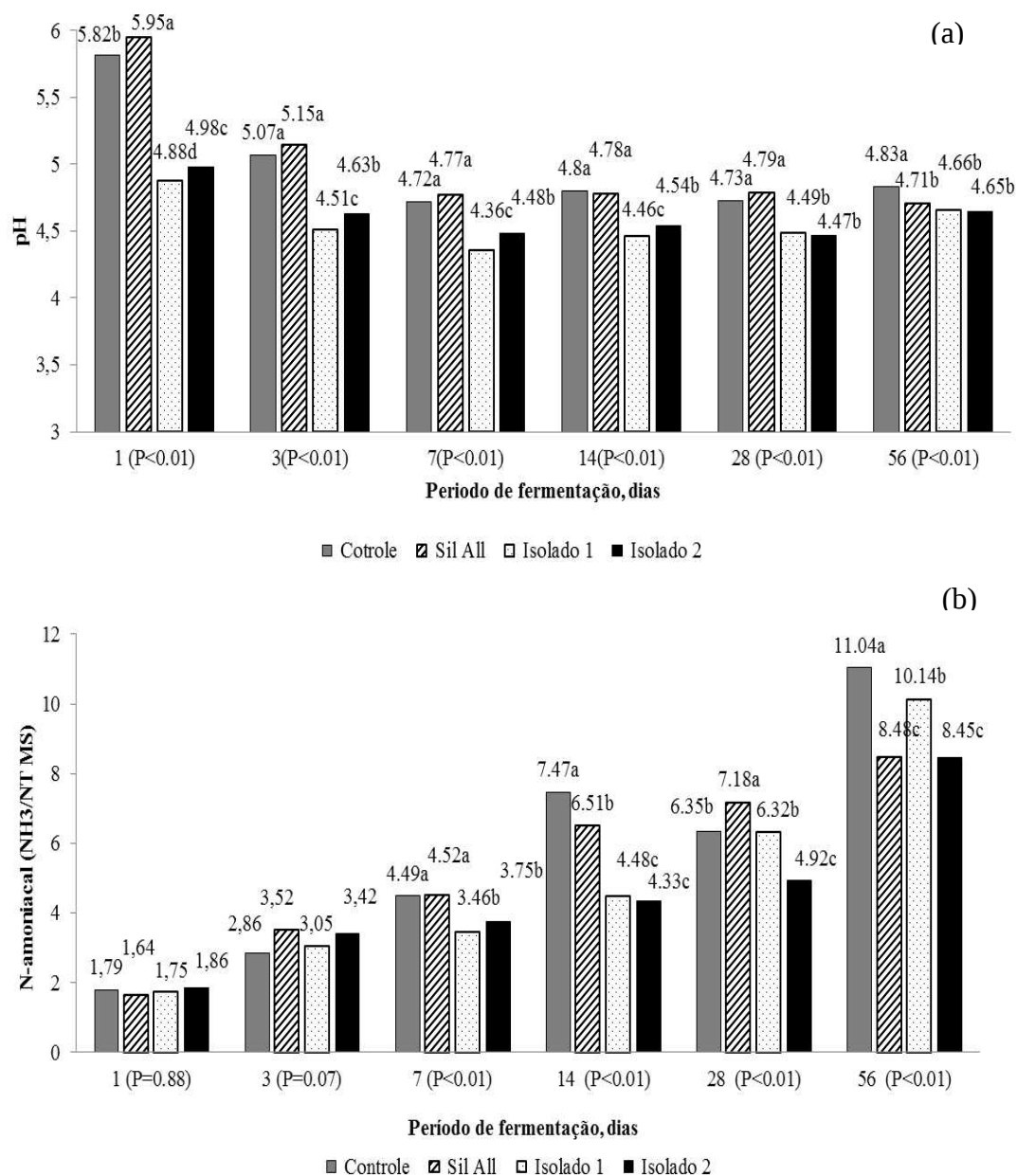


Figura 3. Valores de pH (a) e nitrogênio amoniacal (b) de silagens de alfafa em função dos efeitos dos inoculantes dentro de cada período de fermentação.

*Médias seguidas por letras diferentes nas barras diferem por meio da Diferença Predita ao nível de 0,05.

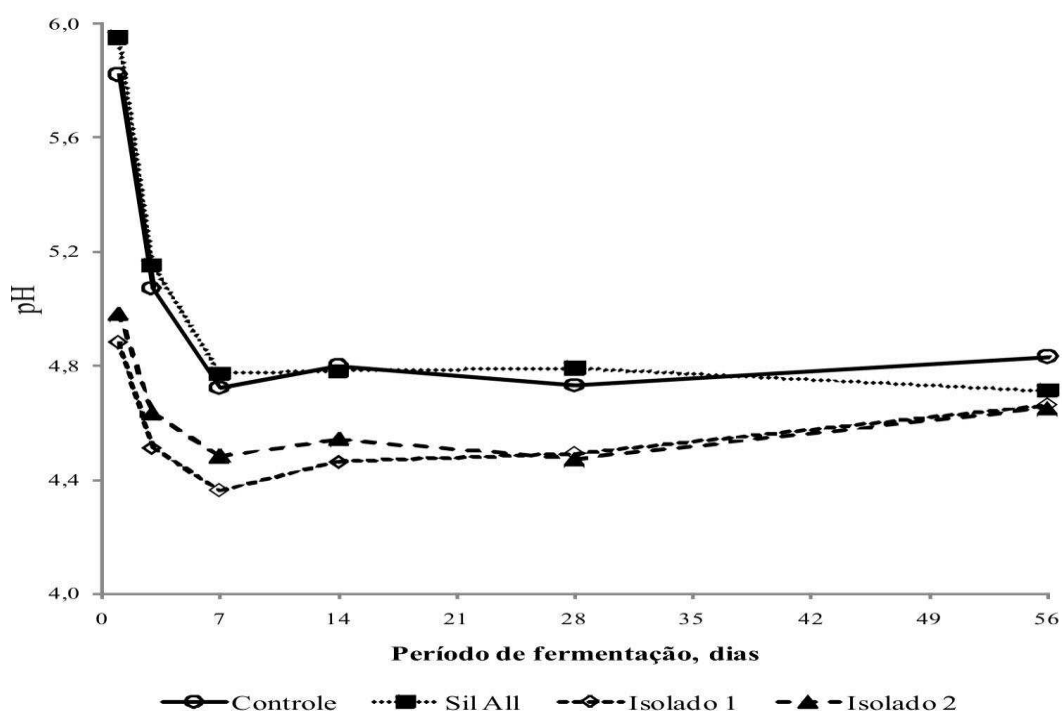


Figura 4. Comportamento do pH das silagens em função de período de fermentação dentro de cada inoculante.

Houve efeito ($P < 0,05$) de inoculante sobre o teor de ácido láctico das silagens nos dias 7, 14 e 56 de fermentação (Figura 5). Nos dias 7 e 14, os isolados 1 e 2 proporcionaram maior concentração desse ácido nas silagens. Aos 56 dias de fermentação foi observado maior ($P < 0,05$) conteúdo na silagem tratada com o isolado 2, Sil All e controle, que não diferiram entre si. O ácido acético foi afetado ($P < 0,05$) pelos inoculantes nos dias 3, 14, 28 e 56 de fermentação (Figura 5). No último dia de fermentação, foi registrado menor concentração de ácido acético na silagem tratada com o isolado 2, em relação à silagem controle.

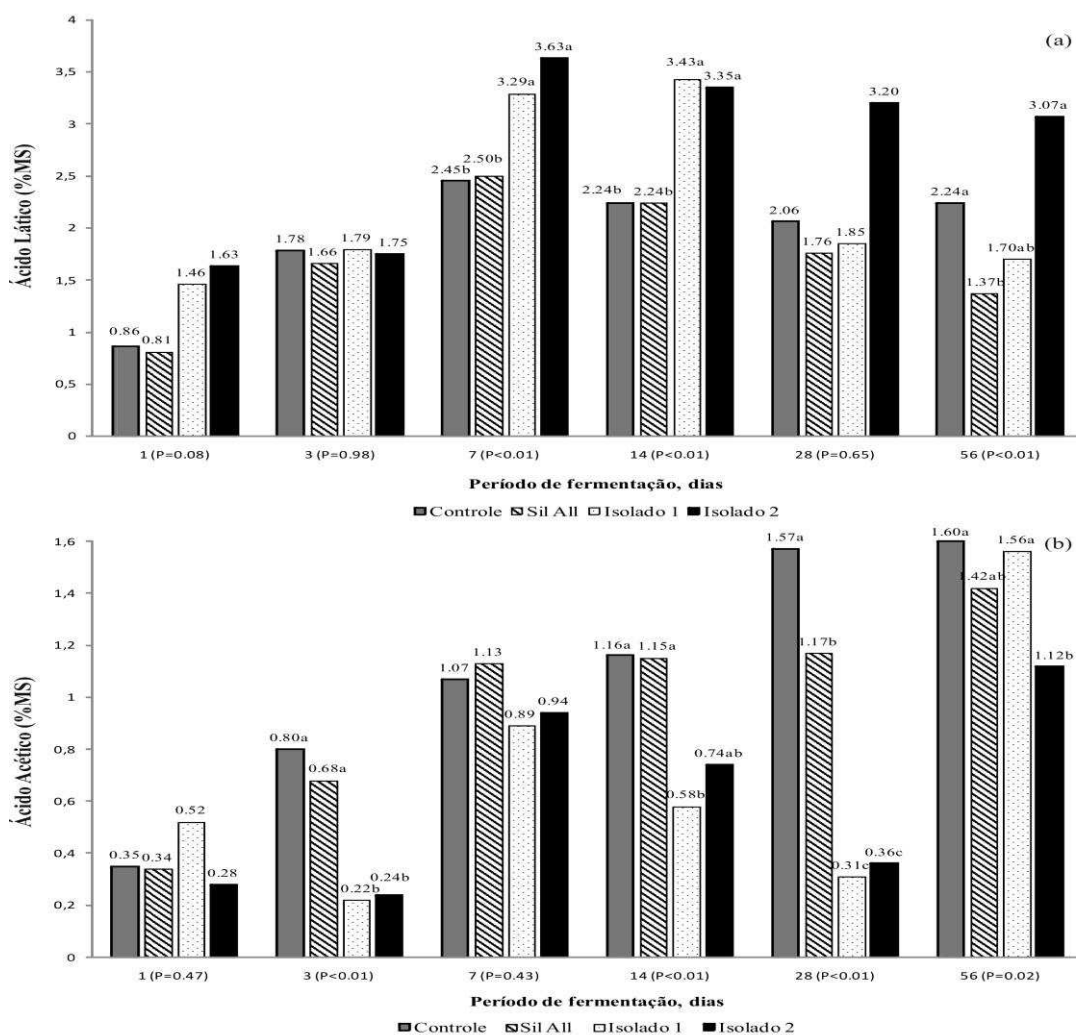


Figura 5. Concentrações de ácido láctico (a) e ácido acético (b) de silagens de alfafa em função de inoculantes dentro de cada período de fermentação

*Médias seguidas por letras diferentes nas barras diferem por meio da Diferença Predita ao nível de 0,05.

Na Figura 6 são apresentadas as concentrações dos ácidos butírico e propiônico das silagens de alfafa em função de inoculantes dentro de períodos de fermentação. Não foi observado efeito ($P>0,05$) de inoculante sobre o teor de ácido butírico nos dias 7 e 14 de fermentação. No último dia de fermentação, foram registrados menores valores deste ácido nas silagens controle e naquela tratada com o isolado 2 em relação à tratada com o inoculante comercial. Foi observado efeito ($P<0,05$) de inoculante sobre o teor de ácido propiônico apenas no 7º dia de fermentação, sendo encontrado maior valor para a silagem controle. As variáveis ácido butírico e ácido propiônico são apresentadas na Figura 6 multiplicados por 10^3 e 10^2 , respectivamente. Quando avaliado o comportamento dos ácidos orgânicos

(lático, acético, butírico e propiônico) em função de período de fermentação dentro de cada inoculante foram encontrados os seguintes: A variável ácido lático seguiu comportamento quadrático ($P<0,05$) para o controle e inoculante comercial e linear e cúbico ($P<0,05$) para os isolados 1 e 2, respectivamente. As concentrações de ácido acético seguiram modelo linear ($P<0,05$) para o controle e quadrático ($P<0,05$) para o inoculante comercial, enquanto os isolados 1 e 2 seguiram modelo cúbico ($P<0,05$). O ácido butírico apresentou comportamento apenas para o controle e o isolado 2, que seguiram o modelo cúbico ($P<0,05$). O ácido propiônico apresentou comportamento quadrático ($P<0,05$) para o controle e o isolado 1, sendo que os demais não apresentaram significância dos parâmetros β_1 , β_2 e β_3 ($P>0,05$), não se ajustando nenhum modelo estatístico (Figura 7).

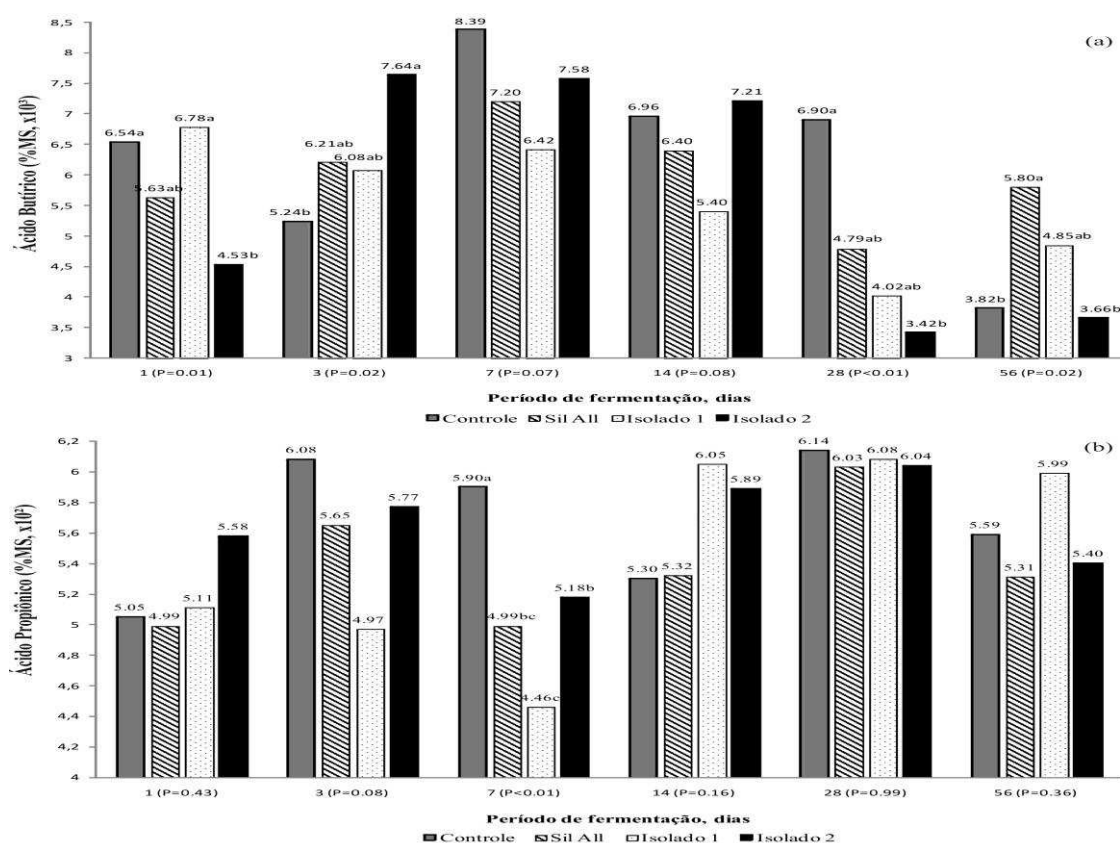


Figura 6. Concentrações de ácido butírico (a) e ácido propiônico (b) de silagens de alfafa em função de inoculantes dentro de cada período de fermentação.

*Médias seguidas por letras diferentes nas barras diferem por meio da Diferença Predita ao nível de 0,05.

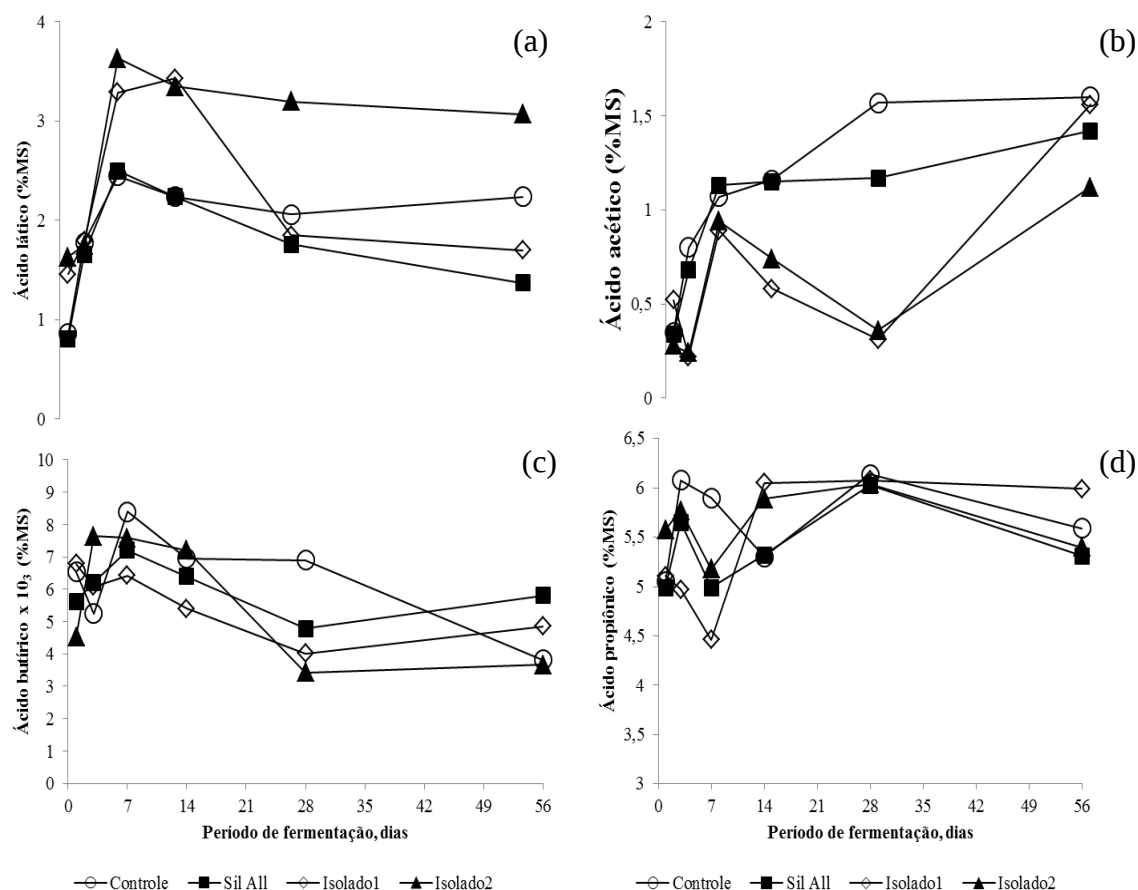


Figura 7. Comportamento dos teores de ácido láctico (a), acético (b), butírico (c) e propiônico (d) das silagens em função de período de fermentação dentro de cada inoculante.

3.3 Populações microbianas

Não houve efeito ($P < 0,05$) de interação inoculante x período de fermentação, nem de inoculantes sobre as populações microbianas das silagens, no entanto, foi observado efeito de períodos sobre as enterobactérias ($P < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Populações microbianas médias em silagens de alfafa.

Itens ¹	Inoculantes				P-valor			EPM	P-valor *
	Cont. ²	Sil All	Isolado 1	Isolado 2	Inocul. ²	Per. ²	Inoc*Per ²		
BAL	8,86	8,94	9,26	9,41	0,94	0,98	0,99	0,05	0,05
ENT	4,41	4,36	5,22	3,04	0,10	<0,01	0,92	0,22	<0,01
Mofos	3,12	3,01	2,74	2,68	0,84	0,45	0,99	0,07	<0,01
Leveduras	3,06	2,49	2,64	2,56	0,73	0,37	0,99	0,10	<0,01

*Hipótese testada pelo teste de Shapiro-Wilk com $\alpha = 0,05$, sendo H_0 : Distribuição normal e H_1 : não H_0 .

¹ BAL = Bactérias do ácido lático; ENT = Enterobactérias.

² Cont.= controle; Inocul.= inoculante; Per.= período e Inoc*Per = Interação inoculante e período

³ T.N = Teste de normalidade.

Foi registrada menor ($P<0,05$) contagem de enterobactérias no dia 14 de fermentação (Figura 8), que aumentou levemente a partir deste ponto.

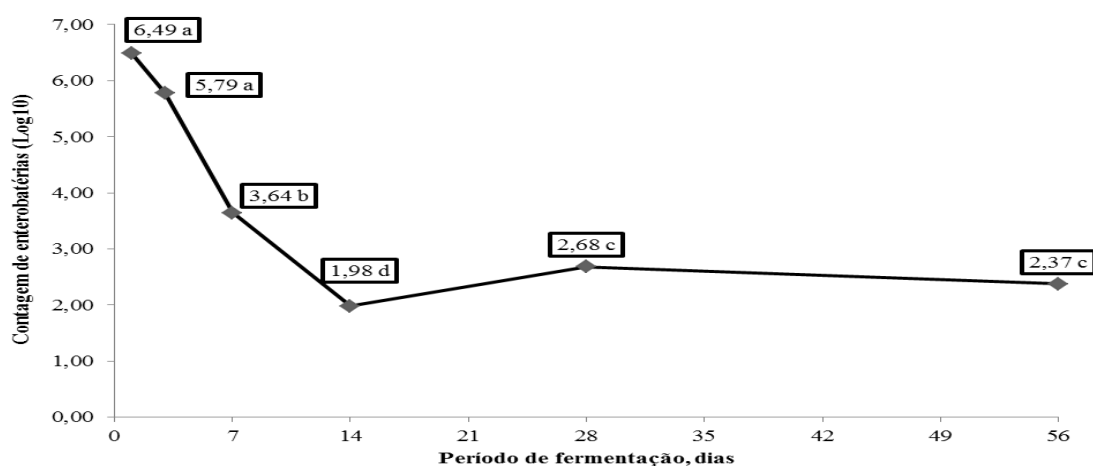


Figura 8. Contagem da população de enterobactérias em silagens de alfafa em função de período de fermentação.

Na Figura 9 é mostrado o comportamento da contagem microbiana de BAL, mofos e leveduras, em função do período de fermentação.

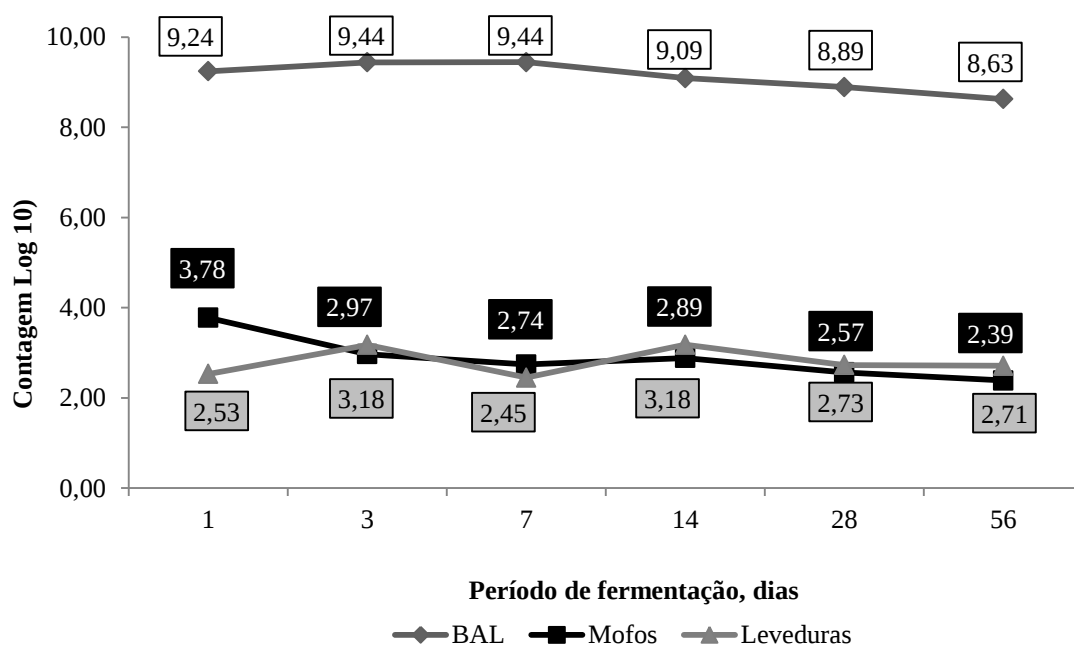


Figura 9. Contagem das populações de BAL, mofos e leveduras em silagens de alfafa em função de período de fermentação.

3.4 Composição química das silagens

Foi observado efeito ($P < 0,05$) de inoculantes apenas para a variável extrato etéreo mensurada aos 56 dias de fermentação (Tabela 4).

Tabela 4. Composição química (g/kg MS) de silagens de alfafa tratadas com inoculantes aos 56 dias de fermentação.

Itens ¹	Inoculantes				EPM	P-valor
	Controle	Sil All	Isolado 1	Isolado 2		
PB	170	184	179	180	3,1	0,07
EE	18,3 ab	20,0 a	16,5 b	11,3 c	0,7	<0,01
NIDA	56,5	46,2	51,8	47,9	3,1	0,17
FDNcp	355	358	346	341	5,9	0,25
FDA	250	249	250	235	5,9	0,27
Lignina	58,5	57,9	57,3	57,1	1,8	0,95
MM	161	162	163	159	3,5	0,59

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pela Diferença de mínimos quadrados predita ao nível de 5% de probabilidade.

¹ PB = Proteína bruta; EE = Extrato etéreo; NIDA = Nitrogênio insolúvel em detergente ácido; FDNcp = Fibra insolúvel em detergente neutro corrigida pra cinzas e proteína; FDA= Fibra insolúvel em detergente ácido; MM = Matéria mineral.

3.5 Caracterização dos isolados

Um total de 102 isolados foram obtidos de amostras de planta e silagens de alfafa coletadas em diferentes períodos de fermentação, sendo quatro isolados da planta e 98 da silagem. Destes, 79 apresentaram similaridade entre as sequências acima de 97%, quando analisadas utilizando o programa BLAST. Todos os isolados foram gram positivos, catalase negativos e apresentaram produção de ácido. Apenas os isolados da planta (0.2, 0.5, 0.6 e 0.11) e os isolados 3.1, 3.6 e 3.7, correspondentes ao dia 3 de fermentação, não cresceram em pH 3.5 (Tabela 5). Todos os isolados apresentaram alguma atividade antagonista contra os micro-organismos indicadores utilizados no teste antimicrobiano (Tabela 6).

Tabela 5. Caracterização dos isolados de bactérias lácticas isoladas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação.

Isolados	Forma	Temp. ¹ (°C)		pH				% Sal		CO ₂
		² 15	45	3.5	4.0	4.5	8.5	4.0	6.5	
0.2	Bacilo	+	+	-	+	+	+	+	+	Hetero
0.5	Cocos	+	+	-	-	-	+	+	+	Homo
0.6	Cocos	+	+	-	+	+	+	+	+	Homo
0.11	Cocos	+	+	-	-	-	+	+	+	Homo
1.2	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.3	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.4	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.5	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.6	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.7	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.8	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.9	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.16	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.17	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
1.24	Cocos	-	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.1	Bacilo	+	+	-	+	+	+	+	+	Hetero
3.3	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
3.5	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
3.6	Bacilo	+	+	-	+	+	+	+	+	Hetero
3.7	Bacilo	+	+	-	+	+	+	+	-	Hetero
3.20	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.22	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.23	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo

Tabela 5 cont. Caracterização dos isolados de bactérias lácticas isoladas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação.

Isolados	Forma	Temp. ¹ (°C)		pH				% Sal		CO ₂
		² 15	45	3.5	4.0	4.5	8.5	4.0	6.5	
3.26	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.28	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
3.29	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
7.1	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
7.4	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
7.5	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
7.7	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Hetero
7.8	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
7.10	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.1	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.2	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.3	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.4	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.7	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.8	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.9	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.10	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.11	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.12	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.13	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.14	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.16	Cocos	+	-	+	+	+	+	+	+	Homo
14.17	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.18	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.20	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
14.23	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.2	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.3	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.4	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.5	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.9	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.12	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.14	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	-	Homo
28.15	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	-	Homo
28.17	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.18	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.19	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
28.20	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo

Tabela 5 cont. Caracterização dos isolados de bactérias lácticas isoladas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação.

Isolados	Forma	Temp. ¹ (°C)		pH				% Sal		CO ₂
		² 15	45	3.5	4.0	4.5	8.5	4.0	6.5	
56.3	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.4	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.5	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.8	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.9	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.11	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.13	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.15	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.18	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.19	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.20	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.22	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.23	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.25	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.26	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.28	Bacilo	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.29	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo
56.30	Cocos	+	+	+	+	+	+	+	+	Homo

¹Temp.=Temperatura .

² - = Ausência de crescimento; + = Presença de crescimento.

Tabela 6. Atividade antagonista dos isolados de bactérias lácticas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação.

Isolados	L. monocytogenes	E. coli	S. aureus	B. cereus	P. aeruginosa ¹
	Raio de inibição ²				
0.2	-	++	+	-	++
0.5	+	-	-	-	++
0.6	+	-	-	+	+
0.11	-	-	-	+	-
1.2	++	++	+	+	++
1.3	-	++	-	++	++
1.4	-	++	-	++	++
1.5	++	+	-	+	+++
1.6	++	+	-	+	+++
1.7	++	++	+	+++	++
1.8	++	++	-	+++	++
1.9	+	++	-	-	++
1.16	-	-	+	-	+++

Tabela 6. Atividade antagonista dos isolados de bactérias lácticas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação.

Isolados	L. monocytogenes	E. coli	S. aureus	B. cereus	P. aeruginosa ¹
	Raio de inibição ²				
1.17	-	++	-	++	++
1.24	+	-	-	++	++
3.1	++	-	+	+	++
3.3	-	++	+	+++	++
3.5	-	+	-	+	++
3.6	++	++	+	++	++
3.7	++	++	+	++	++
3.20	-	+++	++	++	++
3.22	+	+++	+	++	+++
3.23	+	++	+	++	+++
3.26	+	+	+	-	+++
3.28	++	+	+	++	++
3.29	++	++	+	++	++
7.1	++	++	+	++	+++
7.4	++	-	+	++	+++
7.5	+	-	+	++	+++
7.7	++	+	+	+++	+++
7.8	+	++	+	++	++
7.10	++	-	-	+++	+++
14.1	++	++	+	++	++
14.2	++	-	-	++	+++
14.3	++	++	+	+++	+++
14.4	++	++	+	+++	+++
14.7	++	+++	+	+++	+++
14.8	++	+++	+	+++	+++
14.9	++	++	+	+++	+++
14.10	++	+	+	+++	+++
14.11	+	+	+	++	+++
14.12	+	++	+	++	+++
14.13	++	+	+	++	++
14.14	++	++	-	+++	+++
14.16	++	+++	+	+++	+++
14.17	+++	+++	+	+++	+++
14.18	++	-	-	++	-
14.20	++	++	+	+++	++
14.23	-	-	+	++	-
28.2	++	++	+	+++	++
28.3	-	-	+	++	++

Tabela 6. Atividade antagonista dos isolados de bactérias lácticas de alfafa e suas silagens nos diferentes dias de fermentação.

Isolados	L. monocytogenes	E. coli	S. aureus	B. cereus	P. aeruginosa ¹
	Raio de inibição ²				
28.4	++	++	-	++	++
28.5	++	++	+	+++	-
28.9	++	++	+	-	+++
28.12	++	-	+	++	++
28.14	++	-	+	++	+++
28.15	+	-	+	+++	++
28.17	++	+	-	++	+++
28.18	++	-	-	-	+++
28.19	++	-	-	-	+++
28.20	+	++	+	+++	+++
56.3	++	-	+	-	++
56.4	++	-	+	-	+++
56.5	++	-	+	-	+++
56.8	++	-	+	-	+
56.9	++	-	-	++	++
56.11	++	++	+	-	+++
56.13	++	++	+	+++	++
56.15	+	+	+	++	++
56.18	++	++	+	+++	+++
56.19	+	++	+	++	++
56.20	++	++	+	+++	+++
56.22	++	++	+	++	+++
56.23	+	+	+	++	++
56.25	++	+	+	+++	++
56.26	++	++	+	++	++
56.28	+	++	+	++	++
56.29	++	++	+	+++	++
56.30	+	++	+	+++	++

¹ L. monocytogenes, E.coli, S. aureus, B. cereus e P. aeruginosa = Micro-organismos indicadores do teste antimicrobiano.

² Raio de inibição = raio de inibição em mm, + (> 4 e ≤ 15), ++ (> 15 e ≤ 30), +++ (>30), - (ausência de halo de inibição).

3.6. Identificação e análise filogenética

A identificação dos isolados da planta e silagem de alfafa foi confirmada por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA (Tabela 7). A maior parte dos isolados apresentou sequências com alta similaridade com bactérias pertencentes ao gênero *Pediococcus*. Dentre as bactérias do gênero *Pediococcus*, foram identificados

isolados que apresentaram alta identidade com sequências parciais do gene 16S rDNA de bactérias pertencentes as espécies de *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus lolii*. Além destas espécies foram identificadas bactérias da espécie *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus casei*.

A árvore filogenética reconstruída pelo método de Neighbor-joining revela uma relação filogenética existente entre as sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA dos isolados 56.20 e 14.3 com a sequência parcial do gene 16S rDNA de *Lactobacillus plantarum* bacteriocinogênico (Figura 10). Com relação aos isolados que apresentaram identidade com bactérias do gênero *Pediococcus*, alguns isolados agruparam com a sequência parcial do gene 16S rDNA de *Pediococcus pentosaceus*, isolado de silagem, o qual tem a sua sequência já depositada no banco de dados do Genbank (Figura 11). Foi verificado também o mesmo para os isolados que apresentaram identidade com *Weissella cibaria*, onde foi observado o agrupamento dos isolados 0.2 e 3.1, com a sequência de *Weissella cibaria*, pertencente ao banco de dados do GenBank, que apresenta atividade antifúngica (Figura 12).

Tabela 7. Informações sobre as sequências obtidas do produto PCR do 16S rDNA dos isolados obtidos.

Isolados	Identidade (%)	Estirpe referente	Nº acesso Genbank
0.2	99	<i>Weissella cibaria</i>	HF562957.1
0.5	99	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	KJ528946.1
0.6	99	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	KF307676-1
0.11	99	<i>Enterococcus galinarum</i>	EU075075.1
1.2	99	<i>Weissella cibaria</i>	AB510754.1
1.3	99	<i>Weissella cibaria</i>	AB911503.1
1.4	98	<i>Weissella cibaria</i>	KJ095645.1
1.5	99	<i>Weissella cibaria</i>	KJ095645.1
1.6	99	<i>Weissella cibaria</i>	AB510746.1
1.7	99	<i>Weissella</i> sp	EU600924.1
1.8	99	<i>Weissella</i> sp	JX826525.1
1.9	99	<i>Weissella</i> sp	EU600924.1
1.16	98	<i>Weissella cibaria</i>	KJ095645.1
1.17	98	<i>Weissella cibaria</i>	KJ095645.1
1.24	99	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KF598928.1
3.1	98	<i>Weissella cibaria</i>	KJ095645.1
3.3	99	<i>Weissella cibaria</i>	KJ095645.1

Tabela 7. Informações sobre as sequências obtidas do produto PCR do 16S rDNA dos isolados obtidos.

Isolados	Identidade (%)	Estirpe referente	N ^a acesso Genbank
3.5	98	Weissela cibaria	AB469384.1
3.6	99	Weissela cibaria	HF562960.1
3.7	98	Weissela cibaria	AB911503.1
3.20	99	Pediococcus pentosaceus	KF697639.1
3.22	99	Pediococcus sp.	KJ610830.1
3.23	99	Pediococcus pentosaceus	KF697639.1
3.26	99	Pediococcus pentosaceus	JX141316.1
3.28	99	Pediococcus pentosaceus	KC454283.1
3.29	99	Pediococcus acidilactici	KF598928.1
7.1	99	Pediococcus sp.	KF598926.1
7.4	99	Pediococcus acidilactici	KC790981.1
7.5	99	Lactobacillus plantarum	KJ026590.1
7.7	98	Weissela cibaria	JX441793.1
7.8	99	Lactobacillus plantarum	JN573605.2
7.10	99	Pediococcus pentosaceus	JQ322223.1
14.1	100	Pediococcus sp.	KJ610832.1
14.2	99	Lactobacillus brevis	JQ009334.1
14.3	99	Lactobacillus plantarum	JX003604.1
14.4	99	Pediococcus sp.	KJ610832.1
14.7	97	Lactobacillus plantarum	AM157432.1
14.8	99	Pediococcus sp.	KF598926.1
14.9	99	Pediococcus sp.	KJ610832.1
14.10	98	Lactobacillus paraplantarum	JF268321.1
14.11	99	Pediococcus pentosaceus	KC454283.1
14.12	99	Pediococcus sp.	KF598926.1
14.13	98	Lactobacillus plantarum subsp plantarum	JN573602.1
14.14	98	Pediococcus sp.	KF598926.1
14.16	98	Pediococcus sp.	KF598926.1
14.17	99	Lactobacillus plantarum	KJ026590.1
14.18	99	Lactobacillus brevis	AB911493.1
14.20	100	Lactobacillus sp	KJ624757.1
14.23	98	Lactobacillus plantarum	JN573608.1
28.2	99	Pediococcus sp.	KF598926.1
28.3	99	Pediococcus sp.	KF598926.1
28.4	99	Pediococcus sp	KF598926.1
28.5	98	Pediococcus acidilactici	DQ294960.1
28.9	100	Pediococcus sp	KF598926.1
28.12	99	Pediococcus acidilactici	KJ531397.1

Tabela 7. Informações sobre as sequências obtidas do produto PCR do 16S rDNA dos isolados obtidos.

Isolados	Identidade (%)	Estirpe referente	Nº acesso Genbank
28.14	99	<i>Pediococcus acidilactici</i>	HQ315858.1
28.15	99	<i>Pediococcus</i> sp	KF598926.1
28.17	98	<i>Pediococcus acidilactici</i>	JN039351.1
28.18	99	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ538507.1
28.19	99	<i>Pediococcus</i> sp	KF598926.1
28.20	97	<i>Pediococcus acidilactici</i>	KF511963.1
56.3	99	<i>Pediococcus lolii</i>	KJ502293.1
56.4	99	<i>Lactobacillus casei</i>	AB933635.1
56.5	98	<i>Pediococcus</i> sp	KF598926.1
56.8	99	<i>Pediococcus acidilactici</i>	JN039351.1
56.9	98	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AB889712.1
56.11	98	<i>Pediococcus acidilactici</i>	JN039351.1
56.13	99	<i>Pediococcus acidilactici</i>	DQ294960.1
56.15	99	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ3901107.1
56.18	99	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AB889712.1
56.19	98	<i>Lactobacillus plantarum</i>	HQ117897.1
56.20	98	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KJ459029.1
56.22	98	<i>Lactobacillus plantarum</i>	JF965386.1
56.23	99	<i>Pediococcus</i> sp	KF598926.1
56.25	99	<i>Lactobacillus plantarum</i>	AB889712.1
56.26	98	<i>Pediococcus acidilactici</i>	FJ538506.1
56.28	98	<i>Lactobacillus plantarum</i>	FJ538494.1
56.29	99	<i>Pediococcus</i> sp	KF598926.1
56.30	99	<i>Bacterium</i>	JF733794.1

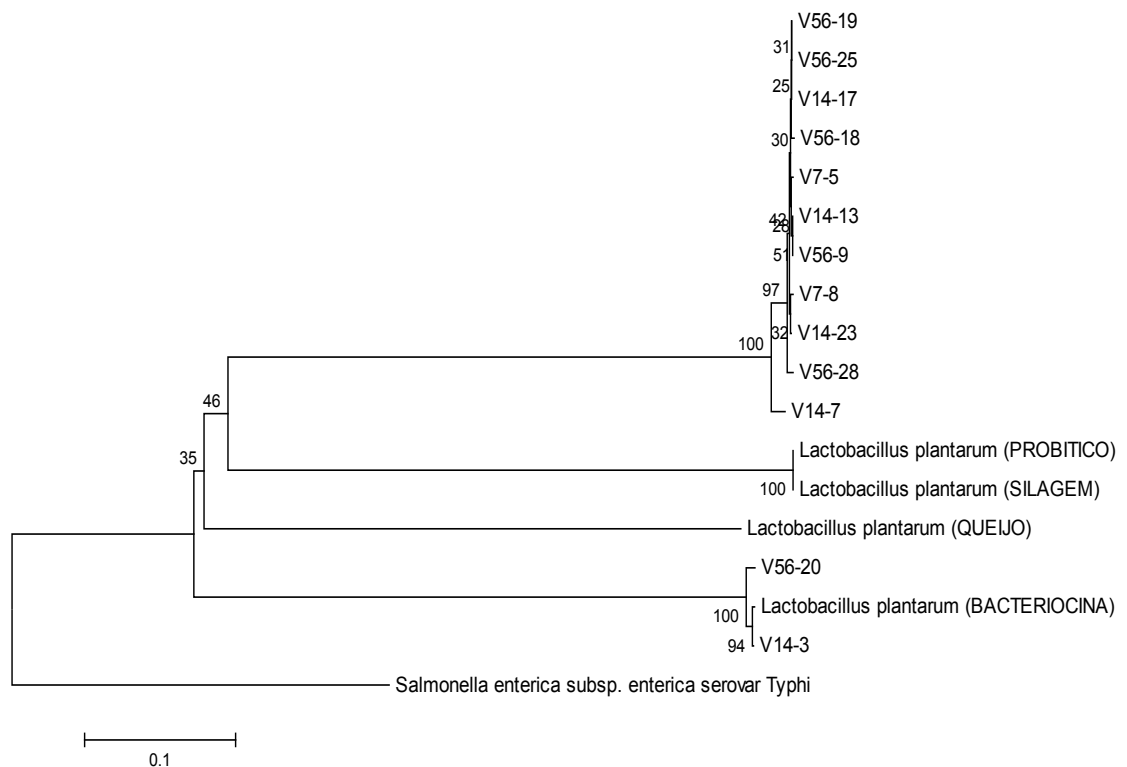


Figura 10. Árvore filogenética baseada na sequência do gene DNA ribossomal 16 S de estirpes de *Lactobacillus plantarum*, mostrando a relação dessas estirpes com outras estirpes relacionadas (número de acesso no parêntese). *Salmonella* entérica subsp. entérica serovar Typhi foi utilizado como grupo externo. A árvore foi reconstruída pelo método Neighbor-joining, e os números nos nós das ramificações da árvore referem aos valores de bootstrap (expresso como porcentagem de 1000 réplicas).

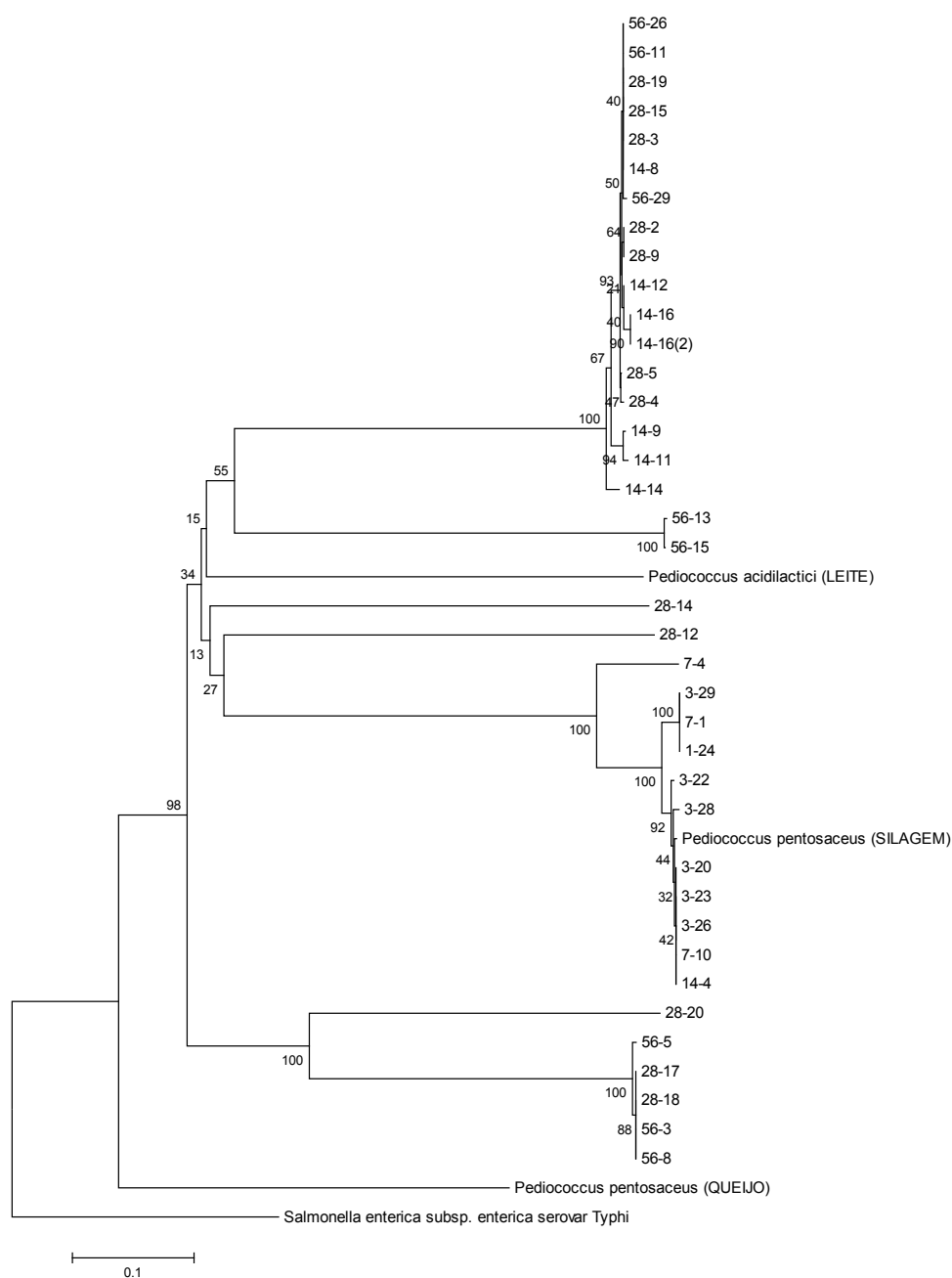


Figura 11. Árvore filogenética baseada na sequência do gene DNA ribossômico 16 S de bactérias do gênero *Pediococcus*, mostrando a relação dessas estirpes com outras estirpes relatadas (número de acesso no parêntese). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi* foi utilizado como grupo externo. A árvore foi reconstruída pelo método Neighbor-joining, e os números nos nós das ramificações da árvore referem aos valores de bootstrap (expresso como porcentagem de 1000 réplicas).

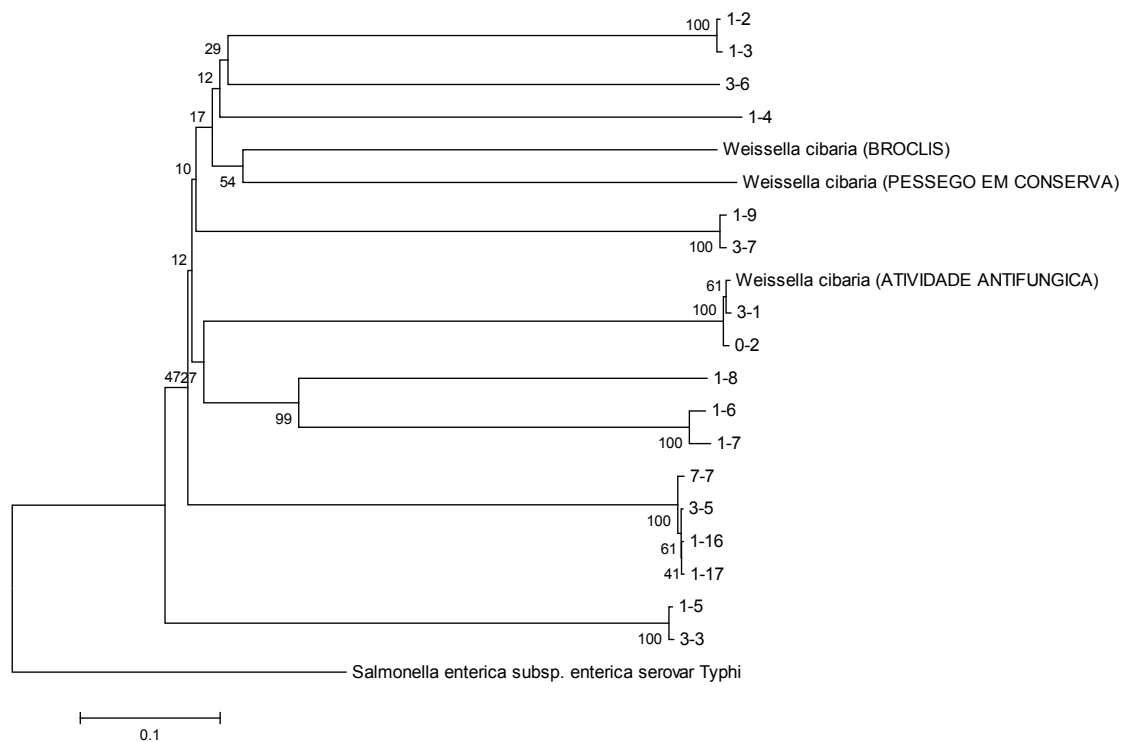


Figura 12. Árvore filogenética baseada na sequência do gene DNA ribossomal 16 S de *Weissella cibaria*, mostrando a relação dessas estirpes com outras estirpes relatadas (número de acesso no parêntese). *Salmonella* entérica subsp. entérica serovar Typhi foi utilizado como grupo externo. A árvore foi reconstruída pelo método Neighbor-joining, e os números nos nós das ramificações da árvore referem aos valores de bootstrap (expresso como porcentagem de 1000 réplicas).

DISCUSSÃO

4.1 Composição química

A composição química da alfafa antes da ensilagem, onde observou-se baixo teor de fibra (FDNcp), alto teor de proteína bruta (197 g/Kg MS) e matéria seca de 313 g/Kg, permite caracterizar esta leguminosa como de alta qualidade. O último encontra-se de acordo com o preconizado de 30-35% (McDONALD et al., 1991), para o sucesso da fermentação principal, a láctica, pois a alfafa é uma cultura considerada vulnerável a fermentações clostrídicas, principalmente quando ensilada com umidade $\geq 70\%$ (Muck e Kung, 2007). Além disso, a população de bactérias lácticas na forragem de 5,42 log UFC/g de forragem está dentro do preconizado por Muck (1996) (5 log UFC/g) como o mínimo necessário para que as perdas durante o processo de fermentação sejam mínimas.

4.2 Perfil fermentativo

O menor teor de matéria seca encontrado na silagem controle e no inoculante comercial no 14º dia de fermentação pode estar associado a maior produção de nitrogênio amoniacal nestas, visto que nestas condições, há desenvolvimento de bactérias do gênero *Clostridium*, favorecidas pela alta atividade de água. Essas bactérias produzem ácido butírico, e, quando isto ocorre, concomitantemente leva à degradação de proteínas e de ácido láctico (McDonald and Henderson, 1981). Esse fato pode ser evidenciado, pois no referido período a redução nos teores de matéria seca foi acompanhada pelo aumento das concentrações de nitrogênio amoniacal destas silagens.

O menor teor de proteína bruta da silagem controle no último dia de fermentação pode ser explicado pela maior proteólise nessa silagem, resultando em maior concentração de nitrogênio amoniacal, ocasionado possivelmente pelo favorecimento de micro-organismos proteolíticos em razão do maior pH observado nesta silagem. Segundo Polan et al. (1998), mesmo com o estabelecimento completo e acelerado das condições anaeróbias, considerável proteólise pode ocorrer devido as atividades das bactérias e enzimas. Além disso, condições ácidas insuficientes para a inibição dos micro-organismos indesejáveis acarretam na extensão da proteólise durante o processo de fermentação (Woolford, 1984; McDonald et al., 1991).

O menor valor de pH das silagens tratadas com inoculantes no último dia de fermentação indica a eficiência destes em reduzir o pH. De fato, um dos principais objetivos de um inoculante é favorecer a rápida acidificação da massa ensilada e diminuir a extensão da fermentação. A rápida redução do pH é desejável pois os micro-organismos deterioradores são menos resistentes às condições ácidas do que as bactérias do ácido láctico (Woolford, 1984; McDonald et al., 1991), reduzindo as perdas no processo. Os valores de pH no último dia de fermentação, que variaram de 4,83 (silagem controle) a 4,65 (isolado 2) podem ser considerados adequados para silagens de leguminosas, que normalmente estabilizam em pH mais elevado.

Embora tenha sido registrado maior teor de nitrogênio amoniacal na silagem controle, 11,04%, esse valor é aceitável para silagens de leguminosas, segundo critérios de Mahana (1994) <10-5%. Contudo, Magalhães et al (2004) e Rodrigues et al. (2004) não verificaram efeito de inoculantes bacterianos sobre o conteúdo de amônia de silagens de alfafa em condições tropicais. Nos dias 7 e 14 de fermentação, as maiores concentrações de nitrogênio amoniacal, acompanhada do baixo teor de ácido láctico e maior pH para a silagem controle e aquela tratada com inoculante comercial, podem indicar que fermentações secundárias ocorreram devido à ação de enterobactérias e bactérias do gênero *Clostridium*, os quais são influenciados pelo potencial hidrogeniônico do meio. A rápida redução do pH pode inibir o crescimento de micro-organismos indesejáveis, o que pode ter ocorrido para os isolados 1 e 2, que resultaram em menores valores de amônia.

No 28º dia de fermentação, o teor de nitrogênio amoniacal encontrado para a silagem controle não diferiu do obtido com a utilização do isolado 1, com decréscimo nos valores de ácido láctico para o segundo, que pode ser explicado pelo aparecimento de clostrídios, que são potenciais consumidores de lactato para seu metabolismo e crescimento. Bactérias do gênero *Clostridium* como: *C. sporogenes*, *C. histolyticum*, *C. putrefaciens*, *C. botulinum* e *C. tetanomorphum*, são fermentadores de aminoácidos e, como resultado do seu processo de fermentação, ocorrem produções de acetato, outros ácidos graxos, amônia e CO₂ (Madigan et al., 2010). Bactérias heterofermentativas também podem estar envolvidas com a redução do ácido láctico, pois este pode ser metabolizado sob condições aeróbias e anaeróbias, como ocorre com a espécie *L. buchneri*, que degrada ácido láctico a ácido acético e 1,2-propanodiol (Oude-Elferink et al., 2001).

O ácido láctico é considerado o principal responsável pela redução do pH (Muck, 1996). A redução dos teores desse ácido do dia 14 para o último dia fermentação pode sugerir uma conversão do ácido láctico em ácido butírico, mas essa hipótese parece não explicar esse comportamento, pois todas as silagens apresentaram baixos teores de ácido butírico. Os maiores teores de ácido acético nas silagens controle e inoculada com Sil All no 7º dia de fermentação podem estar ligados a menor taxa de declínio do pH, que pode ser resultado da menor eficiência das bactérias lácticas em dominar o processo fermentativo, favorecendo outros micro-organismos como aqueles produtores de ácido acético, tais como enterobactérias e bactérias heterofermentativas.

No 14º dia de fermentação, os menores valores de ácido acético encontrado para as silagens tratadas com os isolados 1 e 2 podem ser atribuídos a ausência de contagem de enterobactérias nestas silagens. Devido à ausência de diferenças entre os inoculantes em todos os períodos de fermentação para a contagem de enterobactérias, a presença de bactérias heterofermentativas seria a explicação mais provável para as maiores concentrações de ácido acético encontradas na silagem controle e inoculadas com Sil All no referido período. A possível predominância destes micro-organismos na silagem controle e naquela tratada com inoculante comercial pode estar relacionado à ineficiência no estabelecimento da acidez da massa ensilada que pode ser evidenciado pela presença de baixas concentrações de ácido láctico em relação aos isolados 1 e 2. Os teores de ácido acético de todas as silagens avaliadas, no último dia de fermentação, são inferiores a 2%, valor estabelecido por Mahana (1994a) como adequado em silagens bem fermentadas. Os teores de ácido butírico também indicam boa fermentação das silagens, segundo esse autor. Maiores concentrações de ácido acético (3 a 4% na MS) em relação este estudo foram reportadas por Contreras-Govea et al. (2011), após 60 dias de conservação da alfafa na forma de silagem, com diversos inoculantes microbianos.

O ácido propiônico foi influenciado pelos inoculantes apenas no 7º dia de fermentação, apresentando maiores valores para a silagem controle. Este fato pode ser devido a fermentações secundárias, que resultam na formação de outros ácidos orgânicos, haja vista que neste período a produção de ácido láctico foi menor na silagem controle.

4.3 Composição química das silagens

A composição da silagem também apresentou aspectos relacionados à silagens de boa qualidade e os mesmos já mencionados para a forragem fresca, como baixos teores de fibra e alto teor de proteína. Os teores de proteína bruta, FDN e de matéria seca estão próximos ao encontrado por Contreras-Govea et al. (2013) de 190 g/kg MS, 317 g/kg MS e 336g/ kg respectivamente, ao utilizar *Lactobacillus plantarum* como inoculante em silagem de alfafa. Os teores de NIDA das silagens encontraram-se abaixo do limite de 20% proposto por Van Soest e Mason (1991), caracterizando boa preservação, haja vista que, o aumento do nitrogênio ligado à fração em detergente ácido é indesejável no aspecto nutricional, pois se torna indisponível aos micro-organismos do rúmen (Van Soest 1994). Ainda, altos valores de NIDA na silagem podem indicar aquecimento da massa ensilada, o que resulta em aumento da complexação de nitrogênio com a fração fibrosa da forragem (Wolford, 1984).

4.4 Populações microbianas

É interessante destacar a alta população inicial de BAL na forragem de alfafa antes da ensilagem, 5,42 log UFC/g, em se tratando de uma leguminosa. Entretanto, nenhum grupo varia tanto em número quanto este, indo do limite de detecção 10^1 a 10^5 na alfafa, 10^6 , em gramíneas perenes, e 10^7 UFC/g⁻¹ de forragem, em milho e sorgo (Pahlow et al., 2003). A ausência de efeito de inoculantes sobre a população de bactérias lácticas pode estar associada a dois eventos que limitam o crescimento, o consumo de um nutriente essencial no meio ou o acúmulo de excreção do organismo no meio inibindo o crescimento. Qualquer que seja a forma como o crescimento é limitado, a fase exponencial termina e a população atinge a fase estacionária. Além disso, embora durante a fase estacionária a população possa não crescer, muitas funções celulares podem prosseguir, como os processos biossintéticos e o metabolismo energético (Madigan et al., 2010).

A população de enterobactérias decresceu até o 14º dia e aumentou nos períodos seguintes. Isto provavelmente se deve a um maior teor de ácido lático e de menor pH nessas duas primeiras semanas de avaliação. Segundo Pahlow et al. (2003), a rápida acidificação inicial é a chave para o controle do crescimento de enterobactérias e clostrídios, os quais podem crescer até que uma concentração inibitória de ácidos não dissociados e, ou, um pH suficientemente baixo, sejam

atingidos. A população de enterobactérias e sua taxa de declínio podem ser utilizadas como bons indicadores da qualidade da silagem. Melhor do que qualquer outro parâmetro, sua redução na silagem reflete a presença combinada de boas condições de ensilabilidade, incluindo disponibilidade de nutrientes e água, eficiente conversão desses nutrientes em produtos da fermentação e baixo pH pelas BAL (Pahlow et al., 2003). As enterobactérias competem com as BAL por carboidratos disponíveis, principalmente durante a fase inicial de fermentação. De acordo com Seale (1986), as enterobactérias iniciam a produção de amônia através de várias reações de deaminação e comprometem severamente a redução do pH.

Geralmente, as enterobactérias se desenvolvem até o 7º dia de fermentação, quando bactérias do ácido láctico dominam a fermentação e substituem esse grupo microbiano (Luis e Ramirez., 1988). Entretanto, essas bactérias podem ser encontradas na silagem até o 30º dia após a ensilagem, por serem capazes de crescerem sob condições de anaerobiose e protegerem-se quando se encontram sob condições adversas, como acontece sob valor de pH muito baixo (Pereira et al., 2007). Embora a população de mofos e leveduras não tenha sido afetada pelos inoculantes e período de fermentação, as populações finais desses grupos microbianos nas silagens decresceram em relação àquelas da forragem antes da ensilagem. Apesar das estirpes utilizadas como inoculantes (isolados 1 e 2) apresentarem atividade antimicrobiana, esta pode estar relacionada a produção de bacteriocinas que não afetam os micro-organismos gram-negativos, bolores e leveduras, tendo sua ação apenas contra espécies de bactérias gram-positivas e alguns esporos, dentre eles relevantes patógenos de veiculação alimentar como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* (Hernández et al., 2005).

4.5 Identificação dos isolados

Dentre as BAL identificadas por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA foi observada uma grande identidade com bactérias pertencentes ao gênero *Pediococcus*. Bactérias pertencentes a este gênero são encontradas em plantas, entretanto, a sua presença também é constatada em humanos e animais (Holzapfel et al., 2006). Já se verificou a presença de *Pediococcus pentosaceus* e *P. acidilactici*, que são mais comuns em silagem, em saliva humana e em fezes de animais e de humanos. Assim, provavelmente, o maior número de BAL identificadas como

Pediococcus pode está relacionado à própria forragem e às condições ambientais de cultivo. *Pediococcus* sp. apresenta a característica de se multiplicar rapidamente, e pode tornar-se o maior componente da população de bactérias lácticas quando encontra-se em interação e associação com membros do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissela* (Holzapfel et al., 2006). A diversidade microbiana da silagem de alfafa, abordada por meio da construção de bibliotecas do gene 16S rDNA, revela que grande parte da população microbiana é composta por bactérias pertencentes ao gênero *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* (McGarvey et al., 2013).

Neste estudo, os principais isolados identificados pertencem às espécies *Weissela cibaria* (14), *Lactobacillus plantarum* (14) e *Pediococcus acidilactici* (14). Sabe-se que as condições que prevalecem durante a fermentação (pH, baixa tensão oxigênio, etc) não afetam de forma significativa o crescimento de *L. plantarum*, pois esta estirpe apresenta mecanismos de resistência a várias condições de estresse, entre eles, o estresse ácido, que permite proteção a sua viabilidade (G-alegría, et al., 2004).

A ausência de agrupamento observado na reconstrução da árvore filogenética, entre a maior parte das sequências dos isolados obtidos neste estudo, com aquelas já depositadas no banco de dados, não indica que estes não pertençam a uma mesma espécie. Os micro-organismos sofrem constantemente mutações no ambiente em que estão presentes, e esse acúmulo de mutações ao longo do tempo pode ser a razão deste distanciamento entre as sequencias das diferentes estirpes. A ocorrência das mutações espontâneas em estirpes de uma mesma espécie acaba enfraquecendo essa relação filogenética. Provavelmente, os isolados obtidos neste estudo que se encontram em um mesmo ramo da árvore possam ser clones.

CONCLUSÃO

Os isolados de bactérias lácticas avaliados aumentam as concentrações de ácido láctico e reduzem os tores de nitrogênio amoniacal e pH das silagens, demonstrando potencial de uso como inoculante para silagem. *Weissela cibaria*, *Lactobacillus plantarum* e espécies do gênero *Pediococcus* predominam em silagens de alfafa em condições tropicais, sendo que a primeira relacionou com estirpes que possuem atividade antifúngica, e apresentam potencial como inoculantes para silagens, em estudos futuros. A relação filogenética dos isolados 56.20 e 14.3

(*Lactobacillus plantarum*) com a sequência parcial do gene 16S rDNA de *Lactobacillus plantarum* bacteriocinogênico também despertam interesse para potencial uso em silagens, necessitando de maiores pesquisas acerca desta característica.

REFERÊNCIAS

- ADDAH, W.; BAAH, J.; GROENEWEGEN, P.; OKINE, E.K.; MCALLISTER, T.A. Comparison of the fermentation characteristics, aerobic stability and nutritive value of barley and corn silages ensiled with or without a mixed bacterial inoculant. **J. Anim. Sci.** v. 91, p. 133–146, 2011.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology.** 215,p. 403-410, 1990.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, Z.; MONTEIRO, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Res.** v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMADO, I. R.; FUCINÔS, C.; FAJARDO, P.; GUERRA, N. P.; PASTRANA, L. Evaluation of two bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria as inoculants for controlling *Listeria monocytogenes* in grass and maize silages. **Animal Feed Science and Technology.** v. 175, p. 137 – 149, 2012.
- AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1 - Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control.** v. 17, p. 454-461, 2006.
- Association of Official Analytical Chemists. In: Official Methods of Analysis.. Association of Official Analytical Methods Inc., Arlington, VA, USA770, 15th ed, 1990.

- BAXTER, H. D.; MONTGOMERY, M. J.; OWEN, J. R. Comparison of soybean-grain sorghum silage with corn silage for lacting cows. **Journal Dairy Science**, v. 67, n.1, p. 88-96, 1984.
- BERGEY`S MANUAL FOR SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Baltimore, 4 ed., 1986.
- BOLSEN, K. K.; LIN, C.; BRENT, C. R.; FEYERHERM, A. M.; URBAN, J. E.; AIMUTIS, W.R. Effect os silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfalfa and corn silages. **Journal of Dairy Science**. v.75, n.11, p.3066-83, 1992.
- CARVALHO, L. A.; VILELA, D. Produção artificial de feno de alfafa (*Medicago sativa* L.) e seu uso na alimentação animal. In: CARVALHO, L.A.; VILELA, D. (Ed.). **Cultura da alfafa: estabelecimento, fenação, custo de produção e construção de um secador estático**. Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL, p. 13-20, 1994.
- CHEN, M. M.; LIU, Q. H.; XIN, G. R.; ZHANG, J. G. Characteristics of lactic acid bacteria isolates and theis inoculating effects on the silage fermentation at high temperature. China. Lett. **Appl. Microbial**. v. 56, p. 71-78, 2012.
- CONTRERAS-GOVEA, F. E.; MUCK, R. E.; MERTENS, D. R.; WEIMER, P. J.; 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**. v. 163, p. 2 – 10, 2011.
- CONTRERAS-GOVEA, F. E.; MUCK, R. E.; BRODERICK, G. A.; WEIMER, P. J. Lactobacillus plantarum effects on silage fermentation and in vitro microbial yield. **Animal Feed Science and Technology**. v. 179, p. 61 – 68, 2013.
- DEWHURST, R.J.; Fisher, W.J.; TWEED, J.K.S.; WILKINS, R.J. Comparison of grass and legume silages for milk production. Production responses with different levels of concentrate. **J. Dairy Sci**. v. 86, p. 2598 – 2611, 2003.
- DROSINOS, E. H.; PARAMITHIOTIS, S.; KOLOVOS, G.; TSIKOURAS, I.; METAXOPOULOS, I. Phenotypic and technological diversity of lactic acid

bactéria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. **Food Microbiology**. v. 24, p. 260 – 270, 2007.

EVANGELISTA, A. R.; GARCIA, R.; GOMIDE, J. A. Silagem de milho e soja para novilhos em confinamento. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 21. Belo Horizonte. Anais..., p. 324, 1984.

FILYA, I.; MUCK, R. E.; CONTRERAS-GOVEA, F. E. Inoculant Effects on Alfalfa Silage: Fermentation Products and Nutritive Value. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p. 5108-5114, 2007.

G-ALEGRÍA, E.; LÓPEZ, I.; RUIZ, J. I.; SÁENZ, J.; FERNÁNDEZ, E.; ZARAZAGA, M.; DIZY, M.; TORRES, C.; RUIZ-LARREA, F. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. **FEMS Microbiology Letters**. v. 230, p. 53-61, 2004.

HEINRITZ, S. N.; MARTENS, S. D.; AVILA, P.; HOEDTKE, S. The effect of inoculant and sucrose addition on the silage quality of tropical forage legumes with varying ensilability. **Animal Feed Science and Technology**. v.174, p. 201-210, 2012.

HERNÁNDEZ, D.; CARDELLE, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. **Journal of Applied Microbiology**. v. 99, n. 6, p. 77 – 84, 2005.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, p. 3233-3241, 1997.

HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P.; LUDWIG, W.; BACK, W.; DICKS, L. M. T. **The prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Firmicutes and Cyanobacteria**. v, 4, p. 229-260, 2006.

- HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T. A. Effect of inoculants on whole-crop barley silage fermentation and dry matter disappearance in situ. **Journal of Animal Science**. v. 80, p. 510-516, 2002.
- KIZILSIMSEK, M.; SCHMIDT, R.J.; KUNG, L. Jr. Effects of a Mixture of Lactic Acid Bacteria Applied as a Freeze-Dried or Fresh Culture on the Fermentation of Alfalfa Silage. **J. Dairy Science**. v. 90. p. 5698 – 5705, 2007.
- KLOCKE, M.; MUNDT, K.; IDLER, C.; MCENIRY, J.; O'KIELY, P.; BARTH, S. Monitoring *Lactobacillus plantarum* in grass silages with the aid of 16S rDNA-based quantitative real-time PCR assays. **Systematic and Applied Microbiology**. V. 29, p. 49–58, 2006.
- KUNG, L. Jr.; TUNG, R. S; MACIOROWSKI, K. Effect of a microbial inoculant (Ecosyl™) and/or a glycopeptide antibiotic (vancomycin) on fermentation and aerobic stability of wilted alfalfa silage. **Animal Feed Science and Technology**. v. 35, p. 37–48, 1991.
- KUNG, L. Jr. Preparation of silage water extracts for chemical analysis: standard operating procedure - 001 6.03.96. Worrlow: University of Delaware. **Ruminant Nutrition Lab**. p.309, 1996.
- KUNG, L. Jr.; RANJIT, N. K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**. v. 84, p. 1149-1155, 2001.
- LÉDO, F. J. S.; OLIVEIRA, P. P. A.; PEREIRA, A. V. Livro: **Plantas Forrageiras**. 1ª edição. P. 341-365, 2010.
- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**. v.57, p.347-358, 1996.
- LIU, Q.; CHEN, M.; ZHANG, J.; SHI, S.; CAI, Y. Characteristics of isolated lactic acid bacteria and their effectiveness to improve stylo (*Stylosanthes guianensis* Sw.) silage quality at various temperatures. **Animal Science Journal**. v. 83, p. 128 – 135, 2012.

- LUIS, L.; RAMIREZ, M. Evolución de la flora microbiana en ensilaje de king grass. **Pastos y Forrajes**. v.11, p.249-253, 1988.
- LYNCH, J.P.; JIN, L.; LARA, E. C.; BAAH, J.; BEAUCHEMIN, K. A. The effect of exogenous fibrolytic enzymes and a ferulic acidesterase-producing inoculant on the fibre degradability, chemical composition and conservation characteristics of alfalfa silage. **Animal Feed Science and Technology**. v. 193, p. 21 – 31, 2014.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12^a Edição. Artmed, Porto Alegre, RS. p. 141-174, 2010.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12a Edição. Artmed, Porto Alegre, RS. P. 445 – 486, 2010.
- MAGALHÃES, V. J. A.; RODRIGUES, P. H. M. Desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com silagem pré-seca de alfafa adicionada de inoculante microbiano. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 32, p. 2016-2022, n. 6, 2003.
- MAGALHÃES, V. J. A.; RODRIGUES, P. H. M. Avaliação de inoculante microbiano na composição bromatológica, fermentação e estabilidade aeróbia da Silagem pré-Seca de alfafa. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 33, n. 1, p. 51 – 59, 2004.
- MAHANA, W. C. Proper management assures high-quality silage and grain. **Feddstuffs**. January 10. p. 12-15, 1994.
- MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, E. A medium for isolation of lactobacillus. **Applied Bacteriology**. v. 23, p. 130-135, 1960.
- MANGINELLI, S.; MAGALHÃES, V. J. A.; RODRIGUES, P. H. M. Inoculação microbiana da alfafa para silagem sobre a digestibilidade total e ruminal em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 34, n.3, p. 926 -933, 2005.
- MCCULLOUGH, M. E. **Silage and silage fermentation feedstuffs**. p.49-52, 1977.

- MCDONALD, P.; HENDERSON, A.R. Buffering capacity of herbage samples as a factor in ensilage. **J. Sci. Food Agric.** V. 13, p. 395 – 400, 1962.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R. The **Biochemistry of silage**. New York: John Wiley. p. 226, 1981.
- MCDONALD, P. **The biochemistry of silage**. New York: John Wiley. p. 207-226, 1981.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON; S. J. E. **Biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcombe Publication. p. 340, 1991.
- MCGARVEY, J. A.; FRANCO, R. B.; PALUMBO, J. D.; HNASKO, R.; STANKER, L.; MITLOEHNER, F. M.; Bacterial population dynamics during the ensiling of *Medicago sativa* (alfalfa) and subsequent exposure to air. **Journal of Applied Microbiology**. v. 114, p. 1661 – 1670, 2013.
- MEESKE, R.; BASSON, H.M.; CRUYWAGEN, C.W. The effect of a lactic acid bacterial inoculant with enzymes on the fermentation dynamics, intake and digestibility of *Digitaria eriantha* silage. **Animal Feed Science and Technology**. v.81, n.3/4, p.237-248, 1999.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**. v.85, n.6, p.1217-1240, 2002.
- MUCK, R. Inoculant of silage and its effects on silage quality. : **Informational conference with dairy and forage industries**. Proceedings...US Dairy Forage Research. p. 43 -52, 1996.
- MUCK, R. E. Factors influencing silage quality and their implications for management. **Journal of Dairy Science**. v.71, p.2992-3002, 1988.
- MUCK, R. E.; KUNG, L. Jr. Silage production. **Forages. The Science of Grassland Agriculture**. . v. 2, p. 617-633, 2007.
- MUCK, R.E. Improving alfalfa silage quality with inoculants and silo management. In: Proceedings of 2008 Cornell Nutrition Conference, October 21-23, Syracuse, NY. p. 137-146, 2008.

- OHYAMA, Y.; MORICHI, T.; MASAKI, S. The effect of inoculation with *Lactobacillus plantarum* and addition of glucose at ensiling on the quality of aerated silages. **J. Sci. Food Agric.** v. 26, p. 1001–1008, 1975.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.A. et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology.** v.67, n.1, p.125-132, 2001.
- PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS F. 2003. Microbiology of ensiling. **Silage Science and Technology.** Madison. Proceedings...Madison: ASCSSA-SSSA, Agronomy, v. 42, p. 31-93, 2003.
- PANG, H; Qin, G.; TAN, Z.; Li, Z.; WANG, Y.; CAI, Y. Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis. **Systematic and Applied Microbiology.** v. 34, p. 235–241, 2011.
- PEREIRA, O. G.; ROCHA, K. D.; FERREIRA, C. L. L.F. Composição química, caracterização e quantificação da população de microrganismos em capim-elefante cv. Cameroon (*Pennisetum purpureum*, Schum.) e suas silagens. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v. 36, p. 1742 – 1750, 2007.
- PIARD, J.; DESMAZEAUD, M. **Review: Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.** V. 72, p. 113-142, 1992.
- POLAN, C. E.; STIEVE, D. E.; GARRETT, J. L. Protein preservation and ruminal degradation of ensiled forage treated with heat, formic acid, ammonia, or microbial inoculant. **Journal Dairy Science.** v. 81, n. 3, p. 765-776, 1998.
- RANGRAB, L. H.; MÜHLBACH, P. R. F.; BERTO, J. L. Silagem de alfafa colhida no início do florescimento e submetida ao emurchecimento e à ação de aditivos biológicos. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v. 29 (2), p. 349-356, 2000.
- RODRIGUES, P. H. M.; ALMEIDA, L. F. S.; LUCCI, C. S.; MELOTTI, L.; LIMA, F. R. Efeitos da adição de inoculantes microbianos sobre o perfil fermentativo da silagem de alfafa adicionada de polpa cítrica. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v. 33, p. 1646 – 1653, 2004.

- SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** v.4, p. 406–425, 1987.
- SEALE, D. R. Bacterial inoculants as silage additives. **Journal Applied Bact.** Symp. Supplement. 61(supplement): 9S-26S, 1986.
- SILVA, M. P. S. Prospecção de bactérias lácticas bacteriocinogênicas em silagens de Estilosantes. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- SPINCER, W. J. **Clinical Bacteriology, Mycology and Parasitology**. London: Churchill Livingstone. 221 p, 2000.
- STEVENSON, D. M.; MUCK, R. E.; SHINNERS, K. J.; Weimer, P. J. Use of real time PCR to determine population profiles of individual species of lactic acid bacteria in alfalfa silage and stored corn stover. **Applied Microbiology & Biotechnology**. v. 71, p. 329 - 338, 2006.
- TAGG, J.R.; DAJANI A.S.; WANNAMAKER L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriol. Rev.** v. 40, p. 722-756, 1976.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. Mega 6. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- VALADARES FILHO, S.C. Digestibilidade aparente e locais de digestão da matéria seca, energia e carboidratos de feno de soja perene. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte. 88p, 1981.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Sci.** v. 74, p. 3583–3597, 1991.
- VAN SOEST, P.J.; MASON, V.C. The influence of Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology** v. 32, p. 45-53, 1991.

- VAN SOEST, P.J.; **Nutricional ecology of the ruminant**. 2.ed. Cornell University Press. p. 476, 1994.
- VILELA, D. Aditivos para silagem de plantas de clima tropical. In: **Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia**, 35. Botucatu. Anais..., p.73-108, 1998.
- VILELA, D. Produção de leite em pastagens de alfafa. **Informe agropecuário**. v. 22, n. 211, p. 38-43, 2001.
- WANG, X.; HARUTA, S.; WANG, P.; ISHII, M.; IGARASHI, Y.; CUI, Z. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. **Microbiology Ecol.** v. 57, p. 106 – 115, 2006.
- WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **Microbiology Reviews**. v.19, p. 53-68, 1996.
- WOOLFORD, M.K. 1984. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker. p. 23-132, 1984.
- WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker. p. 165-211, 1984.
- WYSS, U.; VOGEL, R. Test results on silage additives. **Agrarforschung** 1, p. 136–139, 1994.