

WEMERSON DE CASTRO OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS E SUCESSÃO DA  
COMUNIDADE MICROBIANA EM SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada a Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

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

T

O48c  
2016

Oliveira, Wemerson de Castro, 19-  
Caracterização de microrganismos e sucessão da  
comunidade microbiana em silagem de cana-de-açúcar /  
Wemerson de Castro Oliveira. – Viçosa, MG, 2016.  
x, 115f.: il. (algumas color.).

Inclui anexos.

Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Microbiologia, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Cana-de-açúcar - Silagem - Contaminação.  
2. Contaminação microbiana. 3. Bactérias. 4. Leveduras.  
5. Acido láctico. 6. Testes microbiológicos. I. Mantovani, Hilário  
Cuquetto, 1970-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em  
Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 633.619

WEMERSON DE CASTRO OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS E SUCESSÃO DA  
COMUNIDADE MICROBIANA EM SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2016

---

Odilon Gomes Pereira  
(Coorientador)

---

Cláudia Braga Pereira Bento

---

Rosinéia Aparecida de Paula

---

Humberto Moreira Humgaro

---

Hilário Cuquetto Mantovani  
(Orientador)

*“Graças, porém, a Deus, que, em Cristo, sempre nos conduz em triunfo e, por meio de nós, manifesta em todo lugar a fragrância do seu conhecimento.”*

*II Coríntios, 2:14*

*“A História tem demonstrado que os mais notáveis vencedores normalmente encontraram obstáculos dolorosos antes de triunfarem. Eles venceram porque se recusaram a se tornarem desencorajados por suas derrotas.”*

*B. C. Forbes*

## DEDICATÓRIA

*Dedico a minha vitória exclusivamente aos meus anjos da guarda que me guiaram e me encorajaram, dia a dia, a enfrentar de cabeça erguida minhas derrotas e chegar ao triunfo, meus pais e minha irmã.*

*Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado, sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de formas diferentes! Já não caminho mais sozinho, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição. Mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria, saber que já não sou o mesmo de ontem me faz perceber que valeu a pena!*

*Autor desconhecido!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ser um amigo de cada dia, por ser a minha estrutura, por ser meu guia, por ser meu tudo e encher a minha vida de felicidade e paz.

À meus amados pais, Eva e Adelson que na sua simplicidade e humildade souberam com palavras e gestos corretos me encorajar, aconselhar, guiar e direcionar, sendo o amor gerado por eles, um combustível que me permitiu fazer o impossível.

À minha grande e generosa irmã Nayara Caroline a quem amo eternamente e que é parte de mim, juntamente com meu cunhado Bruno e meu sobrinho Gustavo.

Ao meu sobrinho Matheus, que com toda a sua ingenuidade de criança me fez perceber nos pequenos gestos e momentos a grandeza de amar.

À minha segunda mãe, Tia Lú, e minha afilhada Viviam, que mesmo distante fizeram presente em cada momento de alegria e tristeza da minha vida.

Às minhas famílias, Castro e Oliveira que torceram, rezaram e me incentivaram a lutar sempre.

Aos colegas de laboratório, que compartilharam comigo cada minuto dessa trajetória, me ajudando a cada dia a me tornar uma pessoa e um profissional melhor.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia Agrícola por ter me proporcionado mais esta conquista.

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

Ao professor Hilário por ter tido paciência, o cuidado de sempre me ensinar e de me ajudar a me tornar um profissional melhor. É um exemplo de profissional.

Ao professor Odilon por ter aceitado o convite para participar da nossa equipe de trabalho e por ter contribuído grandemente para a conclusão deste trabalho.

A todos que torceram por mim, obrigado!

## **BIOGRAFIA**

WEMERSON DE CASTRO OLIVEIRA, filho de Adelson Geraldo de Oliveira e Eva de Castro Oliveira, nasceu no dia 22 de agosto de 1985 na cidade de Caratinga, Mina Geral.

Graduou-se em dezembro de 2006, Licenciado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Caratinga - UNEC.

Em 2008 ingressou no curso de especialização Controle de Qualidade em Segurança Alimentar no Instituto Metodista Isabela Hendrix, tornando-se especialista em março de 2010.

Em fevereiro de 2012 se titulou mestre em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2012 iniciou o curso de doutorado em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa da tese em fevereiro de 2016.

# SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA .....	5
CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO DE LEVEDURAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	23
Resumo.....	24
Introdução .....	25
Materiais e Métodos.....	27
Resultados .....	32
Discussão .....	38
Anexo .....	48
CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA DURANTE A FERMENTAÇÃO DA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	54
Resumo.....	55
Introdução .....	56
Materiais e Métodos.....	57
Resultados .....	62
Discussão .....	79
Anexo .....	88
CAPÍTULO 4: DIVERSIDADE GENÉTICA DA COMUNIDADE MICROBIANA ENVOLVIDA NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	95
Resumo.....	96
Introdução .....	97
Materiais e Métodos.....	98
Resultados .....	103
Discussão .....	107
CONCLUSÃO GERAL .....	115

## RESUMO

OLIVEIRA, Wemerson de Castro. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2016. **Caracterização de microrganismos e sucessão da comunidade microbiana em silagem de cana-de-açúcar.** Orientador Hilário Cuquetto Mantovani. Coorientador: Odilon Gomes Pereira.

Em países de clima tropical, a silagem de cana-de-açúcar tem sido preconizada para uso na alimentação de ruminantes. No entanto, a cana-de-açúcar ensilada pode ter a qualidade diminuída devido à presença de microrganismos indesejáveis, como as leveduras. O interesse em compreender a dinâmica da sucessão microbiana durante a fermentação da cana-de-açúcar está relacionado com as perdas nutricionais associadas com a fermentação alcoólica causada pelas leveduras. Neste estudo, foram isoladas e caracterizadas 99 culturas de leveduras e 164 culturas de bactérias obtidas da cana *in natura* e da silagem de cana-de-açúcar obtidas em diferentes tempos de fermentação (1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias). Além disso, a análise da composição da comunidade bacteriana e fúngica da silagem de cana-de-açúcar foi realizada utilizando a técnica de PCR-DGGE. Foram identificadas dez espécies de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Meyerozyma* e *Torulaspota*. As espécies *Pichia kudriavzevii* e *Candida glabrata* foram abundantes em todos os períodos de fermentação, representando 45% e 29% do número total de leveduras isoladas, respectivamente. Também foram identificados isolados bacterianos pertencentes a 21 gêneros diferentes, incluindo bactérias do ácido láctico e bactérias aeróbias. O gênero *Weissella* foi o mais abundante nos primeiros dias de fermentação, representando 34,7% dos isolados da cana-de-açúcar, enquanto o gênero *Lactobacillus* predominou na fase mais tardia da fermentação, com 22,9% dos isolados. Sessenta e nove isolados inibiram o crescimento de *Listeria monocytogenes in vitro* e, dentre estes, 18 inibiram ao mesmo tempo *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. A análise da diversidade genética da comunidade bacteriana das amostras avaliadas indicou diferenças entre a cana *in natura* e a silagem após 28 dias de fermentação. O índice de riqueza de espécies do Domínio Bacteria reduziu 34,5% e 27,6% no grupo de leveduras após 28 dias de fermentação. Entretanto, os índices de diversidade foram semelhantes entre os períodos de fermentação avaliados. A análise de diversidade de Firmicutes e  $\gamma$ -Proteobacteria,

indicou aumento de 40% na riqueza de membros do filo Firmicutes após 28 dias de fermentação e redução de 38,1% de representantes da Classe  $\gamma$ -Proteobacteria. A avaliação da composição da microbiota da silagem de cana-de-açúcar indicou o predomínio de algumas espécies de bactérias e leveduras durante a ensilagem que poderão ser utilizadas como alvos para o desenvolvimento de aditivos visando melhorar a qualidade nutricional da silagem de cana-de-açúcar.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Wemerson de Castro. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2016. **Characterization of microorganisms and microbial community succession in sugarcane silage.** Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-adviser: Odilon Gomes Pereira.

In tropical countries, sugarcane silage has been recommended for use in ruminant feed. However, the ensiled sugarcane can have a diminished quality due to the presence of unwanted microorganisms, such as yeasts. The interest in studying the microbial diversity and the dynamics of the microbial succession during sugarcane fermentation is related to nutrient losses associated with alcoholic fermentation caused by yeasts. In this study, we identified 99 yeast cultures and 164 bacterial cultures from silage of sugarcane, in different fermentation times (1, 3, 7, 14, 21 and 28 days). Furthermore, analysis of the bacterial community was performed using PCR-DGGE. Ten species of yeasts belonging to the genera *Candida*, *Pichia*, *Meyerozyma* or *Torulaspora* were identified. The species *Pichia kudriavzevii* and *Candida glabrata* were abundant in all sampling times, representing 45% and 29% of the total number of yeasts, respectively. Bacterial isolates belonging to 21 different genera were identified, including lactic acid bacteria and aerobic bacteria. The *Weissella* genus represented 34.7% of the bacterial population isolated in the first days of fermentation, while the genus *Lactobacillus* was prevalent in the later stages of silage, accounting for 22.9% of the isolates. Sixty-nine isolates inhibited the growth of *Listeria monocytogenes in vitro* and, among these isolates, 18 also inhibited *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Analysis of the bacterial communities showed a difference in diversity indices between fresh and 28-days fermented ensiled sugarcane. A reduction of 34% in culturable bacteria and 27.6% of the yeasts was observed after 28 days of fermentation. However, the diversity indices were similar in both fermentation times. Diversity analysis indicated an increase of 40% in the members of the phylum Firmicutes after 28 days of fermentation, while representants of the Class  $\gamma$ -Proteobacteria, reduced 38.1% during the ensiling process. Determining the composition on the sugarcane silage microbiota indicated the predominance of some species of bacteria and yeast that can be used as targets for the development of additives to improve the nutritional quality of the sugarcane silage .

## INTRODUÇÃO GERAL

A importância da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), como cultura, é evidenciada pela história, visto que antes do século XIX, o Brasil já era mencionado como o maior produtor mundial de açúcar. As várias transformações no setor sucroalcooleiro, explicam em parte a grande expansão da cultura. Além disso, a cana-de-açúcar, também tem tido grande importância na utilização em dietas para bovinos, visto que, apesar das limitações oferecidas por esta cultura, resultados positivos na produtividade animal podem ser obtidos quando são utilizadas estratégias alimentares adequadas. As tradições de cultivo, os baixos custos por unidade de matéria seca (MS) produzida, alta produtividade por área, facilidades no estabelecimento e manejo da cultura, a preservação do valor nutritivo após a maturação, maior disponibilidade nos períodos de escassez de forragens nas pastagens, e flexibilidade no plantio e corte, representam as grandes vantagens da utilização da cana-de-açúcar em dietas de ruminantes.

A cana-de-açúcar é tradicionalmente utilizada na forma *in natura*, sendo fornecida diariamente para os animais. Porém em escala de alta produção, a logística operacional com colheita diária torna-se um grande entrave para o setor devido à necessidade de mão-de-obra diária para a realização dos cortes, despalhamento, trituração e transporte da forrageira. A ensilagem da cana-de-açúcar surge como uma alternativa para contornar os empecilhos relacionados à utilização deste recurso forrageiro na forma *in natura*, além disto, em casos de ocorrência de incêndios acidentais ou geadas nos canaviais, torna-se necessário o armazenamento imediato da cultura, pois o valor nutritivo desta forrageira é comprometido pelo processo de conversão da sacarose.

Geralmente, os microrganismos existentes em maior número nas plantas forrageiras são as enterobactérias, as leveduras e os fungos, que competem com lactobacilos pelos açúcares durante a ensilagem, sendo considerados indesejáveis. Assim, o alto teor de carboidratos solúveis na cana-de-açúcar e a grande população de leveduras epífitas, levam à fermentação alcoólica na qual ocorre a conversão dos açúcares em CO<sub>2</sub>, água e etanol, resultando na redução de carboidratos solúveis, baixos teores de ácido láctico e acético e aumento nos teores de componentes fibrosos nas silagens.

O principal foco dos estudos com silagem de cana-de-açúcar é a busca de aditivos que inibam a fermentação alcoólica da forragem visando a redução de perdas nutricionais do material ensilado. A utilização de aditivos químicos e biológicos tem apresentado resultados controversos e os seus mecanismos de ação não estão claramente elucidados. A adição de um inoculante microbiano no processo de ensilagem visa estimular o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico, a fim destas dominarem a fermentação, produzindo uma silagem de boa qualidade. De forma geral, tem o objetivo de inibir o crescimento de microrganismos aeróbios, que estão associados com a instabilidade aeróbia, inibir o crescimento de organismos anaeróbios indesejáveis como enterobactérias e clostrídeos, inibir a atividade de proteases e desaminases da planta e de microrganismos, bem como adicionar microrganismos benéficos para dominar a fermentação, formar produtos finais benéficos para estimular o consumo e a produção do animal e melhorar a recuperação de matéria seca da forragem conservada.

Para obter um resultado eficiente do aditivo microbiológico na silagem de cana-de-açúcar, é necessário também conhecer de forma mais aprofundada e detalhada o processo de fermentação. Entender a diversidade, a sucessão das espécies e a interação entre os microrganismos ao longo do período de fermentação permite uma melhor compreensão do processo para uma intervenção mais eficiente da fermentação de microrganismos indesejáveis. O conhecimento do ecossistema e da microbiota presente durante o processo fermentativo da cana-de-açúcar ensilada pode proporcionar grandes avanços nos estudos com aditivos biológicos para a melhoria e conservação da silagem.

Neste aspecto, as técnicas moleculares, principalmente as independentes de cultivo, têm contribuído para o conhecimento da diversidade desses microrganismos e do potencial biotecnológico das comunidades microbianas e processos ainda não explorados, como por exemplo, o perfil e a diversidade de microrganismos presentes na cana-de-açúcar e na sua forma fermentada (silagem) que ainda não são bem caracterizados.

A maioria das técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de silagens baseia-se na metodologia da PCR para fazer cópias de uma porção do DNA dos microrganismos. Esta análise permite tanto identificar e quantificar espécies quanto realizar estudos de análise de comunidade. A partir de técnicas como essa, novas espécies de bactérias e fungos vêm sendo reveladas durante as fases de armazenamento e pós-abertura da silagem de cana-de-açúcar. Considerando que as

técnicas de isolamento normalmente utilizadas para avaliar a comunidade microbiana não permitem o estudo de microrganismos não cultiváveis, ocorre uma restrição do estudo somente a grupos já conhecidos. Nos últimos anos, várias técnicas para caracterização da composição de comunidades microbianas tem sido utilizadas para investigar a sucessão de microrganismos durante processos fermentativos, no entanto, em estudos de silagens o uso dessas técnicas ainda é limitado.

Neste trabalho, os objetivos foram (I) enumerar a população microbiana, bactérias e leveduras, ao longo do período de fermentação da silagem de cana-de-açúcar; (II) isolar, identificar e caracterizar a diversidade e o perfil fermentativo das leveduras predominantes durante o processo de ensilagem; (III) caracterizar fisiologicamente e fenotipicamente os microrganismos cultiváveis; (IV) investigar a microbiota presente na cana-de-açúcar e a sucessão microbiana ao longo da fermentação utilizando técnicas moleculares.

# Capítulo 1

---

REVISÃO DE LITERATURA

## REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, sendo que a maioria dos animais é alimentada com dietas à base de forragens (Silva, 2011). A disponibilidade das pastagens tropicais sofre interferência das alterações climáticas ao longo do ano. No período das secas ocorre uma redução do crescimento das plantas (Ferrari Junior *et al.*, 2009), e uma diminuição do valor nutricional das forragens. Dessa maneira, a silagem tem sido utilizada como estratégia para garantir o suprimento de forragens de boa qualidade nutricional ao longo do ano (Pereira e Santos, 2006).

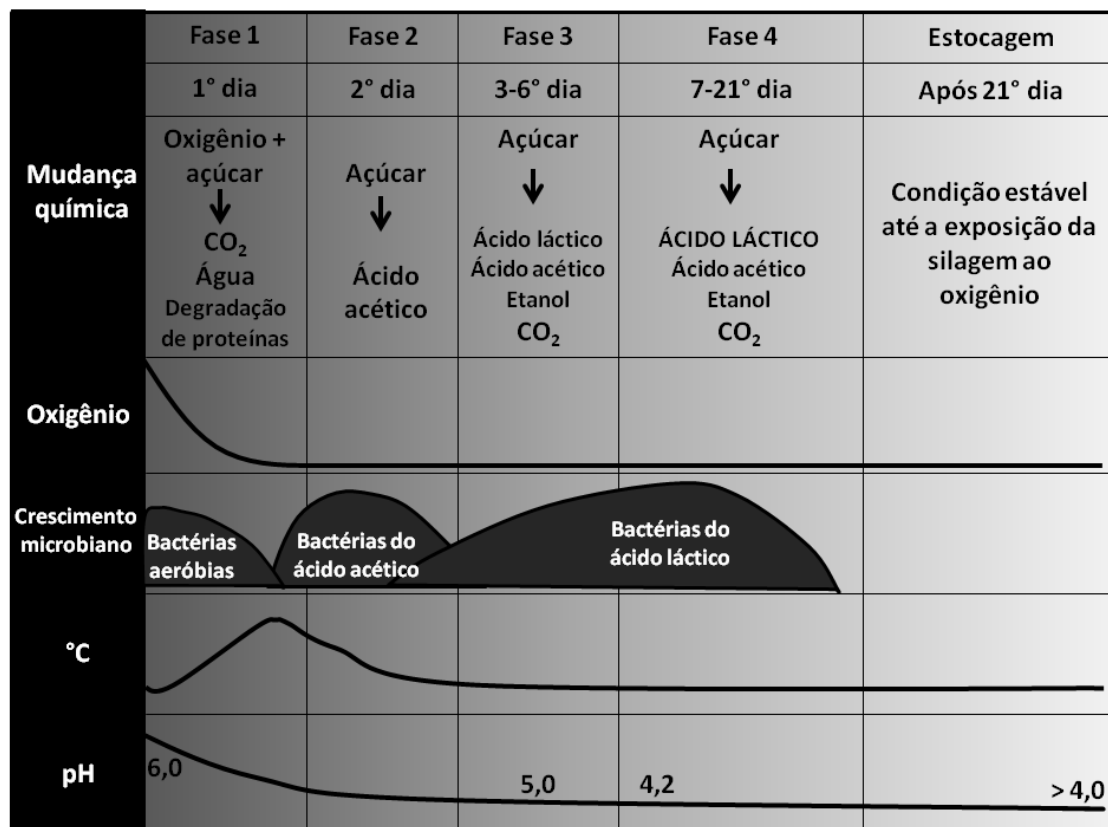
A silagem é o produto final da fermentação da massa de forragem na ausência de oxigênio, realizada por bactérias que consomem, principalmente, os carboidratos solúveis em água disponíveis nas plantas produzindo ácidos orgânicos, principalmente, ácido lático que reduz o pH da silagem até valores próximos de quatro, inibindo a ação de enzimas hidrolíticas e de microrganismos patogênicos e deterioradores capazes de promover a deterioração da silagem (Holzer *et al.*, 2003; Ennahar *et al.*, 2003; Ferrari Junior *et al.*, 2009).

O processo de fermentação durante a ensilagem é promovido pela microbiota epífita ou por microrganismos inoculantes aplicados com o intuito de aumentar a eficiência da fermentação. Essa eficiência é determinada pela quantidade e tipo de microrganismos presentes no silo, bem como pelo teor de matéria seca, capacidade tamponante e teor de carboidratos solúveis da forragem (McDonald *et al.*, 1991).

O processo de fermentação é de fundamental importância para determinar a qualidade da silagem e pode ser influenciado por vários fatores, incluindo pH, poder tampão, temperatura, população bacteriana, conteúdo de carboidratos solúveis, matéria seca, nitrogênio, hemicelulose e volume de ar por volume de forragem (Woolford, 1984). No que se refere à forrageira, esta deve apresentar nível adequado de substratos fermentáveis sob a forma de carboidratos solúveis, baixa capacidade tamponante, teor de matéria seca acima de 20% e estrutura física que permita boa compactação no silo (McDonald *et al.*, 1991).

A fermentação da silagem é dividida em etapas, sendo reconhecidas pelo menos cinco fases que caracterizam as principais mudanças bioquímicas, físico-químicas e microbiológicas da silagem. A fase inicial considera o final da respiração das células da planta, a produção de calor e de dióxido de carbono. Essa fase é importante para o estágio da produção do ácido acético e de redução do pH da forragem. No entanto, à

medida que o pH reduz, bactérias de ácido acético diminuem rapidamente (Harris, 1984). As fases 2 e 3 são caracterizadas pelo início da formação de ácido láctico. A fixação da forragem e o aumento da taxa de infiltração ocorrem nos primeiros dias de ensilagem, com o seu auge nos 4º e 5º dias (Figura 1).



**Figura 1:** Etapas da fermentação da silagem. Fonte: adaptado de Harris (1984).

A formação de ácido acético e láctico, assim como a presença de amônia e aminas, têm influência sobre o pH do processo de ensilagem e estão relacionados com o pH da forragem fermentada. É necessário que o pH da massa ensilada esteja entre 3,5 e 4,5 para o armazenamento de uma boa silagem (Harris, 1984).

O sucesso da confecção da silagem é determinado durante a fase 4, que geralmente começa após 3 a 5 dias de ensilagem e requer de 15 a 20 dias para a sua conclusão. Nessa fase, ocorre aumento gradual no teor de ácido láctico, que acidifica o meio (pH 3,8 a 4,2), o suficiente para cessar a ação bacteriana (Harris, 1984). A fase 5 representa a manutenção da qualidade ao longo de um período de tempo indefinido. Para que a silagem se mantenha constante durante todo o tempo de armazenamento, é necessária a produção suficiente de ácido acético e láctico nas primeiras quatro fases. No entanto, quantidades insuficientes de ácidos conduzem a um aumento da decomposição, que reduz a palatabilidade e causa uma possível deterioração (Figura 1).

A cana-de-açúcar é um alimento desbalanceado e possui baixo teor de proteína (valor médio de 3,8%), alto teor de açúcar e alta proporção de fibra com baixa digestibilidade (Ortiz-Rubio *et al.*, 2007). O valor nutricional da cana-de-açúcar está diretamente relacionado com o seu alto teor de açúcar, o qual pode variar de 40 a 50% da matéria seca (Thiago e Vieira, 2002).

A cana-de-açúcar tem papel fundamental nos confinamentos para terminação de bovinos de corte por apresentar características desejáveis, como manutenção da qualidade por longos períodos, adaptação às condições ambientais das regiões tropicais/subtropicais, disponibilidade de condições e tecnologias adequada para o seu cultivo (Pate *et al.*, 2001), além da grande produção de forragem por unidade de área (80 a 150 t/ha). A cana-de-açúcar possui ainda baixo custo de produção por tonelada de matéria seca (MS) e pode manter o valor nutritivo por até seis meses após a maturação e a época de colheita (Silva *et al.*, 1993). O fornecimento da cana-de-açúcar como suplemento volumoso no período de estiagem é uma das práticas mais interessantes, considerando-se a disponibilidade de forragem neste período crítico (Franzolin Neto *et al.*, 1989), coincidente com o período de escassez de forragem nas pastagens.

O fornecimento da cana-de-açúcar aos animais na forma *in natura* é tradicionalmente utilizada pelos pecuaristas. Entretanto, em escala de alta produção, a logística operacional com colheita diária torna-se um grande entrave para o setor devido à necessidade de mão-de-obra diária para a realização dos cortes, despalhamento, trituração e transporte da forrageira (Pedroso, 2003).

A ensilagem da cana-de-açúcar surge como uma alternativa para contornar esses problemas relacionados à utilização deste recurso forrageiro na forma *in natura*. No caso de ocorrência de incêndios acidentais ou geada nos canaviais, torna-se necessário o armazenamento imediato da cultura, pois o valor nutritivo desta forrageira é comprometido pelo processo de conversão da sacarose. A utilização da cana-de-açúcar *in natura* fora de safra também sofre restrições pela baixa qualidade nutricional que a forrageira apresenta em virtude do baixo teor de sacarose (Matsuoka e Hoffmann, 1993).

Quando ensilada, a cana-de-açúcar tem o seu valor nutritivo diminuído (Alcántara *et al.*, 1989). A isto é atribuído ao consumo do açúcar, que é convertido em CO<sub>2</sub>, água e etanol após o processo de fermentação alcoólica realizada pelas leveduras epifíticas, e também, pelo seu elevado teor de umidade (70 a 80%), resultando em perdas excessivas por infiltração (Pate *et al.*, 2001; Pedroso, 2003).

A fermentação alcoólica pode consumir até 50% da sacarose presente na cana-de-açúcar fresca. As demais perdas estão relacionadas ao consumo de açúcares durante a fase aeróbia pela respiração da planta e produção de ácidos orgânicos pelas bactérias anaeróbias (Alli *et al.*, 1982).

A adição de aditivos químicos ou biológicos possibilita o controle da fermentação alcoólica e a melhoria da conservação da silagem da cana-de-açúcar. Apesar da crescente demanda por informações sobre a ensilagem da cana-de-açúcar, poucos estudos tem investigado o uso de aditivos para o controle da produção de etanol e aumento da estabilidade aeróbia destas silagens, que são aspectos fundamentais na preservação da forragem (Pedroso, 2003). O principal foco dos estudos com ensilagem de cana-de-açúcar tem sido na busca de aditivos biológicos capazes de inibir a fermentação alcoólica dessa forrageira e reduzir as perdas nutricionais.

### **1.1. Aditivos químicos e biológicos**

O uso de aditivos químicos ou biológicos possibilita melhorar a qualidade da silagem e controlar a fermentação alcoólica pelas leveduras. Aditivos são ingredientes adicionados à forragem durante o enchimento do silo, os quais influenciam o processo fermentativo promovendo o desenvolvimento de microrganismos benéficos, como bactérias produtoras de ácido láctico, e, conseqüentemente, a redução do pH da silagem, inibindo reações indesejáveis e impedindo o crescimento de microrganismos aeróbios ou aqueles que degradam proteínas e produzem etanol (Cruz *et al.*, 2001; Pedroso, 2003).

Existem hoje no mercado diferentes tipos de aditivos que tem como objetivo de melhorar a qualidade da silagem e controlar a fermentação. O uso de inoculante não traz melhoras a uma silagem ruim, uma vez que não substituem as boas práticas de ensilagem, como matéria seca (MS) ideal para colheita, picagem, compactação bem-feita, rapidez no processo e boa vedação. Entretanto, os inoculantes fazem com que uma silagem de boa qualidade torne-se melhor. Os inoculantes aceleram o processo de fermentação láctica, reduzem rapidamente o pH, antecipam e aceleram o processo de fermentação, reduzem o percentual de perdas de matéria seca, melhoram o valor energético da silagem e aumentam a estabilidade após a abertura do silo (Cruz *et al.*, 2001).

A utilização de aditivos para melhorar a qualidade das silagens de forragens tropicais não é novidade, mas pouca informação está disponível para a silagem de cana-

de-açúcar. A cana-de-açúcar ensilada com aditivos apresenta melhor valor nutricional comparada à cana-de-açúcar ensilada pura, embora os resultados de suas análises bromatológicas não sejam melhores do que os da cana *in natura* (Silvestre *et al.*, 1976; Alvarez *et al.*, 1977).

Os aditivos químicos, além de melhorar a qualidade da silagem, auxiliam na digestão do material fibroso da cana-de-açúcar. Dentre estes, o óxido de cálcio (CaO) é o mais utilizado em silagem de cana-de-açúcar por oferecer menores riscos e custos, sendo de fácil estocagem. O uso da cal tem por base a formação de hidróxido de cálcio, vcbum agente alcalino com moderado poder de hidrólise da fibra (Berger *et al.*, 1994). Além de a cal virgem apresentar efeito de hidrólise na cana-de-açúcar, Domingues e colaboradores (2006), mostraram o efeito eficaz no controle das leveduras e o aumento da estabilidade aeróbia da silagem, o que é um aspecto interessante, uma vez que as leveduras estão associadas à deterioração aeróbia de alimentos ricos em carboidratos (Pina *et al.*, 2011) e pH baixo. Segundo Santos e colaboradores (2008), o CaO pode alterar a população de microrganismos presentes na silagem por reduzir a atividade de água e elevar o pH.

A utilização de inoculantes microbianos comerciais em silagens, tem o objetivo de inibir o crescimento de microrganismos aeróbios e o de anaeróbios indesejáveis como enterobactérias e clostrídeos. Os aditivos microbiológicos contêm normalmente linhagens de bactérias homofermentativas produtoras de ácido láctico como: *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus faecium*, *Enterococcus faecium* e *Lactococcus lactis*. Pesquisas utilizando bactérias heterofermentativas, como: *Lactobacillus buchneri*, *Pediococcus cerevisiae*, *Propionibacterium shermanie* e *Propionibacterium acidipropionici*, têm sido realizadas buscando melhorar a estabilidade aeróbia das silagens controlando a população de levedura, mas os resultados ainda são variáveis (Pedroso, 2003). Além do ácido láctico, as bactérias heteroláticas produzem ácido acético e propiônico, que têm maior poder de inibir o crescimento de leveduras e fungos filamentosos (Pedroso, 2003).

Os microrganismos homofermentativos caracterizam-se pela taxa de fermentação mais rápida, menor proteólise, maior concentração de ácido láctico, menores teores de ácidos acéticos e butírico, menor teor de etanol, e maior recuperação de energia e matéria seca. Bactérias heterofermentativas utilizam ácido láctico e glicose como substrato para produção de ácido acético e propiônico (Zopollatto *et al.*, 2009).

O sucesso no uso de aditivos microbiológicos em silagens, depende da habilidade da bactéria inoculada crescer rapidamente na massa de forragem ensilada, da

presença de substrato adequado e da população de bactérias inoculadas em relação à população epífita da forragem, sendo necessárias aproximadamente  $10^8$  UFC de bactérias ácido lácticas por grama de forragem para que o pH decline rapidamente. No entanto, esta concentração é muito superior à suprida pelos aditivos microbiológicos, e neste caso, o inoculante deve apresentar rápida taxa de crescimento na forragem recém ensilada (Muck, 1988). Com um aditivo, também é possível utilizar estirpes com as propriedades desejadas, como atividade antifúngica, para melhorar ainda mais o produto final (Broberg *et al.*, 2007).

Estudos realizados com diferentes estirpes de *Lactobacillus plantarum* foram isolados e caracterizados substâncias antifúngicas, como as estirpes MiLAB14 e MiLAB393 que produziram ácido 3-fenilático, vários ácidos graxos 3-hidroxi e uma série de dicetopiperazinas (Ström *et al.*, 2002; Sjogren *et al.*, 2003). Os ácidos graxos 3-hidroxi foram as substâncias antifúngicas mais potentes, com valores de concentração inibitória mínima (MIC) contra leveduras e fungos deterioradores de 10 a 100 g.ml<sup>-1</sup>, enquanto que o ácido 3-fenilático e as dicetopiperazinas foram significativamente menos ativos (Ström *et al.*, 2002; Sjogren *et al.*, 2003).

Valan Arasu e colaboradores (2013), isolaram, identificaram e caracterizaram metabólitos antifúngicos produzidos por *Lactobacillus* sp. KCC-10 em amostras de forragem e observaram atividade antifúngica desses metabólitos, com amplo espectro de atividade, inibindo as seguintes espécies: *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus pullulans*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis elliptica*, *Candida albicans*, *Candida lunata*, *Epidermophyton floccosum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Gibberella moniliformis*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium roqueforti*, *Scytalidium lignicola*, *Scytalidium vaccinii*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Stemonitis fusca*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Thermomicrobium roseum*.

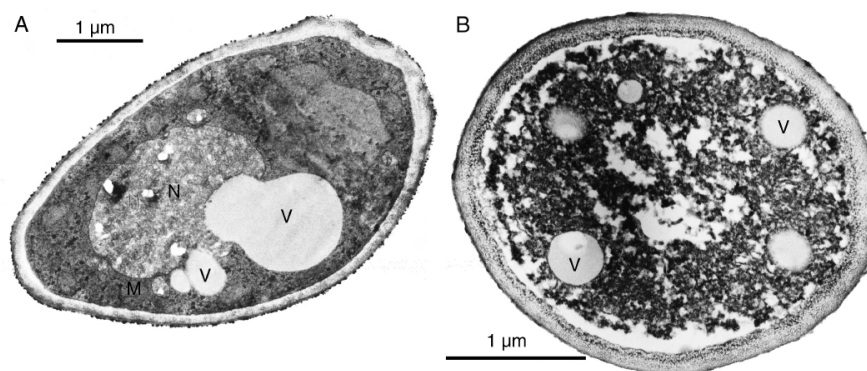
Moon e colaboradores (1983) reportaram que misturas de concentrações elevadas de ácido láctico, ácido acético e propiônico inibiram espécies de leveduras que normalmente crescem bem em concentrações relativamente elevadas (100 mM) dos ácidos individuais, exceto para o ácido propiônico. Lavermicocca e colaboradores (2003) também avaliaram o efeito combinado de ácido láctico e ácido fenilático e obtiveram resultados satisfatórios na inibição fúngica. Estudos realizados com *Lactobacillus casei* e *L. acidophilus* demonstraram a produção de vários metabólitos com propriedades antifúngicas que podem atuar em conjunto para inibir o crescimento de fungos em cultura líquida. A atividade antifúngica tem sido resultado da combinação

de ácidos orgânicos como o ácido láctico, acético e fenilático (Niku-Paavola *et al.*, 1999; Laitila *et al.*, 2002; Lavermicocca *et al.*, 2003), bacteriocinas (Mortvedt *et al.*, 1991) peptídeos antimicrobianos e agentes de baixo peso molecular (Ouweland, 1998; Stiles *et al.*, 1999; Ström *et al.*, 2002).

O efeito combinado de vários ácidos orgânicos, além do ácido láctico, tem sido estudado e tem garantido melhorias na qualidade e principalmente na estabilidade aeróbia da silagem. Em 1996, Wienberg e Muck propuseram a utilização de *Lactobacillus buchneri* como cultura *starter* em silagem de milho. A principal razão para a utilização desta bactéria pertencente ao grupo heterofermentativo foi o aumento da estabilidade da silagem contra a deterioração por leveduras e fungos, quando exposto ao ar, devido a produção de ácido acético e 1,2-propanodiol (Driehuis *et al.*, 1999; Schütz ; Radler, 1984).

Em diversas investigações, o uso de *L. buchneri* na silagem como inoculante resultou no aumento da estabilidade aeróbica (Driehuis *et al.*, 1999; Kung Jr; Ranjit, 2001; Oude-Elferink *et al.*, 2001; Ranjit *et al.*, 2002; Weinberg *et al.*, 1993; Weinberg *et al.*, 2002). Danner e colaboradores (2003) investigaram o efeito de diferentes compostos formados por bactérias de ácido láctico heterofermentativas sobre a estabilidade aeróbica da silagem e percebeu uma relação direta com a quantidade de ácido acético e o aumento da estabilidade da silagem. Weinberg e colaboradores (2002) testaram o efeito de uma combinação de *Lactobacillus plantarum* e *L. buchneri* e observaram que depois de três meses de armazenamento, as silagens de trigo tratadas com *L. buchneri* apresentaram os maiores teores de ácido acético e estavam livres de fungos filamentosos, ao contrário do que foi observado nas camadas superiores do controle ou das silagens tratadas com *L. plantarum*. A estabilidade aeróbica das silagens de trigo tratadas com *L. buchneri* era estável, enquanto que as tratadas com *L. plantarum* apresentou deterioração. Na silagem de milho a inoculação de *L. buchneri* também melhorou a estabilidade aeróbica da silagem, como indicado pela redução no número de leveduras, menor produção de dióxido de carbono e pH estável.

Bergsson e colaboradores (2001) mostraram o efeito de ácidos orgânicos na célula de levedura (Figura 2). Os resultados mostraram que o ácido cáprico, um ácido graxo saturado de 10 carbonos, provoca a morte rápida e de forma eficaz de estirpes de *Candida albicans*, deixando o citoplasma desorganizado e comprimido por causa do desarranjo e desintegração da membrana citoplasmática.



**Figura 2:** Efeito do ácido cáprico na ultraestrutura de *C. albicans*. Demonstração de cortes ultrafinos de células de levedura em Microscopia Eletrônica de Transmissão. (A) controle com citoplasma intacto, núcleo (N), vacúolos (V) e mitocôndrias (M). (B) celular tratada com ácido cáprico 10 mM durante 30 minutos, demonstrando a desorganização do citoplasma (Bergsson *et al.*, 2001).

Nas leveduras a redução de pH interno inibe a glicólise (Krebs *et al.*, 1983). Assim, a acidificação intracelular afeta diretamente o crescimento. Além da redução de pH interno, outras ações, como o acúmulo de ânion e desordenamento da estrutura da membrana celular foram também propostos como sendo responsáveis pela inibição de ácido fraco (Piper *et al.*, 2001). Outros estudos relatam sobre o acúmulo de trealose (Cheng *et al.*, 1999) e, conseqüentemente, a inibição da macroautofagia (Hazan *et al.*, 2004) e captação de aminoácidos aromáticos (Bauer *et al.*, 2003) em *Saccharomyces cerevisiae* por ácidos orgânicos fracos. As comparações da atividade inibidora por diferentes ácidos orgânicos têm demonstrado que a resposta fúngica é diferente dependendo dos ácidos fracos que são utilizados (Stratford e Anslow, 1996). Atividade antifúngica de ácidos graxos hidroxilados de *L. plantarum* MiLAB 14 foram descobertos por Magnusson (2003). Os ácidos graxos isolados do sobrenadante foram ácido 3-hidroxi-decanóico, ácido 3-hidroxi-dodecanóico, ácido 3-hidroxi-tetradecanóico e 3-hidroxi-5-cis-ácido dodecenóico. Bergsson e colaboradores (2001) também verificaram efeito antifúngico de ácidos graxos produzidos por BAL contra levedura e atribuíram este efeito inibitório aos ácidos cáprico (C10) e láurico (C12).

Além do efeito inibitório dos ácidos orgânicos, existem relatos na literatura de que as BAL produzem peptídeos antifúngicos. Batish e colaboradores (Batish *et al.*, 1989) relataram a produção de substâncias antifúngicas de natureza protéica em BAL. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactobacillus casei* apresentaram atividade antifúngica contra fungos filamentosos e duas espécies de *Penicillium*, respectivamente (Roy *et al.*, 1996; Gourama, 1997). Ao investigar culturas starter de inoculante de

silagem comercial, observou-se que uma linhagem de *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* apresentou atividade antifúngica contra *A. flavus*. A substância inibitória foi caracterizada como um composto protéico de baixa massa molecular, menor de 1 kDa (Gourama e Bullerman, 1995).

## 1.2. Bactérias lácticas e compostos antibacterianos

Bactérias do ácido láctico produzem uma variedade de compostos com atividade antimicrobiana. A ação microbicida das BAL é baseada na competição por nutrientes e na produção de vários compostos, como ácidos orgânicos (lático, acético, fórmico, propiônico, fenilático e outros), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil (2,3-butenodiona), reuterina (3-hidroxi propionaldeído), acetaldeído, dipéptidoscíclicos, ácidos graxos 3-hidroxi, bacteriocinas e agentes antimicrobianos de baixa massa molecular (Lindgren e Dobrogosz, 1990; Ouwehand, 1998; Cleveland *et al.*, 2001; Lavermicocca *et al.*, 2003; Schnürer e Magnusson, 2005).

O mecanismo preciso de ação antimicrobiana pode muitas vezes ser definido devido a uma complexa interação entre diferentes compostos (Corsetti *et al.*, 1998; Niku-Paavola *et al.*, 1999). Pesquisas têm sido direcionadas com o objetivo de identificar diferentes substâncias antimicrobianas, principalmente em sistemas simples *in vitro*, mas, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação destes compostos dentro de sistemas complexo no ambiente (Earnshaw, 1992).

As BAL são historicamente empregadas na indústria de alimentos para a produção de fermentados. São consideradas como “organismos seguros” (generally regarded as safe) e seus metabólitos finais contribuem tanto para inibir a microbiota contaminante presente nos alimentos, como para garantir ao produto fermentado características particulares, como aroma, textura e *flavour*, além do valor nutricional (Silva, 2011). Nos processos fermentativos, as BAL podem estar naturalmente presentes ou podem ser adicionadas como culturas *starter*. Além destes tipos de cultura, as BAL podem ser utilizadas na produção de culturas probióticas direcionadas à alimentação humana e à suplementação animal, que vem recebendo atenção pelos benefícios proporcionados à saúde (Caplice, 1999; Teusink e Smid, 2006; Dalié *et al.*, 2010).

Atualmente, muitos estudos têm sido direcionados para o isolamento e caracterização de bacteriocinas para diversas finalidades, dentre elas, conservação e manipulação da fermentação de alimentos. Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos de síntese ribossomal produzidos por diferentes espécies de bactérias e que variam

quanto à estrutura, características bioquímicas, mecanismo e espectro de ação (Komitopoulou *et al.*, 1999; Nagao *et al.*, 2006). As bacteriocinas geralmente inibem bactérias de espécies filogeneticamente relacionadas e podem conferir vantagem ecológica *in vivo* à cultura bacteriocinogênica (Tagg *et al.*, 1976).

De acordo com Cotter e colaboradores (2005), as bacteriocinas podem ser classificadas em classes I, II e III. A classe I ou lantibióticos, apresenta massa molecular inferior a 5 kDa, possuem 19-38 resíduos de aminoácidos (Riley e Wertz, 2002) e sofrem modificações pós-traducionais para a forma biologicamente ativa, apresentando aminoácidos não usuais como dehidroalanina (Dha) e dehidrobutirina (Dhb), monômeros de  $\beta$ -metilantionina (MeLan) e anéis de lantionina (Lan) (Cotter *et al.*, 2005; Kabuki *et al.*, 2011; Montalbán-López *et al.*, 2012). Os lantibióticos foram subdivididos em três classes de acordo com as enzimas de modificação (Willey e Van der Donk, 2007). A classe I é composta dos peptídeos que sofrem ação de LanB, LanC, LanP e LanT (nisina A e epidermina); a classe II são modificados apenas por LanM e LanT (lacticina 3147) e a classe III que são os peptídeos sem atividade antimicrobiana significativa (SapB) (Willey e Van der Donk, 2007).

### **1.3. Análise da diversidade microbiana em silagem de cana-de-açúcar**

Uma microbiota diversa pode ser encontrada associada aos vegetais, tanto em sua superfície como em seu interior. Entre eles estão os que podem ser classificados como microrganismos epífitas, os quais habitam a superfície dos órgãos e tecidos vegetais (Mendes e Azevedo, 2007). O número de espécies de microrganismos epífitas é variável, sendo afetado pelo tipo de forragem, pelo estágio de maturidade das plantas, pelo clima, pelo corte e condicionamento da forrageira (Lin *et al.*, 1992).

Geralmente, os microrganismos existentes em maior número nas plantas forrageiras, além das BAL, são as enterobactérias, as leveduras e os fungos, que competem com os lactobacilos pelos açúcares durante a ensilagem, sendo considerados indesejáveis (Bolsen *et al.*, 1992). São diversos os gêneros de microrganismos que podem ser encontrados na cana-de-açúcar, mas, até o momento, nenhum estudo mais detalhado da diversidade microbiana dessa forrageira foi realizado. Estudos sistemáticos da sucessão microbiana durante o processo de ensilagem da cana-de-açúcar podem auxiliar na manipulação da fermentação, reduzindo perdas nutritivas e a obtenção de uma silagem de boa qualidade com maior tempo de durabilidade.

Apesar do avanço em técnicas de cultivo, ainda não é possível cultivar a grande maioria de espécies bacterianas em condições comuns de laboratório, estando dessa forma, a caracterização desses isolados microbianos sujeita a críticas, pois depende de condições ambientais específicas (Bakonyi *et al.*, 2003). De modo geral, a descrição de comunidade microbiana requer o emprego de técnicas que não envolvam o cultivo em laboratório, uma vez que apenas uma pequena fração dos organismos na natureza (<1%) é cultivável por meio de técnicas microbiológicas de rotina (Amann *et al.*, 1995).

Na última década, a análise da composição de comunidades microbianas utilizando métodos independentes de cultivo tem sido utilizada para investigar mudanças na microbiota de alimentos fermentados (Ercolini, 2004). Essas análises frequentemente baseiam-se na comparação de sequências dos genes que codificam para o rRNA e na determinação de relações filogenéticas e evolutivas entre os organismos, e na detecção e quantificação de populações específicas (Head *et al.*, 1998).

Em bactérias, o gene que codifica o 16S rRNA é o mais amplamente utilizado (Amann *et al.*, 1995) para caracterizar a composição de comunidades bacterianas por meio de técnicas baseadas nos perfis eletroforéticos das sequências amplificadas por PCR, como T-RFLP, ARISA e DGGE (Deng *et al.*, 2008), técnicas de hibridização, como o FISH ou uso de plataformas de sequenciamento de nova geração.

Em estudo realizado por Li e Nishino (2011a) em que foi avaliado os efeitos da inoculação de *L. rhamnosus* e *L. buchneri* em silagens de milho utilizando a técnica de DGGE, os autores observaram que a adição de inoculantes microbianos não alterou a comunidade bacteriana da silagem e também apresentou pouco efeito sobre as populações de fungos durante o processo de fermentação. Contudo, alterações acentuadas foram detectadas na comunidade de fungos após a deterioração aeróbia. Os mesmos autores, avaliando a comunidade bacteriana em silagens de milho colhidas em diferentes safras e armazenadas em diferentes silos, relataram que a análise de DGGE pode indicar uma relação diferente entre os silos e as diferenças dentro de um mesmo silo são indicadas pela determinação dos produtos da fermentação, pois não foram observadas alterações na comunidade bacteriana nos diferentes locais de amostragem dentro de um mesmo silo. Nesse sentido, a análise da comunidade bacteriana neste estudo provou que, além das BAL inoculadas, uma comunidade bacteriana diversificada esteve presente na silagem de milho (Li; Nishino, 2011b).

Stevenson e colaboradores (2006) com o objetivo de desenvolver um método eficaz, independente de cultivo, para quantificar espécies individuais de BAL em silagens e forragens conservadas sob condições divergentes, verificaram que a PCR em

tempo real pode quantificar eficazmente as populações de BAL em forrageiras conservadas. Como resultado, foi observado que os inoculantes melhoraram a qualidade da silagem de alfafa, mas, espécies correspondentes aos inoculantes sofreram variações ao longo de 96 h. *Lactobacillus brevis* foi a espécie mais abundante representando 12 a 32% do DNA total da amostra, seguido da espécie *Lactobacillus plantarum* com 10%. Observou-se um aumento na população de *Pediococcus pentosaceus* ao longo do tempo, entretanto, não excedeu 2% do total. *Lactobacillus buchneri*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus spentusus* e *Enterococcus faecium* também foram quantificados, mas em populações pequenas (Stevenson et al., 2006). Os resultados mostraram que a PCR em tempo real é uma técnica eficiente para quantificar indivíduos das espécies de BAL em sistemas complexos, como em silagem.

Estudos têm sido realizados com RFLP para quantificar a população microbiana e investigar efeitos de tratamentos em silagens. McEniry e colaboradores (2010) estudaram essa técnica independente de cultivo, para realizar enumeração de bactérias e investigar o efeito da concentração de massa seca (MS) nas fases iniciais de ensilagem, bem como, a compactação de ar, após um longo período de ensilagem, na composição da comunidade bacteriana em silagem de capim. A técnica de RFLP foi usada para investigar a dinâmica da comunidade microbiana, e um total de 29 fragmentos de restrição terminal distintas foram detectados após a análise de todas as amostras. Um total de dezessete fragmentos de restrição terminal foi detectado nas plantas com baixa MS ao longo da fermentação em comparação com vinte e seis para as plantas com elevada MS. A concentração de matéria seca e a ausência de compactação foram os principais fatores que afetaram a composição da comunidade microbiana na silagem, e esse resultado refletiu em ambos os dados obtidos para cultivo convencional, quanto para o RFLP.

Anteriormente, o mesmo grupo investigou a dinâmica da comunidade microbiana de silagem utilizando a mesma técnica. O gene 16S rRNA foi amplificado, digerido com a endonuclease MspI, e então separado por eletroforese. A técnica detectou mudanças na comunidade com o tempo (0, 2, 6, 14, 35 e 98 dias) e com o método de ensilagem (enfardado ou silagem picada). Entretanto, devido ao fato de múltiplas espécies poderem apresentar fragmentos de igual comprimento, a diferenciação destas espécies não foi possível (Mceniry et al., 2010).

As plataformas de sequenciamento tem sido muito utilizadas nos estudos de ecologia microbiana e a sua aplicação em estudos da comunidade microbiana em silagem tem mostrado resultados que podem auxiliar na melhoria da qualidade da

fermentação. Heinl e colaboradores (2012) realizaram o sequenciamento completo do genoma de *L. buchneri* CD034 e determinaram a capacidade metabólica relativa da fermentação de carboidratos e degradação de ácido láctico. O sequenciamento (plataforma 454) resultou em 775.207 reads com cerca de 300 milhões de bases. A montagem do sequenciamento gerou 454 reads, sendo 39 contigs grandes ( $\geq 500$  pb) e 3 contigs pequenos ( $< 500$  pb), perfazendo um comprimento total de 2,52 Mb. Com base no sequenciamento de todo o genoma de *L. buchneri* CD034, os autores foram capazes de obter uma visão aprofundada da base molecular de vias metabólicas específicas e o mecanismo de adaptação ao nicho deste microrganismo. A análise revelou que a via heterofermentativa padrão de *L. buchneri* CD034 baseia-se na ausência de 6-fosfofrutoquinase e frutose-bisfosfato-aldolase, duas enzimas da parte superior da via de Embden Meyerhof. Além disso, a anotação dos genes revelou um conjunto de genes putativos envolvidos na dissimilação do lactato por conversão do ácido láctico em acetato, 1,2-propanodiol e etanol (Heinl et al., 2012).

Em outro estudo, Eikmeyer e colaboradores (2013) analisaram a comunidade microbiana durante o processo de ensilagem utilizando análise de DNA metagenômico e sequenciamento de amplicons para o gene rRNA 16S. O objetivo do trabalho foi avaliar alterações no perfil da comunidade taxonômicas durante o processo de ensilagem, identificar microrganismos que estão predominantemente envolvidas na ensilagem e elucidar a competitividade da estirpe *L. buchneri* CD034 inoculada dentro da comunidade bacteriana epifítica com 14 e 58 dias de fermentação. Foi observado aumento de BAL e da concentração de ácido acético na silagem inoculada em comparação com as amostras não tratadas. A partir do sequenciamento dos amplicons de 16S rRNA verificou-se que a abundância relativa de lactococos reduziu no decorrer da fermentação e que a proporção de bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria e Bacteroidetes aumentaram durante a fermentação da silagem tratada. Na silagem inoculada, os membros desses filios foram reduzidos devido ao aumento na abundância de lactobacilos. Este aumento foi mais pronunciado para a silagem inoculada. Durante a fermentação da silagem tratada, a abundância de leituras atribuídos a bactérias não pertencentes ao filo Firmicutes também aumentou. Além disso, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Lactococcus lactis* foram às espécies dominantes dentro da silagem. A análise metagenômica também forneceu evidências de competitividade da estirpe usada como inoculante, *L. buchneri* CD034, com a microbiota epifítica (Eikmeyer et al., 2013).

## 2. Referências

- Alcántara E, Aguilera A, Elliott R, Shimada A (1989) Fermentation and utilization by lambs of sugarcane harvested fresh and ensiled with and without NaOH. 4. Ruminal kinetics. *Anim Feed Sci Technol* 23:323–331.
- Alli I, Baker BE, Garcia G (1982) Studies on the fermentation of chopped sugarcane. *Anim Feed Sci Technol* 7:411–417.
- Alvarez FJ, Priego A, Preston TR (1977) Animal performance on ensiled sugar cane. *Trop Anim Prod* 2:27–33.
- Amann R, Ludwig W, Schleifer K (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143–169.
- Bakonyi T, Derakhshifar I, Grabensteiner E, Nowotny N (2003) Development and Evaluation of PCR Assays for the Detection of *Paenibacillus larvae* in Honey Samples: Comparison with Isolation and Biochemical Characterization. *Appl Environ Microbiol* 69:1504–1510. doi: 10.1128/AEM.69.3.1504-1510.2003
- Batish VK, Grover S, Lal R (1989) Screening lactic starter cultures for antifungal activity. *Cultured Dairy Products J* 24.
- Bauer BE, Rossington D, Mollapour M, Mamnun Y, Kuchler K, Piper PW (2003) Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. *Eur J Biochem* 270:3189–3195. doi: 10.1046/j.1432-1033.2003.03701.x
- Berger LL, Fahey GC, Bourquin LD, Titgemeyer EC (1994) Modification of forage quality after harvest. *Forage Qual Eval Util* 23:922–966.
- Bergsson G, Arnfinnsson J, Steingrímsson Ó, Thormar H (2001) In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3209–3212.
- Bolsen KK, Lin C, Brent BE, Feyerherm AM, Urban JE, Aimutis WR (1992) Effect of Silage Additives on the Microbial Succession and Fermentation Process of Alfalfa and Corn Silages. *J Dairy Sci* 75:3066–3083. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(92)78070-9
- Broberg A, Jacobsson K, Ström K, Schnürer J (2007) Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Appl Environ Microbiol* 73:5547–5552.
- Caplice E (1999) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol* 50:131–149. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00082-3
- Cheng L, Moghraby J, Piper PW (1999) Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Microbiol Lett* 170:89–95.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71:1–20. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00560-8
- Corsetti A, Gobbetti M, Rossi J, Damiani P (1998) Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:253–256. doi: 10.1007/s002530051285
- Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Micro* 3:777–788.
- Cruz JC, Pereira-Filho IA, Rodrigues JAS, Ferreira J (2001) Produção e utilização de silagem de milho e sorgo.
- Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F (2010) Lactic acid bacteria – Potential for control of

- mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* 21:370–380. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.07.011
- Deng W, Xi D, Mao H, Wanapat M (2008) The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Mol Biol Rep* 35:265–274.
- Danner H (2003) Effect of acetic acid on the aerobic stability of silages. *Appl Environ Microbiol* 69:562–567.
- Domingues FN, Oliveira MDS, Siqueira GR, Roth A, Santos J, Andrade AT, Monteiro RR, Roth MTP, Magario FB (2006) Efeito das doses de cal (CaO) microprocessada e do tempo após o tratamento sobre a estabilidade aeróbia e dinâmica de microrganismos da cana-de-açúcar in natura.
- Driehuis F, Elferink SJWHO, Spoelstra SF (1999) Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. *J Appl Microbiol* 87:583–594. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00856.x
- Earnshaw R (1992) The Antimicrobial Action of Lactic Acid Bacteria: Natural Food Preservation Systems. In: Wood BB (ed) *The Lactic Acid Bacteria Volume 1* SE - 9. Springer US, pp 211–232
- Eikmeyer FG, Köfinger P, Poschenel A, Jünemann S, Zakrzewski M, Heinel S, Mayrhuber E, Grabherr R, Pühler A, Schwab H (2013) Metagenome analyses reveal the influence of the inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 on the microbial community involved in grass ensiling. *J Biotechnol* 167:334–343.
- Ennahar S, Cai Y, Fujita Y (2003) Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 69:444–451.
- Ercolini D (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods* 56:297–314.
- Ferrari Junior E, Paulino VT, Possenti R a., Lucenas TL (2009) Aditivos em silagem de capim elefante paraíso (*Pennisetum hybridum* cv. *Paraíso*). *Arch Zootec* 58:185–194. doi: 10.4321/S0004-05922009000200003
- Franzolin Neto R, Zanetti AM, Herling VR, Lima MLP (1989) Efeito de diferentes níveis de dois compostos tamponantes sobre a digestibilidade de rações contendo bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado como volumoso. *Rev da Soc Bras Zootec* 18:456–461.
- Gourama H (1997) Inhibition of Growth and Mycotoxin Production of *Penicillium* by *Lactobacillus* Species. *LWT-Food Sci Technol* 30:279–283.
- Gourama H, Bullerman LB (1995) Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. *J Food Prot* 58:1249–1256.
- Harris B (1984) Harvesting, storing, and feeding silage to dairy cattle. *Florida Coop Ext Serv Circ* 565 *Florida Coop Ext Serv Inst Food Agric Sci Univ Florida* 1–9.
- Hazan R, Levine A, Abeliovich H (2004) Benzoic acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellular membrane trafficking pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 70:4449–57. doi: 10.1128/AEM.70.8.4449-4457.2004
- Head IM, Saunders JR, Pickup RW (1998) Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb Ecol* 35:1–21.
- Heinel S, Wibberg D, Eikmeyer F, Szczepanowski R, Blom J, Linke B, Goesmann A, Grabherr R, Schwab H, Pühler A, Schlüter A (2012) Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. *J Biotechnol* 161:153–66. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.03.007
- Holzer M, Mayrhuber E, Danner H, Braun R (2003) The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol* 21:282–287. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00106-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00106-9)
- Kabuki T, Kawai Y, Uenishi H, Seto Y, Kok J, Nakajima H, Saito T (2011) Gene cluster for biosynthesis

- of thermophilin 1277 – a lantibiotic produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277, and heterologous expression of TepI, a novel immunity peptide. *J Appl Microbiol* 110:641–649.
- Komitopoulou E, Boziaris IS, Davies EA, Delves-Broughton J, Adams MR (1999) *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *Int J Food Sci Technol* 34:81–85. doi: 10.1046/j.1365-2621.1999.00243.x
- Krebs HA, Wiggins D, Stubbs M, Sols A, Bedoya F (1983) Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem J* 214:657–663.
- Kung Jr L, Ranjit NK (2001) The Effect of *Lactobacillus buchneri* and Other Additives on the Fermentation and Aerobic Stability of Barley Silage. *J Dairy Sci* 84:1149–1155.
- Laitila A, Alakomi H-L, Raaska L, Mattila-Sandholm T, Haikara A (2002) Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *J Appl Microbiol* 93:566–576. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01731.x
- Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A (2003) Antifungal Activity of Phenyllactic Acid against Molds Isolated from Bakery Products. *Appl Environ Microbiol* 69:634–640. doi: 10.1128/AEM.69.1.634-640.2003
- Li Y, Nishino N (2011a) Bacterial and fungal communities of wilted Italian ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus buchneri*. *Lett Appl Microbiol* 52:314–21. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.03000.x
- Li Y, Nishino N (2011b) Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *J Appl Microbiol* 110:1561–70. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05010.x
- Lin C, Bolsen KK, Brent BE, Fung DYC (1992) Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *J Appl Microbiol* 73:375–387.
- Lindgren SE, Dobrogosz WJ (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Lett* 87:149–163.
- Magnusson J (2003) Antifungal activity of lactic acid bacteria.
- Matsuoka S, Hoffmann HP (1993) Variedades de cana-de-açúcar para bovinos. SIMPÓSIO SOBRE Nutr Bov 5:17–35.
- McDonald P, Henderson A, Heron S (1991) *The Biochemistry of Silage*, 340 pp. Kingston, Kent: Chalcombe Publications.
- McEniry J, O’Kiely P, Clipson NJW, Forristal PD, Doyle EM (2010) Assessing the impact of various ensilage factors on the fermentation of grass silage using conventional culture and bacterial community analysis techniques. *J Appl Microbiol* 108:1584–93. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04557.x
- Mendes R, Azevedo JL (2007) Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: Abstract, 5o Congresso Brasileiro de Micologia. pp 129–140
- Montalbán-López M, Zhou L, Buivydas A, Heel AJ van, Kuipers OP (2012) Increasing the success rate of lantibiotic drug discovery by Synthetic Biology.
- Moon NJ (1983) Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J Appl Bacteriol* 55:453–460. doi: 10.1111/j.1365-2672.1983.tb01685.x
- Mortvedt CI, Nissen-Meyer J, Sletten K, Nes IF (1991) Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl Environ Microbiol* 57:1829–1834.
- Muck R (1988) Factors influencing silage quality and their implications for management. *J Dairy Sci* 71:2992–3002.
- Nagao J, Asaduzzaman SM, Aso Y, Okuda K-I, Nakayama J, Sonomoto K (2006) Lantibiotics: insight and foresight for new paradigm. *J Biosci Bioeng* 102:139–49. doi: 10.1263/jbb.102.139

- Niku-Paavola M-L, Laitila A, Mattila-Sandholm T, Haikara A (1999) New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. J Appl Microbiol 86:29–35. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00632.x
- Ortiz-Rubio MA, Ørskov ER, Milne J, Galina HMA (2007) Effect of different sources of nitrogen on *in situ* degradability and feed intake of Zebu cattle fed sugarcane tops (*Saccharum officinarum*). Anim Feed Sci Technol 139:143–158.
- Oude Elferink SJ, Krooneman J, Gottschal JC, Spoelstra SF, Faber F, Driehuis F (2001) Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. Appl Environ Microbiol 67:125–32. doi: 10.1128/AEM.67.1.125-132.2001
- Ouwehand AC (1998) Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2 ed. New York: Marcel Dekker
- Pate FM, Alvarez J, Phillips JD, Eiland BR (2001) Sugarcane as a cattle feed: production and utilization. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS
- Pedroso A de F (2003) Aditivos químicos e microbianos no controle de perdas e na qualidade de silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). Universidade de São Paulo
- Pereira OG, Santos EM (2006) Microbiologia e o processo de fermentação em silagens. III Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem AnaisViçosa, UFV,DZO 393–430.
- Pina D dos S, Filho S de CV, Tedeschi LO, Barbosa AM, Azevêdo JAG, Valadares RFD, de Paiva Souza NK, Fonseca MA (2011) Níveis de inclusão e tempo de exposição da cana-de-açúcar ao óxido de cálcio sobre parâmetros digestivos eo desempenho de novilhas Nelore. R Bras Zootec 40:648–656.
- Piper P, Calderon CO, Hatzixanthis K, Mollapour M (2001) Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. Microbiology 147:2635–42. doi: 10.1099/00221287-147-10-2635
- Ranjit NK, Taylor CC, Kung Jr L (2002) Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. Grass Forage Sci 57:73–81. doi: 10.1046/j.1365-2494.2002.00304.x
- Riley MA, Wertz JE (2002) Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. Annu Rev Microbiol 56:117–37.
- Roy U, Batish VK, Grover S, Neelakantan S (1996) Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. Int J Food Microbiol 32:27–34.
- Santos MC, Nussio LG, Mourão GB, Schmidt P, Mari LJ, Ribeiro JL (2008) Influência da utilização de aditivos químicos no perfil da fermentação, no valor nutritivo e nas perdas de silagens de cana-de-açúcar. Rev Bras Zootec 37:1555–1563.
- Schnürer J, Magnusson J (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trends Food Sci Technol 16:70–78. doi: 10.1016/j.tifs.2004.02.014
- Schütz H, Radler F (1984) Anaerobic Reduction of Glycerol to Propanediol-1.3 by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. Syst Appl Microbiol 5:169–178.
- Silva SC da, Peixoto AM, Moura JC, Faria VP (1993) A cana-de-açúcar como alimento volumoso suplementar. Vol para Bov Piracicaba Fundação Estud Agrários Luiz Queiroz 59–74.
- Silva MP (2011) Prospecção de bactérias lácticas bacteriocinogênicas em silagens de estilosantes. Universidade Federal de Viçosa
- Silvestre R, Macleod NA, Preston T (1976) Sugar cane ensiled with urea or ammonia for fattening cattle. Trop Anim Prod 1:216–222.
- Sjogren J, Magnusson J, Broberg A, Schnurer J, Kenne L (2003) Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. Appl Environ Microbiol 69:7554–7557. doi: 10.1128/AEM.69.12.7554-7557.2003

- Stevenson DM, Muck RE, Shinnors KJ, Weimer PJ (2006) Use of real time PCR to determine population profiles of individual species of lactic acid bacteria in alfalfa silage and stored corn stover. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:329–338.
- Stiles J, Plockova M, Toth V, Chumchalova J (1999) Inhibition of *Fusarium* sp. DMF 0101 by *Lactobacillus* strains grown in MRS and Elliker broths. *Adv food Sci* 21:117–121.
- Stratford M, Anslow P a (1996) Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids. *FEMS Microbiol Lett* 142:53–8. doi: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08407.x
- Ström K, Sjögren J, Broberg A, Schnürer J (2002) *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl Environ Microbiol* 68:4322–4327.
- Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40:722–756.
- Teusink B, Smid EJ (2006) Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. *Nat Rev Micro* 4:46–56.
- Thiago LRL de S, Vieira JM (2002) Cana-de açúcar: uma alternativa de alimento para a seca. *Concórdia Embrapa Gado Corte (Comunicado Técnico)* 73:1–8.
- Valan Arasu M, Jung M-W, Ilavenil S, Jane M, Kim D-H, Lee K-D, Park H-S, Hur T-Y, Choi G-J, Lim Y-C, Al-Dhabi NA, Choi K-C (2013) Isolation and characterization of antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* KCC-10 from forage silage with potential beneficial properties. *J Appl Microbiol* 115:1172–85. doi: 10.1111/jam.12319
- Weinberg ZG, Ashbell G, Hen Y, Azrieli A (1993) The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. *J Appl Bacteriol* 75:512–518. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb01588.x
- Weinberg ZG, Ashbell G, Hen Y, Azrieli A, Szakacs G, Filya I (2002) Ensiling whole-crop wheat and corn in large containers with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28:7–11. doi: 10.1038/sj/jim/7000207
- Weinberg ZG, Muck RE (1996) New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol Rev* 19:53–68.
- Willey JM, Van der Donk WA (2007) Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol* 61:477–501.
- Woolford MK (1984) *The silage fermentation*. Marcel Dekker, New York
- Zopollatto M, Daniel JLP, Nussio LG (2009) Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. *Rev Bras Zootec* 38:170–189.

# Capítulo 2

---

**CARACTERIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO DE LEVEDURAS DURANTE A  
FERMENTAÇÃO DA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR**

## Resumo

**Objetivo:** Isolar, identificar e caracterizar a biodiversidade e a sucessão de leveduras cultiváveis durante o processo fermentativo da silagem de cana-de-açúcar. **Métodos e resultados:** Cana-de-açúcar foi ensilada e amostras coletadas nos tempos 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de fermentação. A população de bactérias e de leveduras foram determinadas. Foram identificados noventa e nove isolados de leveduras por métodos moleculares e representantes de cada espécie foram avaliados em relação aos parâmetros cinéticos e fermentativos. Dez espécies diferentes foram identificadas, pertencentes aos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Meyerozyma* e *Torulaspota*. A diversidade das leveduras variou de acordo com o tempo de fermentação. **Conclusões:** As espécies *Pichia kudriavzevii* e *Candida glabrata* permaneceram abundantes em todos os tempos de amostragem demonstrando serem resistentes às condições do processo de ensilagem. A espécie *Pichia kudriavzevii* foi a maior produtora de etanol e apresentou elevada taxa de crescimento.

**Palavras-chave:** Diversidade; rRNA 26S; abundância, sucessão microbiana; *Pichia kudriavzevii*; *Candida glabrata*.

## Introdução

O uso da cana-de-açúcar como volumoso na alimentação de ruminantes em regiões tropicais é economicamente importante devido à alta produtividade por área plantada (Siqueira *et al.*, 2011), baixo custo de produção por tonelada de massa seca (MS) e época de colheita coincidente com a escassez de forragem nas pastagens (Silva *et al.*, 1993). Em sistemas intensivos de produção, a cana-de-açúcar fresca picada pode ser substituída por sua silagem para facilitar a logística operacional da colheita e o fornecimento ao animal, além de manter a qualidade nutricional do alimento ao longo do ano (Pedroso *et al.*, 2006; Pereira e Santos, 2006; Balieiro-Neto *et al.*, 2007).

Para fins de ensilagem, a cana-de-açúcar pode ser considerada uma boa alternativa por possuir conteúdo relativamente alto de MS (25 a 30%), baixa capacidade de tamponamento, o que permite a queda do pH para valores próximos a 3,5 e teores adequados de carboidratos solúveis (Valvasori *et al.*, 1995; Miranda, 2006). Entretanto, ao contrário de outras forrageiras, a cana-de-açúcar apresenta alto teor de carboidratos não-fibrosos que promovem rápida proliferação e desenvolvimento de leveduras durante a ensilagem (Woolford 1984; Valvasori *et al.*, 1995).

Na ensilagem da cana-de-açúcar, a elevada população epífita de leveduras domina o processo fermentativo por não ser inibida pelo baixo pH, produzindo elevadas concentrações de etanol e reduzindo a matéria seca no alimento (Pahlow 1982; McDonald *et al.*, 1991; Ávila *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2014). Algumas espécies de leveduras desenvolvem-se em condições anaeróbias, podendo atingir populações elevadas nessas condições em decorrência da fermentação dos açúcares (Walker, 1998). Ávila e colaboradores (2010) quantificaram a população de leveduras na silagem de cana-de-açúcar de diferentes cultivares e detectaram valores entre  $9,3 \times 10^5$  a  $5,0 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  de silagem após 10 dias de ensilagem e  $2,1 \times 10^5$  a  $1,3 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  de silagem aos 40 dias de fermentação (população final).

As leveduras são os principais microrganismos responsáveis pelas perdas nutricionais durante a fermentação da cana-de-açúcar e pelo início da deterioração aeróbia da silagem (McDonald *et al.*, 1991; Carvalho *et al.*, 2014). Durante a fermentação da cana-de-açúcar pelas leveduras, até 70% do teor de carboidratos solúveis e 30% da massa seca pode ser perdida em consequência da transformação do açúcar em etanol e dióxido de carbono (Pedroso *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008). Teores de etanol de 8 a 17% da MS têm sido relatados para cana-de-açúcar ensilada (Pedroso *et al.*, 2005) e estudos anteriores indicaram que a produção de

etanol na silagem de cana-de-açúcar pode atingir concentrações de 66 e 104 g.kg<sup>-1</sup>.MS, após 40 e 126 dias de fermentação, respectivamente, com população final de leveduras variando de 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de silagem (Ávila *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2014). Além disso, algumas leveduras utilizam ácido láctico como substrato na presença de oxigênio, promovendo o aumento do pH e o risco de desenvolvimento de microrganismos indesejáveis na silagem, principalmente bactérias aeróbias e fungos patogênicos (Pahlow *et al.*, 2003; Wilkinson & Davies, 2013). Muitos microrganismos envolvidos na deterioração não só diminuem o valor nutritivo da silagem, como também tem efeito negativo sobre a saúde do animal ou a qualidade do leite, ou ambos (Oude Elferink *et al.*, 2015).

Alguns trabalhos têm caracterizado e identificado leveduras que estão envolvidas com a deterioração aeróbia de silagem, como os gêneros *Candida*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Pichia*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces* e *Torulopsis* (Jonsson e Pahlow 1984; Bravo-Martins *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2014). Além disso, outros gêneros como *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* também foram isolados da silagem de cana-de-açúcar (Ávila *et al.*, 2010).

O estudo da composição da comunidade microbiana é essencial para a compreensão da dinâmica dos ecossistemas e estudos anteriores demonstram que o controle do crescimento de leveduras é importante para a qualidade nutricional da silagem de cana-de-açúcar (Bravo-Martins *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2007; Pedroso *et al.*, 2008). Assim, a caracterização da diversidade e sucessão das espécies de leveduras durante a ensilagem da cana-de-açúcar pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias para inibir esses microrganismos.

Portanto, esses trabalhos não avaliaram a sucessão das leveduras ao longo do processo de fermentação da silagem. Neste trabalho, a hipótese é que a diversidade de leveduras inicialmente presente na comunidade epífita da cana-de-açúcar diminui durante a ensilagem e que as espécies dominantes na sucessão microbiana são responsáveis pela fermentação alcoólica e pelas perdas nutricionais da silagem de cana-de-açúcar.

Diante disso, os objetivos deste trabalho foram: (1) Enumerar a população de bactérias aeróbias, bactérias do ácido láctico e leveduras ao longo do processo de ensilagem da cana-de-açúcar; (2) isolar e identificar as leveduras presente durante o processo de ensilagem da cana-de-açúcar; (3) caracterizar a diversidade e perfil fermentativo das leveduras predominantes durante o processo de ensilagem da cana-de-açúcar.

## Material e métodos

### 1.0. Forragem e condição de ensilagem

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L) foi colhida manualmente, com aproximadamente 12 meses de idade no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil, situada a 20° e 45' de latitude sul, 42° e 51' de longitude oeste e 640 m de altitude. Após a colheita, a cana-de-açúcar foi picada em máquina forrageira (partículas de 1 cm) e 500 g da forragem picada foi em *bags* com dimensões de 25,4 cm x 35,56 cm (Doug CareEquipment, Springville, CA) e lacrados com seladora a vácuo, em triplicata. Os *bags* foram armazenados em temperatura ambiente e abertos após 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de fermentação.

### 2.0. Processamento das amostras de silagem e procedimentos analíticos

No momento da abertura, para a contagem da população microbiana foi constituída uma amostra composta com material das três repetições de cada tempo de fermentação. Em 25 g de amostra da cana *in natura* ou silagem foram adicionados a 225 ml de solução de Ringer's (Oxoid) estéril para obtenção do extrato aquoso. Esse extrato foi filtrado em gaze e utilizado para enumeração de microrganismos e a leitura do pH foi feita em potenciômetro digital TEC-2 (Gehaka, São Paulo, Brasil). Dois mililitros do extrato aquoso foram acidificados com 1 ml de solução de ácido metafosfórico a 20% (v/v) e congelada para posterior análise dos produtos de fermentação (Kung Jr e Ranjit 2001). As amostras foram descongeladas, centrifugadas e tratadas de acordo com o procedimento descrito por Siegrifield e colaboradores (Siegfried *et al.*, 1984). As amostras foram analisadas no cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Dual acoplado a um detector de índice de refração (RI) Shodex RI-101, a 45°C, com coluna de exclusão iônica Phenomenex Rezex ROA, 300 x 7,8 mm, mantida a 45°C. A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 5 mM com fluxo de 0,7 ml.min<sup>-1</sup>. Os padrões utilizados foram ácido láctico (60 mM), ácido acético (10 mM), ácido propiônico (10 mM), 1,3-propanodiol (10 mM) e etanol (20 mM).

Para determinar a composição bromatológica, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel, pesadas e levadas à estufa com circulação forçada de ar a 55° C, por 72h. Após o período de secagem foram moídas em moinho tipo Wiley, em partículas de 1 mm. As amostras foram analisadas, segundo os métodos descritos por Silva e Queiroz

(Silva e Queiroz, 2002), quanto ao teor de massa seca (MS), material mineral (MM), proteína insolúvel em detergente neutro (PDIN) e cinzas insolúvel em detergente neutro (CDIN). O teor de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) foi analisado conforme proposto por Mertens (2002) e o teor de fibra em detergente ácido (FDA), segundo Goering & Van Soest (1975). O teor de nitrogênio amoniacal foi determinado segundo Bolsen *et al.*, (1992).

### **3.0. Enumeração de microrganismos**

A análise microbiológica foi realizada a partir da cana-de-açúcar fresca – (microbiota epífita) e de amostras compostas da silagem nos diferentes períodos de fermentação. Parte do extrato aquoso da amostra composta obtida em cada tempo de fermentação foi utilizada para a enumeração de bactérias aeróbias, bactérias lácticas e leveduras. Diluições seriadas foram preparadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) usando solução salina (0,85% de NaCl). Os microrganismos foram enumerados por inoculação em superfície (0,1ml) em meio ágar nutriente (Himedia, Mumbai, Índia) para bactérias aeróbias, ágar MRS (Himedia, Mumbai, Índia) pH 6,5 para BAL e ágar YPD com cloranfenicol [1% extrato de levedura (Himedia, Mumbai, Índia), 2% de peptona (Himedia, Mumbai, Índia), 2% glicose (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), cloranfenicol 0,05 mg/ml] para leveduras por até 48h. As placas foram incubadas em estufas bacteriológicas a 25°C para bactérias aeróbias e a 37°C em jarra de anaerobiose para BAL e leveduras, por até 72h. Após a incubação o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado considerando valores entre 30 e 300 colônias e as características culturais das colônias (tamanho, cor, textura, forma e borda) foram avaliadas.

### **4.0. Isolamento e identificação de leveduras**

#### **4.1. Isolamento**

Após a enumeração, as colônias cultivadas em ágar YPD com cloranfenicol foram estriadas sucessivamente no mesmo meio de cultura para obtenção de culturas puras. Os isolados de leveduras foram cultivados em caldo YPD e, posteriormente, armazenados a – 80°C no em caldo YPD contendo 20% de glicerol (v/v). Antes de cada experimento as culturas estoque foram ativadas em caldo YPD a 37°C *overnight*.

## 4.2. Extração de DNA genômico

Os isolados (n=99) foram ativados em caldo YPD a 37°C durante 24 h e as células foram colhidas por centrifugação (12.000 rpm/5min.). O *pellet* foi lavado duas vezes com água peptonada 0,01% (p/v) e ressuscitado para um volume final de 1 ml. A suspensão de células foi transferida para tubo de microcentrífuga e centrifugada (12.000 rpm, 5 min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi acrescido de 400 µl de tampão de extração (Triton 100x, SDS 10%, NaCl 1M, Tris 1M pH 8,0, EDTA 0,5M pH 8,0 e água), 200 µl de fenol-clorofórmio (1:1) e 0,3 g de *beads* de zircônio (0,1 mm de diâmetro). Os tubos foram agitados vigorosamente por 2 min para promover a lise celular, centrifugados (12.000 rpm, 10 min) e o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrífuga. Clorofórmio (200 µl) foi adicionado ao sobrenadante, e os tubos foram agitados novamente em vortex, centrifugados (12.000 rpm, 10 min) e a fase superior coletada. Em seguida, a fase líquida coletada foi acrescida de 1/10 volume de acetato de potássio 5 M e 2 volumes de etanol absoluto frio. A mistura foi mantida por 2 min em temperatura ambiente e centrifugada por 5 min a 12.000 rpm. O *pellet* foi lavado com 1 ml de etanol 75%, centrifugado (12.000 rpm, 5 min) e seco em temperatura ambiente. O *pellet* foi ressuscitado em 20 µl de água ultrapura estéril. Após a extração, as amostras foram tratadas com RNase para concentração final de 50 µg ml<sup>-1</sup> a 37°C por 30 min.

## 5.0. Análise Filogenética

O domínio D1/D2 da região 26S rRNA das leveduras isoladas foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA extraído foi utilizado como molde para amplificar o domínio D1/D2 com os primers NL-1 (5' - GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5' - GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Lachance *et al.*, 1999). A reação de amplificação foi preparada utilizando 5,0 µl de tampão de reação GoTaq (5X), 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µl de dNTPs (2,5 mmol l<sup>-1</sup>), 1,0 µl de cada primer (10 mmol l<sup>-1</sup>), 0,2 µl de Taq DNA polimerase (Promega) e 1,0 µl de DNA genômico (200 ng). As condições da reação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg, anelamento a 54 °C por 30 seg, extensão a 72 °C por 1 min e extensão final a 72 °C por 10 min. Ao produto da PCR foi adicionado gel Red e analisado por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v). As sequências de nucleotídeos do domínio D1 / D2 do rRNA 26S foram determinadas a partir da purificação do produto da PCR (tamanho

aproximado de 800 pb) e sequenciamento automatizado (MacroGen Inc, South Korea). As sequências de fragmentos de rRNA de cada isolado foram analisadas no software BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - 2215 BLAST, version 2.0) disponível no sítio do Centro Nacional de Biotecnologia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) na internet. A identidade das culturas foi atribuída conforme os critérios propostos por Barnett *et al.*, (2000) (Tabela S1). Os isolados que apresentaram sequências com identidade igual ou superior a 97% a sequências anteriormente depositadas no GenBank foram consideradas como pertencentes à mesma espécie. O número dos isolados com os valores de identidade, similaridade e o número de acesso estão incluídos na Tabela S1.

O alinhamento foi realizado utilizando o software Mafft (Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequence, version 7), disponível no site <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>. Para eliminar posições e regiões divergentes do alinhamento das sequências mal alinhadas de modo que se torne mais adequado para análise filogenética foi utilizado o software Gblocks Server (Castresana Lab, Animal Biodiversity and Evolution Program – Barcelo, Spain, version 0,91b) (Castresana, 2000; Talavera e Castresana, 2007), disponível no site ([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html)). As relações filogenéticas foram calculadas com o método *Maximum Composite Likelihood* (Brysch-Herzberg e Seidel, 2015) no software MEGA 5.0. Os valores foram calculados a partir de bootstrap com 5000 interações.

## **6.0. Número de acesso da sequência de nucleotídeos**

As sequências de genes da região 26S rRNA, domínio D1/D2, das leveduras isoladas utilizadas neste estudo foram depositadas no banco de dados DDBJ – DNA Data Bank of Japan. As sequências referência para as comparações filogenéticas do gene 26S rRNA foram obtidas a partir do banco de dados GenBank para as espécies: *Candida coipomoensis* ATCC58904 (HQ651966), *Candida glabrata* L18 (EU373468), *Candida glabrata* UMY (KP171571), *Candida glabrata* LE004 (JQ672605), *Candida glabrata* DMIC (KP260989), *Candida glabrata* ATCC2001 (JQ070154), *Candida glabrata* CG1107 (KM055440), *Candida glabrata* CGA26 (KM055474), *Candida glabrata* RND13 (AJ617300), *Candida glabrata* ATCC64677 (KP780469), *Candida glabrata* ATCC908776 (KP780472), *Candida lignicola* MA-4674 (HQ652029), *Candida sorbosivrans* DMC113940 (JN031573), *Candida stellimalicola* KDLYS10-1 (KM14008), *Candida tartarivorans* NU28S61 (HM461710), *Candida tropicalis* ATCC20615 (EU589206), *Meyerozyma caribbica* BJ111(JQ219337), *Meyerozyma*

*guillierandii* KCTC7832 (AF257270), *Pichia aff. fermentans* IMUFRJ51964 (FN428873), *Pichia fermentans* LTQB69 (KR558718), *Pichia galeiformis* ZB05242196/97 (KF442633), *Pichia galeiformis* PiGa4(KP324975), *Pichia hampshirensis* ATCC62897 (FJ381702), *Pichia kudriavzevii* SA16S06 (EF460648), *Pichia kudriavzevii* SI (KR336548), *Pichia kudriavzevii* DMKU3-ET15 (AB742515), *Pichia kudriavzevii* CTS1405 (KM005245), *Pichia kudriavzevii* DM3212 (KM005239), *Pichia kudriavzevii* SB150 (AB568332), *Pichia kudriavzevii* 11C-2Y1 (KP190153), *Pichia kudriavzevii* H9Y8 (HQ860272), *Torulaspora delbrueckii* NSA-1 (KM434245), *Torulaspora delbrueckii* WKZ1-2 (JQ678673), *Torulaspora delbrueckii* V1-23 (KP8552496), *Torulaspora delbrueckii* LE005 (JQ672606), *Torulaspora delbrueckii* LTQB48 (KR558713). Os números de acesso dos isolados obtidos neste estudo são de LC015261 até LC015327.

## **7.0. Perfil fermentativo das leveduras**

O meio utilizado para análise dos produtos de fermentação foi o caldo YPD. O cultivo foi realizado em batelada, em tubos de vidro (30 ml), contendo 15 ml do meio, a uma temperatura de 37°C por 48 h.

Para os ensaios de fermentação foi selecionado aleatoriamente um isolado de cada espécie identificada durante o processo de ensilagem da cana-de-açúcar, totalizando 10 diferentes isolados utilizados nos experimentos de batelada: *Candida glabrata* (Y28.211), *Candida sorbosivrans* (0.145), *Candida stellimalicola* (Y1.157), *Candida tartarivorans* (Y0.285), *Candida tropicalis* (Y1.161), *Meyerozyma caribbica* (Y0.142), *Pichia aff. fermentans* (Y0.150), *Pichia galeiformis* (Y21.307), *Pichia kudriavzevii* (Y0.141), *Torulaspora delbrueckii* (Y3.170).

Amostras coletadas no início (0 horas) e após 48 horas de fermentação foram centrifugadas (12.000 rpm, 10 min) e o sobrenadante livre de células foi analisado em HPLC nas mesmas condições descritas no item 2.0. Foram determinados a concentração de sacarose e etanol.

## 8.0. Cinética de crescimento

### 8.1. Medida de crescimento

O crescimento das culturas de leveduras foi estimado pela medida da densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. Os valores obtidos foram convertidos em Ln DO para posterior análise. As culturas de leveduras foram ativadas, padronizado a D.O<sub>600nm</sub> para 0,1 e inoculadas (3%, v/v) em caldo YPD. Os isolados foram cultivados a 37°C por até 24 h em microplacas de 96 poços, em condições de microaerofilia.

### 8.2. Determinação dos parâmetros de crescimento, fermentativo e velocidade de consumo e produção de etanol

- **Velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ ):** foi determinada como o coeficiente angular da equação da reta representativa do crescimento exponencial das culturas de leveduras em função do tempo, utilizando a equação  $\ln X = \mu t + \ln X_0$ .

- **Tempo de geração (Tg):**  $\log 2/\mu$

- **Rendimento de etanol ( $Y_{p/s}$ ):**  $Y_{p/s} = \frac{[P_{final}] - [P_{inicial}]_{g/L-1}}{[S_{final}] - [S_{inicial}]_{g/L-1}}$

## 9. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (Ferreira, 2011).

## Resultados

A composição química da silagem de cana-de-açúcar para os diferentes períodos de fermentação é apresentada na Tabela 1. Os conteúdos de MS, PDIN e NH<sub>3</sub> não variaram durante a fermentação ( $p > 0,05$ ). A concentração de FDN e FDA da cana *in natura* (486,1 e 271,5 g kg<sup>-1</sup>MS) diferiu da silagem após 28 dias de fermentação (619,6 e 363,6 g kg<sup>-1</sup>MS) sendo 21,5 e 25,3% maior, respectivamente em relação à cana *in natura* (Tabela 1). A análise de CDIN indicou que a maior concentração foi obtida no tempo final de fermentação (28 dias) e a menor no terceiro dia após a vedação do silo.

**Tabela 1.** Variação da composição centesimal e produtos metabólicos da silagem da cana *in natura* e da silagem de cana-de-açúcar em diferentes períodos de fermentação. Teores médios de matéria seca (MS), nitrogênio amoniacal (NH<sub>3</sub>), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), proteínas insolúvel em detergente neutro (PDIN), cinzas insolúvel em detergente neutro (CDIN), ácidos orgânicos e etanol após 28 dias de fermentação de silagem de cana-de-açúcar.

Composição* (g kg <sup>-1</sup> MS)	Período de abertura							EPM	P-valor
	0 dia	1 dia	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias		
MS	263,7	257,1	258,0	234,4	235,8	253,6	252,8	7,36	0,10
FDN	486,1 <sup>c</sup>	545,0 <sup>abc</sup>	511,8 <sup>bc</sup>	569,1 <sup>abc</sup>	578,9 <sup>abc</sup>	612,3 <sup>ab</sup>	619,6 <sup>a</sup>	21,32	<0,01
FDA	271,5 <sup>b</sup>	309,7 <sup>ab</sup>	290,3 <sup>ab</sup>	321,7 <sup>ab</sup>	330,6 <sup>ab</sup>	352,0 <sup>a</sup>	363,6 <sup>a</sup>	15,28	0,01
PDIN	72,6	65,1	123,9	71,1	45,1	67,7	75,7	25,57	0,53
CDIN	5,9 <sup>bc</sup>	6,4 <sup>bc</sup>	4,7 <sup>c</sup>	8,2 <sup>abc</sup>	9,5 <sup>ab</sup>	9,5 <sup>ab</sup>	11,2 <sup>a</sup>	0,85	<0,01
NH <sub>3</sub>	nd	137,3	170,9	174,3	174,9	188,4	165,1	1,39	0,27
pH	5,5 <sup>a</sup>	3,7 <sup>b</sup>	3,6 <sup>bc</sup>	3,6 <sup>bcd</sup>	3,5 <sup>cd</sup>	3,5 <sup>cd</sup>	3,4 <sup>d</sup>	0,03	<0,01
<b>Ácidos Orgânicos (g kg<sup>-1</sup> MS)</b>									
Acético	nd	4,5 <sup>b</sup>	5,6 <sup>b</sup>	7,5 <sup>ab</sup>	9,0 <sup>ab</sup>	10,2 <sup>ab</sup>	12,9 <sup>a</sup>	1,27	<0,01
Láctico	nd	15,0 <sup>b</sup>	17,4 <sup>b</sup>	32,0 <sup>ab</sup>	36,2 <sup>ab</sup>	45,7 <sup>ab</sup>	66,5 <sup>a</sup>	7,64	0,01
Propiônico	nd	0,4 <sup>b</sup>	0,7 <sup>b</sup>	1,0 <sup>b</sup>	1,6 <sup>b</sup>	1,7 <sup>b</sup>	3,7 <sup>a</sup>	0,38	<0,01
1,3 propanodiol	nd	0	0	0,2	0,4	0,5	0,8	0,24	0,25
Etanol	nd	36,5 <sup>b</sup>	43,3 <sup>b</sup>	80,3 <sup>ab</sup>	111,1 <sup>a</sup>	106,2 <sup>a</sup>	73,8 <sup>ab</sup>	9,61	<0,01
Láctico/acético	nd	3,23	2,9	4,1	4,1	4,4	5,0	0,68	0,17

nd = não determinado;

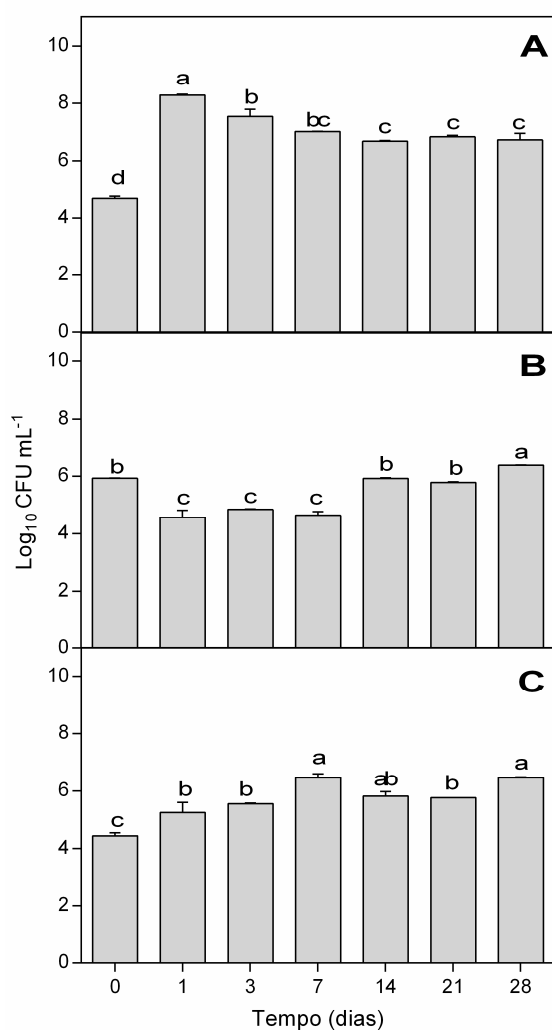
\*Médias da composição química-bromatológica da silagem de cana-de-açúcar seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem em 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

A redução mais rápida no pH ocorreu no primeiro dia de fermentação (de 5,5 para 3,7) e após o terceiro dia não foi verificada diferença entre os valores encontrados (Tabela 1). O valor médio de pH da silagem de cana-de-açúcar foi de 3,83. A concentração de ácido acético e ácido láctico quantificado na silagem no vigésimo oitavo dia de fermentação foi, em média, 60% e 75% maior, respectivamente do que a concentração desses ácidos na silagem após 1 e 3 dias de fermentação (Tabela 1). A concentração de ácido propiônico foi maior no 28º dia de fermentação em relação aos demais períodos de ensilagem amostrados e a concentração de 1,3 propanodiol e a relação ácido láctico/acético não diferiu ( $p > 0,05$ ) durante a ensilagem da cana-de-açúcar.

A concentração de etanol aumentou entre 7 e 21 dias de fermentação (111,1 e 106,2 g kg<sup>-1</sup> MS, respectivamente), porém a concentração final de etanol na silagem de cana-de-açúcar (73,8 g kg<sup>-1</sup> MS) não diferiu do início da fermentação (36,5 g kg<sup>-1</sup> MS) (Tabela 1).

As populações microbianas presentes na silagem de cana-de-açúcar variaram de acordo com o período de fermentação, com média populacional de 6,82, 5,43 e 5,68 log UFC.g<sup>-1</sup> de silagem para BAL, bactérias aeróbias e leveduras, respectivamente (Figura 1). BAL foram predominantes durante todo o período de fermentação, com rápido aumento da população após 1 dia de fermentação ( $p < 0,05$ ) (Figura 1A). Bactérias

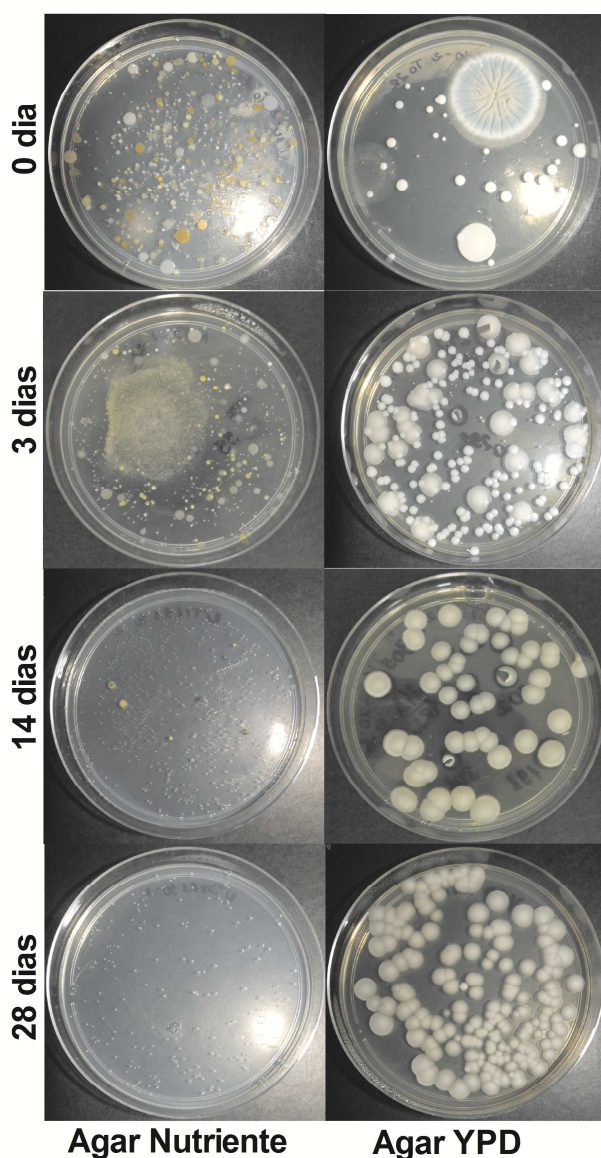
aeróbias foram abundantes na comunidade epífita da cana *in natura*, porém a população diminuiu cerca de 2 ciclos log após a ensilagem, retornando a níveis mais altos que os iniciais no final da fermentação (28 dias) ( $p < 0,05$ ) (Figura 1B). O aumento das leveduras foi mais lento e gradual em relação às bactérias, porém a população de leveduras no final da fermentação foi maior do que na cana *in natura* e nos 3 primeiros dias de ensilagem (Figura 1C).



**Figura 1.** Enumeração de microrganismos durante a fermentação de cana-de-açúcar. (A) bactérias do ácido láctico; (B) bactérias aeróbias; (C) leveduras. A enumeração foi realizada utilizando ágar nutriente (25°C por 48 h) para contagem de bactérias aeróbias, MRS (37°C por 24 h) para bactérias lácticas e YPD com cloranfenicol (37°C por 24 h). O método de plaqueamento utilizado foi “*Spread plate*”. Médias da contagem seguidas de letras diferentes diferem em 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

A análise morfológica e fenotípica das colônias de bactérias e leveduras demonstrou grande diversidade de microrganismos cultiváveis. Dentre as características avaliadas (cor, tamanho, textura, forma e borda das colônias) observou-se maior diversidade morfológica e fenotípica na população de bactérias que na de leveduras (Figura 2). Em ambos os grupos microbianos ocorreu redução da diversidade ao longo do período de fermentação. A diversidade fenotípica das bactérias foi reduzida, diminuindo a ocorrência de colônias pigmentadas e aumentando a predominância de colônias pequenas, brancas e de forma circular (Figura 2). Nas leveduras, ocorreu

redução das colônias pequenas e brancas, com aumento de colônias grandes, de cor bege e com bordas irregulares. As características morfológicas e fenotípicas das colônias de leveduras estão apresentadas na Tabela S2.

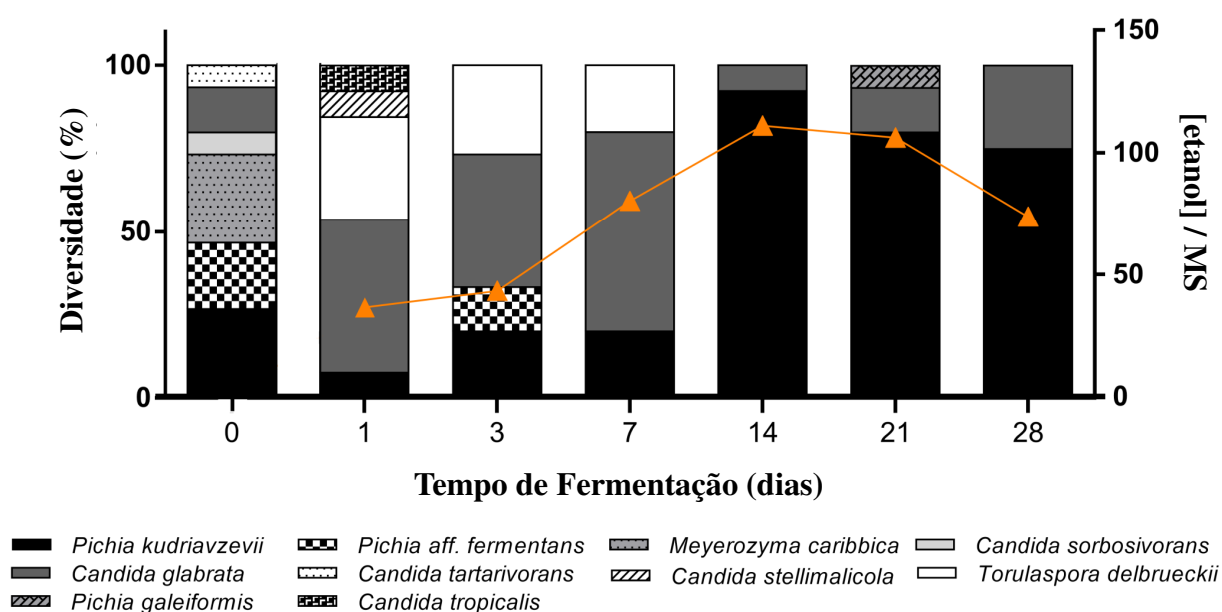


**Figura 2.** Características morfológicas da população de bactérias aeróbias e de leveduras da silagem de cana-de-açúcar durante o processo de ensilagem. Amostras foram coletadas da cana *in natura* e nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de fermentação. Os plaqueamentos foram realizados em ágar nutriente (25°C por 48 h) ou YPD com cloranfenicol (37°C por 24 h) para enumeração de bactérias aeróbias e leveduras, respectivamente.

Noventa e nove isolados de leveduras foram obtidos a partir das amostras de silagem de cana-de-açúcar, e as culturas apresentaram sequências de 26S rRNA com identidade  $\geq 97\%$  para dez espécies distintas de leveduras. Foram identificados quatro gêneros distintos, sendo o gênero *Pichia* o mais predominante, seguido do gênero *Candida*, *Torulaspota* e *Meyerozyma*. Em relação à diversidade de espécies de leveduras na cana-de açúcar, foram detectadas cinco espécies diferentes do gênero *Candida*, seguida de *Pichia* com três espécies diferentes e *Meyerozyma* e *Torulaspota* com um representante cada. As espécies identificadas foram, *C. glabrata*, *C. sorbosivorans*, *C. tartarivorans*, *C. stellimalicola*, *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii*, *P. aff.*

*fermentans*, *P. galeiformis*, *M. caribbica* e *T. delbrueckii*. Alguns isolados foram identificados como *Issatchenkia orientalis*, no entanto, esses isolados foram denominados *P. kudriavzevii* neste estudo, seguindo a reclassificação feita por Boidin e colaboradores (1965). Dentre todas as espécies de leveduras isoladas neste trabalho, a *P. kudriavzevii* foi à espécie encontrada em maior número durante todo o processo de ensilagem, com a razão do número de indivíduos total de cada espécie pelo tempo de fermentação de 1,57, seguida da *C. glabrata* e *T. delbrueckii*, com 1,03 e 0,392, respectivamente.

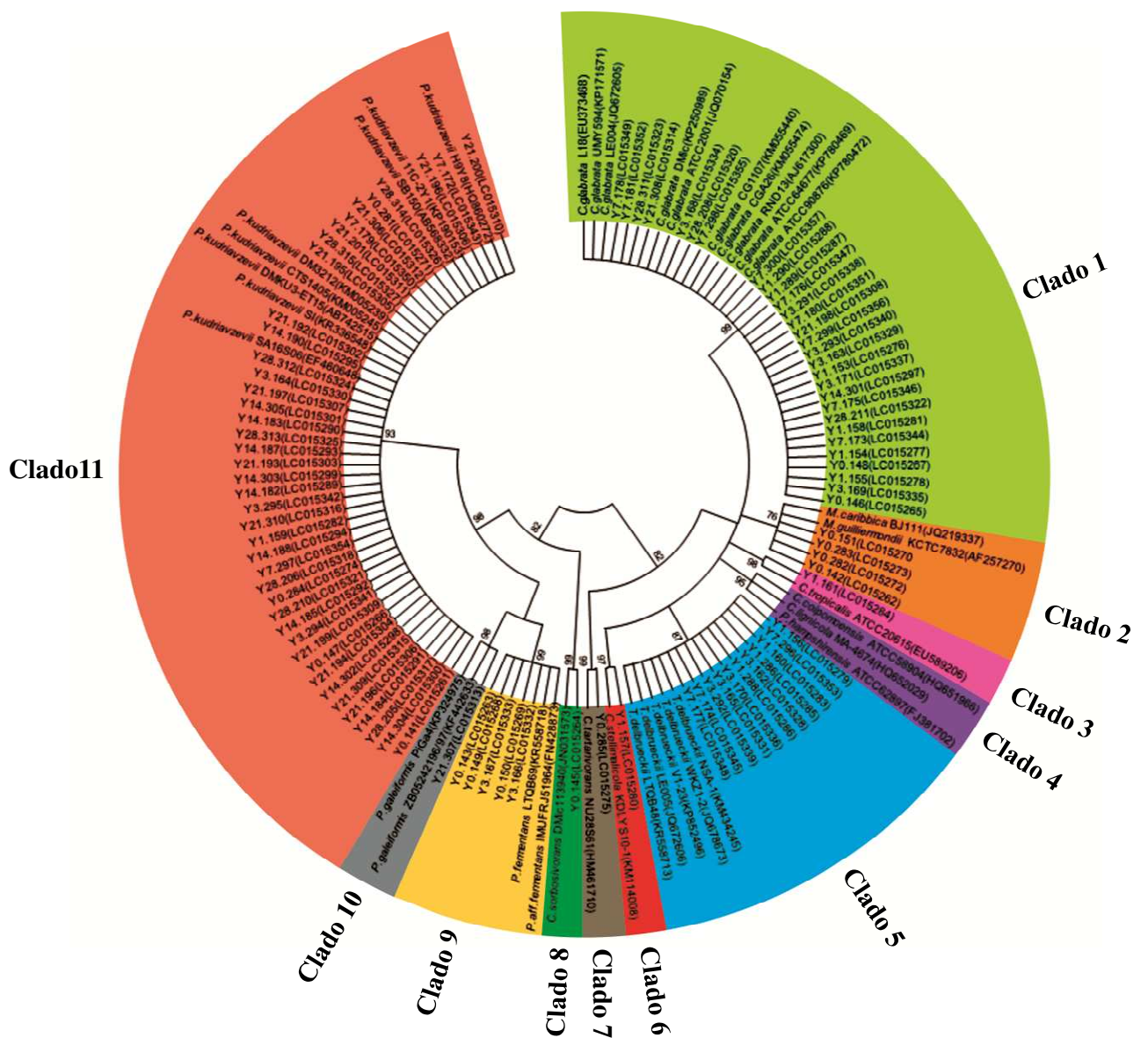
O número de espécies de levedura variou durante os períodos de fermentação. A maior diversidade de leveduras (seis espécies) foi encontrada na população epífita da cana-de-açúcar, reduzindo drasticamente ao final do período de fermentação (duas espécies) (Figura 3). As espécies encontradas aos 28 dias de fermentação foram *P. kudriavzevii* e *C. glabrata* que estiveram presentes em todos os períodos de fermentação. A abundância de *C. glabrata* diminuiu a partir do 7º dia de fermentação, enquanto *P. kudriavzevii* aumentou após esse mesmo período, dominando a população de leveduras na silagem de cana-de-açúcar (Figura 3).



**Figura 3.** Dinâmica e abundância da população de leveduras na cana-de-açúcar *in natura* e na silagem de cana-de-açúcar com 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de fermentação. As leveduras foram isoladas em meio YPD a 37°C, em jarra de anaerobiose. Foi realizado o sequenciamento do domínio D1/D2 da região 26S rRNA. (▲) concentração de etanol em relação a porcentagem de massa seca.

A análise filogenética dos isolados de levedura revelou 11 subgrupos contendo pelo menos uma das espécies de leveduras identificadas neste trabalho (Figura 4). O clado incluindo as estirpes que estão estreitamente relacionadas com as espécies do

gênero *Pichia* foi suportado por um valor de bootstrap de 93% e esteve próximo filogeneticamente do clado da espécie *C. sorbosivorans* (clado 8) (Figura 4). Quarenta e dois isolados foram mais estreitamente relacionados com *P. kudriavzevii*, uma levedura comumente encontrada em silagens de capim, azevém, milho e cana-de-açúcar (Jonsson & Pahlow 1984; Li & Nishino 2011; Carvalho *et al.*, 2014; Ávila *et al.*, 2014) e no rúmen bovino (clado 11). Vinte e nove isolados agruparam com as sequências referência da espécie *C. glabrata* (clado 1), indicando elevado nível de homogeneidade entre as sequências analisadas. Os clados 1, 2, 3, 4, 5 e 6 compartilharam de um mesmo ancestral comum, ao contrário do isolado do clado 7 se que agrupou separado (Figura 4).



**Figura 4.** Dendrograma de similaridade genética de leveduras isoladas da silagem de cana-de-açúcar pelo sequenciamento da região rRNA 26S, domínio D1/D2. As sequências dos isolados foram comparadas com o software MEGA 5.0. Análise *Bootstrap* foi realizada a partir de 5000 *resamplings* aleatórios.

A velocidade específica de crescimento e o tempo de geração não variaram ( $p>0,05$ ) entre as espécies de leveduras estudadas (Tabela 2). Os isolados Y3.170 (*T. delbrueckii*), Y0.150 (*P. aff. fermentans*), Y0.142 (*M. caribbica*), Y0.141 (*P. kudriavizevii*), Y1.161 (*C. tropicalis*), Y0.285 (*C. tartarivorans*) e Y28.211 (*C. glabrata*) apresentaram a concentração de etanol acima de  $100 \text{ mmol}^{-1}$  e apenas três isolados, Y1.157 (*C. stellimalicola*), Y0.145 (*C. sorbosivorans*) e Y21.307 (*P. galeiforms*), produziram concentrações de etanol abaixo dessa concentração (Tabela 2). A concentração média de etanol do grupo 1 ( $161,42 \text{ mmol}^{-1}$ ) foi 76,7% maior quando comparada ao grupo 2 ( $37,6 \text{ mmol}^{-1}$ ). O rendimento máximo de etanol por substrato ( $Y_{P/S}$ ) também diferiu entre os isolados, sendo as espécies *T. delbrueckii*, *P. aff. Fermentans*, *M. caribbica*, *P. kudriavizevii*, *C. tropicalis*, *C. tartarivorans* e *C. glabrata* as que apresentaram os maiores valores de rendimento (0,41-0,47) e as espécies *C. stellimalicola*, *C. sorbosivorans* e *P. galeiforms* apresentaram o menor rendimento (0,08 – 0,26) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Parâmetros de crescimento e fermentação de leveduras isoladas da silagem de cana-de-açúcar em caldo YPD a 37°C por 48 h.

Group	Isolate	Yeast	Growth parameters		Fermentation broth YPD - Yield	
			$\mu$ (hora <sup>-1</sup> )	T <sub>ghoras</sub>	Ethanol	
					Concentração (mmol <sup>-1</sup> )**	Y <sub>P/S</sub>
1	3.170	<i>T. delbrueckii</i>	0.95±0.2	0.32±0.1	176.1±20.3 <sup>a</sup>	0.47±0.1 <sup>ab</sup>
	0.150	<i>P. aff. fermentans</i>	0.73±0.1	0.65±0.4	162.2±6.2 <sup>a</sup>	0.46±0.0 <sup>ab</sup>
	0.142	<i>M. caribbica</i>	0.90±0.1	0.37±0.0	159.5±9.5 <sup>a</sup>	0.47±0.1 <sup>a</sup>
	0.141	<i>P. kudriavizevii</i>	1.03±0.1	0.29±0.0	158.8±11.2 <sup>a</sup>	0.43±0.0 <sup>ab</sup>
	1.161	<i>C. tropicalis</i>	1.03±0.1	0.28±0.0	157.8±10.4 <sup>a</sup>	0.45±0.1 <sup>ab</sup>
	0.285	<i>C. tartarivorans</i>	0.94±0.2	0.32±0.1	152.8±1.0 <sup>a</sup>	0.41±0.0 <sup>abc</sup>
	28.211	<i>C. glabrata</i>	1.02±0.1	0.29±0.1	151.9±8.0 <sup>a</sup>	0.41±0.1 <sup>abc</sup>
2	1.157	<i>C. stellimalicola</i>	0.81±0.1	0.49±0.2	73.5±31.5 <sup>b</sup>	0.26±0.0 <sup>bcd</sup>
	0.145	<i>C. sorbosivorans</i>	0.70±0.2	0.87±0.8	29.0±18.4 <sup>b</sup>	0.22±0.1 <sup>cd</sup>
	21.307	<i>P. galeiforms</i>	0.80±0.1	0.47±0.2	10.3±7.5 <sup>b</sup>	0.08±0.0 <sup>d</sup>
	EPM	0,13	0,19	11,11	0,03	
	P-valor	057	053	<001	<001	

\*Rendimento máximo de etanol por substrato em  $\text{g g}^{-1}$ . Valor expresso em porcentagem (%).

\*\* Concentração final após 48 h de fermentação.

## Discussão

Com o intuito de definir o perfil bromatológico da silagem de cana-de-açúcar Zopollatto e colaboradores (2009) realizaram uma metanálise em que foi avaliada a variação no valor nutricional, nos parâmetros fermentativos e no desempenho de bovinos alimentados com silagem de cana-de-açúcar. Os autores verificaram variação na composição nutricional de MS, FDN e FDA com valores entre 193-341, 491-753 e

346-487 g kg<sup>-1</sup> DM respectivamente. No entanto, no presente estudo as concentrações de MS, PDIN e NH<sub>3</sub> não variaram ao longo de toda a fermentação. A manutenção do valor de MS na silagem de cana-de-açúcar com 84 dias de fermentação também foi observado por Balieiro-Neto e colaboradores (Balieiro-Neto *et al.*, 2009). A possível explicação para a manutenção da MS durante a fermentação é a disponibilidade de elevada concentração de açúcares no meio que foram suficientes para as reações de fermentação, fazendo com que as leveduras tivessem acesso diretamente à fonte de carbono. Em uma avaliação realizada por Ávila e colaboradores (2010) para determinar a concentração de açúcares totais em suspensão da silagem da cana-de-açúcar com o auxílio de um refratômetro, valores de 21 °Brix foram obtidos. Segundo esses autores, a concentração de açúcares disponível era suficiente para as reações de fermentação na silagem.

A população de BAL aumentou após o primeiro dia de fermentação e o principal efeito desse aumento foi a drástica redução do pH de 5,5 para 3,7. A rápida acidez do meio nos tempos iniciais da fermentação, entre 3,5-4,5, é necessário para o armazenamento de uma boa silagem (Harris, 1984). A acidificação da silagem ocorre devido à alta concentração de ácidos orgânicos produzidos pelas BAL e a baixa capacidade de tamponamento da cana (Alli *et al.*, 1982; Santos *et al.*, 2008; Evangelista *et al.*, 2009). O ácido orgânico que deve estar em maior proporção em uma silagem é o ácido láctico, devido à sua maior eficiência em baixar o pH rapidamente (Cruz *et al.*, 2001). Após o terceiro dia de fermentação houve redução da população de BAL. Para Oude Elferink e colaboradores (2001) a redução da população de BAL após os primeiros dias de fermentação ocorre devido à perda de viabilidade das espécies mais sensíveis que é decorrente da elevada acidez, permanecendo as espécies mais ácido-tolerantes (Oude Elferink *et al.*, 2001).

A contagem de leveduras viáveis indicou que esse grupo de microrganismos não foi inibido pela acidez do meio, aumentando de população ao longo da fermentação, mesmo com valores de pH abaixo de 3,7. A cana-de-açúcar possui uma população epífita de leveduras elevada que pode chegar até 10<sup>6</sup> UFC/g de forragem fresca. Mesmo com uma população epífita de leveduras (2,7x10<sup>4</sup> UFC/g de forragem fresca) menor do que tem aquela observada em outros estudos com silagem de cana-de-açúcar (Pedroso *et al.*, 2005; Ávila *et al.*, 2008; Ávila *et al.*, 2010; Cavali *et al.*, 2010; Ávila *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2014), a população de levedura cresceu no meio ácido atingindo valores de 2,8x10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de silagem após 7 dias de fermentação.

Como consequência da elevada população de levedura na silagem de cana-de-açúcar, observou-se valores elevados da concentração de etanol devido à fermentação alcoólica. A fermentação alcoólica reduz o valor nutritivo da silagem devido à conversão do açúcar em CO<sub>2</sub>, água e etanol (Pate *et al.*, 2001; Pedroso, 2003). A produção de etanol pode corresponder ao consumo de 50% da sacarose presente na cana-de-açúcar fresca (Alli *et al.*, 1982). Neste estudo, a população média de levedura foi de  $4,8 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> de silagem e observações prévias indicam que silagens contendo populações de levedura de  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> são mais suscetíveis à deterioração aeróbia (Webster, 1992).

Vários gêneros de leveduras já foram relatados em silagem de cana-de-açúcar sendo eles *Candida*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Hanseniaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Endomycopsis*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Torulopsis*, *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* (Jonsson e Pahlow 1984; Webster 1992; Bravo-Martins *et al.*, 2006; Ávila *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2014), destes, três foram identificadas no nosso estudo (*Candida*, *Pichia* e *Torulaspota*). O gênero *Meyerozyma* identificado neste estudo ainda não foi relatado na literatura como componente da população de leveduras da silagem de cana-de-açúcar. A espécie *M. caribbica* foi isolada a partir da cana *in natura* fazendo parte da população epífita.

Espécies do gênero *Meyerozyma* têm sido isoladas de diversos ambientes, como o solo, alimentos, insetos, água do mar e subprodutos de árvores. Algumas espécies fazem parte da microbiota da pele e mucosas, podendo causar doenças em pacientes imunossuprimidos (Papon *et al.*, 2013). Algumas características importantes podem ser atribuídas a esse gênero: temperatura padrão de crescimento de 30°C (máxima de 42°C); crescimento em aerobiose e em condições estritas de oxigênio; capacidade de fermentar açúcares; incapacidade de metabolizar amido, lactose e inositol como fontes de carbono; leveduras heterotáticas e que possuem divisão celular multilateral por brotamento; algumas espécies produzem pseudohifas (Kurtzman e Suzuki 2010; Papon *et al.*, 2013). Diversos estudos tem sido realizados com o gênero *Meyerozyma* sp. por apresentar importância clínica e possuir potencial para aplicações biotecnológicas e controle biológico (Coda *et al.*, 2013; Joel & Valentin Bhimba, 2013; Papon *et al.*, 2013; Romi *et al.*, 2014). Espécies desse gênero já foram descritas como produtoras de surfactantes e enzimas extracelulares P450, as quais são importantes no processo de degradação de moléculas aromáticas (Das e Chandran 2011).

A espécie *M. caribbica* foi capaz de liberar açúcares redutores a partir de resíduos *in natura* de bagaço de cana-de-açúcar sendo promissora na degradação de

resíduos da agroindústria, além de produzir etanol a partir da fermentação de D-xilose (Canali 2015). Essa característica é de grande relevância, uma vez que existe um grande número de leveduras capazes de fermentar pentoses, mas apenas algumas espécies podem produzir etanol a partir de D-xilose (Matos *et al.*, 2014). Isso demonstra a capacidade de utilização dessa levedura para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

Para todos os isolados sequenciados a homologia com espécies depositadas no GenBank foi >99%, caracterizando os isolados como da mesma espécie de referência (Kurtzman e Robnett 1998). Vários métodos moleculares estão bem estabelecidos para a identificação e tipagem de leveduras, incluindo a amplificação do rRNA 5.8S e as duas regiões espaçadoras intergênicas ribossomais (ITS1 e ITS2) que são usados no agrupamento de isolados de leveduras (James *et al.*, 1996; Petersen *et al.*, 2001). Entretanto, nos últimos anos, o sequenciamento do domínio D1/D2 da região rRNA 26S tem sido utilizado na identificação de leveduras a nível de espécie (Kurtzman e Robnett 1998; van der Aa Kühle e Jespersen 2003).

O nosso estudo avaliou, pela primeira vez, a sucessão e abundância das espécies de leveduras cultiváveis presentes durante a fermentação da cana-de-açúcar. A diversidade de espécies diminuiu de acordo com a acidificação da silagem e algumas espécies como *C. glabrata* e *P. kudriavzevii* estiveram presente durante todo o período de fermentação e aumentaram a sua abundância ao longo da ensilagem, demonstrando ser resistentes a baixos valores de pH. As leveduras são capazes de se desenvolverem em baixas concentrações de oxigênio e podem tolerar um pH tão baixo quanto 3,0-4,0 (Laukova *et al.*, 2003), ocorrendo a sucessão de populações ao longo de todo o processo fermentativo (Webster 1992).

As leveduras possuem sistemas elaborados para manter o pH intracelular e esses sistemas desempenham papel essencial na fisiologia e no crescimento desse grupo microbiano (Henriques *et al.*, 1997). O pH intracelular e a bomba de H<sup>+</sup> são regulados pela ATPase da membrana plasmática que mantém o gradiente transmembrana de H<sup>+</sup> utilizado para o transporte de nutrientes (Imai e Ohno, 1995). Este sistema desempenha um papel essencial na fisiologia da levedura diminuindo a permeabilidade da membrana plasmática e auxiliando a extrusão ativa de prótons (Henriques *et al.*, 1997). A extrusão ativa do ácido para a manutenção do pH intracelular já foi reportado em *Zygosaccharomyces bailii* (Warth, 1977) e *Saccharomyces cerevisiae* (Henriques *et al.*, 1997).

Além dos mecanismos de resistência a ácidos orgânicos, algumas leveduras são capazes de assimilar ácido láctico (Laukova *et al.*, 2003). Algumas espécies de leveduras dos gêneros *Candida* spp., *Debaryomyces* spp., *Metschnikowia* spp., *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp., *Torulaspota* spp., *Trichosporon* spp. e *Yarrowia* spp degradam oxidativamente ácido láctico e produzem CO<sub>2</sub> e água (Laukova *et al.*, 2003). Leveduras possuem lactato desidrogenase, o que lhes permite utilizar ácido láctico como uma fonte de carbono e energia para o crescimento (Cassio *et al.*, 1987). A assimilação de lactato pelas leveduras quando a silagem é exposta ao ar permite o aparecimento de fungos filamentosos e o aumento do pH. Diante disso, o efeito inibidor do pH é reduzido e a população de microrganismos deterioradores e patogênicos aumentada. Estudos relatam a influência de espécies dos gêneros *Candida* e *Pichia* na diminuição da estabilidade aeróbia (McDonald 1981; Jonsson and Pahlow 1984; Bravo-Martins, Carneiro *et al.*, 2006; Carvalho, Ávila *et al.*, 2014).

A presença de *P. kudriavzevii* foi associada com o aumento da concentração de etanol na silagem de cana-de-açúcar (Figura 3 e Tabela 1). No 14º dia de fermentação a prevalência dessa espécie foi de 98% em relação ao número de espécies totais isoladas e a produção de etanol atingiu a maior concentração dentre os períodos de amostragem. Entretanto, o intervalo em que se observou a maior variação na concentração de etanol foi entre o 3º e 7º dia de fermentação em que as espécies mais prevalentes foram *C. glabrata*, *P. kudriavzevii* e *T. delbrueckii*. Isto indica que essas espécies têm alta capacidade de fermentar a cana-de-açúcar, produzindo elevadas concentrações de etanol, além de se manterem viáveis em condições adversas e em ambientes altamente competitivos. Embora as espécies de levedura envolvidas na fermentação de cana-de-açúcar ainda não tenham sido totalmente identificadas, sabe-se que as diferentes espécies são divergentes em relação à sua eficiência na produção de etanol (Campos *et al.*, 2010).

A espécie *C. glabrata* também esteve presente em todo o processo fermentativo da silagem de cana-de-açúcar, representando 25% do total de isolados do último dia de fermentação (28 dias). Essa espécie pode ser intrinsecamente associada com diarreia em bezerros recém-nascidos (Elad *et al.*, 1998) e associada com casos de mastite clínica ou sub-clínica em ruminantes, quer como agentes primários ou secundários (Spanamberg *et al.*, 2009). Além disso, ela tem sido frequentemente associada com resistência múltipla a drogas antifúngicas (Samaranayake e Samaranayake, 1994).

As espécies *P. galeiformis*, *C. tartarivorans*, *C. tropicalis*, *C. stellimalicola* e *Meyerozyma caribbica* não são frequentemente relatadas em silagem de cana-de-açúcar,

ao contrário das espécies *P. fermentans*, *P. kudriavzevii* e *C. glabrata* que são relatadas por diversos autores (Rossi e Dellaglio 2007; Ávila *et al.*, 2010; Li e Nishino 2011; Dolci *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2014). Ávila e colaboradores (2010) isolaram cinco gêneros de leveduras em diferentes cultivares e tempos da silagem de cana-de-açúcar. As espécies encontradas foram *T. delbrueckii*, *P. anomala*, *P. guilliermondii*, *P. jadinii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus*, *C. glabrata*, *C. membranifaciens*, *Kluyveromyces lactis*.

Devido à grande biodiversidade de leveduras, diferentes reações de fermentação e assimilação de distintas fontes de carbono e nitrogênio são observadas durante todo o processo de fermentação (Ávila *et al.*, 2010). Os resultados obtidos neste estudo, adicionam novas informações sobre a diversidade e a sucessão de leveduras durante a ensilagem da cana-de-açúcar. A população de leveduras se manteve alta e constante na maior parte do período de fermentação, entretanto, a diversidade de levedura diminuiu ao longo do período de fermentação e as espécies dominantes foram estritamente relacionadas à fermentação alcoólica. Novos estudos poderão avaliar estratégias para reduzir ou inibir o crescimento de determinadas espécies de levedura na silagem de cana-de-açúcar minimizando as perdas de matéria seca causadas pela fermentação alcoólica.

## Referências

- Alli I, Baker BE, Garcia G (1982) Studies on the fermentation of chopped sugarcane. *Anim Feed Sci Technol* 7:411–417.
- Ávila CLS, Bravo-Martins CEC, Chwan RF (2010) Identification and characterization of yeasts in sugarcane silages. *J Appl Microbiol* 109:1677–1686.
- Ávila CLS, Carvalho BF, Pinto JC, Duarte WF, Schwan RF (2014) The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. *J Dairy Sci* 97:940–951.
- Ávila CLS, Pinto JC, Sugawara MS, Silva MS, Schwan RF (2008) Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. *Anim Sci* 30:255–261.
- Balieiro-Neto G, Junior EF, Nogueira JR, Possenti R (2009) e digestibilidade aparente de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químico e microbiano. *Pesqui Agropecuária Bras bra* 44:621–630.
- Balieiro-Neto G, Siqueira GR, Reis RA, Nogueira JR, Roth MDTP, Roth a. PDTP (2007) Óxido De Cálcio Como Aditivo Na Ensilagem De Cana-De-Açúcar. *Rev Bras Zootec* 36:1231–1239.
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (2000) *Yeast: Characteristics and Identification*, 3rd edn. UK: Cambridge University Press, Cambridge
- Boidin J, Pignal MC, Besson M (1965) Le genre *Pichia* sensu lato. Quatrieme contribution. *Bull la Société Mycol Fr* 81:566–606.
- Bolsen KK, Lin C, Brent BE, Feyerherm AM, Urban JE, Aimutis WR (1992) Effect of Silage Additives on the Microbial Succession and Fermentation Process of Alfalfa and Corn Silages. *J Dairy Sci* 75:3066–3083.
- Bravo-Martins CEC, Carneiro H, Castro-Gómez RJH, Figueiredo HCP, Schwan RF (2006) Chemical and microbiological evaluation of ensiled sugar cane with different additives. *Brazilian J Microbiol* 37:499–504.
- Brysch-Herzberg M, Seidel M (2015) Yeast diversity on grapes in two German wine growing regions. *Int J Food Microbiol* 214:137–144.
- Campos CR, Silva CF, Dias DR, Basso LC, Amorim H V, Schwan RF (2010) Features of *Saccharomyces cerevisiae* as a culture starter for the production of the distilled sugar cane beverage, cachaça in Brazil. *J Appl Microbiol* 108:1871–1879.
- Canali MC (2015) Prospecção de leveduras para a produção de biocombustíveis: estudo dos gêneros *Aureobasidium* e *Meyerozyma*. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- Carvalho BF, Ávila CLS, Pinto JC, Neri J, Schwan RF (2014) Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. *Anim Feed Sci Technol*.
- Cassio F, Leao C, van Uden N (1987) Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Envir Microbiol* 53:509–513.
- Castresana J (2000) Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Mol Biol Evol* 17:540–552.
- Cavali J, Pereira OG, Filho S de CV, Edson, Santos M, Carvalho GGP de, Santos MV, Marlos, Porto O, Rodrigues JFH (2010) Bromatological and microbiological characteristics of sugarcane silages treated with calcium oxide. *Rev Bras Zootec* 39:1398–1408.
- Coda R, Rizzello CG, Di Cagno R, Trani A, Cardinali G, Gobbetti M (2013) Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. *Food Microbiol* 33:243–51.

- Cruz JC, Pereira-Filho IA, Rodrigues JAS, Ferreira J (2001) Produção e utilização de silagem de milho e sorgo.
- Das N, Chandran P (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int* 2011:941810.
- Dolci P, Tabacco E, Coccolin L, Borreani G (2011) Microbial dynamics during aerobic exposure of corn silage stored under oxygen barrier or polyethylene films. *Appl Environ Microbiol* 77:7499–507.
- Elad D, Brenner J, Markovics a, Yakobson B, Shlomovitz S, Basan J (1998) Yeasts in the gastrointestinal tract of preweaned calves and possible involvement of *Candida glabrata* in neonatal calf diarrhea. *Mycopathologia* 141:7–14.
- El-Gazzar FE, Rusul G, Marth EH (1987) Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of lactic acid and at different initial pH values. *J Food Prot* 50:940–944.
- Evangelista AR, Siqueira GR, Lima JA de, Lopes J, Rezende AV de (2009) Alterações bromatológicas e fermentativas durante o armazenamento de silagens de cana-de-açúcar com e sem milho desintegrado com palha e sabugo. *Rev Bras Zootec* 38:20–26.
- Ferreira, D.F (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFPA)*, 35 6: 1039-1042.
- Freitas a WP, Pereira JC, Rocha FC, Costa MG, Leonel FP, Ribeiro MD (2006) Evaluation of the nutritional quality of sugarcane silage treated with microbial additives and soybean crop residue. *Rev Bras Zootec* 35:38–47.
- Harris B (1984) Harvesting, storing, and feeding silage to dairy cattle. Florida Coop Ext Serv Circ 565 Florida Coop Ext Serv Inst Food Agric Sci Univ Florida 1–9.
- Henriques M, Quintas C, Loureiro-Dias MC (1997) Extrusion of benzoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by an energy-dependent mechanism. *Microbiology* 143 6:1877–83.
- Imai T, Ohno T (1995) Measurement of yeast intracellular pH by image processing and the change it undergoes during growth phase. *J Biotechnol* 38:165–172.
- James SA, Collins MD, Roberts IN (1996) Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulopsis*. *Int J Syst Bacteriol* 46:189–94.
- Joel EL, Valentin Bhimba B (2013) Evaluation of secondary metabolites from mangrove associated fungi *Meyerozyma guilliermondii*. *Alexandria J Med* 49:189–194.
- Jonsson A, Pahlow G (1984) Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus cultures*. *Anim Res Dev* 20:7–22.
- Kung Jr L, Ranjit NK (2001) The Effect of *Lactobacillus buchneri* and Other Additives on the Fermentation and Aerobic Stability of Barley Silage. *J Dairy Sci* 84:1149–1155.
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* 73:331–371.
- Kurtzman CP, Suzuki M (2010) Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* 51:2–14.
- Lachance M-A, Bowles JM, Starmer WT, Barker JSF (1999) *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Can J Microbiol* 45:172–177.
- Laukova D, Valik L, Gorner F (2003) Effect of lactic acid on the growth dynamics of *Candida maltosa* YP1. *Czech J food Sci* 21:43–49.

- Li Y, Nishino N (2011) Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. *Grassl Sci* 57:184–191.
- Lopes J, Evangelista AR, Rocha GP (2007) Valor nutricional da silagem de cana-de-açúcar acrescida de uréia e aditivos absorventes de umidade. *Rev Bras Zootec* 36:1155–1161.
- Matos ITSR, Cassa-Barbosa LA, Galvão R de SM, Nunes-Silva CG, Astolfi-Filho S (2014) biotechnological potential of wild-type *Meyerozyma guilliermondii* associated with amazonian termites able to ferment D-xylose= Isolamento, identificação taxonômica. *J Biociências Uberlândia* 30:260–266.
- McDonald P, Henderson A, Heron S (1991) *The Biochemistry of Silage*, Chalcombe.
- Mertens DR (2002) Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *J AOAC Int* 85:1217–1240.
- Miranda DCL (2006) Perda de matéria seca em silagem de cana - de - açúcar tratada com aditivos químicos e microbiológicos. Universidade Federal de Lavras
- Oude Elferink SJ, Krooneman J, Gottschal JC, Spoelstra SF, Faber F, Driehuis F (2001) Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl Environ Microbiol* 67:125–32.
- Oude Elferink SJWH, Driehuis F, Gottschal JC, Spoelstra SF (2015) Paper 2.0: Silage fermentation processes and their manipulation. In: <http://www.fao.org/docrep/005/x8486e/x8486e09.htm>. <http://www.fao.org/docrep/005/x8486e/x8486e09.htm>. Accessed 29 dez 2015
- Pahlow G (1982) Verbesserung der aeroben stabilitat von silagen durcimpfpreparate. *Das Wirtschaftseigene Futter* 28:107–122.
- Pahlow G, Muck R, Driehuis F, Elferink S, Spoelstra S (2003) Microbiology of ensiling. *Silage Sci Technol* 31–94.
- Papon N, Savini V, Lanoue A, Simkin AJ, Crèche J, Giglioli-Guivarc'h N, Clastre M, Courdavault V, Sibirny AA (2013) *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Curr Genet* 59:73–90.
- Pate FM, Alvarez J, Phillips JD, Eiland BR (2001) Sugarcane as a cattle feed: production and utilization. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS
- Pedroso A de F (2003) Aditivos químicos e microbianos no controle de perdas e na qualidade de silagem de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). Universidade de São Paulo
- Pedroso A de F, Nussio LG, Loures DRS, Paziani S de F, Igarasi MS, Coelho RM, Horii J, Rodrigues A de A (2007) Efeito do tratamento com aditivos químicos e inoculantes bacterianos nas perdas e na qualidade de silagens de cana-de-açúcar. *Rev Bras Zootec* 36:558–564.
- Pedroso A de F, Nussio LG, Paziani S de F, Loures DRS, Igarasi MS, Coelho RM, Packer IH, Horii J, Gomes LH (2005) Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. *Sci Agric* 62:427–432.
- Pedroso ADF, Nussio LG, Loures DRS, Paziani SDF, Ribeiro JL, Mari LJ, Zopollatto M, Schmidt P, Mattos WRS, Horii J (2008) Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. *Sci Agric* 65:589–594.
- Pedroso ADF, Nussio LG, Waldomiro B, Rodrigues ADA, Santana Loures DR, De Campos F, Ribeiro JL, Mari LJ, Zopollatto M, Junqueira M, Schmidt P, Paziani SDF, Horii J (2006) Performance of Holstein heifers fed sugarcane silages treated with urea, sodium benzoate or *Lactobacillus buchneri*. *Pesqui Agropecu Bras* 41:649–654.
- Pereira OG, Santos EM (2006) Microbiologia e o processo de fermentação em silagens. III Simpósio sobre manejo estratégico da pastagem AnaisViçosa, UFV,DZO 393–430.
- Petersen KM, Møller PL, Jespersen L (2001) DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *Int J Food Microbiol* 69:11–24.

- Romi W, Keisam S, Ahmed G, Jeyaram K (2014) Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC Microbiol* 14:1–11.
- Rossi F, Dellaglio F (2007) Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. *J Appl Microbiol* 103:1707–15.
- Samaranayake YH, Samaranayake LP (1994) *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol* 41:295–310.
- Santos MC, Nussio LG, Mourão GB, Schmidt P, Mari LJ, Ribeiro JL (2008) Influência da utilização de aditivos químicos no perfil da fermentação, no valor nutritivo e nas perdas de silagens de cana-de-açúcar. *Rev Bras Zootec* 37:1555–1563.
- Siegfried BR, Ruckemann H, Stumpf G (1984) Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. *Landwirtsch Forsch* 37:298.
- Silva SC da, Peixoto AM, Moura JC, Faria VP (1993) A cana-de-açúcar como alimento volumoso suplementar. Vol para Bov Piracicaba Fundação Estud Agrários Luiz Queiroz 59–74.
- Silva DJ, Queiroz AC (2002) Análise de alimentos. Métodos químicos e biológicos., 3 d. Imprensa Universitária, Viçosa-MG
- Siqueira GR, Reis R a, Schocken-Iturrino RP, Roth a PTP, Roth MTP, Resende FD (2011) Fermentative profile of silage of fresh or burned sugarcane treated or not with *L. buchneri*. *Rev Bras Zootec* 40:1651–1661.
- Spanamberg A, Sanches EMC, Santurio JM, Ferreiro L (2009) No Title Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. *Ciência Rural* 39:282–290.
- Talavera G, Castresana J (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol* 56:564–77.
- Valvasori E, Lucci C de S, Arcaro JRP, Pires FL, Júnior IA (1995) Avaliação da cana-de-açúcar em substituição a silagem de milho para vacas leiteiras. *Brazilian J Vet Res Anim Sci* 32:224–228.
- van der Aa Kühle A, Jespersen L (2003) The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Syst Appl Microbiol* 26:564–71.
- Walker GM (1998) Yeast physiology and biotechnology.
- Warth AD (1977) Mechanism of Resistance of *Saccharomyces bailii* to Benzoic, Sorbic and Other Weak Acids Used as Food Preservatives. *J Appl Bacteriol* 43:215–230.
- Webster J (1992) The Biochemistry of Silage (Second Edition). By P. McDonald, A. R. Henderson and S. J. E. Heron. Marlow, Bucks, UK: Chalcombe Publications, (1991), pp. 340, £49.50, ISBN 0-948617-225. *Exp Agric* 28:125.
- Wilkinson JM, Davies DR (2013) The aerobic stability of silage: Key findings and recent developments. *Grass Forage Sci* 68:1–19.
- Woolford MK (1984) The antimicrobial spectra of organic compounds with respect to their potential as hay preservatives. *Grass Forage Sci* 39:75–79.
- Zopollatto M, Daniel JLP, Nussio LG (2009) Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. *Rev Bras Zootec* 38:170–189.

# Anexos

**Tabela S1.** Identificação dos isolados de leveduras obtidas de silagem de cana-de-açúcar.

Identificação dos isolados de leveduras								
Isolado	Identificação	Bp	Max score	Total score	Query cover	E-value	Identidade %	Acesso no NCBI
Y0.141(LC015261)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	580	1064	1064	99%	0.0	100	KF811416
Y0.142 (LC015262)	<i>Meyerozyma caribbica</i> strain Y-17844	589	1086	1086	99%	0.0	100	KJ705006
Y0.143 (LC015263)	<i>Pichia aff. fermentans</i> IMUFRJ 51964	571	1040	1040	99%	0.0	99	FN428873
Y0.145 (LC015264)	<i>Candida sorbosivorans</i> strain DMic 113940	465	857	857	99%	0.0	100	JN031573
Y0.146 (LC015265)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	594	1096	1096	99%	0.0	100	KJ624034
Y0.147 (LC015266)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain Y7-7	576	1061	1061	99%	0.0	100	KJ183049
Y0.148 (LC015267)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	585	1079	1079	99%	0.0	100	KJ624034
Y0.149 (LC015268)	<i>Pichia aff. fermentans</i> Y153	567	1037	1037	99%	0.0	99	HE863822
Y0.150 (LC015269)	<i>Pichia aff. fermentans</i> Y15	569	1050	1050	99%	0.0	100	HE863822
Y0.151 (LC015270)	<i>Meyerozyma caribbica</i> strain Y-17844	574	1057	1057	99%	0.0	100	KJ705006
Y0.281 (LC015271)	<i>Issatchenkia orientalis</i> strain IMAU3Y005	573	1057	1057	99%	0.0	100	FJ770478
Y0.282 (LC015272)	<i>Meyerozyma caribbica</i> strain Y-17844	582	1075	1075	100%	0.0	100	KJ705006
Y0.283 (LC015273)	<i>Meyerozyma caribbica</i> strain Y-17844	581	1072	1072	99%	0.0	100	KJ705006
Y0.284 (LC015274)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain Y7-7	576	1059	1059	99%	0.0	100	KJ183049
Y0.285 (LC015275)	<i>Candida tartarivorans</i>	578	1055	1055	99%	0.0	99	DQ438226
Y1.153 (LC015276)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	588	1083	1083	99%	0.0	100	KJ624034
Y1.154 (LC015277)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	597	1103	1103	100%	0.0	100	KJ624034
Y1.155 (LC015278)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	593	1090	1090	99%	0.0	100	KJ624034
Y1.156 (LC015279)	<i>Torulaspora delbrueckii</i> isolate KDLYH2-5	577	1064	1064	99%	0.0	100	KF633187

**Tabela S1 cont.** Identificação dos isolados de leveduras obtidas de silagem de cana-de-açúcar.

Identificação dos isolados de leveduras								
Isolado	Identificação	Bp	Max score	Total score	Query cover	E-value	Identidade %	Acesso no NCBI
Y1.157 (LC015280)	<i>Candida stellimalicola</i>	590	883	883	99%	0.0	91	FM180552
Y1.158 (LC015281)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	596	1101	1101	100%	0.0	100	KJ624034
Y1.159 (LC015282)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain Y7-7	572	1057	1057	100%	0.0	100	KJ183049
Y1.160 (LC015283)	<i>Torulaspota delbrueckii</i> isolate BBMV3FA5	569	1051	1051	100%	0.0	100	KF735113
Y1.161 (LC015284)	<i>Candida tropicalis</i>	615	1061	1061	95%	0.0	99	AB719415
Y1.286 (LC015285)	<i>Torulaspota delbrueckii</i> isolate KDLYH2-5	587	1084	1081	99%	0.0	100	KF633187
Y1.288 (LC015286)	<i>Torulaspota delbrueckii</i> isolate KDLYH2-5	589	1085	1085	100%	0.0	100	KF633187
Y1.289 (LC015287)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	578	1068	1068	100%	0.0	100	KJ624034
Y1.290 (LC015288)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	577	1066	1066	100%	0.0	100	KJ624034
Y3.162 (LC015328)	<i>Torulaspota delbrueckii</i> isolate KDLYH2-5	588	1079	1079	99%	0.0	99	KF633187
Y3.163 (LC015329)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	597	1099	1099	99%	0.0	100	KJ624034
Y3.164 (LC015330)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	577	1062	1062	99%	0.0	100	KF811416
Y3.165 (LC015331)	<i>Torulaspota delbrueckii</i> isolate KDLYH2-5	586	1077	1077	99%	0.0	100	KF633187
Y3.166 (LC015332)	<i>Pichia aff. fermentans</i> Y153	541	992	992	99%	0.0	99	HE863822
Y3.167 (LC015333)	<i>Pichia aff. fermentans</i> Y153	563	1035	1035	100%	0.0	99	HE863822
Y3.168 (LC015334)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	591	1086	1086	99%	0.0	100	KJ624034
Y3.169 (LC015335)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	594	1092	1092	99%	0.0	100	KJ624034
Y3.170 (LC015336)	<i>Torulaspota delbrueckii</i> isolate KDLYH2-5	589	1088	1088	100%	0.0	100	KF633187
Y3.171 (LC015337)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	597	1103	1103	100%	0.0	100	KJ624034
Y3.291 (LC015338)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	593	1085	1085	99%	0.0	99	KJ624034
Y3.292 (LC015339)	<i>Torulaspota delbrueckii</i> isolate KDLYH2-5	586	1083	1083	100%	0.0	100	KF633187
Y3.293 (LC015340)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	592	1090	1090	99%	0.0	100	KJ624034
Y3.294 (LC015341)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	577	1064	1064	99%	0.0	100	KF811416
Y3.295 (LC015342)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	575	1062	1062	100%	0.0	100	KF811416
Y7.172 (LC015343)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	583	1026	1026	99%	0.0	98	KF811416
Y7.173 (LC015344)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	595	1099	1099	100%	0.0	100	KJ624034

**Tabela S1 cont.** Identificação dos isolados de leveduras obtidas de silagem de cana-de-açúcar.

Identificação dos isolados de leveduras								
Isolado	Identificação	Bp	Max score	Total score	Query cover	E-value	Identidade %	Acesso no NCBI
Y7.174 (LC015345)	<i>Torulaspora delbrueckii</i> isolate KDLYH2-5	581	1074	1074	100%	0.0	100	KF633187
Y7.175 (LC015346)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	596	1101	1101	100	0.0	100	KJ624034
Y7.176 (LC015347)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	590	1088	1088	99%	0.0	100	KJ624034
Y7.177 (LC015348)	<i>Torulaspora delbrueckii</i> isolate KDLYH2-5	583	1075	1075	99%	0.0	100	KF633187
Y7.178 (LC015349)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	597	1101	1101	99%	0.0	100	KJ624034
Y7.179 (LC015350)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	580	1068	1068	100%	0.0	99	KF811416
Y7.180 (LC015351)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	594	1094	1094	99%	0.0	100	KJ624034
Y7.181 (LC015352)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	596	1101	1101	100%	0.0	100	KJ624034
Y7.297 (LC015354)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain Y7-7	576	1057	1057	99%	0.0	100	KJ183049
Y7.298 (LC015355)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	591	1086	1086	99%	0.0	99	KJ624034
Y7.299 (LC015356)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	592	1090	1090	99%	0.0	100	KJ624034
Y7.300 (LC015357)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	581	1074	1074	100%	0.0	100	KJ624034
Y14.182 (LC015289)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	579	1070	1070	100%	0.0	100	KF811416
Y14.183 (LC015290)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	578	1066	1066	99%	0.0	100	KF811416
Y14.184 (LC015291)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	577	1066	1066	100%	0.0	100	KF811416
Y14.185 (LC015292)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	577	1066	1066	100%	0.0	100	KF811416
Y14.187 (LC015293)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	575	1062	1062	100%	0.0	100	KF811416
Y14.188 (LC015294)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	576	1062	1062	100%	0.0	100	KF811416
Y14.190 (LC015295)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain ZB05242194/95	580	1070	1070	99%	0.0	100	KF442634
Y14.191 (LC015296)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	579	1062	1062	100%	0.0	100	KF811416
Y14.301 (LC015297)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	596	1098	1098	99%	0.0	100	KJ624034
Y14.302 (LC015298)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain ZB05242194/95	582	1070	1070	99%	0.0	100	KF442634
Y14.303 (LC015299)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	579	1062	1062	100%	0.0	100	KF811416
Y14.304 (LC015300)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	580	1072	1072	100%	0.0	100	KF811416
Y14.305 (LC015301)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	578	1066	1066	99%	0.0	100	KF811416
Y21.192 (LC015302)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain Y7-7	566	1046	1046	100%	0.0	100	KJ183049

**Tabela S1 cont.** Identificação dos isolados de leveduras obtidas de silagem de cana-de-açúcar.

Identificação dos isolados de leveduras										
Isolado	Identificação	Bp	Max score	Total score	Query cover	E-value	Identidade %	Acesso no NCBI		
Y21.193 (LC015303)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	579	1070	1070	100%	0.0	100	KF811416		
Y21.194 (LC015304)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	567	1048	1048	100%	0.0	100	KF811416		
Y21.195 (LC015305)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	577	1062	1062	99%	0.0	100	KF811416		
Y21.196 (LC015306)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	578	1053	1053	99%	0.0	99	KF811416		
Y21.197 (LC015307)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	578	1066	1066	99%	0.0	100	KF811416		
Y21.198 (LC015308)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	594	1090	1090	99%	0.0	100	KJ624034		
Y21.199 (LC015309)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	577	1064	1064	99%	0.0	100	KF811416		
Y21.200 (LC015310)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	559	1016	1016	100%	0.0	100	KF811416		
Y21.201 (LC015311)	<i>Issatchenkia orientalis</i> isolate 149	571	1055	1055	100%	0.0	100	AY529505		
Y21.306 (LC015312)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain Y7-7	571	1050	1050	99%	0.0	100	KJ183049		
Y21.307 (LC015313)	<i>Pichia galeiformis</i> strain ZB05242196/97	573	1059	1059	100%	0.0	100	KF442633		
Y21.308 (LC015314)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	598	1101	1101	100%	0.0	100	KJ624034		
Y21.309 (LC015315)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	579	1068	1068	99%	0.0	100	KF811416		
Y21.310 (LC015316)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	576	1062	1062	99%	0.0	100	KF811416		
Y28.205 (LC015317)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	580	1072	1072	100%	0.0	100	KF811416		
Y28.206 (LC015318)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain Y7-7	576	1059	1059	99%	0.0	100	KJ183049		
Y28.207 (LC015319)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	578	1066	1066	99%	0.0	100	KF811416		
Y28.208 (LC015320)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	597	1099	1099	99%	0.0	100	KJ624034		
Y28.209	<i>Issatchenkia orientalis</i> isolate 216	541	1000	1000	100%	0.0	100	AY529502		
Y28.210 (LC015321)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain Y7-7	576	1059	1059	99%	0.0	100	KJ183049		
Y28.211 (LC015322)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	596	1101	1101	100%	0.0	100	KJ624034		
Y28.311 (LC015323)	<i>Candida glabrata</i> isolate HC10C	596	1099	1099	99%	0.0	100	KJ624034		
Y28.312 (LC015324)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	577	1062	1062	99%	0.0	100	KF811416		
Y28.313 (LC015325)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	576	1064	1064	100	0.0	100	KF811416		
Y28.314 (LC015326)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	578	1057	1057	99%	0.0	100	KF811416		
Y28.315 (LC015327)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat	578	1064	1064	99%	0.0	100	KF811416		

**Tabela S2.** Características fenotípicas dos isolados de leveduras obtidos da silagem de cana-de-açúcar.

Isolado	Caracterização morfológica das colônias – Meio YPD					
	Cor	Tamanho*	Textura	Forma	Borda	Outras
Y0.141	Creme	grande	lisa	achatada	irregular	opaca
Y0.142	Branca	média	lisa	circular	lisa	-
Y0.143	Bege	média	aveludado	cônica	irregular	centro denso
Y0.144	Bege	pequena	lisa	circular	lisa	opaca
Y0.145	amarelada	pequena	lisa	circular	lisa	opaca
Y0.146	Creme	grande	lisa	achatada	lisa	-
Y0.147	Creme	grande	aveludada	achatado	irregular	núcleo mais opaco
Y0.148	Creme	média	lisa	cônica	lisa	-
Y0.149	Bege	média	lisa	circular	lisa	centro denso
Y0.150	Creme	média	lisa	achatada	lisa	bordas transparentes
Y0.151	Branca	grande	rugosa	achatada	irregular	núcleo amarelado
Y0.281	amarela	pequena	lisa	circular	lisa	-
Y0.282	amarela	média	rugosa	cônica	irregular	-
Y0.283	Creme	média	lisa	achatada	lisa	-
Y0.284	Bege	média	lisa	circular	lisa	-
Y0.285	Bege	média	lisa	circular	lisa	-
Y1.153	Creme	grande	lisa	achatada	lisa	opaca
Y1.154	Bege	grande	lisa	circular	lisa	centro denso
Y1.155	Creme	média	lisa	achatada	lisa	borda transparente
Y1.156	Branca	pequena	lisa	circular	lisa	-
Y1.157	Creme	média	lisa	circular	lisa	-
Y1.158	Branca	média	lisa	cônica	lisa	-
Y1.159	Creme	grande	aveludada	achatada	irregular	-
Y1.160	Bege	pequena	lisa	circular	lisa	-
Y1.161	Creme	grande	rugosa	circular	irregular	possui irregularidades
Y1.286	Creme	grande	lisa	cônica	lisa	-
Y1.288	Branca	média	lisa	circular	lisa	-
Y1.289	Branca	média	lisa	achatada	lisa	-
Y1.290	Creme	grande	lisa	achatada	irregular	-
Y3.162	Creme	média	lisa	circular	lisa	opaca
Y3.163	Creme	grande	lisa	achatada	lisa	opaca
Y3.164	Creme	grande	rugosa	achatada	irregular	borda mais densa
Y3.165	Branca	pequena	lisa	circular	lisa	brilhosa
Y3.166	Creme	média	lisa	cônica	lisa	opaca
Y3.167	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	opaca
Y3.168	Branca	média	lisa	achatada	lisa	opaca
Y3.169	Creme	grande	lisa	achatada	lisa	opaca
Y3.170	Branca	pequena	lisa	circular	lisa	brilhante
Y3.171	Branca	média	lisa	achatada	irregular	opaca
Y3.291	Creme	grande	lisa	achatada	lisa	opaca
Y3.292	Branca	pequena	lisa	circular	lisa	-
Y3.293	Branca	média	lisa	achatada	lisa	Brilhante
Y3.294	Bege	grande	aveludada	achatada	lisa	opaca
Y3.295	Creme	grande	aveludada	achatada	irregular	opaca
Y7.172	Bege	grande	aveludada	achatada	irregular	-
Y7.173	Creme	média	lisa	achatada	lisa	brilhante
Y7.174	Branca	pequena	lisa	circular	lisa	brilhante
Y7.175	Creme	média	lisa	achatada	lisa	opaca
Y7.176	Branca	média	lisa	circular	lisa	-
Y7.177	Branca	pequena	lisa	circular	lisa	brilhante
Y7.178	Branca	média	lisa	circular	lisa	brilhante
Y7.179	Bege	grande	aveludada	achatada	irregular	opaca
Y7.180	Branca	grande	lisa	achatada	lisa	brilhante
Y7.181	Branca	grande	lisa	achatada	lisa	brilhante
Y7.296	Branca	pequena	lisa	circular	lisa	brilhante
Y7.297	Bege	grande	aveludada	achatada	irregular	-
Y7.298	Creme	grande	lisa	achatada	lisa	Brilhante
Y7.299	Creme	grande	lisa	achatada	lisa	-
Y7.300	Branca	pequena	lisa	circular	lisa	-
Y14.182	Creme	grande	aveludada	achatada	irregular	centro denso
Y14.183	Creme	grande	aveludada	achatada	irregular	centro denso
Y14.184	Creme	grande	aveludada	achatada	irregular	centro denso
Y14.185	Creme	grande	aveludada	achatada	irregular	-
Y14.187	Creme	grande	aveludada	achatada	irregular	centro denso
Y14.188	Branca	média	lisa	circular	lisa	brilhante
Y14.190	Creme	grande	aveludada	achatada	irregular	centro denso
Y14.191	Creme	grande	aveludada	achatada	irregular	-
Y14.301	Branca	média	lisa	circular	lisa	brilhante
Y14.302	Creme	grande	aveludada	achatada	irregular	-
Y14.303	Creme	média	aveludada	achatada	irregular	-
Y14.304	Creme	média	aveludada	achatada	irregular	-
Y14.305	Creme	grande	aveludada	achatada	irregular	-
Y21.192	Creme	grande	rugosa	achatada	irregular	-

**Tabela S2 cont.** Características fenotípicas dos isolados de leveduras obtidos da silagem de cana-de-açúcar.

Isolado	Caracterização morfológica das colônias – Meio YPD					
	Cor	Tamanho*	Textura	Forma	Borda	Outras
Y21.193	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	-
Y21.194	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	-
Y21.195	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	-
Y21.196	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	-
Y21.197	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	-
Y21.198	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	-
Y21.199	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	-
Y21.200	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	-
Y21.201	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	-
Y21.306	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	ranhuras
Y21.307	branca	pequena	lisa	circular	lisa	brilhante
Y21.308	Branca	média	lisa	circular	lisa	brilhante
Y21.309	Creme	grande	rugosa	achatada	irregular	centro denso
Y21.310	Creme	grande	rugosa	achatada	irregular	ranhuras
Y28.205	Creme	média	rugosa	cônica	irregular	-
Y28.206	Creme	grande	rugosa	achatada	irregular	-
Y28.207	Creme	grande	rugosa	achatada	irregular	-
Y28.208	Branca	média	lisa	cônica	lisa	brilhante
Y28.209	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	-
Y28.210	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	-
Y28.211	Branca	pequena	lisa	cônica	lisa	brilhante
Y28.311	Creme	pequena	rugosa	achatada	irregular	-
Y28.312	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	Ranhuras
Y28.313	Creme	média	rugosa	achatada	irregular	-
Y28.314	Creme	pequena	rugosa	achatada	irregular	-
Y28.315	Creme	pequena	rugosa	achatada	irregular	-

\*Colônia pequena ( $\leq 1.0$  mm); Média ( $> 1.0 \leq 2.0$  mm) e grande ( $> 2.0$  mm).

# Capítulo 3

---

**CARACTERIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA  
DURANTE A FERMENTAÇÃO DA SILAGEM DE CANA-DE-AÇÚCAR**

## Resumo

**Objetivo:** Isolar, identificar e caracterizar bactérias envolvidas no processo fermentativo da silagem de cana-de-açúcar e selecionar bactérias do ácido lático potencialmente produtoras de bacteriocinas. **Métodos e resultados:** Cana-de-açúcar foi ensilada e amostras foram coletadas nos tempos 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de fermentação. A população de bactérias foi determinada utilizando dois meios de cultivo diferentes (MRS e Agar nutriente) . Cento e sessenta e quatro isolados bacterianos foram identificados por meio da análise da sequência do rRNA 16S. Oitenta e sete culturas foram isoladas a partir do meio MRS, pertencentes a 8 gêneros diferentes , enquanto setenta e sete culturas foram isoladas do meio Agar nutriente, sendo distribuídos em 13 gêneros distintos. *Weissella* foi o gênero mais abundante no início da fermentação e *Lactobacillus* predominou nas fases mais tardias da fermentação. Sessenta e nove isolados apresentaram atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes*. Dezoito isolados inibiram ao mesmo tempo *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. **Conclusões:** A silagem de cana-de-açúcar apresentou elevada diversidade de bactérias, a qual variou ao longo do período de fermentação. A espécie *W. cibaria* se destacou dentre as avaliações realizadas, demonstrando potencial como inoculante biológico para a ensilagem da cana-de açúcar.

**Palavras-chave:** Diversidade; 16S rRNA; abundância, sucessão bacteriana; antagonismo, bacteriocinas e lantibióticos.

## Introdução

A cana-de-açúcar tem atraído atenção para a sua utilização na alimentação animal, principalmente nos confinamentos para terminação de bovinos de corte por ser uma forragem que mantém a qualidade por longos períodos de tempo, além de ser adaptada às condições ambientais das regiões tropicais/subtropicais (Pate *et al.*, 2001) e apresentar grande produção por unidade de área (80 a 150 t/ha). Além disso, a cana-de-açúcar possui baixo custo de produção por tonelada de matéria seca (MS) (Torres and Costa 2001) e época de colheita coincidente com o período seco do ano (Silva *et al.*, 1993).

Uma das maneiras de usar a cana-de-açúcar na alimentação animal é na forma de silagem. O processo de ensilagem é uma técnica que consiste em preservar a forragem por meio da fermentação, em que as bactérias do ácido láctico (BAL) convertem os açúcares solúveis em ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico (Gollop *et al.*, 2005). Estudos anteriores analisaram a microbiota associada às silagens de forrageiras como sorgo, trigo, milho e alfafa (Lindgren *et al.*, 1985; Umaña *et al.*, 1991; Kung *et al.*, 2003; Nishino *et al.*, 2004; Filya *et al.*, 2006). Apesar da silagem de cana-de-açúcar já ser utilizada como alimento para ruminantes, a caracterização da sucessão microbiana durante o processo de ensilagem e a caracterização dos microrganismos que contribuem para a qualidade da silagem tem sido pouco investigadas (Bravo-Martins *et al.*, 2006). Neste estudo o objetivo foi avaliar a diversidade de espécies e a sucessão bacteriana de cultiváveis envolvidos no processo de fermentação da cana-de-açúcar.

As bactérias epífitas que são responsáveis pela fermentação natural da silagem são as BAL homofermentativas produtoras de ácido láctico, como *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Pediococcus acidilactici* e *Enterococcus faecalis* (Cai *et al.*, 1999; Ennahar *et al.*, 2003; Giraffa *et al.*, 2010). As BAL heterofermentativas, como *Lactobacillus buchneri*, *Pediococcus cerevisiae*, *Propionibacterium shermani* e *Propionibacterium acidipropionici* também tem sido consideradas benéficas para o processo de fermentação da silagem de cana-de-açúcar por produzirem ácido acético e propiônico (Weinberg e Muck, 1996) que inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis, principalmente leveduras, que são responsáveis pela fermentação alcoólica, além de fungos filamentosos envolvidos na deterioração aeróbia (Holzer *et al.*, 2003).

Tem sido demonstrado que espécies do gênero *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Pediococcus* podem, inicialmente, dominar o processo fermentativo, e que seriam substituídas por *Lactobacillus* tolerantes a ácido em fases posteriores da fermentação (McDonald *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1992). Microrganismos aeróbios mesófilos e anaeróbios indesejáveis como *Bacillus*, enterobactérias e clostrídeos também podem ocorrer durante a fermentação da silagem. Apesar de não existirem relatos sobre a quantidade total de bactérias anaeróbias facultativas mesofílicas em silagem de cana-de-açúcar, para outras forrageiras os níveis são aproximadamente  $10^2$  UFC g<sup>-1</sup> de forragem (Bolsen *et al.*, 1993). Esses microrganismos são indesejáveis porque competem com as BAL pelos substratos disponíveis e estão associados com a degradação da proteína, modificação aeróbia e redução geral da qualidade da silagem (Henderson, 1993).

Vários estudos têm investigado o desenvolvimento e aplicação de aditivos microbiológicos para melhorar a qualidade da silagem de cana-de-açúcar (Ferreira *et al.*, 2007; Ávila *et al.*, 2008; Balieiro-Neto *et al.*, 2009; Ávila *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2011; Junges *et al.*, 2011). A maioria dos aditivos para silagem baseia-se na utilização de microrganismos benéficos capazes de acelerar a acidificação da forragem (inoculantes), de inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis (leveduras, *Bacillus*, enterobactérias e clostrídeos) ou que sejam capazes de produzir metabólitos que estimulem o consumo ou a produção do ruminante (Kung *et al.*, 2003).

Neste estudo, bactérias cultiváveis predominantes durante o processo de ensilagem da cana-de-açúcar foram isoladas e identificadas e a atividade antimicrobiana das bactérias lácticas foi testada *in vitro*. A análise dos parâmetros cinéticos de crescimento e da produção de ácidos orgânicos indicou grande diversidade fermentativa dos isolados de bactérias lácticas e revelou a presença de genes de biossíntese de bacteriocinas em culturas de BAL com atividade antibacteriana.

## **Material e métodos**

### **1.0. Processamento das amostras e enumeração microbiana**

A cana-de-açúcar foi colhida, processada em máquina forrageira estacionária e em seguida ensilada em mini-silos. Em *bags* medindo 25,4 cm x 35,56 cm (Doug Care Equipament, Springville, CA) foi adicionado 500 g de forragem picada e a condição de anaerobiose estabelecida por uma seladora a vácuo. Os mini-silos foram incubados em temperatura ambiente e nos tempos de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de fermentação, amostras

foram coletadas para análises posteriores. Para a análise do pH, 25 g de silagem foi adicionada em 225 ml de solução de Ringer's (Oxoid) estéril e homogeneizado por um minuto em liquidificador industrial.

A partir do homogeneizado, diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) foram realizadas usando solução salina (0,85% de NaCl) e alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram plaqueadas. Os microrganismos foram enumerados por inoculação em superfície em ágar nutriente (N) (Himedia, Mumbai, Índia) para bactérias totais e em ágar MRS (M) (Himedia, Mumbai, Índia) para análise de bactérias lácticas. As placas foram incubadas em estufas bacteriológicas a 25 °C para bactérias totais e a 37°C em jarra de anaerobiose para BAL, por até 72 h. Após a incubação, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinado considerando limites entre 30 e 300 colônias.

A partir dos valores de UFC foi calculado o coeficiente de variação da população bacteriana (CVPB) subtraindo o log das unidades formadoras de colônias de cada tempo de abertura pelo log das unidades formadoras de colônias obtidas da cana *in natura* dividido pelo tempo de abertura analisado.

## **2.0. Isolamento e identificação de bactérias cultiváveis predominantes durante a ensilagem da cana-de-açúcar**

### **2.1. Isolamento**

As colônias que se desenvolveram em ágar nutriente e ágar MRS foram transferidas sucessivamente para seus respectivos meios de cultura até a obtenção de culturas puras. Após a caracterização do morfotipo das colônias isoladas (tamanho, cor, textura, forma e borda), análise das culturas em microscópio de luz e avaliação da coloração de Gram dos isolados, as culturas foram armazenadas a – 80°C em caldo nutriente ou caldo MRS contendo 20% de glicerol (w/w).

### **2.2. Extração de DNA genômico, identificação e análise filogenética**

Os isolados (n=204) foram ativados em seus respectivos meio de cultivo na temperatura de crescimento de 37 °C para as BALs e 25 °C para as bactérias aeróbias durante 24 h e, posteriormente, as células foram obtidas por centrifugação (15.000 x g por 15 min.). Alguns isolados não foram recuperados a partir do estoque. O DNA genômico foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA A1125 (Promega, Madison, WI, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

A sequência que codifica o 16S rRNA das bactérias isoladas foi amplificada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 005F (5'-TGGAGAGTTTGGATCCTGGCTCA-3') e 1513R (5'-TACIGITACCTTGTTACGACTT-3'). A reação de amplificação foi preparada utilizando 5,0  $\mu$ l de tampão de reação GoTaq (5X), 2,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 1,0  $\mu$ l de dNTPs (2,5 mmol l<sup>-1</sup>), 1,0  $\mu$ l de cada oligonucleotídeo iniciador (10 mmol l<sup>-1</sup>), 0,2  $\mu$ l de Taq DNA polimerase (Promega) e 1,0  $\mu$ l de DNA genômico (200 ng). As condições da reação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 2 min, anelamento a 53 °C por 40 segundos e extensão a 72 °C por 40 segundos. A extensão final foi feita a 72 °C por 5 min.

As sequências do 16S rRNA foram determinadas a partir da purificação do produto da PCR e sequenciamento automatizado (Macrogen Inc, Coreia do Norte). As sequências dos fragmentos de 16S rRNA de cada isolado foram analisadas no software BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - 2215 BLAST, version 2.0) disponível no site do Centro Nacional de Biotecnologia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Os isolados com identidade de sequência  $\geq 97\%$  com o banco de dados foram considerados como filogeneticamente relacionados à espécie indicada.

O alinhamento de sequências foi realizado utilizando o software Mafft (Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequence, version 7) disponível no site <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>. Posições e regiões divergentes do alinhamento das sequências utilizadas na análise filogenética foram eliminadas utilizando o software Gblocks Server (Castresana Lab, Animal Biodiversity and Evolution Program – Barcelo, Spain, version 0,91b) (Castresana 2000; Talavera and Castresana 2007) disponível no site ([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html)). A qualidade do sequenciamento de alguns isolados foi ruim e por este motivo não foram consideradas nas análises posteriores.

As relações filogenéticas foram calculadas com o método estatístico *Neighbor-joining* utilizando o software MEGA 5.0, a partir de bootstrap 5000 iterações. As sequências dos genes do 16S rRNA dos isolados bacterianos utilizados neste estudo foram depositadas no banco de dados DDBJ – DNA Data Bank of Japan / GenBank com os números de acesso LC090402 à LC090550.

### 3.0. Meio de cultivo e condição de crescimento

O meio de cultivo utilizado neste estudo foi o meio RM proposto por Persson e colaboradores (2001) adicionado de caldo de cana-de-açúcar. O meio RM foi composto de extrato de levedura (5 g/l), peptona (5 g/l), casaminoácidos (1 g/l),  $K_2HPO_4$  (2,5 g/l),  $KH_2PO_4$  (2,5 g/l) e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,5 g/l) e foi adicionado de caldo de cana-de-açúcar (1:10 v/v) sendo denominado meio rico de caldo de cana-de-açúcar (RSJ). A temperatura de crescimento de 37 °C foi padronizada para todos os isolados.

### 4.0. Cinética de crescimento

O crescimento das culturas (n=197) foi estimado pelo monitoramento da densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. As culturas bacterianas foram ativadas, padronizadas para D.O.<sub>600nm</sub> de 0,1, inoculadas (1%, v/v) em caldo RSJ e cultivadas a 37 °C por 24 h em microplacas de 96 poços, em condição de microaerofilia. Para análise dos resultados, os valores obtidos foram convertidos em LnDO.

- **Velocidade específica de crescimento -  $\mu$  ( $h^{-1}$ ):** foi determinada como o coeficiente angular da equação da reta representativa do crescimento exponencial das culturas bacterianas em função do tempo ( $\ln X = \mu t + \ln X_0$ ).

- **Tempo de geração:** foi calculado utilizando a expressão matemática  $\log 2/\mu$

### 5.0. Fermentação e determinação da produção de ácidos orgânicos (AOV)

Os isolados ativados e padronizados (n=197) como descrito no item 4.0 foram inoculados no meio RSJ (3%, v/v) e uma alíquota de 1 ml foi coletada logo após a inoculação (tempo 0 h) e após 24 h de incubação a 37 °C.

As amostras foram tratadas de acordo com o protocolo descrito por Siegfried e colaboradores (1984) e, posteriormente, analisada em Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC). Os ácidos orgânicos foram determinados utilizando HPLC Dionex Ultimate 300 duplo detector (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) acoplado ao índice de refração Shodex RI-101 mantido a 40 °C. A coluna utilizada foi de exclusão iônica Phenomenex Rezex ROA (300 x 7.8 mm) (Phenomenex Inc. Torrance, CA, USA) e mantida a 45 °C. A fase móvel continha  $H_2SO_4$  5 mM e o fluxo foi de 0,7 ml  $min^{-1}$ . Os seguintes ácidos orgânicos foram usados como padrão: acético, láctico, succínico, fórmico, propiônico, valérico, isovalérico, isobutírico e butírico.

Todos os padrões de ácidos orgânicos foram preparados para a concentração final de 10 mmol l<sup>-1</sup>, exceto ácido acético (20 mmol l<sup>-1</sup>) e isovalérico (5 mmol l<sup>-1</sup>).

## **6.0. Avaliação da produção de compostos antimicrobianos**

### **6.1. Teste de inibição direta**

A atividade antibacteriana dos isolados (n=204) foi avaliada pelo método da difusão em ágar, de acordo com Salminen e VonWright (1998). Placas de Petri contendo 25 ml de ágar MRS ou ágar nutriente estéril foram inoculadas na superfície do meio com 5 µl da cultura a ser testada, previamente ativada. As placas foram incubadas a 37 °C por até 48 h. Após a incubação, foi adicionado clorofórmio até envolver toda a superfície da colônia teste e as placas foram mantidas abertas sob luz UV por 30 minutos até a evaporação completa do clorofórmio. As colônias foram sobrepostas com uma camada de 10 ml de meio BHI semi-sólido (0,8% p/v) acrescido de 50 µl da suspensão bacteriana contendo aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC ml<sup>-1</sup> do microrganismo indicador (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*). As placas foram incubadas aerobiamente por até 48 h a 37 °C. A atividade inibitória foi determinada averiguando a presença de zonas de inibição (raio) em torno das colônias das bactérias testadas.

### **6.2. Atividade de inibição do sobrenadante das culturas**

Para avaliação da atividade antimicrobiana do sobrenadante (n=36) das culturas que apresentaram atividade inibitória no teste de inibição direta, diluições seriadas de 2X foram realizadas e 25 µl de cada diluição foram adicionadas em poços com diâmetro de 5 mm, feitos em meio sólido (1,5%, p/v) previamente inoculado com o microrganismo indicador (*Listeria monocytogenes*). As placas foram incubadas a 4 °C por 12 h para difusão do sobrenadante e, em seguida, a 37 °C por 24 h. A atividade antimicrobiana do sobrenadante foi avaliada pela observação da formação de halos de inibição ao redor dos poços.

## **7.0. Detecção molecular de genes da biossíntese de lantibióticos nos isolados bacterianos**

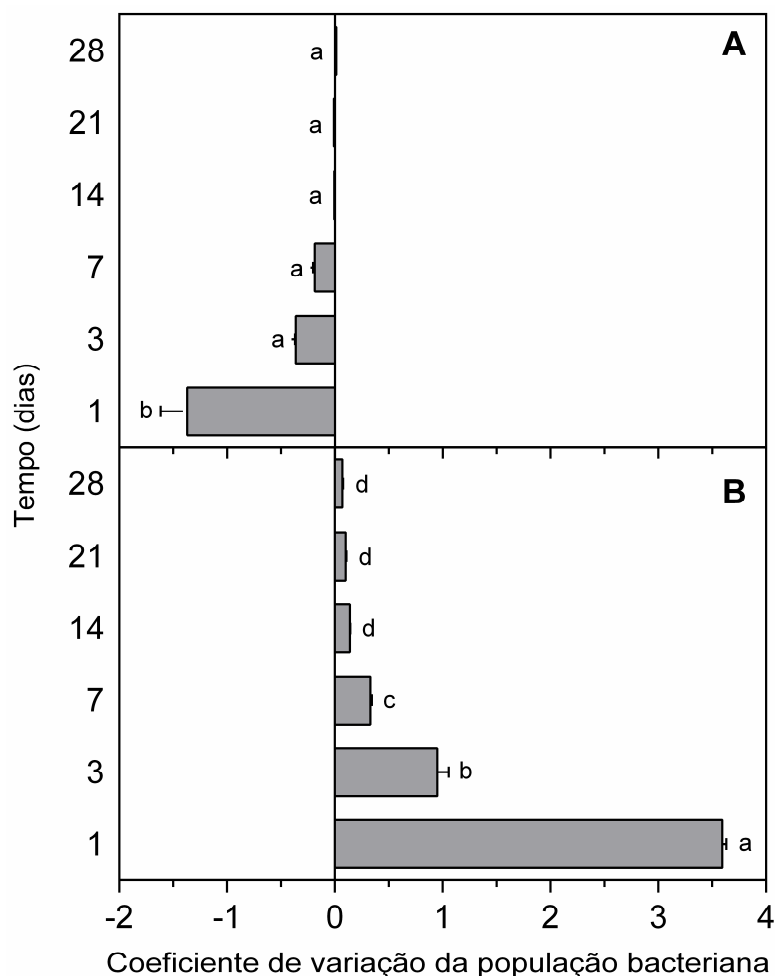
Os isolados (n=36) que apresentaram atividade inibitória contra *Listeria monocytogenes* ou *Bacillus subtilis* ou que inibiram os três indicadores testados (*L. monocytogenes*, *E. coli* e *B. subtilis*) foram selecionados para análise molecular da

presença de genes codificadores de enzimas que realizam modificações pós-traducionais durante a biossíntese de lantibióticos (*lanM*, *lanB* e *lanC*). A PCR foi realizada de acordo com Wescombe e colaboradores (2011), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *lanB* (*forward*, TATGATCGAGAARYAKAWAGATATGG; *reverse*, TTATTAIRCAIATGIAYDAWACT), *lanC* (*forward*, TAATTTAGGATWISYIMAYGG; *reverse*, ACCWKGKIIICCRTRRCACCA) e *lanM* (*forward*, ATGCWAGWYWTGCWCATGG; *reverse*, CCTAATGAACCRTRRYAYCA). Para cada par de oligonucleotídeo iniciador, a reação foi constituída de 5  $\mu$ l de GoTaq (10 X), 2,5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>, 1,0  $\mu$ l dNTP (2,5 mmol l<sup>-1</sup>), 1,0  $\mu$ l de cada oligonucleotídeo iniciador (10 mmol l<sup>-1</sup>), 0,75  $\mu$ l DMSO, 0,4  $\mu$ l de BSA (10 mg ml<sup>-1</sup>), 0,3  $\mu$ l de DNA-Taq Polimerase (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), 2  $\mu$ l DNA genômico (100 ng) e água ultra-pura para completar o volume para 25  $\mu$ l.

A reação de amplificação foi realizada a uma temperatura inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 40 °C por 30 s e 72 °C por 60 s, finalizando com extensão final a 72 °C por 5 minutos. As amplificações foram consideradas positivas quando foram observados *amplicons* de 200-300 pb (*lanC* e *lanM*) e 400-500 pb (*lanB*). Foram utilizados como controles positivos DNA genômico de *Streptococcus bovis* HC5 (*lanC*), *Streptococcus mutans* (*lanBC*), *Streptococcus salivarius* 20P3 (*lanBC*), *Streptococcus salivarius* 9 (*lanM*) e *Lactococcus lactis* 3147 (*lanM*).

## Resultados

A determinação do CVPB de bactérias aeróbias cultiváveis ao longo da fermentação da silagem de cana-de-açúcar indicou redução da população bacteriana ao longo do período de fermentação (Figura 1). No primeiro dia o valor do CVPB foi de -1,36 log UFC/dia de fermentação, chegando a -0,007 log UFC/dia de fermentação após 21 dias de fermentação. O CVPB do primeiro dia de ensilagem foi maior (p<0,05) em relação aos demais dias de fermentação, indicando maior perda de viabilidade das bactérias aeróbias no início da fermentação. Em contrapartida, a população de BAL apresentou rápido aumento no primeiro dia após o fechamento do silo (3,59 log UFC/dia de fermentação), reduzindo a sua população após três dias de fermentação (0,95 log UFC/dia de fermentação). Do 14º dia até o final da ensilagem não se observou diferença entre a população de BAL presente na silagem de cana-de-açúcar (Figura 1).

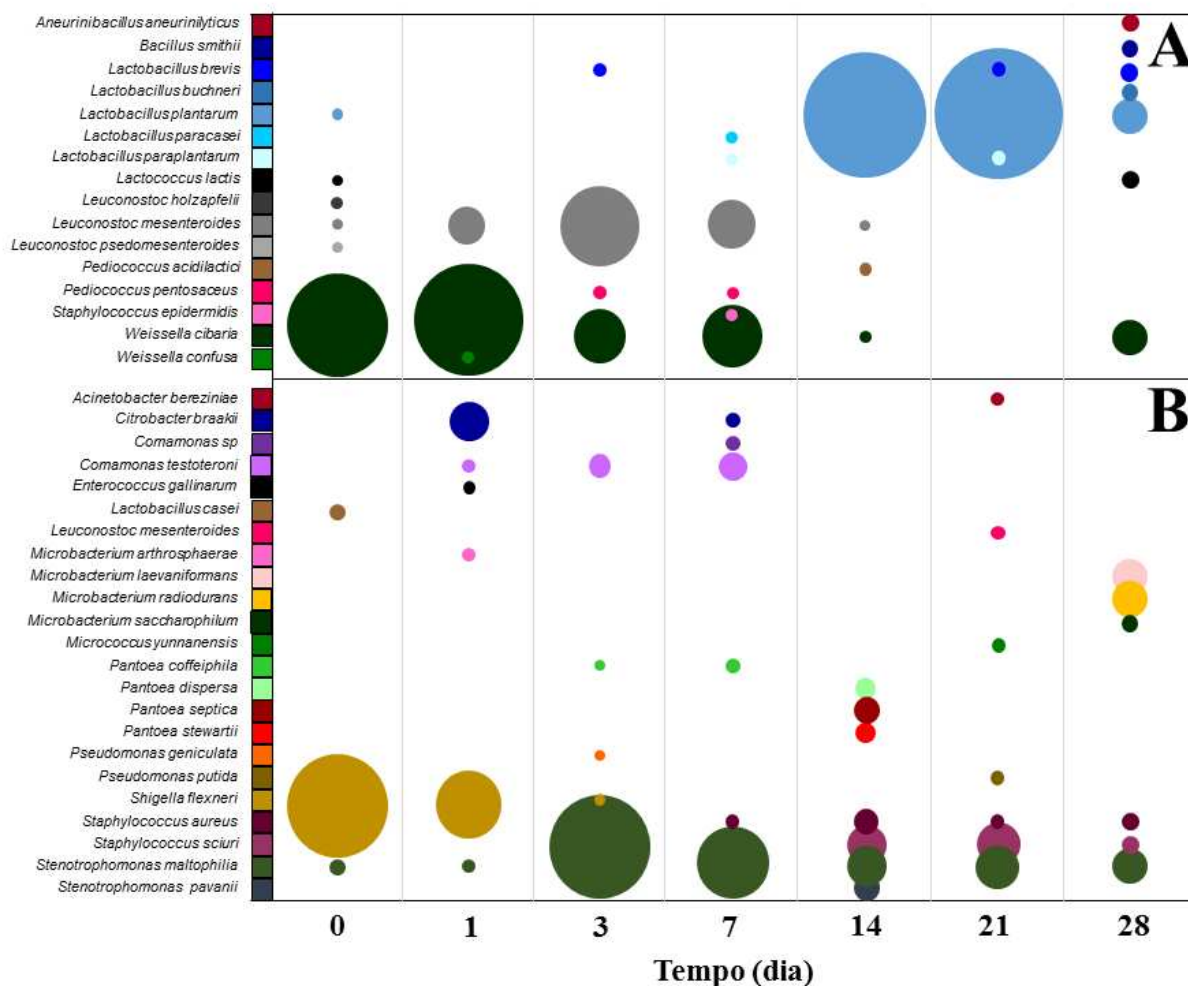


**Figura 1.** Coeficiente de variação da população bacteriana da silagem de cana-de-açúcar fermentada durante 28 dias. A taxa de crescimento foi calculada a partir da razão entre o Log UFC final (cada tempo de abertura) subtraído por Log de UFC da cana *in natura* pelo tempo (cada tempo de abertura). Dois meios foram utilizados para o isolamento, (A) ágar nutriente (28 °C por 48 h) para contagem de bactérias aeróbias e (B) MRS (37 °C por 24 h) para bactérias lácticas. O método de plaqueamento utilizado foi *Spread plate*. Médias seguidas de letras diferentes diferem em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A análise fenotípica das colônias de bactérias obtidas nos diferentes meios de cultura demonstrou grande riqueza de isolados (Tabela S1). De acordo com as características culturais avaliadas (cor, tamanho, textura, forma e borda das colônias) foi observada maior diversidade morfológica e fenotípica dos isolados obtidos no meio ágar nutriente, onde foi detectada maior variação de cores (amarela, laranja, rosa, branca, creme e bege) e tamanho de colônias (pequena, média e grande) quando comparado às colônias obtidas em meio MRS. No meio MRS predominaram colônias de cor creme/branca e de tamanho médio (Tabela S1). A análise fenotípica das colônias obtidas nos diferentes períodos de ensilagem da cana-de-açúcar indicou redução da

diversidade de isolados ao longo do processo de fermentação, com uma população epífita diversificada e redução da diversidade durante o período fermentativo.

A análise das sequências do 16S rRNA dos isolados obtidos nos dois meios de cultivo (n=163) indicou que as espécies bacterianas podem ser classificadas em 18 gêneros distintos (Figura 2 e Tabela S2). Oitenta e quatro isolados provenientes do meio MRS foram identificados em espécies relacionadas aos gêneros *Anaurinibacillus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Staphylococcus* e *Weissella*. Os demais isolados, obtidos do meio ágar nutriente (n=79), foram distribuídos nos gêneros *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Comamonas*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas* (Figura 2 e Tabela S1).



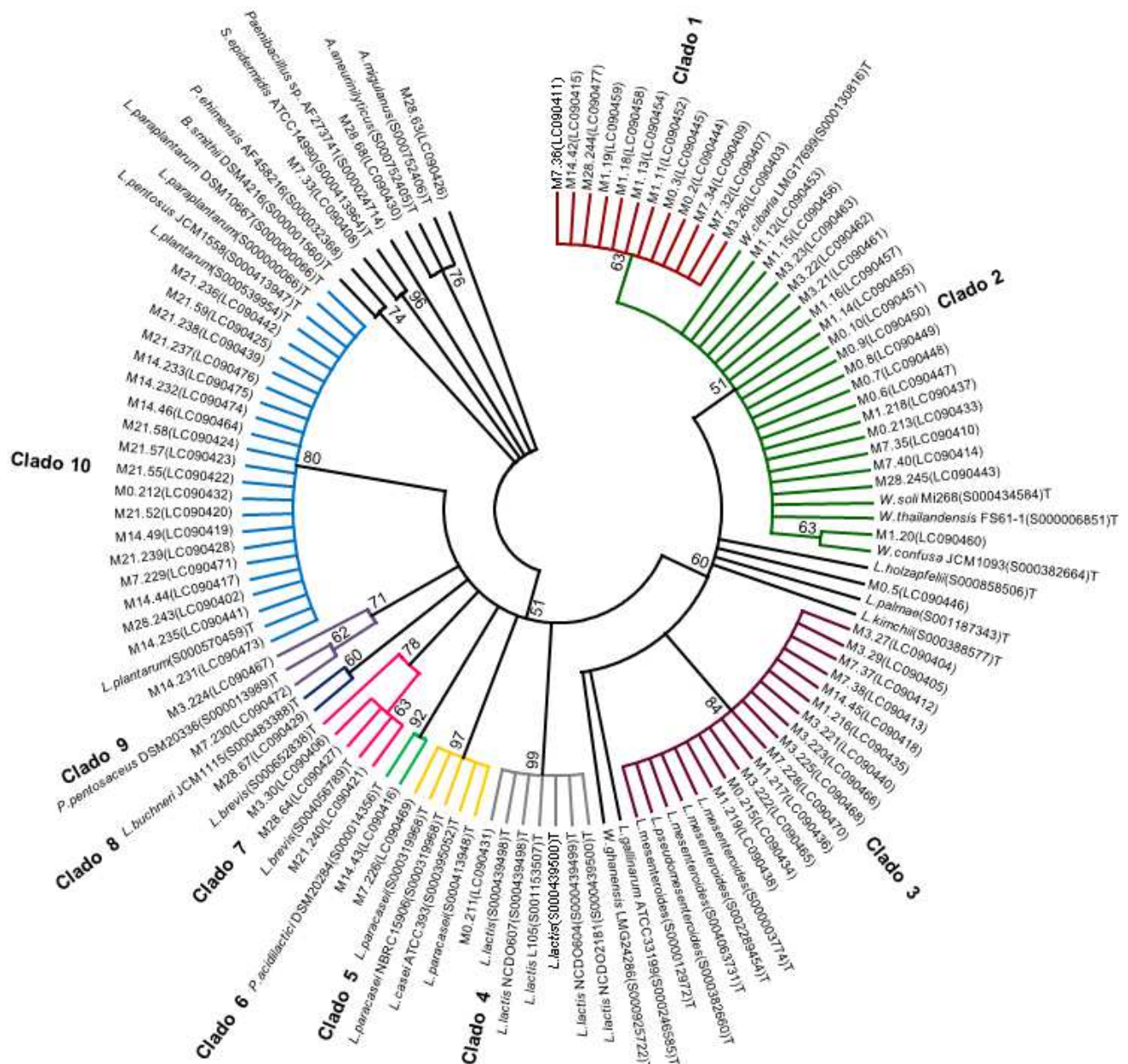
**Figura 2.** Dinâmica da sucessão bacteriana dos isolados bacterianos obtidos em meio agar MRS (A) e nutriente (B) na silagem de cana-de-açúcar durante 28 dias de fermentação. O valor do diâmetro de cada círculo representado é 30 vezes menor do que a porcentagem real obtida.

Diversas espécies de *Lactobacillus* foram isoladas da silagem de cana-de-açúcar, sendo as mais frequentes *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei* e *L.*

*paraplantarum*. Também foram isoladas culturas de *Microbacterium* e *Pantoea* com quatro diferentes espécies: *M. arthrosphaerae*, *M. laevaniformans*, *M. radiodurans*, *M. saccharophilum*, *P. coffeiphila*, *P. dispersa*, *P. septica* e *P. stewartii* (Figura 2). As outras espécies identificadas foram *Aneurinibacillus aneurinilyticus*, *Bacillus smithii*, *Lactococcus lactis*, *Leuconosoc holzapfelii*, *Leuconosoc mesenteroides*, *Leuconosoc pseudomesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Acinetobacter bereziniae*, *Citrobacter braakii*, *Comamonas testoteroni*, *Enterococcus gallinarum*, *Micrococcus yunnanensis*, *Pseudomonas geniculata*, *Pseudomonas putida*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sciuri*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Stenotrophomonas pavanii*.

No meio MRS foi observado maior abundância de *Weissella cibaria* na cana *in natura* e no primeiro dia de fermentação, reduzindo drasticamente a população nos demais dias de fermentação (Figura 2). Por outro lado, espécies de *Lactobacillus* apresentaram maior abundância nos períodos finais da fermentação, com aumento populacional expressivo de *L. plantarum* a partir do 14º dia de fermentação. *Leuconostoc mesenteroides* foi isolado principalmente nos primeiros dias de fermentação e apresentou maior abundância no 3º dia de fermentação, não sendo detectada nos períodos finais da fermentação (Figura 2). Quando amostras da silagem de cana-de-açúcar foram plaqueadas em meio ágar nutriente, observou-se maior abundância de *S. flexneri* na cana *in natura* e após 1 dia de fermentação, porém a população de *S. flexneri* reduziu rapidamente após 3 dias de fermentação, não sendo detectada a partir deste momento. No entanto, houve aumento expressivo de *S. maltophilia* a partir do terceiro dia de ensilagem, sendo que essa espécie foi detectada em todas as amostragens posteriores realizadas neste trabalho (Figura 2).

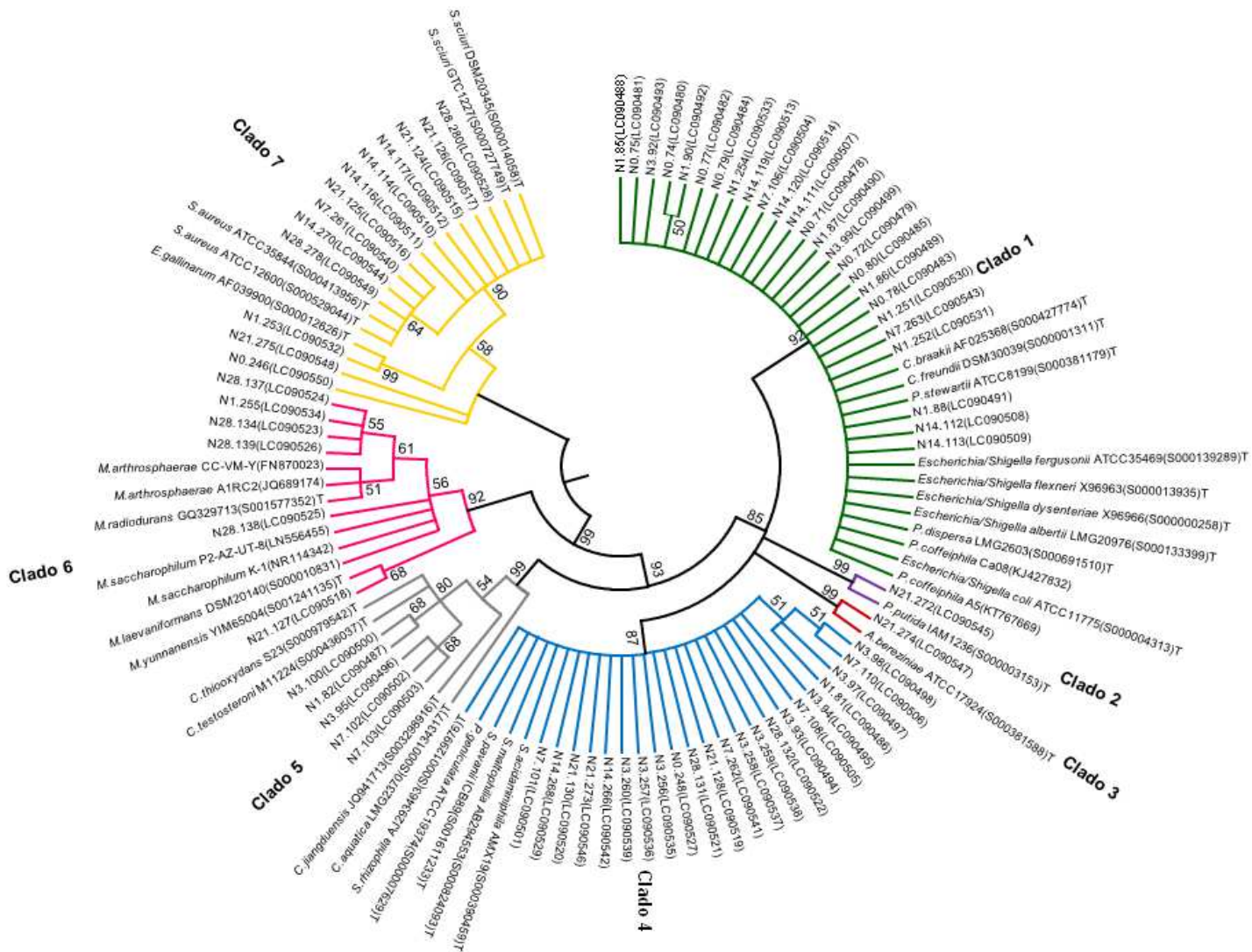
Os isolados a partir do ágar MRS foram agrupados em 10 clados principais (Figura 3). Trinta isolados foram mais estreitamente relacionados ao gênero *Weissella* (*W. cibaria* e *W. confusa*) (clados 1 e 2) e quatorze ao gênero *Leuconostoc* (clado 3). As espécies do gênero *Lactobacillus* agruparam em clados diferentes (clados 5, 7, 8 e 10), mas, todos compartilharam do mesmo ancestral comum. Dois isolados, M3.224 e M7.230, apresentaram alta homologia com sequências 16S rRNA depositadas em bancos de dados (Tabela S2) e agruparam-se no mesmo clado com valor de bootstrap > 70%. Isolados que não fazem parte do grupo de BAL se agruparam separadamente.



**Figura 3.** Dendrograma de similaridade genética de bactérias do ácido láctico isoladas da silagem de cana-de-açúcar pelo sequenciamento da região 16S rRNA. O isolados foram obtidos da cana *in natura* e da silagem com 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de fermentação. O isolamento foi realizado no ágar MRS à 37 °C em condição de microaerofilia. As seqüências dos isolados foram comparadas com o software MEGA 5.0. Análise *Bootstrap* foi realizada a partir de 5000 *resamplings* aleatórios.

Na análise *maximum likelihood* dos isolados obtidos a partir do ágar nutriente foi observado que no clado 1 foram agrupados 26 isolados de três diferentes gêneros (*Citrobacter*, *Pantoea* e *Shigella*) e apresentaram alta similaridade com bootstrap de 92%. Este resultado indica uma alta homologia entre os isolados dos diferentes gêneros (Figura 4). O grupo de isolados dos clados 2 (*P. putida*), 3 (*A. bereziniae*) e 4 (*Stenotrophomonas*) apresentaram semelhança com os isolados da clado 1, pois, foram agrupados a partir de um mesmo ancestral comum, com bootstrap de 85% (Figura 4). Alguns isolados de BAL foram identificados em ágar nutriente e se agruparam separadamente, mas, compartilhando de um mesmo ancestral comum. Isolados que

agruparam com seqüências referência de *Staphylococcus* também compartilharam do mesmo ancestral comum dos isolados de BAL, no entanto, apresentaram baixa similaridade (Figura 4). Outros dois agrupamentos foram observados, em que, cinco isolados pertenciam ao gênero *Comamonas* (clado 5) e seis aos gêneros *Microbacterium* e *Micrococcus* (clado 6) (Figura 4).



**Figura 4.** Dendrograma de similaridade genética de bactérias aeróbias isoladas da silagem de cana-de-açúcar pelo sequenciamento da região 16S rRNA. O isolados foram obtidos da cana *in natura* e da silagem com 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de fermentação. O isolamento foi realizado no ágar Nutriente à 25 °C. As seqüências dos isolados foram comparadas com o software MEGA 5.0. Análise *Bootstrap* foi realizada a partir de 5000 *resamplings* aleatórios.

A produção de AOV, no meio RSJ, variou entre os grupos de bactérias lácticas e aeróbias isoladas da silagem de cana-de-açúcar (Tabela 1 e 2). A concentração média de AOV foi 32% maior para os isolados de bactérias lácticas (Tabela 1) quando comparado às bactérias aeróbias (Tabela 2) com  $77,1 \pm 27,3$  e  $52,4 \pm 13,0$  mmol<sup>-1</sup>, respectivamente. Os principais produtos dos isolados de BAL foram ácido láctico, ácido isobutírico e

ácido acético com concentração média de  $70,8 \pm 26,4$ ,  $5,7 \pm 2,97$  e  $3,7 \pm 2,88$  mmol l<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 1). Dos quatro gêneros mais abundantes no meio MRS o que apresentou maior valor médio de produção de AOV foi o gênero *Pediococcus* ( $88,1 \pm 39,4$  mmol l<sup>-1</sup>), seguido pelos gêneros *Lactobacillus* ( $83,3 \pm 30,8$  mmol l<sup>-1</sup>), *Weissella* ( $76,4 \pm 24,2$  mmol l<sup>-1</sup>) e *Leuconostoc* ( $73,9 \pm 20,4$  mmol l<sup>-1</sup>).

**Tabela 1.** Cinética de crescimento e produtos da fermentação de bactérias lácticas da silagem de cana-de-açúcar em meio RSJ mantido à 37 °C, por 24 horas.

Isolado*	Identificação isolados	Parâmetros de crescimento			Ácidos Orgânicos* - mmol l <sup>-1</sup>			
		$\mu_{\text{máximo}}$ (h <sup>-1</sup> )	D.O <sub>máx24hs</sub>	Tg <sub>(h)</sub>	Total AOV	L	A	I
M14.43	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0,60±0,1	0,89±0,1	0,50±0,1	133,37	128,25	2,87	2,25
M21.236	<i>Lactobacillus plantarum</i>	nd	nd	nd	118,76	113,74	3,41	1,61
M1.14	<i>Weissella cibaria</i>	0,87±0,2	0,78±0,2	0,35±0,0	116,11	101,43	5,28	9,40
M7.39	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,57±0,2	0,74±0,1	0,57±0,2	115,99	105,65	6,67	3,67
M14.235	<i>Lactobacillus plantarum</i>	nd	nd	nd	114,62	109,61	2,64	2,37
M1.11	<i>Weissella cibaria</i>	0,62±0,2	0,97±0,0	0,52±0,2	114,31	103,79	4,42	6,10
M14.231	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,31±0,1	0,49±0,1	1,06±0,4	110,65	100,87	4,73	5,05
M21.52	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,45±0,1	0,55±0,2	0,68±0,1	110,21	105,59	3,04	1,58
M0.6	<i>Weissella cibaria</i>	0,47±0,1	0,95±0,1	0,66±0,1	108,42	104,35	4,07	-
M21.237	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	0,49±0,2	0,40±0,2	0,68±0,3	107,24	105,32	1,92	-
M14.49	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,36±0,1	0,59±0,3	0,85±0,2	106,41	104,10	2,31	-
M14.48	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,40±0,1	0,76±0,0	0,78±0,2	106,06	96,58	3,58	5,90
M1.18	<i>Weissella cibaria</i>	0,72±0,1	0,69±0,2	0,42±0,1	105,74	88,86	7,50	9,38
M21.239	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,47±0,2	0,57±0,4	0,68±0,2	103,36	101,81	1,55	-
M7.35	<i>Weissella cibaria</i>	0,57±0,1	0,90±0,2	0,54±0,1	102,35	92,93	3,48	5,94
M14.46	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,03±0,1	0,78±0,0	0,30±0,0	101,61	92,82	2,59	6,20
M21.238	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,31±0,3	0,47±0,2	1,05±0,1	99,79	98,21	1,58	-
M14.234	nd	0,45±0,1	0,50±0,2	0,69±0,2	99,66	93,68	2,61	3,37
M14.50	<i>Lactobacillus plantarum</i>	nd	nd	nd	98,94	96,61	2,33	-
M0.211	<i>Lactococcus lactis</i>	0,96±0,8	0,40±0,1	0,46±0,4	98,82	75,15	5,21	18,46
M1.17	nd	0,76±0,2	0,74±0,0	0,41±0,1	96,92	84,78	3,81	8,33
M28.61	nd	0,88±0,2	0,48±0,4	0,35±0,1	95,41	87,32	2,73	5,36
M14.44	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,45±0,1	0,77±0,2	0,69±0,2	94,88	92,90	1,98	-
M0.4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,50±0,1	0,78±0,2	0,61±0,1	94,12	92,10	2,02	-
M21.59	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,68±0,4	0,45±0,2	0,52±0,3	93,74	91,45	2,29	-
M21.55	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,24±0,1	0,60±0,5	1,49±0,9	93,16	90,95	2,21	-
M7.34	<i>Weissella cibaria</i>	0,76±0,0	0,73±0,1	0,40±0,0	91,74	82,73	3,38	5,63
M0.8	<i>Weissella cibaria</i>	1,20±0,1	0,95±0,2	0,25±0,5	90,66	75,67	5,04	9,95
M28.241	nd	1,14±0,1	1,78±0,1	0,27±0,0	90,65	88,48	-	2,17
M28.69	<i>Lactococcus lactis</i>	1,13±0,4	0,38±0,2	0,42±0,3	90,46	78,87	4,13	7,46
M3.30	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,55±0,0	0,90±0,14	0,55±0,0	90,42	88,24	2,18	-
M14.47	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,01±0,4	0,78±0,2	0,32±0,1	90,41	87,98	2,43	-
M21.54	nd	0,55±0,0	0,51±0,4	0,55±0,0	89,81	87,88	1,93	-
M1.16	<i>Weissella cibaria</i>	0,86±0,1	0,91±0,2	0,36±0,0	88,22	76,81	3,55	7,86

**Tabela 1 cont.** Cinética de crescimento e produtos da fermentação de bactérias lácticas da silagem de cana-de-açúcar em meio RSJ mantido à 37 °C, por 24 horas.

Isolado*	Identificação isolados	Parâmetros de crescimento			Ácidos Orgânicos* - mmol l <sup>-1</sup>			
		$\mu_{\text{máximo}}$ (h <sup>-1</sup> )	D.O <sub>máx24hs</sub>	Tg <sub>(horas)</sub>	Total AOV	L	A	I
M14.45	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,56±0,1	0,83±0,1	0,54±0,1	87,25	81,31	2,20	3,74
M0.1	<i>Weissella cibaria</i>	0,54±0,1	0,74±0,1	0,57±0,1	86,54	79,48	2,43	4,63
M3.26	<i>Weissella cibaria</i>	0,55±0,2	0,86±0,0	0,57±0,2	86,35	79,60	2,31	4,44
M1.15	<i>Weissella cibaria</i>	0,92±0,1	0,98±0,1	0,33±0,0	86,15	74,86	5,50	5,79
M3.21	<i>Weissella cibaria</i>	1,06±0,1	0,93±0,1	0,29±0,0	84,85	64,81	14,02	6,02
M0.212	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,81±0,0	0,39±0,1	0,37±0,0	84,02	81,77	2,25	-
M7.32	<i>Weissella cibaria</i>	0,71±0,1	0,60±0,0	0,44±0,1	83,69	80,73	2,96	-
M28.63	<i>Bacillus smithii</i>	0,54±0,1	1,25±0,0	0,57±0,1	83,22	76,11	1,61	5,50
M21.57	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,58±0,1	0,41±0,1	0,52±0,1	82,77	81,10	1,67	-
M14.41	nd	0,20±0,0	0,45±0,1	1,52±0,2	82,75	80,64	2,11	-
M28.68	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	0,85±0,4	0,73±0,6	0,40±0,2	82,71	76,91	2,51	3,29
M3.24	nd	0,84±0,2	0,96±0,1	0,37±0,1	82,49	71,58	2,97	7,94
M0.5	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	0,61±0,1	0,76±0,0	0,50±0,1	82,14	78,50	2,21	1,43
M7.38	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,43±0,1	0,92±0,1	0,72±0,1	81,79	58,11	17,82	5,86
M0.9	<i>Weissella cibaria</i>	0,96±0,3	0,76±0,0	0,33±0,1	81,57	67,79	4,68	9,10
M21.56	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,52±0,0	0,50±0,4	0,59±0,0	81,54	79,61	1,93	-
M14.42	<i>Weissella cibaria</i>	0,82±0,3	0,76±0,1	0,39±0,1	81,47	79,19	2,28	-
M7.40	<i>Weissella cibaria</i>	0,54±0,1	0,94±0,1	0,56±0,1	81,34	78,53	2,81	-
M3.223	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,38 ±0,2	0,46 ±0,2	0,93±0,5	79,91	71,70	1,32	6,89
M14.232	<i>Lactobacillus plantarum</i>	nd	nd	nd	79,21	78,10	1,11	-
M28.243	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,02±0,3	1,39±0,4	0,31±0,1	79,15	76,55	-	2,60
M7.229	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	0,55±0,1	0,88±0,3	0,56±0,1	78,82	73,92	-	4,90
M28.244	<i>Weissella cibaria</i>	0,84±0,3	1,66±0,2	0,39±0,1	78,15	75,26	-	2,89
M3.29	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,79±0,1	0,93±0,1	0,38±0,0	77,73	69,17	3,64	4,91
M21.51	nd	0,44±0,1	1,01±0,7	0,71±0,2	77,45	76,10	-	1,35
M0.7	<i>Weissella cibaria</i>	1,13±0,1	0,78±0,2	0,27±0,0	75,65	61,17	4,83	9,65
M3.27	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,95±0,2	0,95±0,1	0,33±0,1	75,05	66,87	2,75	5,43
M1.12	<i>Weissella cibaria</i>	0,68±0,2	0,79±0,1	0,46±0,1	74,66	68,60	2,62	3,44
M7.37	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,57±0,0	0,82±0,1	0,53±0,0	72,98	54,32	15,40	3,26
M21.53	nd	0,62±0,3	0,67±0,0	0,56±0,3	70,51	67,31	3,20	-
M3.23	<i>Weissella cibaria</i>	0,94±0,3	1,00±0,1	0,34±0,1	70,49	58,40	3,29	8,80
M0.10	<i>Weissella cibaria</i>	0,79±0,3	0,89±0,1	0,42±0,2	69,05	52,44	11,83	4,78
M3.224	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0,59±0,1	0,36±0,1	0,51±0,1	68,98	61,26	2,30	5,42
M1.20	<i>Weissella confusa</i>	0,83±0,1	0,65±0,1	0,37±0,1	68,82	57,92	3,65	7,25
M3.221	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,79±0,3	0,51±0,4	0,40±0,1	68,37	59,84	3,66	4,87
M3.25	nd	0,91±0,2	0,90±0,1	0,34±0,1	68,14	62,58	2,58	2,98
M1.13	<i>Weissella cibaria</i>	1,16±0,0	0,87±0,0	0,26±0,0	66,80	52,62	3,68	10,50
M0.3	<i>Weissella cibaria</i>	0,83±0,0	0,79±0,0	0,36±0,0	66,21	64,69	1,52	-
M7.33	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,74±0,2	0,72±0,0	0,42±0,1	65,60	52,95	2,51	10,14
M1.220	nd	0,83±0,7	0,49±0,3	0,57±0,5	65,45	52,83	4,88	7,73
M3.222	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,89±0,4	0,41±0,3	0,37±0,2	64,28	55,67	3,37	5,24
M7.230	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0,68±0,1	0,91±0,4	0,45±0,1	61,83	56,16	3,74	1,93
M3.22	<i>Weissella cibaria</i>	1,00±0,3	0,91±0,1	0,31±0,1	61,27	52,20	4,00	5,07
M7.228	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,78±0,3	0,47±0,3	0,42±0,2	60,04	56,23	3,81	-
M7.36	<i>Weissella cibaria</i>	0,66±0,1	0,98±0,0	0,46±0,1	59,87	52,16	5,32	2,39

**Tabela 1 cont.** Cinética de crescimento e produtos da fermentação de bactérias lácticas da silagem de cana-de-açúcar em meio RSJ mantido à 37 °C, por 24 horas.

Isolado*	Identificação isolados	Parâmetros de crescimento			Ácidos Orgânicos* - mmol l <sup>-1</sup>			
		$\mu_{\text{máximo}}$ (h <sup>-1</sup> )	D.O. <sub>máx24hs</sub>	Tg <sub>(horas)</sub>	Total AOV	L	A	I
M28.246	nd	0,97±0,4	1,17±0,1	0,34±0,1	56,96	53,34	-	3,62
M0.2	<i>Weissella cibaria</i>	0,92±0,3	0,63±0,3	0,34±0,1	48,02	39,93	2,18	5,91
M28.62	nd	0,51±0,1	0,72±0,1	0,61±0,1	46,54	45,63	0,91	-
M1.218	<i>Weissella cibaria</i>	0,93±0,4	0,70±0,5	0,36±0,1	42,43	31,17	3,81	7,45
M0.215	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	0,73±0,3	0,33±0,2	0,44±0,2	39,72	29,04	3,27	7,41
M28.67	<i>Lactobacillus buchneri</i>	0,86±0,4	0,55±0,4	0,40±0,2	37,95	37,95	-	-
M1.216	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,68±0,5	0,57±0,6	1,19±0,8	36,40	36,40	-	-
M28.245	<i>Weissella cibaria</i>	0,43±0,3	1,34±0,4	0,84±0,5	33,75	27,16	6,59	-
M21.240	<i>Lactobacillus brevis</i>	0,96±0,2	0,86±0,3	0,32±0,1	26,69	26,69	-	-
M28.242	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,12±0,1	0,68±0,2	0,27±0,0	25,05	25,05	-	-
M21.58	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,68±0,1	0,75±0,3	0,45±0,1	21,86	18,24	2,43	1,19
M7.226	<i>Lactobacillus paracasei</i>	0,89±0,1	0,66±0,4	0,34±0,0	11,92	2,26	-	9,66
M21.60	nd	0,66±0,4	0,57±0,3	0,54±0,3	8,97	0,62	1,48	6,87
M7.227	nd	0,51±0,2	0,64±0,5	0,63±0,2	7,74	-	1,54	6,20
M7.31	nd	0,95±0,2	0,87±0,0	0,32±0,1	5,94	0,15	-	5,79
M0.213	<i>Weissella cibaria</i>	0,89±0,1	0,36±0,2	0,34±0,0	0,63	0,63	-	-
Média		0,72±0,2	0,75±0,2	0,51±0,2	77,06	70,82	3,67	5,66

\*Ácido láctico (L), ácido acético (A) e ácido isobutírico (I). nd= não determinado. M= meio MRS

As bactérias aeróbias produziram ácido succínico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico e ácido isobutírico com concentração média de 34,3±24,8, 47,2±11,6, 5,1±2,1, 7,7±2,5, 5,17±7,8 e 2,4±0,71 mmol l<sup>-1</sup>. Somente 50% dos isolados de bactérias aeróbias produziram ácido láctico, 72,5% succínico, 28,4% acético, 20,6% fórmico, 8,8% isobutírico e 7,8% propiônico (Tabela 2).

Bactérias aeróbias apresentaram em média velocidade específica de crescimento 28% maior do que as bactérias lácticas (Tabela 1 e 2). O isolado obtido M0.8 (*W. cibaria*) foi o que apresentou a maior velocidade de crescimento ( $\mu=1,2$  h<sup>-1</sup>) e menor tempo de geração (0,25 h) dentre todos os isolados (MRS e nutriente) (Tabela 1 e 2). Os isolados da espécie *W. cibaria* apresentaram os maiores valores de velocidade de crescimento, D.O. máxima e menores valores de Tg, com média de 0,81 h<sup>-1</sup>, 0,86 e 0,42 h, respectivamente. Comparando a cinética de crescimento dos isolados da espécie *W. cibaria* o isolado M1.13 foi o que apresentou os maiores valores de  $\mu$ , D.O máxima e menores valores de Tg ( $\mu=1,16$  h<sup>-1</sup>; D.O=0,87 nm; Tg=0,26 h) e o M28.245 os menores valores de  $\mu$ , D.O máxima e maiores valores de Tg ( $\mu=0,43$  h<sup>-1</sup>; D.O=1,34 nm; Tg=0,84 h) (Tabela 1). Do total de 102 isolados de bactérias aeróbias, 49 apresentaram valores de velocidade de crescimento acima de 1,0 h<sup>-1</sup>. O isolado *Comamonas testosteroni* (N3.100) foi o que apresentou os maiores valores de  $\mu$ , D.O máxima e Tg, com 1,76 h<sup>-1</sup>, 0,87 nm e 0,19 h, respectivamente (Tabela 2).

**Tabela 2.** Cinética de crescimento e produtos da fermentação de bactérias aeróbias da silagem de cana-de-açúcar em meio RSJ à 37 °C.

Isolado*	Identificação isolados	Parâmetros de crescimento			Ácidos Orgânicos* - mmol l <sup>-1</sup>						
		$\mu_{\text{máximo}} (\text{h}^{-1})$	D.O <sub>máx24hs</sub>	Tg <sub>(horas)</sub>	Total AOV	S	L	F	A	PP	I
N0.79	<i>Shigella flexneri</i>	1,51±0,0	0,95±0,0	0,20±0,0	81,52	-	69,28	-	12,24	-	-
N28.138	<i>Microbacterium saccharophilum</i>	0,89±0,3	1,14±0,2	0,36±0,1	81,47	57,00	-	-	-	24,47	-
N3.93	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,53±0,1	0,93±0,0	0,20±0,0	78,78	1,98	65,68	-	9,23	-	1,89
N28.132	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,54±0,1	0,89±0,4	0,58±0,1	72,13	67,48	-	4,65	-	-	-
N1.88	<i>Shigella flexneri</i>	1,28±0,2	0,88±0,0	0,24±0,0	71,70	2,54	53,42	-	12,95	-	2,79
N21.275	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,95±0,0	0,48±0,0	0,32±0,0	71,10	67,50	-	3,60	-	-	-
N14.270	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,59±0,0	0,52±0,0	0,51±0,0	71,05	67,60	-	3,45	-	-	-
N0.75	<i>Shigella flexneri</i>	1,35±0,2	0,88±0,0	0,23±0,0	69,79	-	64,20	-	5,59	-	-
N7.101	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,61±0,4	0,85±0,1	0,19±0,0	69,29	2,61	54,93	-	9,82	-	1,93
N7.264	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,60±0,1	0,62±0,0	0,69±0,0	68,95	68,95	-	-	-	-	-
N0.72	<i>Shigella flexneri</i>	1,24±0,3	0,90±0,0	0,25±0,1	68,90	-	61,43	-	7,47	-	-
N1.83	Nd	1,28±0,5	0,93±0,0	0,26±0,1	67,50	-	67,50	-	-	-	-
N0.77	<i>Shigella flexneri</i>	1,47±0,2	0,92±0,0	0,21±0,0	65,77	-	56,10	-	9,67	-	-
N28.278	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,70±0,0	0,45±0,1	0,43±0,0	65,51	61,81	-	3,70	-	-	-
N3.91	Nd	1,52±0,1	0,89±0,0	0,20±0,0	65,19	2,05	54,29	-	8,85	-	-
N3.95	<i>Comamonas testosteroni</i>	1,58±0,4	0,94±0,0	0,20±0,1	65,05	1,93	54,41	-	6,48	-	2,23
N14.266	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,06±0,1	0,66±0,0	0,28±0,0	64,67	64,67	-	-	-	-	-
N14.115	Nd	0,74±0,1	0,72±0,0	0,42±0,1	64,35	60,89	-	3,46	-	-	-
N1.90	<i>Shigella flexneri</i>	1,36±0,1	0,93±0,0	0,22±0,0	63,58	1,74	52,41	-	6,90	-	2,53
N1.89	Nd	1,50±0,3	0,87±0,0	0,20±0,0	63,40	1,68	52,49	-	9,23	-	-
N1.85	<i>Shigella flexneri</i>	1,28±0,2	0,94±0,0	0,24±0,0	63,24	-	63,24	-	-	-	-
N3.92	<i>Shigella flexneri</i>	1,38±0,0	0,94±0,0	0,22±0,0	62,90	1,75	53,05	-	8,10	-	-
N28.131	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,62±0,4	0,59±0,3	0,63±0,4	62,47	62,47	-	-	-	-	-

**Tabela 2 cont.** Cinética de crescimento e produtos da fermentação de bactérias aeróbias da silagem de cana-de-açúcar em meio RSJ à 37°C.

Isolado*	Identificação isolados	Parâmetros de crescimento				Ácidos Orgânicos* - mmol l <sup>-1</sup>					
		$\mu_{\text{máximo}} (\text{h}^{-1})$	D.O <sub>máx24hs</sub>	Tg <sub>(horas)</sub>	Total AOV	S	L	F	A	PP	I
N28.279	Nd	0,85±0,0	0,43±0,1	0,35±0,0	61,15	57,85	-	3,30	-	-	-
N21.125	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,08±0,1	0,41±0,0	0,28±0,0	61,11	58,28	-	2,83	-	-	-
N28.280	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0,90±0,0	0,44±0,0	0,33±0,0	60,55	57,83	-	2,72	-	-	-
N14.267	Nd	1,00±0,1	0,66±0,0	0,30±0,0	60,39	60,39	-	-	-	-	-
N3.96	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,43±0,3	0,91±0,0	0,21±0,0	59,66	1,87	50,91	-	6,88	-	-
N14.113	<i>Pantoea stewartii</i>	0,58±0,1	0,62±0,3	0,52±0,1	59,15	51,12	-	8,03	-	-	-
N14.111	<i>Pantoea dispersa</i>	0,91±0,1	0,62±0,0	0,33±0,0	59,12	45,75	-	10,38	-	2,99	-
N21.127	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	1,11±0,0	0,47±0,1	0,27±0,0	58,96	58,96	-	-	-	-	-
N1.87	<i>Shigella flexneri</i>	1,24±0,1	0,96±0,0	0,24±0,0	57,90	2,02	49,40	-	6,48	-	-
N21.126	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1,01±0,1	0,41±0,0	0,30±0,0	57,40	57,40	-	-	-	-	-
N7.104	Nd	1,41±0,1	0,88±0,0	0,21±0,0	57,28	1,94	49,31	-	6,03	-	-
N14.118	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	0,79±0,2	0,37±0,0	0,40±0,1	57,10	57,10	-	-	-	-	-
N21.273	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,89±0,0	0,53±0,0	0,34±0,0	56,84	56,84	-	-	-	-	-
N21.130	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,88±0,1	0,66±0,4	0,35±0,1	56,43	56,43	-	-	-	-	-
N0.80	<i>Shigella flexneri</i>	1,53±0,2	0,95±0,0	0,20±0,0	56,14	-	43,60	-	12,54	-	-
N14.116	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1,02±0,1	0,34±0,1	0,30±0,0	56,02	56,02	-	-	-	-	-
N3.259	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,97±0,0	0,37±0,0	0,31±0,0	55,44	-	55,44	-	-	-	-
N21.128	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,66±0,3	0,74±0,3	0,50±0,2	55,17	49,27	-	5,90	-	-	-
N0.249	Nd	1,03±0,0	0,39±0,0	0,29±0,0	55,12	-	55,12	-	-	-	-
N3.94	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,38±0,1	0,92±0,0	0,22±0,0	54,69	2,18	47,68	-	4,83	-	-
N7.102	<i>Comamonas testosteroni</i>	1,24±0,2	0,85±0,0	0,25±0,0	54,67	1,32	44,90	-	8,45	-	-
N14.114	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0,60±0,0	0,58±0,1	0,50±0,0	54,21	50,85	-	3,36	-	-	-
N7.109	Nd	1,11±0,1	0,89±0,0	0,27±0,0	53,53	48,79	-	4,74	-	-	-
N3.99	<i>Pantoea coffeiphila</i>	1,47±0,4	0,91±0,1	0,21±0,1	53,50	1,44	45,79	-	6,27	-	-
N14.120	<i>Pantoea dispersa</i>	0,69±0,0	0,69±0,4	0,44±0,0	53,25	53,25	-	-	-	-	-

**Tabela 2 cont.** Cinética de crescimento e produtos da fermentação de bactérias aeróbias da silagem de cana-de-açúcar em meio RSJ à 37°C.

Isolado*	Identificação isolados	Parâmetros de crescimento				Ácidos Orgânicos* - mmol l					
		$\mu_{\text{máximo}} (\text{h}^{-1})$	D.O <sub>máx24hs</sub>	Tg <sub>(horas)</sub>	Total AOV	S	L	F	A	PP	I
N21.124	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1,34±0,5	0,71±0,3	0,24±0,1	53,20	53,20	-	-	-	-	-
N14.268	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,95±0,1	0,63±0,0	0,32±0,0	52,33	52,33	-	-	-	-	-
N0.76	Nd	1,59±0,0	0,87±0,0	0,19±0,0	52,31	-	52,31	-	-	-	-
N14.119	<i>Pantoea septica</i>	0,68±0,4	0,64±0,4	0,54±0,3	52,21	52,21	-	-	-	-	-
N21.274	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	0,88±0,2	0,61±0,0	0,35±0,1	52,20	46,87	-	5,33	-	-	-
N14.112	<i>Pantoea stewartii</i>	0,97±0,1	0,43±0,0	0,31±0,0	51,83	48,82	-	3,01	-	-	-
N28.140	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	0,71±0,6	0,54±0,2	0,65±0,6	51,81	51,81	-	-	-	-	-
N7.110	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,32±0,3	0,91±0,0	0,24±0,1	51,79	44,32	-	5,73	-	1,74	-
N1.255	<i>Microbacterium arthrosphaerae</i>	0,29±0,3	0,37±0,2	1,75±0,1	51,52	-	51,52	-	-	-	-
N1.251	<i>Citrobacter braakii</i>	0,65±0,4	0,71±0,0	0,57±0,4	51,49	-	51,49	-	-	-	-
N0.78	<i>Shigella flexneri</i>	1,42±0,0	0,94±0,0	0,21±0,0	51,26	-	51,26	-	-	-	-
N21.122	Nd	0,61±0,5	0,62±0,4	0,68±0,5	50,79	50,79	-	-	-	-	-
N21.129	Nd	0,95±0,2	0,60±0,3	0,32±0,0	50,41	50,41	-	-	-	-	-
N0.250	Nd	0,24±0,2	0,69±0,4	1,68±0,2	50,02	-	50,02	-	-	-	-
N14.117	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0,42±0,3	0,62±0,2	0,97±0,7	49,87	49,87	-	-	-	-	-
N3.260	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,42±0,2	0,61±0,2	0,81±0,4	49,84	-	44,72	-	5,12	-	-
N28.134	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	0,82±0,3	0,83±0,6	0,39±0,2	49,50	49,50	-	-	-	-	-
N0.248	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,59±0,6	0,65±0,4	0,94±0,9	49,24	-	49,24	-	-	-	-
N3.258	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,91±0,4	0,33±0,0	0,37±0,2	48,93	-	48,93	-	-	-	-
N14.269	Nd	0,82±0,1	0,75±0,0	0,37±0,0	48,53	42,74	-	4,10	-	1,69	-
N3.100	<i>Comamonas testosteroni</i>	1,76±0,8	0,87±0,1	0,19±0,1	48,48	2,35	31,61	-	11,51	-	3,01
N28.136	Nd	0,61±0,2	0,39±0,1	0,53±0,2	48,44	48,44	-	-	-	-	-
N1.82	<i>Comamonas testosteroni</i>	1,40±0,5	0,93±0,0	0,23±0,1	48,04	-	48,04	-	-	-	-
N0.247	Nd	0,57±0,6	0,63±0,3	1,01±0,9	48,01	-	48,01	-	-	-	-
N3.256	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,11±0,9	0,52±0,1	0,39±0,3	47,88	-	47,88	-	-	-	-

**Tabela 2 cont.** Cinética de crescimento e produtos da fermentação de bactérias aeróbias da silagem de cana-de-açúcar em meio RSJ à 37°C.

Isolado*	Identificação isolados	Parâmetros de crescimento				Ácidos Orgânicos* - mmol l					
		$\mu_{\text{máximo}} (\text{h}^{-1})$	D.O <sub>máx24hs</sub>	Tg <sub>(horas)</sub>	Total AOV	S	L	F	A	PP	I
N7.103	<i>Comamonas testosteroni</i>	0,52±0,1	0,44±0,1	0,58±0,1	47,41	1,53	39,10	-	6,78	-	-
N28.137	<i>Microbacterium radiodurans</i>	0,74±0,6	0,59±0,3	0,56±0,4	47,18	47,18	-	-	-	-	-
N7.263	<i>Citrobacter braakii</i>	0,67±0,4	0,65±0,3	0,49±0,5	47,14	47,14	-	-	-	-	-
N7.106	<i>Pantoea coffeiphila</i>	1,36±0,3	0,89±0,3	0,23±0,0	46,79	2,09	36,60	-	8,10	-	-
N1.81	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,41±0,2	0,95±0,0	0,22±0,0	46,31	-	46,31	-	-	-	-
N1.86	<i>Shigella flexneri</i>	1,51±0,0	0,67±0,1	0,20±0,0	46,29	1,07	40,43	-	4,79	-	-
N3.97	<i>Pseudomonas geniculata</i>	1,26±0,1	0,96±0,0	0,24±0,0	46,28	1,16	40,97	-	4,15	-	-
N28.139	<i>Microbacterium radiodurans</i>	0,89±0,4	0,43±0,0	0,37±0,2	44,41	44,41	-	-	-	-	-
N28.133	Nd	0,47±0,1	0,75±0,4	0,67±0,2	44,28	44,28	-	-	-	-	-
N7.262	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,82±0,3	0,67±0,1	0,38±0,2	43,99	43,99	-	-	-	-	-
N7.107	<i>Comamonas sp.</i>	1,40±0,5	0,88±0,0	0,23±0,1	43,60	1,27	38,36	-	3,97	-	-
N21.121	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0,66±0,5	0,43±0,1	0,61±0,5	43,34	43,34	-	-	-	-	-
N.071	<i>Shigella flexneri</i>	1,33±0,5	0,92±0,0	0,24±0,1	42,86	-	42,86	-	-	-	-
N7.105	Nd	1,39±0,0	0,87±0,0	0,22±0,0	42,58	1,29	39,64	-	-	-	1,65
N1.254	<i>Citrobacter braakii</i>	1,03±0,2	0,62±0,0	0,30±0,1	41,92	-	41,92	-	-	-	-
N0.246	<i>Lactobacillus casei</i>	0,61±0,6	0,33±0,1	1,05±0,8	40,08	-	40,08	-	-	-	-
N3.257	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,98±0,2	0,62±0,3	0,31±0,1	38,82	-	38,82	-	-	-	-
N1.253	<i>Enterococcus gallinarum</i>	0,96±0,4	0,49±0,0	0,34±0,1	37,82	-	33,23	-	4,59	-	-
N1.252	<i>Citrobacter braakii</i>	0,56±0,1	0,44±0,1	0,54±0,1	36,51	-	36,51	-	-	-	-
N21.271	Nd	0,84±0,0	0,49±0,0	0,36±0,0	35,99	25,88	-	6,91	-	3,20	-
N7.108	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,25±0,3	0,92±0,0	0,25±0,0	31,75	21,77	-	8,21	-	1,77	-
N0.73	Nd	1,32±0,3	0,85±0,0	0,23±0,1	31,68	-	30,01	-	-	-	1,67
N21.272	<i>Pseudomonas putida</i>	0,86±0,1	0,49±0,0	0,35±0,0	28,78	18,18	-	7,67	-	2,93	-
N28.276	Nd	0,23±0,0	0,62±0,0	1,32±0,0	27,29	27,29	-	-	-	-	-
N7.261	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,15±0,1	0,92±0,3	0,26±0,1	26,77	17,34	-	6,84	-	2,59	-

**Tabela 2 cont.** Cinética de crescimento e produtos da fermentação de bactérias aeróbias da silagem de cana-de-açúcar em meio RSJ à 37°C.

Isolado*	Identificação isolados	Parâmetros de crescimento				Ácidos Orgânicos* - mmol l					
		$\mu_{\text{máximo}} (\text{h}^{-1})$	$\text{D.O}_{\text{máx24hs}}$	$\text{Tg}_{(\text{horas})}$	Total AOV	S	L	F	A	PP	I
N3.98	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1,33±0,2	0,97±0,1	0,23±0,0	25,16	1,76	11,31	-	8,29	-	3,80
N0.74	<i>Shigella flexneri</i>	1,33±0,4	0,87±0,0	0,24±0,1	19,69	1,60	9,71	-	8,38	-	-
N21.123	Nd	0,36±0,1	0,57±0,4	0,87±0,3	18,93	18,93	-	-	-	-	-
N28.135	Nd	0,42±0,1	0,87±0,2	0,74±0,2	7,83	7,83	-	-	-	-	-
Média		1,00±0,2	0,70±0,1	0,41±0,3	52,40	34,39	47,17	5,14	7,71	5,17	2,39

\*Ácido succínico (S), láctico (L), ácido fórmico (F) ácido acético (A), ácido propiônico (PP) e ácido isobutírico (I). nd= não determinado. N= meio nutriente

Quando os isolados obtidos de silagem de cana-de-açúcar (n=204) foram avaliados quanto à produção de agentes antimicrobianos, 66 culturas apresentaram atividade inibitória contra *L. monocytogenes*, sendo 60 culturas de bactérias lácticas e seis isolados de bactérias aeróbias (Tabela 3). Os isolados obtidos no meio MRS que apresentaram atividade antibacteriana contra *L. monocytogenes* também foram testados contra outros dois indicadores, *E. coli* e *B. subtilis* (Tabela 3). Desses 60 isolados, 55% apresentaram atividade inibitória contra *E. coli*, e 73% contra *B. subtilis*. Dezoito isolados apresentaram atividade contra os três indicadores testados, sendo a maioria culturas de *W. cibaria*, *P. pentosaceus* e *L. plantarum*. (Tabela 3).

**Tabela 3.** Atividade antagonista\* de bactérias lácticas isoladas da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias. O método utilizado para avaliar a capacidade inibitória dos isolados foi o de difusão em ágar, utilizando o MRS como meio base e BHI semi-sólido (0,8% p/v) na sobrecamada. As placas foram incubadas a 37 °C por até 48 h. A inibição foi considerada a partir do tamanho do raio a partir da extremidade da colônia.

Isolado	Identificação isolados	Indicadores		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
M0.1	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-
M0.2	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-
M0.3	<i>Weissella cibaria</i>	+	-	-
M0.4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-
M0.5	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	-	-	-
M0.6	<i>Weissella cibaria</i>	+++	+++	+++
M0.7	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-
M0.8	<i>Weissella cibaria</i>	+++	-	++
M0.9	<i>Weissella cibaria</i>	+++	-	-
M0.10	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-
M0.211	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	-
M0.212	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+
M0.213	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-
M0.214	Nd	-	-	-
M0.215	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	-	-	-
M1.11	<i>Weissella cibaria</i>	++	++	+++
M1.12	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-
M1.13	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	+
M1.14	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-
M1.15	<i>Weissella cibaria</i>	+++	-	-
M1.16	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-
M1.17	Nd	+++	-	++
M1.18	<i>Weissella cibaria</i>	++	-	-
M1.19	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-
M1.20	<i>Weissella confusa</i>	-	-	-
M1.216	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-
M1.217	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-
M1.218	<i>Weissella cibaria</i>	+	+++	+
M1.219	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	+++	-
M1.220	Nd	-	-	+++
M3.21	<i>Weissella cibaria</i>	+++	+++	++
M3.22	<i>Weissella cibaria</i>	++	++	+++
M3.23	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	++
M3.24	Nd	-	-	-
M3.25	Nd	-	-	+++
M3.26	<i>Weissella cibaria</i>	++	+++	+

**Tabela 3 cont.** Atividade antagonista\* de bactérias lácticas isoladas da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias. O método utilizado para avaliar a capacidade inibitória dos isolados foi o de difusão em ágar, utilizando o MRS como meio base e BHI semi-sólido (0,8% p/v) na sobrecamada. As placas foram incubadas a 37 °C por até 48 h. A inibição foi considerada a partir do tamanho do raio a partir da extremidade da colônia.

M3.27	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	+	-
M3.29	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	++	+++
M3.30	<i>Lactobacillus brevis</i>	-	+	+++
M3.221	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+++	-	+
M3.222	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-
M3.223	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+++	-	+++
M3.224	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	++	+	++
M3.225	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-
M7.31	nd	-	+	-
M7.32	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	+++
M7.33	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-	-
M7.34	<i>Weissella cibaria</i>	+	+++	+++
M7.35	<i>Weissella cibaria</i>	-	+	-
M7.36	<i>Weissella cibaria</i>	++	-	+++
M7.37	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	+++	+
M7.38	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-
M7.39	nd	++	-	-
M7.40	<i>Weissella cibaria</i>	++	+++	+++
M7.226	<i>Lactobacillus paracasei</i>	-	+++	-
M7.227	nd	-	-	-
M7.228	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-
M7.229	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	++	+++	-
M7.230	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+++	+++	+
M14.41	nd	+++	+++	++
M14.42	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-
M14.43	<i>Pediococcus acidilactici</i>	++	++	+++
M14.44	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	-
M14.45	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-
M14.46	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	++	+++
M14.47	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-
M14.48	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-
M14.49	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	++	+++
M14.50	<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	-	+++
M14.231	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++	+++	-
M14.232	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++	+++	-
M14.233	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	+++
M14.234	nd	++	-	+++
M14.235	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++	+	-
M21.51	nd	++	-	-
M21.52	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++	-	+++
M21.53	nd	-	-	-
M21.54	nd	-	-	-
M21.55	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++	-	+++
M21.56	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++	-	+
M21.57	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++	-	-
M21.58	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++	+	+
M21.59	<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	+++	+++
M21.60	nd	+++	+	+++
M21.236	<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	-	+++
M21.237	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	-	-	+++
M21.238	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-
M21.239	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++	+	+++
M21.240	<i>Lactobacillus brevis</i>	-	-	-
M28.61	Nd	-	-	-
M28.62	Nd	-	-	-
M28.63	<i>Bacillus smithii</i>	-	-	-
M28.64	<i>Lactobacillus brevis</i>	-	-	-
M28.66	Nd	-	-	-
M28.67	<i>Lactobacillus buchneri</i>	-	-	-

**Tabela 3 cont.** Atividade antagonista\* de bactérias lácticas isoladas da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias. O método utilizado para avaliar a capacidade inibitória dos isolados foi o de difusão em ágar, utilizando o MRS como meio base e BHI semi-sólido (0,8% p/v) na sobrecamada. As placas foram incubadas a 37 °C por até 48 h. A inibição foi considerada a partir do tamanho do raio a partir da extremidade da colônia.

M28.68	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	-	-	-
M28.69	<i>Lactococcus lactis</i>	-	-	-
M28.241	Nd	-	-	-
M28.242	<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	+	+++
M28.243	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-
M28.244	<i>Weissella cibaria</i>	++	++	+++
M28.245	<i>Weissella cibaria</i>	++	+	+++
M28.246	Nd	++	-	++
N1.82	<i>Comamonas testosteroni</i>	+	Nd	nd
N14.113	<i>Pantoea stewartii</i>	+	Nd	nd
N3.259	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	++	Nd	nd
N14.268	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	Nd	nd
N21.272	<i>Pseudomonas Putida</i>	+	Nd	nd
N21.275	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	++	Nd	nd

\*Os valores de atividade estão representados em raio.

Tamanho do raio de inibição + ( $\leq 3.0$  mm); ++ ( $>3.0 \leq 5.0$  mm) e +++ ( $> 5.0$  mm).

Dos 60 isolados de BAL com atividade antimicrobiana, 36 foram selecionados, por apresentarem atividade contra os três indicadores testados ou contra somente um único indicador. A atividade inibitória no sobrenadante dessas culturas e a presença de genes de biossíntese de lantibióticos foi investigado nesses isolados. Nenhum dos isolados selecionados apresentou atividade no sobrenadante contra os indicadores testados. A análise molecular de genes envolvidos na biossíntese de lantibióticos indicou nove isolados positivos para o gene *lanB*, 4 com amplificação positiva para o gene *lanC* e sete positivos para *lanM* (Tabela 4). Em alguns isolados foi observada a amplificação para mais de um gene de biossíntese de lantibióticos. No isolado M1.218 (*W. cibaria*) observou-se a amplificação dos genes *lanC* e *lanM* e no isolado M14.43 (*P. acidilactici*) foram detectados os genes *lanB* e *lanM* (Tabela 4). Nenhum dos isolados apresentou simultaneamente os genes *lanB* e *lanC* ou os três genes investigados.

**Tabela 4.** Prospecção molecular de genes de modificação de lantibióticos, *LanB*, *LanC* e *LanM*, em isolados de bactérias do ácido láctico obtidos de diferentes períodos de fermentação da silagem de cana-de-açúcar.

Isolados	Identificação	Tempo (dias)	Lantibióticos		
			LanB	LanC	LanM
M3	<i>Weissella cibaria</i>	0	-	-	-
M6	<i>Weissella cibaria</i>		-	-	-
M9	<i>Weissella cibaria</i>		-	-	-
M212	<i>Lactobacillus plantarum</i>		+		
M11	<i>Weissella cibaria</i>	1	-	-	-
M13	<i>Weissella cibaria</i>		-	-	-
M15	<i>Weissella cibaria</i>		-	-	-
M18	<i>Weissella cibaria</i>		-	-	-
M218	<i>Weissella cibaria</i>		-	+	+
M220	Nd		-	-	-
M21	<i>Weissella cibaria</i>	3	-	-	+
M22	<i>Weissella cibaria</i>		-	-	-
M23	<i>Weissella cibaria</i>		-	-	-
M25	Nd		-	-	-
M26	<i>Weissella cibaria</i>		-	-	-
M224	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		-	-	+
M32	<i>Weissella cibaria</i>	7	-	-	-
M34	<i>Weissella cibaria</i>		-	-	-
M36	<i>Weissella cibaria</i>		-	-	+
M40	<i>Weissella cibaria</i>		-	-	+
M230	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		-	-	+
M41	Nd	14	-	-	-
M43	<i>Pediococcus acidilactici</i>		+	-	+
M44	<i>Lactobacillus plantarum</i>		-	-	-
M233	<i>Lactobacillus plantarum</i>		+	-	-
M235	<i>Lactobacillus plantarum</i>		+	-	-
M51	Nd	21	-	-	-
M57	<i>Lactobacillus plantarum</i>		-	+	-
M58	<i>Lactobacillus plantarum</i>		-	+	-
M59	<i>Lactobacillus plantarum</i>		+	-	-
M60	Nd		+	-	-
M237	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>		+	-	-
M239	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	-	
M242	<i>Lactobacillus plantarum</i>	28	+	-	-
M244	<i>Weissella cibaria</i>		-	+	-
M245	<i>Weissella cibaria</i>		-	-	-

(+) presença do gene de lantibiótico; (-) ausência do gene de lantibiótico; nd= não determinado

## Discussão

A microbiota de culturas forrageiras é consideravelmente diferente daquela encontrada durante o processo de fermentação da silagem. No nosso trabalho, foram observadas diferenças tanto na composição da microbiota epifítica com a encontrada durante o processo fermentativo, quanto na abundância das espécies nos diferentes

períodos de fermentação (Figura 2). Na cana *in natura* foram identificados nove espécies bacterianas diferentes, incluindo *W. cibaria*, *L. pseudomesenteroides*, *L. mesenteroides*, *L. holzapfelii*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. casei*, *S. flexneri* e *S. maltophilia* (Figura 2).

Estudos sobre a diversidade microbiana em silagens de clima tropical são raros e dados sobre a sucessão bacteriana, principalmente da microbiota epífita em silagem de cana-de-açúcar é escasso. Além disso, divergências dos resultados já reportados na literatura são comuns uma vez que a microbiota na silagem pode variar devido a vários fatores, como o tipo de forragem usado, práticas de ensilagem empregada e aplicação de inoculantes químicos ou microbiológicos (Santos *et al.*, 2015). Devido à falta de informações a respeito da sucessão microbiana em silagem de cana-de-açúcar, esse estudo representa o primeiro relato da descrição do perfil bacteriano do processo fermentativo da silagem de cana-de-açúcar (Figura 2). No início da fermentação espécies do gênero *Weissella* dominaram a fermentação, sendo posteriormente substituídos por *Leuconostoc* e *Pediococcus*, e, em seguida, por *Lactobacillus*. No último período de fermentação foi observado a presença de *Lactococcus*. A sucessão de bactérias aeróbias iniciou-se com predominância da espécie *Shigella flexneri*, que foi substituída após o terceiro dia de fermentação pela espécie *Stenotrophomonas maltophilia*, que se manteve até o final da amostragem. Na transição entre *Shigella* e *Stenotrophomonas* foi observada a presença de espécies de *Comamonas* e *Citrobacter* e no final da fermentação a presença de *Staphylococcus*.

Existem relatos de que a fase inicial da fermentação é dominada por bactérias do gênero *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Pediococcus*. Em seguida, observa-se a predominância do gênero *Leuconostoc* que, posteriormente, é substituído por bactérias resistentes às condições ácidas, como *Lactobacillus* e *Pediococcus* na fase final da fermentação da silagem. (McDonald *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1992; Hammes e Hertel 2006). Segundo Oude Elferink e colaboradores (2001), à medida que a fermentação progride as bactérias do gênero *Lactobacillus* perdem a viabilidade e algumas espécies mais resistentes, como *L. buchneri*, permanecem presentes em números mais reduzidos na população. Os microrganismos ácido-tolerante sobrevivem a esta fase em estado de inatividade ou como esporos (Oude Elferink *et al.*, 2015).

A espécie *W. cibaria* foi a mais abundante na cana *in natura*. Bactérias dessa espécie são Gram-positivas, bastonetes curtos, crescem em pares, não móveis, catalase negativo, colônia pequena na cor branco acinzentado e heterofermentativo produzindo CO<sub>2</sub> a partir de glicose. Sintetiza os isômeros ácidos D- e L-láctico, cresce às

temperaturas de 15, 37 e 45 °C e produz um limo a partir de sacarose. São capazes de crescer em até 6,5% de NaCl e fermenta L-arabinose, D-xilose, glicose, frutose, manose, N- acetilglucosamina, salicina, celobiose, maltose, sacarose e gentiobiose (Björkroth *et al.*, 2002).

Esse estudo é o primeiro relato da presença da espécie *W. cibaria* em silagem de cana-de-açúcar, bem como a sua importância na acidificação da forragem. Em estudos anteriores, realizados com silagem de milho, foram identificadas espécies do gênero *Weissella* que desempenhavam um papel importante na primeira fase de fermentação da silagem (Dellaglio *et al.*, 1984; Dellaglio e Torriani 1986). Santos e colaboradores (2015) relataram a presença de isolados do gênero *Weissella* em silagem de milho a partir do 10º dia até o final da fermentação (90 dias). Até o momento, a única espécie deste gênero isolada a partir da cana-de-açúcar foi a espécie *W. confusa* (Hammes and Hertel 2006), que também foi isolada neste estudo no primeiro dia de fermentação (Tabela S2). Brusetti e colaboradores (2006) avaliaram BAL em silagem de milho ao longo de um período de fermentação de 30 dias e observaram que *W. confusa* foi uma das espécies mais prevalentes na silagem e estiveram presentes durante todo o processo de fermentação.

O grupo de enterobactérias representa o segundo grupo bacteriano mais abundante durante a ensilagem, sendo importante devido à competição com BAL e produção de ácido acético. Enterobactérias também são importantes na redução de NO<sub>3</sub>, resultando na produção de nitritos e de gases (óxidos de nitrogênio) (Pahlow *et al.*, 2003). Segundo Henderson (1993) várias espécies da família *Enterobacteriaceae* foram encontradas em estudos com silagem. Os principais gêneros relatados nas silagens foram *Escherichia*, *Klebsiela*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Proteus* e *Enterobacter* (Henderson 1993; Li e Nishino 2011).

A manutenção da qualidade nutricional da forrageira após o processo de ensilagem depende da presença de espécies microbianas benéficas, como as BALs, que se mantêm viáveis durante o processo fermentativo e da velocidade de acidificação do meio. O aumento elevado da população de BAL no primeiro dia de fermentação pode explicar a redução do pH para 3,7 (Figura 1). A rápida acidificação do meio no início da fermentação é necessário para a produção de uma boa silagem (Harris 1984). A acidificação da silagem ocorre devido à alta concentração de ácidos orgânicos produzidos pelas BAL e a baixa capacidade de tamponamento da cana-de-açúcar (Alli *et al.*, 1982; Santos *et al.*, 2008; Evangelista *et al.*, 2009). O ácido orgânico que deve estar em maior proporção em uma silagem é o ácido láctico, devido à sua maior

eficiência em baixar o pH rapidamente (Cruz *et al.*, 2001). Em consequência da elevada acidez, após o terceiro dia de fermentação, observou-se à perda de viabilidade das espécies mais sensíveis, permanecendo as espécies ácido-tolerantes (Oude Elferink *et al.*, 2001).

No agrupamento filogenético, os gêneros *Weissella* e o *Leuconostoc* foram agrupados em um mesmo cluster indicando o compartilhamento de ancestral comum. O gênero *Weissella* surgiu da reclassificação do gênero *Leuconostoc*, com base em estudos moleculares do gênero (Björkroth *et al.*, 2002). *W. cibaria* (M1.14) foi a espécie que produziu as maiores concentrações de ácidos orgânicos dentre todos os isolados de BAL, com concentração total de AOV de 116,11 mmol l<sup>-1</sup>, predominando ácido láctico, acético e propiônico com concentrações de 101,4, 5,3 e 9,4 mmol l<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 1). Além do ácido láctico, a produção dos ácidos acético e propiônico são de extrema importância para manutenção da qualidade da silagem, uma vez que, vários estudos relataram que esses ácidos contribuem para reduzir o crescimento de leveduras e aumentar a estabilidade aeróbia da silagem (Ranjit e Kung 2000; Oude Elferink *et al.*, 2001; Filya *et al.*, 2006). Esse resultado justifica a acidificação rápida da silagem no primeiro dia de fermentação, uma vez que *W. cibaria* foi encontrada em maior abundância na cana *in natura*, produzir elevadas concentrações de AOV e possuir alta velocidade de crescimento (valores médios  $\geq 1,0$  h<sup>-1</sup>).

É possível que as interações entre as diferentes espécies e isolados de BAL no seu ambiente natural sejam influenciadas por substâncias antimicrobianas, tais como bacteriocinas. A produção de substâncias antimicrobianas podem fornecer vantagens competitivas para o desenvolvimento de populações bacterianas na silagem. Neste estudo, foram obtidas 69 isolados (BAL e aeróbios) que apresentaram atividade contra *L. monocytogenes*. Do total de isolados de BAL (n=60) 22% apresentaram inibição contra os três indicadores testados. Em estudo onde se investigou a produção de bacteriocinas por lactobacilos de origem vegetal, Rammelsberg e Radler (1990) constataram que cerca de 15% dos isolados apresentaram resultados positivos para os testes de inibição direta em ágar. No entanto, Schillinger e Lucke (1989) demonstraram que a maioria dos lactobacilos com atividade inibitória em meio sólido não secreta compostos antibacterianos em meios líquidos. Esta observação foi confirmada pelos resultados do ensaio de difusão utilizando sobrenadantes livres de células dos isolados obtidos neste estudo. Dos 36 isolados de BAL que apresentaram atividade antimicrobiana, nenhum mostrou atividade em meio líquido, corroborando com as observações de Schillinger e Lucke (1989).

Todos os isolados que amplificaram pelo menos um gene envolvido na biossíntese de lantibiótico apresentaram atividade *in vitro*. Os isolados que amplificaram *lanM*, foram os que apresentaram maior atividade inibitória contra os indicadores testados. Esse resultado sugere a produção de lantibióticos da classe II que são modificados pós-traducionalmente pela enzima bifuncional LanM (Willey and Van der Donk 2007). Os genes *lanB* e *lanC* podem ser substituídos pelo gene *lanM*, que apresenta certa homologia com *lanC* e possui a capacidade de realizar tanto as reações de desidratação dos aminoácidos quanto a reação de ciclização dos peptídeos (Field *et al.*, 2010). Outra observação interessante é que todos os isolados que apresentaram atividade inibitória somente contra *Bacillus subtilis* amplificaram somente o gene *lanB*. As estirpes dos gêneros *Weissella* e *Pediococcus* apresentaram atividade inibitória e a presença de pelo menos um gene de biossíntese de lantibióticos (*lanB*, *lanC* e *lanM*). Em dezesseis isolados foi identificada a presença de pelo menos um dos genes de modificação, sugerindo que esses isolados são potenciais produtores de lantibióticos, conforme conclusão de Hyink e colaboradores (2007) e Wirawan e colaboradores (2006). Os genes *lanB* e *lanC* não foram identificados conjuntamente em nenhum dos isolados obtidos, entretanto, esses genes estão frequentemente localizados dentro do mesmo operon nos isolados produtores de lantibióticos (Wirawan *et al.*, 2006; Hyink *et al.*, 2007).

A mais nova abordagem para determinar a identidade de novas bacteriocinas encontradas é o teste aleatório por PCR com iniciadores dirigidos contra um ou mais bacteriocinas suspeitas (Akçelik *et al.*, 2006; Remiger *et al.*, 1996). Knoll e colaboradores (Knoll *et al.*, 2008) empregaram o uso de múltiplos alvos de genes relacionados com bacteriocinas na caracterização de bactérias lácticas isoladas a partir da fermentação de vinhos e de milho. Ambos os grupos utilizaram iniciadores de reação em cadeia da polimerase (PCR) para mais de 20 genes de bacteriocinas agrupados em 5 operons diferentes em *Lactobacillus plantarum*. Os diversos genes codificam bacteriocina e proteínas de imunidade, sistemas de transporte ABC, os sistemas de transdução de sinal e os outros de função desconhecida envolvido com a síntese da bacteriocina. Yi e colaboradores (2010) usou a PCR de colônia para facilitar a triagem de colônias produtoras de bacteriocinas da classe IIa produzidas por BAL. Eles utilizaram iniciadores degenerados com base nas regiões conservadas N-terminal encontradas em muitas bacteriocinas de classe IIa e os iniciadores a *downstream* para realizar reações de PCR específicas, resultando em *amplicons* específicos para pediocina, enterocina e plantaricina (Yi *et al.*, 2010). O nosso estudo foi o primeiro a

reportar o isolamento de culturas bacteriocinogênicas e a prospecção molecular de genes relacionados com a biossíntese de lantibióticos em silagem de cana-de-açúcar.

Diante dos resultados apresentados, conclui-se que o perfil da diversidade bacteriana foi alterado ao longo do período de fermentação e que a população de bactérias do ácido láctico esteve em maior número comparado aos outros grupos de bactérias analisados, sendo responsáveis pelo processo fermentativo da cana-de-açúcar. Além disso, o perfil fermentativo dos isolados da silagem de cana-de-açúcar foi determinado, mostrando que algumas espécies de BAL, como *W. cibaria* possui características que podem contribuir para uma boa fermentação da silagem. A prospecção de isolados com atividade antimicrobiana indicou que genes envolvidos na biossíntese de lantibióticos estão distribuídos em BAL isoladas da silagem e podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana desses isolados. Experimentos adicionais deverão ser realizados para avaliar se os genes identificados são expressos nesses isolados nas condições da ensilagem da cana-de-açúcar.

## Referências

- Akçelik O, Tükel C, Ozcengiz G, Akçelik M (2006) Characterization of bacteriocins from two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates. *Mol Nutr Food Res* 50:306–13. doi: 10.1002/mnfr.200500172
- Ávila CL da S, Pinto JC, Sugawara MS, Michele, Silva S da, Schwan e RF (2008) Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. *Acta Sci Anim Sci* 30:255–261. doi: 10.4025/actascianimsci.v30i3.1564
- Ávila CL da S, Valeriano AR, Pinto JC, Henrique, Figueiredo CP, Rezende AV de, Schwan RF (2010) Chemical and microbiological characteristics of sugar cane silages treated with microbial inoculants. *Rev Bras Zootec* 39:25–32.
- Balieiro-Neto G, Junior EF, Nogueira JR, Possenti R (2009) e digestibilidade aparente de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químico e microbiano. *Pesqui Agropecuária Bras bra* 44:621–630.
- Björkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, Korkeala HJ, Vandamme P (2002) Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:141–148. doi: 10.1099/00207713-52-1-141
- Bolsen KK, Dickerson JT, Brent BE, Sonon RN, Dalke BS, Lin C, Boyer JE (1993) Rate and Extent of Top Spoilage Losses in Horizontal Silos. *J Dairy Sci* 76:2940–2962. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77634-1
- Bravo-Martins CEC, Carneiro H, Castro-Gómez RJH, Figueiredo HCP, Schwan RF (2006) Chemical and microbiological evaluation of ensiled sugar cane with different additives. *Brazilian J Microbiol* 37:499–504. doi: 10.1590/S1517-83822006000400018
- Brusetti L, Borin S, Mora D, Rizzi A, Raddadi N, Sorlini C, Daffonchio D (2006) Usefulness of length heterogeneity-PCR for monitoring lactic acid bacteria succession during maize ensiling. *FEMS Microbiol Ecol* 56:154–164.
- Cai Y, Benno Y, Ogawa M, Kumai S (1999) Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. *J Dairy Sci* 82:520–6. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75263-X
- Castresana J (2000) Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Mol Biol Evol* 17:540–552. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334
- Dellaglio F, Torriani S (1986) DNA-DNA homology, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria isolated from maize silage. *J Appl Bacteriol* 60:83–92. doi: 10.1111/j.1365-2672.1986.tb03363.x
- Dellaglio F, Vescovo M, Morelli L, Torriani S (1984) Lactic Acid Bacteria in Ensiled High-Moisture Corn Grain: Physiological and Genetic Characterization. *Syst Appl Microbiol* 5:534–544. doi: 10.1016/S0723-2020(84)80011-9
- Ennahar S, Cai Y, Fujita Y (2003) Phylogenetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Paddy Rice Silage as Determined by 16S Ribosomal DNA Analysis. *Appl Environ Microbiol* 69:444–451. doi: 10.1128/AEM.69.1.444-451.2003
- Ferreira DA, Gonçalves LC, Molina LR, Neto AGC, Tomich TR (2007) Características de fermentação da silagem de cana-de-açúcar tratada com uréia, zeólita, inoculante bacteriano e inoculante bacteriano/enzimático. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec* 59:423–433.
- Field D, Hill C, Cotter PD, Ross RP (2010) The dawning of a “Golden era” in lantibiotic bioengineering. *Mol Microbiol* 78:1077–87. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07406.x
- Filya I, Sucu E, Karabulut A (2006) The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic

- stability and ruminal degradability of maize silage. *J Appl Microbiol* 101:1216–23. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03038.x
- Giraffa G, Chanishvili N, Widyastuti Y (2010) Importance of *Lactobacilli* in food and feed biotechnology. *Res Microbiol* 161:480–7. doi: 10.1016/j.resmic.2010.03.001
- Gollop N, Zakin V, Weinberg ZG (2005) Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *J Appl Microbiol* 98:662–6. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02504.x
- Hammes WP, Hertel C (2006) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The prokaryotes*.
- Henderson N (1993) Silage additives. *Anim Feed Sci Technol* 45:35–56. doi: 10.1016/0377-8401(93)90070-Z
- Holzer M, Mayrhuber E, Danner H, Braun R (2003) The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol* 21:282–287. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00106-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00106-9)
- Hyink O, Wescombe PA, Upton M, Ragland N, Burton JP, Tagg JR (2007) Salivaricin A2 and the novel lantibiotic salivaricin B are encoded at adjacent loci on a 190-kilobase transmissible megaplasmid in the oral probiotic strain *Streptococcus salivarius* K12. *Appl Environ Microbiol* 73:1107–13. doi: 10.1128/AEM.02265-06
- Knoll C, Divol B, du Toit M (2008) Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. *Food Microbiol* 25:983–91. doi: 10.1016/j.fm.2008.06.010
- Kung L, Taylor CC, Lynch MP, Neylon JM (2003) The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 86:336–43. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73611-X
- Li Y, Nishino N (2011) Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. *Grassl Sci* 57:184–191. doi: 10.1111/j.1744-697X.2011.00226.x
- Lin C, Bolsen KK, Brent BE, Fung DYC (1992) Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *J Appl Bacteriol* 73:375–387.
- Lindgren S, Pettersson K, Kaspersson A, Jonsson A, Lingvall P (1985) Microbial dynamics during aerobic deterioration of silages. *J Sci Food Agric* 36:765–774.
- Maeda EM, Zeoula LM, Jobim CC, Bertaglia F, Jonker RC, Geron LJV, Henrique DS (2011) Chemical composition, fermentation, in vitro digestibility and in situ degradability of sugar cane silages with *Lactobacillus*, urea and agricultural byproduct. *Rev Bras Zootec* 40:2866–2877. doi: 10.1590/S1516-35982011001200034
- McDonald P, Henderson A, Heron S (1991) *The Biochemistry of Silage*, Chalcombe.
- Nishino N, Wada H, Yoshida M, Shiota H (2004) Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J Dairy Sci* 87:2563–70. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73381-0
- Oude Elferink SJ, Krooneman J, Gottschal JC, Spoelstra SF, Faber F, Driehuis F (2001) Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl Environ Microbiol* 67:125–32. doi: 10.1128/AEM.67.1.125-132.2001
- Oude Elferink SJWH, Driehuis F, Gottschal JC, Spoelstra SF (2015) Paper 2.0: Silage fermentation processes and their manipulation. In: <http://www.fao.org/docrep/005/x8486e/x8486e09.htm>. <http://www.fao.org/docrep/005/x8486e/x8486e09.htm>. Accessed 29 Dec 2015
- Pahlow G, Muck R, Driehuis F, Elferink S, Spoelstra S (2003) Microbiology of ensiling. *Silage Sci Technol* 31–94. doi: 10.2134/agronmonogr42.c2
- Pate FM, Alvarez J, Phillips JD, Eiland BR (2001) Sugarcane as a cattle feed: production and utilization.

University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS

- Patrick Schmidt Daniel Junges, Laila Talarico Dias, Rodrigo de Almeida, Lucas José Mari PRJ (2011) Novos aditivos microbianos na ensilagem da cana-de-açúcar: composição bromatológica, perdas fermentativas, componentes voláteis e estabilidade aeróbia. *Rev Bras Zootec* 40:543–549.
- Persson A, Jönsson AS, Zacchi G (2001) Separation of lactic acid-producing bacteria from fermentation broth using a ceramic microfiltration membrane with constant permeate flow. *Biotechnol Bioeng* 72:269–277. doi: 10.1002/1097-0290(20010205)72:3<269::AID-BIT3>3.0.CO;2-H
- Rammelsberg M, Radler F (1990) Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *J Appl Bacteriol* 69:177–184. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb01507.x
- Ranjit NK, Kung L (2000) The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J Dairy Sci* 83:526–35. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74912-5
- Remiger A, Ehrmann MA, Vogel RF (1996) Identification of Bacteriocin-Encoding Genes in *Lactobacilli* by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Syst Appl Microbiol* 19:28–34. doi: 10.1016/S0723-2020(96)80005-1
- Salminen S, von Wright A (1998) *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. New York, NY: Marcel Dekker, New York, NY
- Santos AO, Ávila CLS, Pinto JC, Carvalho BF, Dias DR, Schwan RF (2015) Fermentative profile and bacterial diversity of corn silages inoculated with new tropical lactic acid bacteria.
- Schillinger U, Lucke FK (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 55:1901–1906.
- Siegfried R, Ruckemann H, Stumpf G (1984) Method for the determination of organic acids in silage by high performance liquid chromatography. *Landwirt Forsch* 37:298–304.
- Silva SC da, Peixoto AM, Moura JC, Faria VP (1993) A cana-de-açúcar como alimento volumoso suplementar. Vol para Bov Piracicaba Fundação Estud Agrários Luiz Queiroz 59–74.
- Talavera G, Castresana J (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol* 56:564–77. doi: 10.1080/10635150701472164
- Torres RA, Costa J. (2001) Uso da Cana-de-Açúcar na Alimentação Animal. In: Evangelista, A.R.; Sales. E.C.J. de; Siqueira, G.R.; Lima, J.A. (ed). *Uso de Cana-de-açúcar na Alimentação Animal*. In: II Simpósio de Forragicultura e Pastagens - NEFOR (UFLA).
- Umaña R, Staples CR, Bates DB, Wilcox CJ, Mahana WC (1991) Effects of the digestibility of bermudagrass ensiled at two moisture contents. *J Anim Sci* 69:4588–4601.
- Weinberg ZG, Muck RE (1996) New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol Rev* 19:53–68.
- Wescombe PA, Wirawan RE, Jackf RW, Burton JP, Chilcott C, Tagg JR (2011) Isolation of the *Streptococcus salivarius* megaplasmid-encoded lantibiotic salivaricin 9 and identification of the locus by the application of lantibiotic modification gene-specific PCR primers.
- Wiley JM, Van der Donk WA (2007) Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol* 61:477–501.
- Wirawan RE, Klesse NA, Jack RW, Tagg JR (2006) Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl Environ Microbiol* 72:1148–56. doi: 10.1128/AEM.72.2.1148-1156.2006
- Yi H, Zhang L, Tuo Y, Han X, Du M (2010) A novel method for rapid detection of class IIa bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Food Control* 21:426–430. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.07.002

# Anexos

**Tabela S1.** Características fenotípicas das colônias bacterianas isoladas da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias. Os meios de cultivo utilizado para o isolamento foi o ágar MRS e o ágar nutriente. As culturas foram cultivadas a 37 °C por até 48 h.

Isolado**	Caracterização morfológica das colônias – Meio MRS					
	Cor	Tamanho*	Textura	Forma	Borda	Outras
M0.1	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Lisa e clara	Núcleo mais denso
M0.2	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Translucida
M0.3	Creme	Pequena	Lisa	Oval	Lisa	Opaco
M0.4	Creme	Media	Lisa	Oval	Lisa	Brilhante
M0.5	Bege	Pequena	Lisa	Oval	Lisa	Translucida
M0.6	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Borda translucida
M0.7	Branca	Media	Lisa	Oval	Lisa	Alongada e translucida
M0.8	Branca	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Borda translucida
M0.9	Bege	Pequena	Lisa	Oval	Lisa	Opaca
M0.10	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Núcleo translucido
M0.211	Creme	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	Transparente
M0.212	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Núcleo mais denso
M0.213	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Opaca
M0.215	Bege	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Transparente
M1.11	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Irregular	Aspecto filamentosos
M1.12	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	-
M1.13	Bege	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Borda translucida
M1.14	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Irregular	Núcleo mais denso
M1.15	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Transparente	-
M1.16	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Borda translucida
M1.17	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Translucida
M1.18	Creme	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Translucida
M1.20	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	-
M1.216	Creme	Media	Lisa	Cone	Lisa	Borda translucida
M1.217	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M1.218	Creme	Media	Lisa	Achatada	Irregular	-
M1.219	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Borda translucida
M1.220	Creme	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	-
M3.21	Branca	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	Borda translucida
M3.22	Bege	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Translucida
M3.23	Creme	Grande	Lisa	Circular	Lisa	-
M3.24	Creme	Grande	Áspera	Achatada	Irregular	-
M3.25	Branca	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	Núcleo denso
M3.26	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M3.27	Creme	Media	Lisa	Circular	Transparente	-
M3.29	Creme	Grande	Áspera	Achatada	Irregular	-
M3.30	Bege	Pequena	Lisa	Cone	Lisa	Borda translucida
M3.221	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M3.222	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
M3.223	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Núcleo translucida
M3.224	Bege	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	Transparente
M3.225	Branca	Grande	Lisa	Achatada	Irregular	-
M7.31	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	Brilhante
M7.32	Creme	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	Borda translucida
M7.33	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M7.34	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Borda
M7.35	Creme	Grande	Lisa	Cone	Lisa	Opaca
M7.36	Creme	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Transparente
M7.37	Creme	Grande	Lisa	Cone	Lisa	-
M7.38	Creme	Pequena	Lisa	Cone	Lisa	Borda transparente
M7.39	Creme	Grande	Aveludado	Achatada	Irregular	-
M7.40	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M7.226	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Opaca
M7.227	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	Opaca
M7.228	Branca	Media	Lisa	Cone	Lisa	Borda transparente
M7.229	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Borda transparente
M7.230	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M14.41	Creme	Media	Lisa	Circular	Lisa	Borda transparente
M14.42	Creme	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M14.43	Bege	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Borda transparente

**Tabela S1 cont.** Características fenotípicas das colônias bacterianas isoladas da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias. Os meios de cultivo utilizado para o isolamento foi o ágar MRS e o ágar nutriente. As culturas foram cultivadas a 37 °C por até 48 h.

M14.44	Creme	Grande	Lisa	Cone	Lisa	-
M14.45	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M14.46	Esverdeado	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
M14.47	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Transparente
M14.48	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
M14.49	Bege	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Borda creme
M14.50	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M14.231	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M14.232	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M14.233	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M14.234	Creme	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M14.235	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	Opaca
M14.236	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M21.51	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	Transparente
M21.52	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M21.53	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	-
M21.54	Creme	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Transparente
M21.55	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M21.56	Bege	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	Transparente
M21.57	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M21.58	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Transparente
M21.59	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
M21.60	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M21.237	Bege	Pequena	Lisa	Achatada	Irregular	Borda transparente
M21.238	Creme	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	Transparente
M21.239	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M21.240	Branca	Media	Lisa	Achatada	Irregular	Borda transparente
M28.61	Creme	Media	Lisa	Cone	Lisa	-
M28.62	Creme	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
M28.63	Creme	Media	Lisa	Cone	Lisa	-
M28.64	Creme	Grande	Lisa	Cone	Lisa	-
M28.66	Creme	Grande	Lisa	Cone	Lisa	-
M28.67	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M28.68	Creme	Grande	Lisa	Cone	Lisa	-
M28.69	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M28.241	Creme	Grande	Lisa	Circular	Lisa	-
M28.242	Creme	Grande	Lisa	Cone	Lisa	-
M28.243	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
M28.244	Creme	Grande	Lisa	Cone	Lisa	-
M28.245	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
M28.246	Creme	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N0.71	Laranja	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	Borda mais clara
N0.72	Creme	Media	Lisa	Achatada	Irregular	Brilhosa
N0.73	Amarela	Media	Aveludada	Achatada	Irregular	Opaca
N0.74	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Gelatinosa
N0.75	Amarelo forte	Media	Lisa	Achatada	Lisa	-
N0.76	Laranja	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N0.77	Creme	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N0.78	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N0.79	Esverdeada	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N0.80	Rosado	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N0.246	Amarela	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	Brilhante
N0.247	Laranja	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N0.248	Creme	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N0.249	Branca	Media	Rugosa	Achatada	Irregular	-
N0.250	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Transparente
N1.81	Creme	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N1.82	Laranja	Media	Lisa	Circular lisa	Brilhante	-
N1.83	Amarela	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N1.84	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Irregular	Transparente
N1.85	Creme	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N1.86	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Opaca
N1.87	Bege	Grande	Lisa	Circular	Irregular	Transparente
N1.88	Creme	Grande	Lisa	Circular	Irregular	Transparente
N1.89	Creme	Pequena	Lisa	Circular	Irregular	-
N1.90	Rosa	Grande	Lisa	Circular	Lisa	-
N1.251	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Irregular	Transparente
N1.252	Amarelo	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Transparente
N1.253	Bege	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	Transparente
N1.254	Bege	Grande	Lisa	Achatada	Irregular	Transparente
N1.255	Amarela	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N3.91	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N3.92	Laranja	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Borda transparente

**Tabela S1 cont.** Características fenotípicas das colônias bacterianas isoladas da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias. Os meios de cultivo utilizado para o isolamento foi o ágar MRS e o ágar nutriente. As culturas foram cultivadas a 37 °C por até 48 h.

N3.93	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	-
N3.94	Amarela	Media	Lisa	Achatada	Lisa	-
N3.95	Bege	Media	Lisa	Achatada	Lisa	-
N3.96	Bege	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	Borda transparente
N3.97	Laranja	Media	Lisa	Achatada	Lisa	-
N3.98	Branca	Media	Lisa	Circular	Lisa	-
N3.99	Creme	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	-
N3.100	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Irregular	-
N3.256	Branca	Media	Aveludada	Achatada	Lisa	-
N3.257	Bege	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	-
N3.258	Bege	Media	Lisa	Circular	Lisa	-
N3.259	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N3.260	Bege	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	Transparente
N7.101	Bege	Grande	Lisa	Achatada	Irregular	-
N7.102	Laranja	Media	Lisa	Circular	Lisa	Borda transparente
N7.103	Bege	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N7.104	Amarela	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N7.105	Amarela	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N7.106	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Opaca
N7.107	Laranja	Pequena	Lisa	Circular	Irregular	Borda transparente
N7.108	Branca	Pequena	Lisa	Achatada	Irregular	-
N7.109	Salmon	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N7.110	Creme	Grande	Lisa	Cone	Lisa	-
N7.261	Bege	Media	Rugosa	Achatada	Irregular	-
N7.262	Bege	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	Transparente
N7.263	Creme	Media	Lisa	Achatada	Lisa	-
N7.264	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N14.111	Amarela	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N14.112	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N14.113	Amarela	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N14.114	Bege	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N14.115	Branca	Media	Lisa	Achatada	Irregular	Borda transparente
N14.116	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N14.117	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N14.118	Branca	Media	Lisa	Achatada	Irregular	-
N14.119	Branca	Media	Lisa	Achatada	Irregular	-
N14.120	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Borda transparente
N14.266	Bege	Media	Lisa	Achatada	Lisa	Brilhante
N14.267	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Irregular	-
N14.268	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N14.269	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N14.270	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N21.121	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N21.122	Bege	Pequena	Lisa	-	Lisa	Transparente
N21.123	Creme	Média	Lisa	Achatado	Lisa	-
N21.124	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N21.125	Branca	Grande	Rugosa	Achatada	Lisa	Borda transparente
N21.126	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N21.127	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N21.128	Amarela	Pequena	Lisa	Achatada	Lisa	-
N21.129	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	Borda transparente
N21.130	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N21.271	Salmon	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N21.272	Creme	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	-
N21.273	Rosa	Media	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N21.274	Bege	Grande	Lisa	Achatada	Lisa	Brilhante
N21.275	Creme	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N28.131	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N28.132	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	-
N28.133	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N28.134	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N28.135	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N28.136	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N28.137	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N28.138	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N28.139	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N28.140	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N28.276	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N28.277	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N28.278	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N28.279	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante
N28.280	Branca	Pequena	Lisa	Circular	Lisa	Brilhante

\*Colônia pequena ( $\leq 1.0$  mm); Media ( $> 1.0 \leq 2.0$  mm) e grande ( $> 2.0$  mm). \*\*M = isolamento MRS; N = isolamento

Ágar nutriente. Símbolos: (+) produz gás (-) não produz gás.

**Tabela S2.** Identificação e número de acesso dos isolados de bactérias aeróbias e do ácido láctico obtidos da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias.

Isolado	Identificação isolados	pb*	Max score	Toral score	Query cover (%)	E-value	Identidade (%)	Accession	Número de depósito
M0.1	<i>Weissella cibaria</i>	228	361	361	100	4e-96	95	KM392063	-
M0.2	<i>Weissella cibaria</i>	729	1341	1341	100	0.0	99	NR036924	LC090444
M0.3	<i>Weissella cibaria</i>	656	1206	1206	100	0.0	99	NR036924	LC090445
M0.4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	138	217	217	100	1e-56	95	NR118557	-
M0.5	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	441	754	754	100	0.0	98	NR042620	LC090446
M0.6	<i>Weissella cibaria</i>	658	1216	1216	100	0.0	99	NR113258	LC090447
M0.7	<i>Weissella cibaria</i>	709	1310	1310	100	0.0	100	NR036924	LC090448
M0.8	<i>Weissella cibaria</i>	697	1288	1288	100	0.0	100	NR036924	LC090449
M0.9	<i>Weissella cibaria</i>	730	1349	1349	100	0.0	100	NR036924	LC090450
M0.10	<i>Weissella cibaria</i>	699	1291	1291	100	0.0	100	NR036924	LC090451
M0.211	<i>Lactococcus lactis</i>	748	1375	1375	100	0.0	99	NR103918	LC090431
M0.212	<i>Lactobacillus plantarum</i>	635	1160	1160	100	0.0	99	NR075041	LC090432
M0.213	<i>Weissella cibaria</i>	721	1332	1332	100	0.0	100	NR036924	LC090433
M0.215	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	705	1297	1297	100	0.0	99	NR109004	LC090434
M1.11	<i>Weissella cibaria</i>	649	1194	1194	100	0.0	99	NR036924	LC090452
M1.12	<i>Weissella cibaria</i>	564	1042	1042	100	0.0	100	NR036924	LC090453
M1.13	<i>Weissella cibaria</i>	607	1116	1116	100	0.0	99	NR036924	LC090454
M1.14	<i>Weissella cibaria</i>	646	1186	1186	100	0.0	100	NR036924	LC090455
M1.15	<i>Weissella cibaria</i>	607	1116	1116	100	0.0	99	NR036924	LC090456
M1.16	<i>Weissella cibaria</i>	733	1354	1354	100	0.0	99	NR036924	LC090457
M1.18	<i>Weissella cibaria</i>	648	1192	1192	100	0.0	99	NR036924	LC090458
M1.19	<i>Weissella cibaria</i>	633	1164	1164	100	0.0	99	NR036924	LC090459
M1.20	<i>Weissella confusa</i>	775	1432	1432	100	0.0	100	NR113258	LC090460
M1.216	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	773	1423	1423	100	0.0	99	NR074957	LC090435
M1.217	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	705	1303	1303	100	0.0	100	NR074957	LC090436
M1.218	<i>Weissella cibaria</i>	825	1524	1524	100	0.0	100	NR036924	LC090437
M1.219	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	606	1199	1199	100	0.0	90	NR074957	LC090438
M3.21	<i>Weissella cibaria</i>	770	1423	1423	100	0.0	100	NR036924	LC090461
M3.22	<i>Weissella cibaria</i>	772	1426	1426	100	0.0	100	NR036924	LC090462
M3.23	<i>Weissella cibaria</i>	773	1428	1428	100	0.0	100	NR036924	LC090463
M3.26	<i>Weissella cibaria</i>	547	1000	1000	100	0.0	99	NR036924	LC090403
M3.27	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	719	1328	1328	100	0.0	99	NR074957	LC090404
M3.29	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	796	1458	1458	100	0.0	99	NR036924	LC090405
M3.30	<i>Lactobacillus brevis</i>	797	1472	1472	100	0.0	100	NR116238	LC090406
M3.221	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	829	1526	1526	100	0.0	99	NR074957	LC090440
M3.222	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	836	1544	1544	100	0.0	100	NR074957	LC090465
M3.223	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	706	1299	1299	100	0.0	99	NR074957	LC090466
M3.224	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	645	1170	1170	100	0.0	99	NR075052	LC090467
M3.225	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	796	1465	1465	100	0.0	99	NR074957	LC090468

**Tabela S2 cont.** Identificação e número de acesso dos isolados de bactérias aeróbias e do ácido láctico obtidos da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias.

Isolado	Identificação isolados	pb*	Max score	Toral score	Query cover (%)	E-value	Identidade (%)	Accession	Número de depósito
M7.32	<i>Weissella cibaria</i>	708	1297	1297	100	0.0	99	NR036924	LC090407
M7.33	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	725	1334	1334	100	0.0	99	NR074995	LC090408
M7.34	<i>Weissella cibaria</i>	666	1225	1225	100	0.0	99	NR036924	LC090409
M7.35	<i>Weissella cibaria</i>	771	1424	1424	100	0.0	100	NR036924	LC090410
M7.36	<i>Weissella cibaria</i>	628	1144	1144	100	0.0	99	NR036924	LC090411
M7.37	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	780	1435	1435	100	0.0	99	NR074957	LC090412
M7.38	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	782	1439	1439	100	0.0	99	NR074957	LC090413
M7.40	<i>Weissella cibaria</i>	467	852	852	100	0.0	99	NR036924	LC090414
M7.226	<i>Lactobacillus paracasei</i>	696	1286	1286	100	0.0	100	NR121787	LC090469
M7.228	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	768	1413	1413	100	0.0	99	NR074957	LC090470
M7.229	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	502	911	911	100	0.0	99	NR025447	LC090471
M7.230	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	816	1502	1502	100	0.0	99	NR075052	LC090472
M14.42	<i>Weissella cibaria</i>	439	797	797	100	0.0	99	NR036924	LC090415
M14.43	<i>Pediococcus acidilactici</i>	775	1413	1413	100	0.0	99	NR042057	LC090416
M14.44	<i>Lactobacillus plantarum</i>	635	1158	1158	100	0.0	99	NR075041	LC090417
M14.45	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	779	1434	1434	100	0.0	99	NR074957	LC090418
M14.46	<i>Lactobacillus plantarum</i>	813	1496	1496	100	0.0	99	NR075041	LC090464
M14.47	<i>Lactobacillus plantarum</i>	146	270	270	100	1e-72	100	NR075041	-
M14.48	<i>Lactobacillus plantarum</i>	219	399	399	100	2e-111	100	NR075041	-
M14.49	<i>Lactobacillus plantarum</i>	528	976	976	100	0.0	100	NR075041	LC090419
M14.50	<i>Lactobacillus plantarum</i>	120	217	217	100	4e-53	99	NR075041	-
M14.231	<i>Lactobacillus plantarum</i>	470	824	824	100	0.0	98	NR075041	LC090473
M14.232	<i>Lactobacillus plantarum</i>	788	1450	1450	100	0.0	99	NR075041	LC090474
M14.233	<i>Lactobacillus plantarum</i>	815	1500	1500	100	0.0	99	NR075041	LC090475
M14.235	<i>Lactobacillus plantarum</i>	323	586	586	100	4E-167	99	NR075041	LC090441
M21.52	<i>Lactobacillus plantarum</i>	763	1404	1404	100	0.0	99	NR075041	LC090420
M21.55	<i>Lactobacillus plantarum</i>	816	1502	1502	100	0.0	99	NR115605	LC090422
M21.56	<i>Lactobacillus plantarum</i>	105	195	195	100	4e-50	100	NR075041	-
M21.57	<i>Lactobacillus plantarum</i>	715	1315	1315	100	0.0	99	NR075041	LC090423
M21.58	<i>Lactobacillus plantarum</i>	721	1371	1371	100	0.0	99	NR075041	LC090424
M21.59	<i>Lactobacillus plantarum</i>	563	1035	1035	100	0.0	99	NR075041	LC090425
M21.236	<i>Lactobacillus plantarum</i>	525	959	959	100	0.0	99	NR075041	LC090442
M21.237	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	796	1465	1465	100	0.0	99	KR006320	LC090476
M21.238	<i>Lactobacillus plantarum</i>	617	1129	1129	100	0.0	99	NR075041	LC090439
M21.239	<i>Lactobacillus plantarum</i>	547	994	994	100	0.0	99	NR075041	LC090428
M21.240	<i>Lactobacillus brevis</i>	592	1088	1088	100	0.0	99	NR075024	LC090421
M28.63	<i>Bacillus smithii</i>	419	243	243	87	9e-64	78	NR115583	LC090426
M28.64	<i>Lactobacillus brevis</i>	695	1273	1273	100	0.0	99	NR116238	LC090427
M28.67	<i>Lactobacillus buchneri</i>	779	1273	1273	100	0.0	99	NR041293	LC090429
M28.68	<i>Aneurinibacillus aneurinilyticus</i>	679	1254	1254	100	0.0	100	NR112639	LC090430
M28.69	<i>Lactococcus lactis</i>	272	492	492	100	7e-139	99	NR103960	-
M28.242	<i>Lactobacillus plantarum</i>	158	291	291	99	8e-79	100	NR075041	-
M28.243	<i>Lactobacillus plantarum</i>	552	948	948	100	0.0	99	NR075041	LC090402

**Tabela S2 cont.** Identificação e número de acesso dos isolados de bactérias aeróbias e do ácido láctico obtidos da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias.

Isolado	Identificação isolados	pb*	Max score	Toral score	Query cover (%)	E-value	Identidade (%)	Accession	Número de deposito
M28.244	<i>Weissella cibaria</i>	733	1349	1349	100	0.0	99	KM392063	LC090477
M28.245	<i>Weissella cibaria</i>	424	778	778	100	0.0	99	NR036924	LC090443
N.071	<i>Shigella flexneri</i>	551	998	998	100	0.0	99	NR074882	LC090478
N0.72	<i>Shigella flexneri</i>	600	1103	1103	100	0.0	99	NR074882	LC090479
N0.74	<i>Shigella flexneri</i>	549	920	920	100	0.0	97	NR074882	LC090480
N0.75	<i>Shigella flexneri</i>	556	953	953	99	0.0	98	NR074882	LC090481
N0.77	<i>Shigella flexneri</i>	594	1042	1042	100	0.0	98	NR074882	LC090482
N0.78	<i>Shigella flexneri</i>	676	1221	1221	100	0.0	99	NR074882	LC090483
N0.79	<i>Shigella flexneri</i>	671	1190	1190	100	0.0	99	NR074882	LC090484
N0.80	<i>Shigella flexneri</i>	622	1103	1103	99	0.0	99	NR074882	LC090485
N0.246	<i>Lactobacillus casei</i>	556	981	981	100	0.0	99	GQ395613	LC090550
N0.248	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	678	1240	1240	100	0.0	99	KT293907	LC090527
N1.81	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	586	1035	1035	100	0.0	98	NR041577	LC090486
N1.82	<i>Comamonas testosteroni</i>	519	909	909	100	0.0	98	NR102841	LC090487
N1.85	<i>Shigella flexneri</i>	558	965	965	100	0.0	98	NR074882	LC090488
N1.86	<i>Shigella flexneri</i>	634	1122	1122	100	0.0	98	NR074882	LC090489
N1.87	<i>Shigella flexneri</i>	622	1138	1138	100	0.0	99	NR074882	LC090490
N1.88	<i>Shigella flexneri</i>	713	1306	1306	99	0.0	99	NR074882	LC090491
N1.90	<i>Shigella flexneri</i>	487	856	856	100	0.0	98	NR074882	LC090492
N1.251	<i>Citrobacter braakii</i>	622	1144	1144	100	0.0	99	NR117750	LC090530
N1.252	<i>Citrobacter braakii</i>	573	1038	1038	100	0.0	99	NR117750	LC090531
N1.253	<i>Enterococcus gallinarum</i>	782	1434	1434	100	0.0	99	NR104559	LC090532
N1.254	<i>Citrobacter braakii</i>	572	1035	1035	100	0.0	99	NR117750	LC090533
N1.255	<i>Microbacterium arthrosphaerae</i>	525	920	920	100	0.0	98	NR117046	LC090534
N3.92	<i>Shigella flexneri</i>	567	996	996	100	0.0	97	NR074882	LC090493
N3.93	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	549	987	987	100	0.0	99	NR113648	LC090494
N3.94	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	548	979	979	100	0.0	99	NR113648	LC090495
N3.95	<i>Comamonas testosteroni</i>	587	1059	1059	100	0.0	99	NR102841	LC090496
N3.96	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	184	340	340	100	1e-89	100	NR024708	-
N3.97	<i>Pseudomonas geniculata</i>	443	787	787	100	0.0	99	KT168245	LC090497
N3.98	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	471	471	471	100	0.0	98	NR041577	LC090498
N3.99	<i>Pantoea coffeiphila</i>	604	1050	1052	100	0.0	98	KJ427832	LC090499
N3.100	<i>Comamonas testosteroni</i>	559	998	998	100	0.0	99	NR102841	LC090500
N3.256	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	682	1254	1254	100	0.0	99	NR041577	LC090535
N3.257	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	767	1411	1411	100	0.0	99	NR041577	LC090536
N3.258	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	677	1229	1229	100	0.0	99	NR041577	LC090537
N3.259	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	576	1044	1044	100	0.0	99	NR041577	LC090538
N3.260	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	679	1247	1247	99	0.0	99	NR041577	LC090539
N7.101	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	547	987	987	100	0.0	99	NR113648	LC090501
N7.102	<i>Comamonas testosteroni</i>	534	933	933	100	0.0	98	NR102841	LC090502
N7.103	<i>Comamonas testosteroni</i>	736	1349	1349	100	0.0	99	NR102841	LC090503
N7.106	<i>Pantoea coffeiphila</i>	616	1088	1088	100	0.0	99	KJ427832	LC090504
N7.107	<i>Comamonas sp.</i>	304	446	446	98	1e-121	94	HM05574	-

**Tabela S2 cont.** Identificação e número de acesso dos isolados de bactérias aeróbias e do ácido láctico obtidos da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias.

Isolado	Identificação isolados	pb*	Max score	Toral score	Query cover (%)	E-value	Identidade (%)	Accession	Número de depósito
N7.108	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	509	889	889	99	0.0	98	NR113648	LC090505
N7.110	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	435	712	712	100	0.0	96	NR113648	LC090506
N7.261	<i>Staphylococcus aureus</i>	760	1399	1399	100	0.0	99	NR075000	LC090540
N7.262	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	483	876	876	100	0.0	99	NR113648	LC090541
N7.263	<i>Citrobacter braakii</i>	672	1230	9836	100	0.0	99	NR117750	LC090543
N7.264	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	304	479	479	98	1e-131	96	NR113648	-
N14.111	<i>Pantoea dispersa</i>	581	939	939	98	0.0	96	NR043883	LC090507
N14.112	<i>Pantoea stewartii</i>	679	1216	1216	100	0.0	99	NR104928	LC090508
N14.113	<i>Pantoea stewartii</i>	798	1397	1397	100	0.0	98	NR104928	LC090509
N14.114	<i>Staphylococcus sciuri</i>	736	1354	1354	100	0.0	99	NR025520	LC090510
N14.116	<i>Staphylococcus sciuri</i>	555	1014	1014	100	0.0	99	NR025520	LC090511
N14.117	<i>Staphylococcus sciuri</i>	796	1465	1465	100	0.0	99	NR025520	LC090512
N14.118	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	340	526	526	93	2e-93	98	NR118008	-
N14.119	<i>Pantoea séptica</i>	535	931	931	100	0.0	98	NR116752	LC090513
N14.120	<i>Pantoea dispersa</i>	591	996	996	100	0.0	98	NR116755	LC090514
N14.266	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	738	1358	1358	100	0.0	99	NR041577	LC090542
N14.268	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	676	1229	1229	100	0.0	99	NR041577	LC090529
N14.270	<i>Staphylococcus aureus</i>	746	1378	8266	100	0.0	100	NR075000	LC090544
N21.121	<i>Staphylococcus sciuri</i>	195	361	361	100	8e-100	100	NR025520	-
N21.124	<i>Staphylococcus sciuri</i>	684	1225	1225	100	0.0	99	NR025520	LC090515
N21.125	<i>Staphylococcus aureus</i>	791	1456	1456	100	0.0	99	NR075000	LC090516
N21.126	<i>Staphylococcus sciuri</i>	807	1485	1485	100	0.0	99	NR025520	LC090517
N21.127	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	858	1585	1585	100	0.0	100	KT443901	LC090518
N21.128	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	668	1208	1208	100	0.0	99	NR041577	LC090519
N21.130	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	628	1146	1146	100	0.0	99	NR041577	LC090520
N21.272	<i>Pseudomonas putida</i>	639	1175	1175	100	0.0	99	NR074596	LC090545
N21.273	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	679	1249	1249	100	0.0	99	NR041577	LC090546
N21.274	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	679	1214	1214	100	0.0	99	NR117625	LC090547
N21.275	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	706	1304	1304	100	0.0	100	NR074957	LC090548
N28.131	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	773	1423	1423	100	0.0	99	NR041577	LC090521
N28.132	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	432	773	773	100	0.0	99	NR041577	LC090522
N28.134	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	559	994	994	100	0.0	99	KF241157	LC090523
N28.137	<i>Microbacterium radiodurans</i>	647	1109	1109	100	0.0	98	NR117294	LC090524
N28.138	<i>Microbacterium saccharophilum</i>	607	1099	1099	100	0.0	99	NR114342	LC090525
N28.139	<i>Microbacterium radiodurans</i>	530	872	870	99	0.0	97	NR117294	LC090526
N28.140	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	190	348	348	100	6e-96	99	NR044935	-
N28.278	<i>Staphylococcus aureus</i>	616	1138	1138	100	0.0	100	NR075000	LC090549
N28.280	<i>Staphylococcus sciuri</i>	722	1334	1334	100	0.0	100	NR025520	LC090528

\*pb = pares de base

# Capítulo 4

---

**DIVERSIDADE GENÉTICA DA COMUNIDADE MICROBIANA ENVOLVIDA  
NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO DA SILAGEM DE CANA-DE-  
AÇÚCAR**

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar a diversidade genética por PCR-DGGE da comunidade bacteriana e fúngica envolvida no processo de fermentação da silagem de cana-de-açúcar. **Métodos e resultados:** Cana-de-açúcar da espécie *Saccharum officinarum* L foi ensilada e amostras foram coletadas nos tempos 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de fermentação. O DNA genômico foi extraído e posteriormente utilizado nas análises de PCR-DGGE com os primers para o Domínio Bacteria, filo Firmicutes, classe  $\gamma$ -Proteobacteria e leveduras. A cana *in natura* e os períodos de fermentação agruparam diferentemente para cada oligonucleotídeo utilizado. A análise dos perfis eletroforéticos do número de bandas obtido por meio da análise por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) revelou que o número de OTUs obtidos foram os mesmos para o oligonucleotídeo universal de Bacteria e o de levedura (45 OTUs). Foram encontrados 35 OTUs para Firmicutes e 34 OTUs para  $\gamma$ -Proteobacteria. As estimativas da riqueza e do índice de Shannon-Wiener revelaram níveis semelhantes de diversidade. **Conclusões:** Foi observado alta diversidade entre os grupos microbianos avaliados. De acordo com os índices de diversidade, não foram observadas variações expressivas entre os períodos de fermentação, exceto entre a cana *in natura* e o último dia de amostragem. O perfil de diversidade entre os Filos Firmicutes e  $\gamma$ -Proteobacteria foram contrários em relação ao aumento e diminuição da diversidade de espécies.

**Palavras-chave:** Diversidade; 16S rRNA; rRNA 26S, DGGE.

## Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tem sido utilizada como forrageira para a alimentação animal por possuir características como alto potencial de produção, variedades adaptadas a diversos ambientes de produção, resistência a doenças, elevada produção de nutrientes digestíveis totais (NDT), baixo custo por tonelada de matéria seca, ponto de maturação coincidente com a escassez de forragem, grande amplitude de corte e ganhos em logística operacional e manejo do canavial (Santos *et al.*, 2008).

A ensilagem da cana-de-açúcar é uma alternativa para preservar o valor nutritivo da forrageira, otimizar as atividades no canavial e facilitar a operação do processo (Schmidt *et al.*, 2011). Durante a ensilagem, bactérias do ácido láctico (BAL) convertem os açúcares solúveis em ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico (Gollop *et al.*, 2005), resultando na queda do pH, inibindo a ação de enzimas hidrolíticas e a atividade de microrganismos patogênicos e deterioradores (Holzer *et al.*, 2003; Ennahar *et al.*, 2003; Ferrari Junior *et al.*, 2009). Alguns microrganismos podem causar deterioração anaeróbia (clostrídios e enterobactérias) ou deterioração aeróbia (leveduras, bacilos, listeria e outros) da forragem ensilada, diminuindo o valor nutritivo da silagem (REF). Além disso, podem causar efeitos negativos na saúde do animal ou diminuir a qualidade dos produtos gerados (Oude Elferink *et al.*, 2015).

A fermentação da silagem depende tipicamente da microbiota epífita presente na forragem antes da ensilagem (REF). As principais bactérias epífitas responsáveis pela fermentação natural da silagem são as bactérias produtoras de ácido láctico, como *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Pediococcus acidilactici* e *Enterococcus faecalis* (Cai *et al.*, 1999; Ennahar *et al.*, 2003; Giraffa *et al.*, 2010). Na fase inicial, bactérias do gênero *Streptococcus* predominam no processo, sendo posteriormente substituídos por *Leuconostoc* e, em seguida, por bactérias mais resistentes às condições ácidas, como por exemplo, *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Hammes and Hertel, 2006). Nas fases finais da fermentação diminuem as populações de *Lactobacillus*, e algumas espécies mais tolerantes, tais como *L. buchneri*, se mantêm como parte da microbiota da silagem (Oude Elferink *et al.*, 2001).

Estudos anteriores indicaram que a microbiota epífita da cana-de-açúcar é rica em leveduras (populações de até  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup> de forragem fresca), sendo capazes de produzir elevadas concentrações de etanol (Ávila *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2014). Alguns trabalhos têm caracterizado e identificado leveduras que estão envolvidas na deterioração aeróbia de silagem, a exemplo dos gêneros *Candida*, *Endomycopsis*,

*Hansenula*, *Pichia*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces* e *Torulopsis* (Jonsson e Pahlow 1984; Bravo-Martins *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2014). Além disso, outros gêneros como *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* também foram isolados em silagem de cana-de-açúcar (Ávila *et al.*, 2010).

Apesar de estudos relatarem a presença de microrganismos envolvidos no processo de fermentação ou na deterioração aeróbia da silagem, poucos trabalhos tem avaliado a composição da comunidade microbiana durante as diferentes fases do processo de ensilagem (Bravo-Martins *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2007; Pedroso *et al.*, 2008). Desse modo, a caracterização da diversidade e sucessão das espécies de bactérias e de leveduras durante a ensilagem da cana-de-açúcar pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias para melhorar a qualidade nutricional da silagem. Análises moleculares para avaliar a diversidade genética e a atividade microbiana em diferentes ecossistemas têm sido cada vez mais utilizadas (Head and Bailey, 2003). Assim, este estudo objetivou avaliar a composição da comunidade microbiana, por meio da técnica de PCR-DGGE, durante a ensilagem da cana-de-açúcar.

## **Material e métodos**

### **1.0. Preparação da silagem**

Os mini-silos de cana-de-açúcar, *Saccharum officinarum* L, foram preparados no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A cana-de-açúcar foi picada com tamanho médio de 1 cm em máquina picadeira estacionária. Em seguida, 500 g da forragem foi imediatamente ensilada em *bags* com dimensões de 25,4 cm x 35,56 cm (mini-silos) (Doug CareEquipment, Springville, CA), lacrados com seladora a vácuo e mantida à temperatura ambiente. Após 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento os mini-silos foram abertos e as amostras de silagem congeladas a – 80 °C, juntamente com amostras de cana *in natura*, até as análises posteriores. O experimento foi realizado em três repetições.

### **2.0. Extração DNA metagenômico**

#### **2.1. Preparo da amostra**

A cana-de-açúcar *in natura* e as silagens foram descongeladas e processadas de acordo com Eikmeyer e colaboradores (2013). Amostras de 50 g da silagem foram

homogeneizadas em 150 ml de solução fisiológica de NaCl (salina 0,85%) durante 30 s em Stomacher (Logen, modelo LS1901). O procedimento de homogeneização foi repetido cinco vezes. Posteriormente, o extrato da silagem foi obtido por filtração e centrifugado a 8.000 x g por 15 min a 4 °C. O *pellet* foi ressuspenso em solução salina e centrifugado a 15.000 x g por 20 min a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* novamente ressuspenso e centrifugado a 3.900 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* utilizado para extração do DNA.

## 2.2. Extração de DNA

O procedimento de extração de DNA foi realizado segundo Stevenson e Weimer (2007). O *pellet* obtido a partir do extrato da silagem foi ressuspenso em 2,0 ml de tampão de extração (100 mM de Tris/HCl, 10 mM de EDTA, 0,15 M de NaCl, pH 8,0) e 1,0 ml da suspensão de células foi transferido para microtubos, em duplicatas, de 2,0 mL com tampa de rosca contendo 0,5 g de *beads* de zircônio (0,1 mm de diâmetro). Ao microtubo foram adicionados 50  $\mu$ l de SDS (20%), 700  $\mu$ l de fenol equilibrado pH 8,0 e submetido a lise mecânica em BeadBeater (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, USA) por dois min a 4 °C. Posteriormente, os microtubos foram incubados em banho-maria a 60 °C por 10 min e o procedimento de lise mecânica foi repetido por dois min a 4 °C. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 x g por 10 min, o sobrenadante transferido para microtubos de 1,5 ml, acrescido de 500  $\mu$ l de fenol equilibrado pH 8,0, agitado em vortex por 10 s e centrifugado a 12.000 x g por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi removido e transferido para novos tubos, acrescido de 500  $\mu$ l de fenol/clorofórmio (1:1 v/v) e centrifugado a 12.000 x g por 5 min. A etapa de fenol/clorofórmio (1:1 v/v) foi repetida, o sobrenadante transferido para novos tubos, adicionado de 500  $\mu$ l de clorofórmio, agitado em vortex por 10 s e centrifugado novamente a 12.000 x g por 5 min. Ao sobrenadante foi adicionado 400  $\mu$ l de clorofórmio e a mistura agitada por 10 s, seguida por centrifugação a 12.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionado de 1/10 volume de acetato de sódio (3 M) e 0,6 volumes de isopropanol. A mistura foi centrifugada por 20 min a 12.000 x g, o sobrenadante descartado, adicionado 1,0 ml de etanol 70%, centrifugado por 5 min a 12.000 x g e o sobrenadante descartado. Ao *pellet* foi adicionado 500  $\mu$ l de etanol puro, ressuspenso gentilmente, centrifugado por 5 min a 12.000 x g, o sobrenadante descartado e o *pellet* seco ao ar. Depois de seco, o centrifugado foi ressuspenso em 100  $\mu$ l de tampão TE (10 mM de Tris/HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) e novamente centrifugado por 5 min a 12.000 x g. O DNA foi armazenado a -20 °C até o tratamento com RNAase.

### **2.3. Tratamento do DNA com RNAase Ribonuclease A**

As replicas da extração foram combinadas em um único tubo (200  $\mu$ l) e adicionadas com 2,0  $\mu$ l de RNAase (10 mg/ml), misturadas e os tubos foram incubados em banho-maria por 2 h a 37 °C. Posteriormente, foi adicionado 1/10 volume de acetado de sódio (3 M) e 2,5 volumes de etanol 100%, misturado e mantido *overnight* a -20 °C. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 min a 12.000 x g, o sobrenadante descartado, adicionado 1,0 ml de etanol 70% e novamente centrifugado por 5 min a 12.000 x g. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* seco em temperatura ambiente, ressuspenso em 100  $\mu$ l de tampão TE e centrifugado por 5 min a 12.000 xg. Os tubos foram armazenados a -20 °C até o momento da sua utilização. Para a realização dos procedimentos posteriores as amostras de DNA das três repetições foram combinadas em um único tubo.

### **3.0. Análise da diversidade genética da comunidade bacteriana e fúngica por PCR-DGGE**

#### **3.1. Amplificação do rRNA**

O DNA total da comunidade microbiana da cana *in natura* e da silagem de cana-de-açúcar coletadas em diferentes períodos de fermentação foram utilizados em reações de amplificação com oligonucleotídeos específicos para o gene 16S rRNA de Bactéria e 26S de leveduras (Muyzer *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 2008). Para avaliar as diferenças na composição de grupos bacterianos distintos durante o processo fermentativo da silagem de cana-de-açúcar foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para os genes que codificam o 16S rRNA de Bactéria (universal), filo Firmicutes e classe  $\gamma$ -proteobactéria (Tabela 1). A mistura da reação foi constituída de 2,5  $\mu$ l de tampão GoTaq Reaction Buffer (5X), 2,0  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,0  $\mu$ l de dNTPs (2 mM), 0,3  $\mu$ l de cada *primer* (10  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ l de GoTaq DNA polimerase (5 u  $\mu$ l<sup>-1</sup>), 0,2  $\mu$ l de BSA (10 mg ml<sup>-1</sup>), 1,0  $\mu$ l de DNA (~ 20 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>) e o volume completado para 25  $\mu$ l com água MilliQ (Muhling *et al.*, 2008). As condições das reações da PCR estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Sequências e condições de amplificação dos oligonucleotídeos utilizados para as sequências de genes 16S rRNA e 26S nas reações de PCR grupo-específico e nested-PCR.

Grupo alvo	Primer grupo específico	Condições da PCR	Primer Nested-PCR	Condições da PCR	Referência
Bactéria					
Bacteria	9bfm/1512uR (Muhling <i>et al.</i> , 2008)	- 96 °C: 4 min - 35 ciclos: 96 °C: 1 min 56 °C: 1 min 72 °C: 2 min - 72 °C: 5 min	341fGC/518r (Muhling <i>et al.</i> , 2008)	- 96 °C: 4 min - 35 ciclos: 96 °C: 1 min 56 °C: 1 min 72 °C: 30 seg - 72 °C: 5 min	
$\gamma$ -Proteobacteria	395f/871r (Muhling <i>et al.</i> , 2008)	- 96 °C: 4 min - 35 ciclos: 96 °C: 1 min 54 °C: 1 min 72 °C: 1 min - 72 °C: 5 min	518f-GC/785r (Muhling <i>et al.</i> , 2008)	- 96 °C: 4 min - 35 ciclos: 96 °C: 1 min 56 °C: 1 min 72 °C: 1 min - 72 °C: 5 min	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993) modificado
Firmicutes*	350f/814r (Muhling <i>et al.</i> , 2008)	- 96 °C: 4 min - 35 ciclos: 96 °C: 1 min 50 °C: 1 min 72 °C: 30 seg - 72 °C: 5 min	518f-GC/785r (Muhling <i>et al.</i> , 2008)	- 96 °C: 4 min - 35 ciclos: 96 °C: 1 min 56 °C: 1 min 72 °C: 30 seg - 72 °C: 5 min	
Fungo					
Leveduras	NL-1/NL-4 (Lachance <i>et al.</i> , 1999)	- 95 °C: 5 min - 35 ciclos: 94 °C: 30 seg 54 °C: 30 seg 72 °C: 1 min - 72 °C: 10 min	GCNL-1/LS2 (Chang <i>et al.</i> , 2008)	- 92 °C: 5 min - 30 ciclos: 95 °C: 1 min 52 °C: 1 min 72 °C: 1 min - 72 °C: 7 min	(Lachance <i>et al.</i> , 1999; Chang <i>et al.</i> , 2008)

\*A primeira reação de PCR foi realizada com o oligonucleotídeo 9bfm/1512uR

Para avaliar a diversidade de leveduras foram utilizados oligonucleotídeos do domínio D1/D2 da região 26S do rRNA (Tabela 1). A mistura da reação foi preparada para 25  $\mu$ l e continha 5,0  $\mu$ l de tampão GoTaq Reaction Buffer (5X), 2,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1,0  $\mu$ l de dNTPs (2 mM), 1,0  $\mu$ l de cada oligonucleotídeo (10  $\mu$ M), 0,2  $\mu$ l de GoTaq DNA polimerase (5 u/ $\mu$ l), 1,0  $\mu$ l de DNA (~ 20 ng  $\mu$ l<sup>-1</sup>) e água MilliQ para completar o volume. As condições da PCR estão descritas na Tabela 1.

A técnica de Nested-PCR foi utilizada em todas as amplificações realizadas (Heuer *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2008). A mistura de reação foi preparada conforme descrito anteriormente e as condições estão listadas na Tabela 1. Como molde para a reação, foi utilizado 1  $\mu$ L do produto da primeira reação de PCR.

### 3.2. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante - DGGE

A DGGE foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Bento *et al.*, (2015), utilizando o equipamento DGGE-2401 (C.B.S., Scientific Company, INC., USA). O gel vertical de poli(acrilamida) (acrilamida:N,N'-metilenobisacrilamida 37,5:1) a 8% (p/v) foi preparado em tampão TAE 1X (40 mmol l<sup>-1</sup> Tris, 20 mmol l<sup>-1</sup> ácido acético e 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA) com gradiente desnaturante linear de 40% a 60% de

ureia/formamida. O gradiente foi formado a partir da mistura de duas soluções (A e B) dispensadas por mini-bomba peristáltica formadora de gradiente (MPP-100-220: Mini-Peristaltic Pump for Gradient Gel Casting, C.B.S., Scientific Company, INC., USA), contendo uma mistura da solução A com 100% de agentes desnaturantes (uréia 7 mol l<sup>-1</sup> e formamida deionizada 40% (v/v)) em 8% de acrilamida: N,N'-metilenobisacrilamida (37,5:1) e solução B que foi preparado da mesma maneira que a solução A, mas, sem os agentes desnaturantes. As soluções também continham o polimerizador persulfato de amônia (3,1 mmol l<sup>-1</sup>) e o catalizador N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (0,0037 mmol l<sup>-1</sup>). O gradiente desnaturante foi monitorado utilizando 20 µl do corante de visualização (azul de bromofenol 0,5%, xileno cianol 0,5% e 1 × TAE). A polimerização dos géis ocorreu durante 3 h.

O preparo das amostras foram realizadas a partir de 8 µL dos produtos de PCR, juntamente com 8 µL do tampão da amostra (azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%, glicerol 70% e TAE 1 X). A mistura de fragmentos de 16S rRNA das espécies *Escherichia coli* ATCC 29214 (γ-Proteobacteria), *Salmonella entérica* Typhimurium ATCC 14028 (γ-Proteobacteria), *Bacillus cereus* ATCC 14579 (Firmicutes) e *Lactococcus lactis* ATCC 19435 (Firmicutes) foram utilizadas como marcadores bacterianos e as espécies *Saccharomyces boulardii*, *Kluyveromyces marxianus* ATCC 8554, *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 e *Yarrowia lypolítica* como marcadores fúngicos.

A eletroforese foi realizada com temperatura de 60 °C e voltagem constante de 100 V, durante 15 h. O gel foi corado por 20 minutos com solução de SYBR® Gold (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante. A imagem do gel foi visualizada e foto-documentada no sistema de digitalização de imagem Eagle Eye™ (Stratagene).

#### **4.0. Análise dos dados**

O software Bionumerics 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) foi utilizado para analisar os perfis de banda dos géis obtidos após a DGGE. Para a análise de agrupamento a estrutura da comunidade microbiana foi avaliada com base no coeficiente de similaridade Dice com otimização de 1% e tolerância de 1,5% pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic) (REF).

Os índices de diversidade foram calculados e a variável riqueza foi estimada com base na matriz binária gerada pelo software Bionumerics 5.1. Nessa análise cada unidade taxonômica operacional (OTU) corresponde a presença de uma banda de DNA

no gel de DGGE. A riqueza e diversidade foram calculados utilizando o programa Past (Hammer *et al.*, 2001).

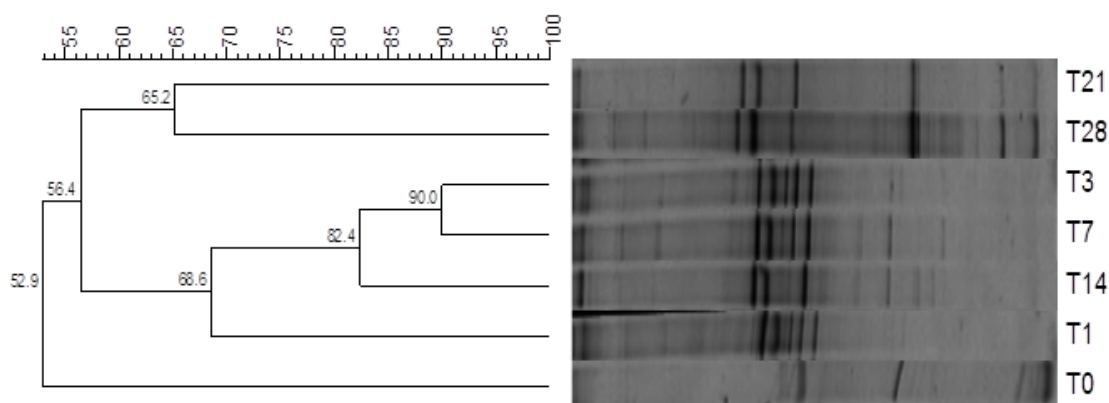
Os diagramas de Venn foram construídos pelo programa Mothur (Schloss *et al.*, 2009), utilizando a matriz binária de presença e ausência de OTU obtidos no software Bionumerics 5.1.

## Resultados

A análise dos perfis eletroforéticos do número de bandas obtido por meio da análise por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) revelou o mesmo número de OTUs para o oligonucleotídeo universal de bactéria e de levedura (45 OTUs). Foram encontrados 35 e 34 OTUs para Firmicutes e  $\gamma$ -Proteobacteria, respectivamente.

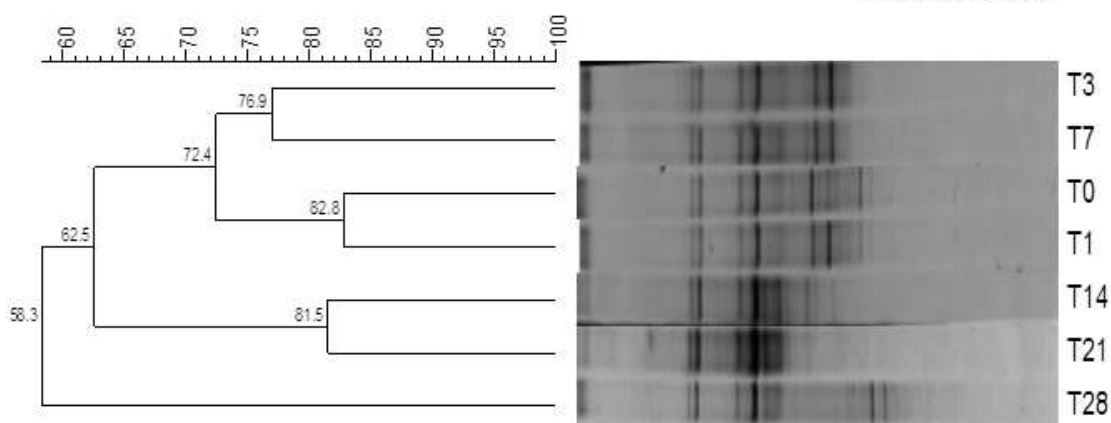
A diversidade de bactérias avaliada a partir da amplificação do gene 16S rRNA, utilizando diferentes oligonucleotídeos, revelou baixa similaridade entre os períodos de fermentação (Figuras 1, 2 e 3). A análise de agrupamento do Domínio Bacteria mostrou que todos os períodos de fermentação (T1-T28) agruparam separadamente da cana *in natura* (Figura 1). Os períodos foram subdivididos em dois grupos, tempos iniciais (T1, T3, T7 e T14) e tempos finais da fermentação (T21 e T28). Para os filos Firmicutes e  $\gamma$ -Proteobacteria, a análise de agrupamento indicou que as amostras da silagem de cana-de-açúcar foram separadas em dois grupos (Figuras 2 e 3). Em ambos os grupos há dois clados distintos separando os tempos iniciais (T1 a T7) dos tempos finais de ensilagem (T14 a T28).

## Bacteria



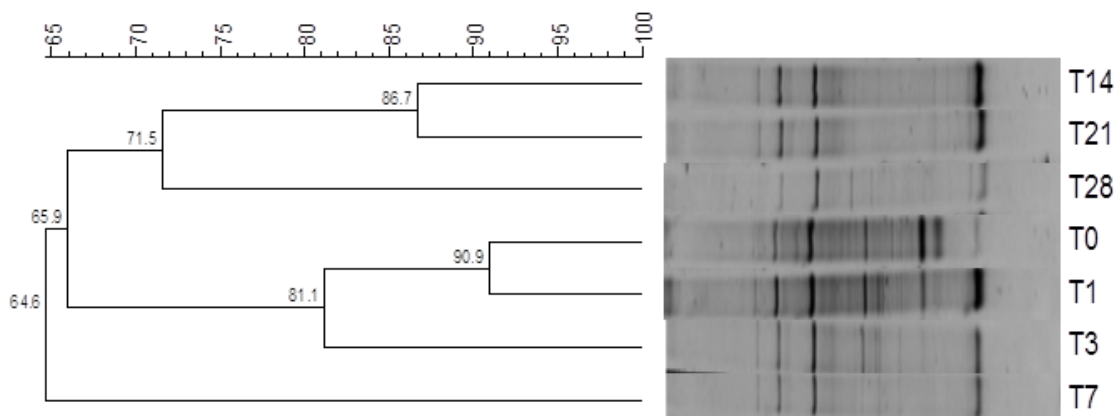
**Figura 1.** Perfil da análise de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) de seqüências do gene 16S rRNA da população bacteriana da cana *in natura* e da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias. Os amplicons foram obtidos utilizando oligonucleotídeo universal para Bacteria, pela técnica de Nested-PCR. O software Bionumerics 5.1. foi utilizado para a realização do dendograma. O agrupamento foi realizado utilizando o método UPGMA e a escala de 55 a 100 indica o nível de similaridade. (T0) cana *in natura*; (T) tempo de fermentação da silagem em dias.

## Firmicutes



**Figura 2.** Perfil da análise de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) de seqüências do gene 16S rRNA da população bacteriana da cana *in natura* e da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias. Os amplicons foram obtidos utilizando oligonucleotídeo para o Filo Firmicutes, pela técnica de Nested-PCR. O software Bionumerics 5.1. foi utilizado para a realização do dendograma. O agrupamento foi realizado utilizando o método UPGMA e a escala de 60 a 100 indica o nível de similaridade. (T0) cana *in natura*; (T) tempo de fermentação da silagem em dias.

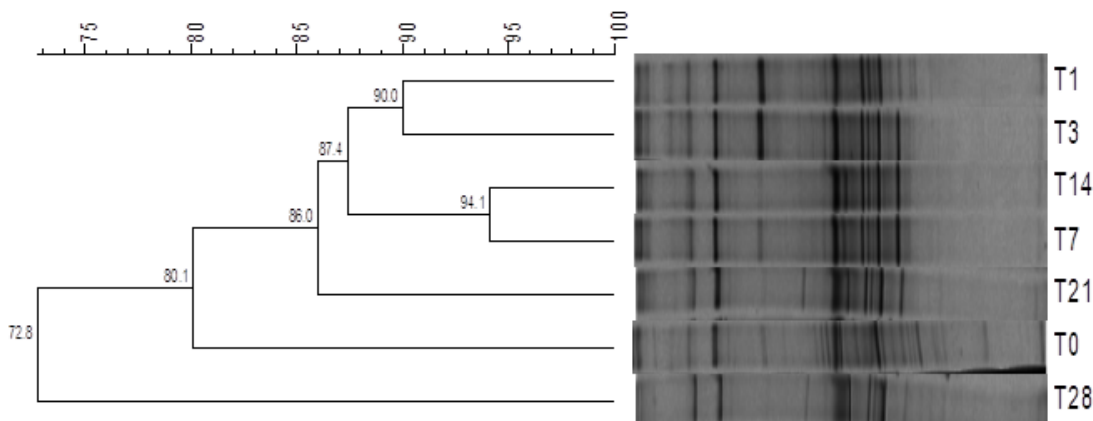
## Gammaproteobacteria



**Figura 3.** Perfil da análise de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) de seqüências do gene 16S rRNA da população bacteriana da cana *in natura* e da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias. Os amplicons foram obtidos utilizando oligonucleotídeo para o Filo  $\gamma$ -Proteobacteria, pela técnica de Nested-PCR. O software Bionumerics 5.1. foi utilizado para a realização do dendograma. O agrupamento foi realizado utilizando o método UPGMA e a escala de 65 a 100 indica o nível de similaridade. (T0) cana *in natura*; (T) tempo de fermentação da silagem em dias.

A diversidade de leveduras avaliada a partir da amplificação do gene 26S rRNA, mostrou uma separação entre a cana *in natura* e os períodos de fermentação (Figura 4). O período de 28 dias foi o que apresentou menor similaridade quando comparado aos outros períodos. Observou-se um agrupamento entre os períodos T1-T3 e T7-T14 (Figura 4).

## Leveduras



**Figura 4.** Perfil da análise de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) de seqüências do gene rRNA 26S, região D1/D2, de leveduras da cana *in natura* e da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias. Os amplicons foram obtidos utilizando oligonucleotídeo para leveduras, pela técnica de Nested-PCR. O software Bionumerics 5.1. foi utilizado para a realização do dendograma. O agrupamento foi realizado utilizando o método UPGMA e a escala de 75 a 100 indica o nível de similaridade. (T0) cana *in natura*; (T) tempo de fermentação da silagem em dias.

As estimativas da riqueza e do índice de diversidade de Shannon-Wiener revelaram níveis semelhantes de diversidade apesar da composição da comunidade

microbiana entre os períodos de fermentação terem sido diferente nos grupos avaliados (Tabela 2). A riqueza obtida para o Domínio Bacteria e Filo Firmicutes foram 34,5% e 40% maiores, respectivamente, após os 28 dias de fermentação comparada com a riqueza da população epífita. No entanto, a riqueza do Filo  $\gamma$ -Proteobacteria e de leveduras reduziu em 38% e 27,6%, respectivamente, após 28 dias de fermentação quando comparado com a cana *in natura*. Esse resultado indica que o número de espécies epífitas de bactérias do Filo  $\gamma$ -Proteobacteria e de leveduras são maiores no início da fermentação em relação ao período final da fermentação. A mesma tendência foi observada para o índice de Shannon-Wiener (Tabela 2). Para o Domínio Bacteria e Filo Firmicutes o índice de Shannon-Wiener da população epífita foi 12,8% e 16,2% menor, respectivamente e para  $\gamma$ -Proteobacteria e de leveduras foi 15,7% e 9,5% maior do que o apresentado após 28 dias de ensilagem da cana-de-açúcar.

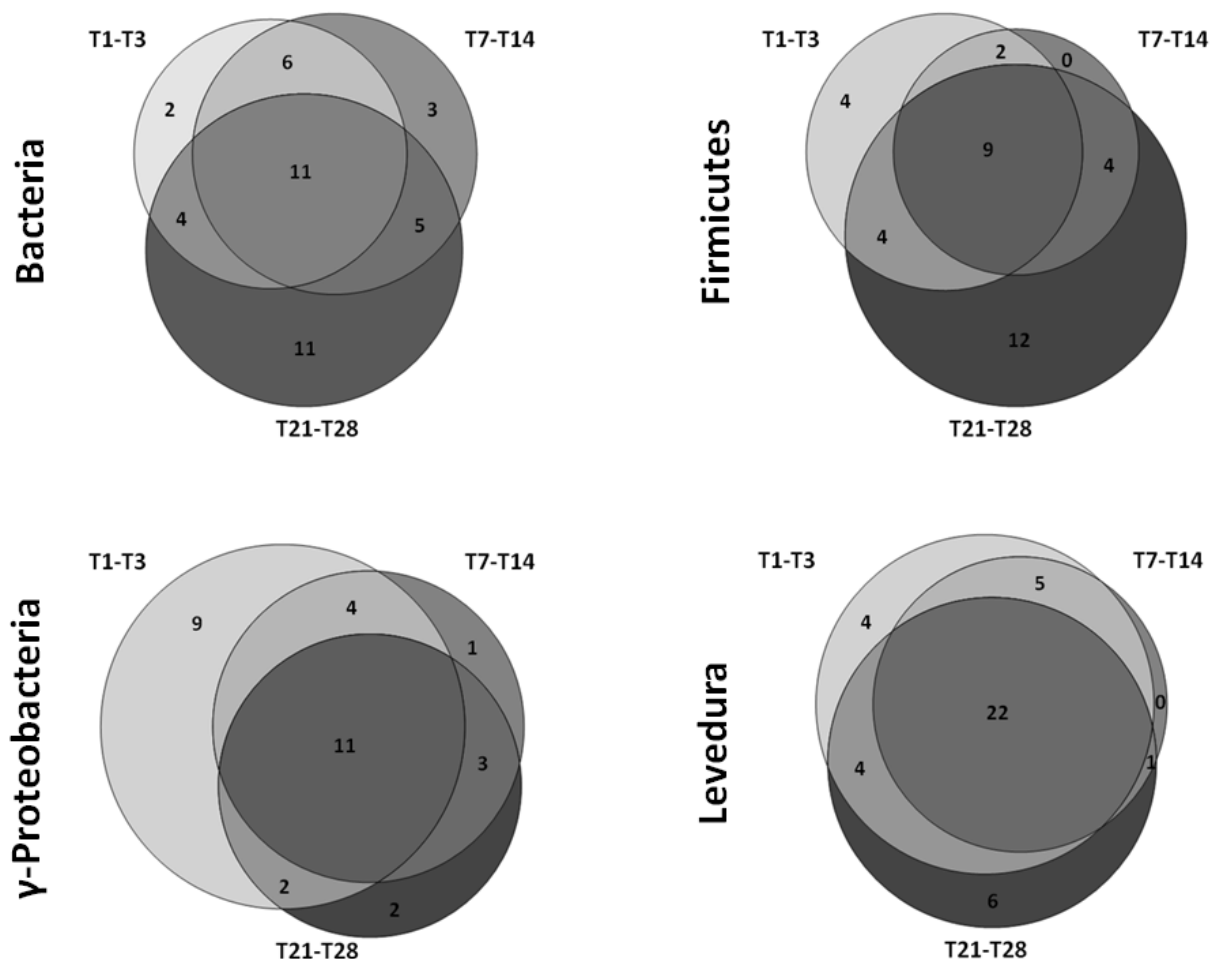
**Tabela 2.** Análise da diversidade por PCR-DGGE, de bactérias e leveduras da cana *in natura* e da silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias. O Índice de Shannon-Wiener foi calculado a partir da matriz binária de ausência e presença de OTUs.

Período de fermentação (dias)	Bacteria	Firmicutes	$\gamma$ -Proteobacteria	Levedura
<b>Riqueza (n° OTUs)</b>				
0*	19	15	21	29
1	18	14	23	30
3	19	16	15	30
7	21	10	15	26
14	20	15	16	25
21	17	12	14	31
28	29	25	13	21
<b>Índice de Shannon-Wiener (H')</b>				
0*	2,94	2,70	3,05	3,37
1	2,89	2,64	3,14	3,40
3	2,94	2,77	2,71	3,40
7	3,05	2,30	2,71	3,26
14	3,00	2,71	2,77	3,22
21	2,83	2,49	2,64	3,43
28	3,37	3,22	2,57	3,05

\* Cana-de-açúcar antes da ensilagem

Os diagramas de Venn demonstraram maior diversidade entre os períodos de fermentação para o Domínio Bacteria e o Filo  $\gamma$ -Proteobacteria, com 11 OTUs comuns entre os períodos de fermentação avaliados. Para o Filo Firmicutes, 9 OTUs estiverem presentes durante todo o processo de ensilagem da cana-de-açúcar (Figura 5). No Domínio Bacteria detectou-se pelo menos 11 OTUs que foram exclusivas para o período de 21 a 28 dias de fermentação, enquanto no Filo  $\gamma$ -Proteobacteria foi observado o maior número de OTUs exclusivos (9) no intervalo entre o 1° e 3° dia de fermentação. Para o grupo de leveduras, 22 OTUs estiveram presentes em todos os períodos analisados. Um número baixo de OTUs foi exclusivo dos períodos analisados,

indicando que não ocorreu grande variação de OTUs entre as faixas de períodos observados (Figura 5). Tanto no Filo Firmicutes quanto no grupo das leveduras foi observado períodos de fermentação que não continham OTUs exclusivos.



**Figura 5.** Diagrama de Venn com a distribuição de OTUs entre três faixas de períodos da fermentação de cana-de-açúcar. Os seis períodos de fermentação analisados foram divididos em três faixas de períodos: início (T1 e T3), intermediário (T7 e T14) e final (T21 e T28). Os diagramas de Venn foram construídos a partir da matriz binária obtidas pela análise da imagem do gel no software Bionumerics 5.1 utilizando o programa Mothur.

## Discussão

Trabalhos com silagem de cana-de-açúcar envolvendo a manipulação do processo fermentativo por meio da adição de aditivos biológicos e químicos têm sido realizados com o objetivo de reduzir os efeitos negativos de microrganismos indesejáveis e melhorar a qualidade da silagem (Santos *et al.*, 2006; Ávila *et al.*, 2008a; Balieiro-Neto *et al.*, 2009; Ávila *et al.*, 2010a; Cavali *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2014a). No entanto, poucos estudos relacionados têm sido realizados

para caracterizar a composição da comunidade microbiana durante a fermentação da cana-de-açúcar.

O interesse em estudar a diversidade microbiana e conhecer a dinâmica da sucessão desses microrganismos durante a fermentação da cana-de-açúcar está relacionado às perdas nutricionais associadas à fermentação alcoólica das leveduras. Além disso, bactérias que estão envolvidas na deterioração da silagem podem ser patogênicas e também podem causar efeitos negativos sobre a saúde do animal e/ou a qualidade do leite (Oude Elferink *et al.*, 2015).

Trabalhos anteriores sobre microbiologia da silagem basearam-se em técnicas dependentes de cultivo (Kempton e Clemente 1959; Lin *et al.*, 1992; Ávila *et al.*, 2010b; Carvalho *et al.*, 2014), nas quais meios de cultura e condições físico-químicas apropriadas são requeridas para o cultivo de microrganismos específicos. Apesar dos esforços de diversos grupos de pesquisa, o número de bactérias cultiváveis em uma amostra ambiental é geralmente menor do que 10%, o que tipicamente não representa a diversidade de microrganismos do ecossistema (Ercolini, 2004).

A utilização de técnicas moleculares independentes de cultivo como PCR-DGGE permite acessar diferenças nas sequências do material genético de microrganismos cultiváveis e não-cultiváveis e relacioná-las com diferenças taxonômicas para determinar a diversidade “real” dos ecossistemas microbianos. No nosso estudo foi observado alta diversidade genética para bactérias e leveduras. Foi observado, a partir da análise de riqueza, que a diversidade de leveduras ao longo do tempo não variou, uma vez que, o número de OTUs foi similar entre os períodos de fermentação da silagem. O valor do índice de Shannon-Wiener foi elevado para a população de leveduras na cana *in natura*, indicando que há grande diversidade de leveduras na população epífita desta cultura. Geralmente o índice de Shannon-Wiener varia entre 1,5 e 3,5 e raramente são verificados valores acima de 5,0 (Kent e Coker, 1992; Fiedler *et al.*, 2004). Estudos anteriores indicaram que a cana-de-açúcar possui microbiota epífita rica em leveduras, com populações de até  $10^6$  UFC/g de forragem fresca (Ávila *et al.*, 2008a; Cavali *et al.*, 2010). Além disso, algumas espécies de leveduras se desenvolvem em condições anaeróbias, podendo manter altas populações durante todo o processo de fermentação (Walker, 1998).

As leveduras são os principais microrganismos responsáveis pelas perdas durante a fermentação da cana-de-açúcar e pelo início da deterioração aeróbia da silagem após a abertura do silo (Ávila *et al.*, 2010b). Perdas de até 30% da massa seca ensilada da cana-de-açúcar, podem ocorrer em consequência da transformação do

açúcar em etanol e dióxido de carbono durante a fermentação (Freitas *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008). O interesse em estudar a dinâmica e a diversidade da população de leveduras na silagem de cana-de-açúcar está relacionada ao entendimento do processo fermentativo para manipular a fermentação com o uso de aditivos biológicos, reduzir as perdas e melhorar a qualidade do alimento e o desempenho animal.

A análise do 16S rRNA indicou que o número de OTUs no Domínio Bacteria foi maior do que os encontrados para os Filos Firmicutes e  $\gamma$ -Proteobacteria. No  $\gamma$ -Proteobacteria o número de OTUs detectadas na cana *in natura* reduziu durante a fermentação e, em alguns casos, OTUs específicos até desapareceram. Mcgarvey e colaboradores (2013) verificaram redução de 8% de *Enterobacteriaceae*, uma família da classe  $\gamma$ -Proteobacteria, durante o processo de fermentação e concluíram que essa redução pode ser devido à entrada dessas bactérias em um estado fisiológico de dormência. Segundo Oude Elferink e colaboradores (2015) os microrganismos ácido-tolerante que sobrevivem às fases finais da fermentação estão em estado de inatividade ou como esporos.

Após a ensilagem, na etapa de anaerobiose, a principal alteração microbiana observada em silagens de boa qualidade é a redução de enterobactérias e o desenvolvimento de uma população de BAL dominante (Cai *et al.*, 1998). As enterobactérias geralmente são o segundo grupo bacteriano mais numeroso da microbiota epífita ativa no silo e, portanto, são importantes pois competem com a população de BAL na forragem ensilada pelo mesmo substrato (Pahlow *et al.*, 2003). A família Enterobacteriaceae possui várias espécies patogênicas, particularmente dos gêneros *Escherichia* sp., *Salmonella* sp., e *Citrobacter* sp. (Williams *et al.*, 2010).

Mcgarvey e colaboradores (2013) verificaram em alfafa, antes da ensilagem, que a maioria das sequências de 16S rRNA analisadas foi associada com o Filo Proteobacteria, mais especificamente, com os gêneros *Erwinia*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Pantoea*. Esses autores observaram também que após 40 dias de ensilagem da alfafa, o número de sequências associadas com Proteobacteria caiu significativamente, de 89,6% para 26,9%, sendo, 96,9% associados com a classe Gammaproteobacteria e 3,1% associados com Alphaproteobacteria. Das sequências associadas à Gammaproteobacteria, 97,6% foram relacionados à família Enterobacteriaceae (Mcgarvey *et al.*, 2013).

A população microbiana das culturas forrageiras é consideravelmente diferente da encontrada na silagem, sendo observadas variações tanto na população quanto, na composição da microbiota (Pahlow *et al.*, 2003). O filo Firmicutes inclui bactérias da

ordem Lactobacillales, que são de grande importância para a fermentação da silagem. Esse grupo envolve as bactérias produtoras de ácido láctico, que desempenham papel fundamental durante a fermentação da silagem e são as principais responsáveis pela qualidade final do produto (Dunière *et al.*, 2013).

Em um levantamento realizado na silagem de alfafa com o objetivo de descrever a dinâmica populacional de bactérias, observou-se que mais de 95% do total das sequências obtidas para o filo Firmicutes eram associadas com BAL, sendo, em sua maioria homofermentativas (Mcgarvey *et al.*, 2013). Depois de 40 dias de ensilagem, o número de sequências associadas com o filo Firmicutes subiu de 8,1% para 70,6%, sendo, 99,5% da classe Bacilli (99,6% de Lactobacillales). Das sequências associadas a Lactobacillales, 72,2% eram relacionados a família Lactobacillaceae, 17,1% Streptococcaceae, 2,2% Leuconostocaceae e 2,1% Enterococcaceae (Mcgarvey *et al.*, 2013).

Apesar da diversidade de espécies do filo Firmicutes ter sido menor nos períodos iniciais da fermentação (Tabela 2), elevada população de BAL tem sido quantificada nos primeiros dias após o fechamento do silo, que ocorre provavelmente por causa das condições ácidas e baixas concentrações de oxigênio na massa ensilada (Pedroso *et al.*, 2005; Ávila *et al.*, 2008b; Ávila *et al.*, 2010b). Parvin e colaboradores (2010) avaliaram a sucessão de BAL por meio de análises de DGGE e relataram resultados semelhantes para a sucessão de BAL. *Lactococcus lactis* foi particularmente ativo nas fases iniciais de ensilagem, enquanto que *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis* foram detectados ao longo da fermentação (Parvin and Nishino 2010). Li e Nishino (2011) também identificaram as espécies de bactérias dominantes em silagem de milho utilizando DGGE. Os autores verificaram a presença de *L. brevis*, *Pediococcus parvulus*, *Weissella confusa* e *Klebsiella pneumonia* na forragem, antes da ensilagem, e na silagem.

Mudanças significativas na população bacteriana não necessariamente resultam em índices de diversidade diferentes, uma vez que mudanças em certos grupos taxonômicos podem ser compensadas por alterações em outros grupos bacterianos (Hartmann and Widmer 2006). No nosso estudo, esse comportamento foi observado para o Filo Firmicutes e  $\gamma$ -Proteobacteria. No Filo Firmicutes observou-se aumento na riqueza de espécies e no índice de Shannon-Wiener durante a fermentação, ao contrário do observado para  $\gamma$ -Proteobacteria, que apresentou redução desses valores. Outros estudos de diversidade já relataram fenômeno semelhante, com estruturas populacionais

significativamente diferentes e com níveis semelhantes de diversidade (Hartmann e Widmer 2006; Mcgarvey *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos a partir do diagrama de Venn (Figura 5) mostram que um grande número de OTUs está presente em todo o processo fermentativo e que alguns outros, em menor quantidade, são exclusivos de um determinado período de fermentação. É importante identificar no ecossistema da silagem quais as espécies que estão sempre presentes e quais que variam de acordo com as condições impostas pelo ambiente, para identificar as espécies dominantes e mais resistentes. A colonização da forrageira por microrganismos é um processo complexo que depende de muitos fatores como o tipo de forragem, estágio de maturidade da planta, clima, localização geográfica, corte, tipo de fertilizante utilizado, condicionamento e tipo de cultivar da forrageira (Lin *et al.*, 1992; Ávila *et al.*, 2010b; Mcgarvey *et al.*, 2013). Parvin e colaboradores (2010) avaliaram os perfis eletroforéticos de DGGE de quatro tipos de silagem (azevém, milho, capim e capim-guiné) e identificaram uma população diferenciada entre os tipos de silagem, forragem fresca e forragem ensilada.

Em resumo, os resultados obtidos no nosso estudo mostraram alta diversidade entre os grupos microbianos avaliados, sendo que as leveduras apresentaram maior números de OTUs durante o processo de ensilagem. De acordo com os índices de diversidade, não foram observadas variações expressivas entre os períodos de fermentação, somente entre a cana *in natura* e o último dia de amostragem. O perfil de diversidade entre os Filos Firmicutes e  $\gamma$ -Proteobacteria foram contrários em relação ao aumento e diminuição da diversidade de espécies. Resultados mais conclusivos a respeito da dinâmica da sucessão microbiana poderão ser obtidos por meio do sequenciamento das OTUs para caracterizar e identificar de forma precisa as possíveis alterações no ecossistema da silagem de cana-de-açúcar durante seu processo fermentativo.

## Referências

- Ávila CL da S, Pinto JC, Sugawara MS, Michele, Silva S da, Schwan e RF (2008a) Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. Acta Sci Anim Sci 30:255–261. doi: 10.4025/actascianimsci.v30i3.1564
- Ávila CL da S, Valeriano AR, Pinto JC, Henrique, Figueiredo CP, Rezende AV de, Schwan RF (2010a) Chemical and microbiological characteristics of sugar cane silages treated with microbial inoculants. Rev Bras Zootec 39:25–32.
- Ávila CLS, Bravo-Martins CEC, Chwan RF (2010b) Identification and characterization of yeasts in sugarcane silages. J Appl Microbiol 109:1677–1686. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04796.x
- Ávila CLS, Carvalho BF, Pinto JC, Duarte WF, Schwan RF (2014) The use of *Lactobacillus* species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. J Dairy Sci 97:940–951.
- Ávila CLS, Pinto JC, Sugawara MS, Silva MS, Schwan RF (2008b) Qualidade da silagem de cana-de-açúcar inoculada com uma cepa de *Lactobacillus buchneri*. Anim Sci 30:255–261.
- Balieiro-Neto G, Junior EF, Nogueira JR, Possenti R (2009) e digestibilidade aparente de silagem de cana-de-açúcar com aditivos químico e microbiano. Pesqui Agropecuária Bras bra 44:621–630.
- Bento CBP, Azevedo AC de, Detmann E, Mantovani HC (2015) Biochemical and genetic diversity of carbohydrate-fermenting and obligate amino acid-fermenting hyper-ammonia-producing bacteria from Nellore steers fed tropical forages and supplemented with casein. BMC Microbiol 15:28.
- Bravo-Martins CEC, Carneiro H, Castro-Gómez RJH, Figueiredo HCP, Schwan RF (2006) Chemical and microbiological evaluation of ensiled sugar cane with different additives. Brazilian J Microbiol 37:499–504. doi: 10.1590/S1517-83822006000400018
- Cai Y, Benno Y, Ogawa M, Kumai S (1999) Effect of applying lactic acid bacteria isolated from forage crops on fermentation characteristics and aerobic deterioration of silage. J Dairy Sci 82:520–6.
- Cai Y, Benno Y, Ogawa M, Ohmomo S, Kumai S, Nakase T (1998) Influence of *Lactobacillus* spp. from an Inoculant and of *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from Forage Crops on Silage Fermentation. Appl Envir Microbiol 64:2982–2987.
- Carvalho BF, Ávila CLS, Pinto JC, Neri J, Schwan RF (2014a) Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. Anim Feed Sci Technol. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.04.003>
- Carvalho BF, Ávila CLS, Pinto JC, Neri J, Schwan RF (2014b) Microbiological and chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria. Anim Feed Sci Technol 195:1–13. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2014.04.003
- Cavali J, Pereira OG, Filho S de CV, Edson, Santos M, Carvalho GGP de, Santos MV, Marlos, Porto O, Rodrigues JFH (2010) Bromatological and microbiological characteristics of sugarcane silages treated with calcium oxide. Rev Bras Zootec 39:1398–1408.
- Chang H, Kim K, Nam Y, Woon S, Kim M, Ok C, Oh H, Bae J (2008) Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. Int J Food Microbiol 126:159–166. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.013
- Dunière L, Sindou J, Chaucheyras-Durand F, Chevallier I, Thévenot-Sergentet D (2013) Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. Anim Feed Sci Technol 182:1–15.
- Eikmeyer FG, Köfinger P, Poschenel A, Jünemann S, Zakrzewski M, Heinel S, Mayrhuber E, Grabherr R, Pühler A, Schwab H (2013) Metagenome analyses reveal the influence of the inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 on the microbial community involved in grass ensiling. J Biotechnol 167:334–343.

- Ennahar S, Cai Y, Fujita Y (2003) Phylogenetic Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Paddy Rice Silage as Determined by 16S Ribosomal DNA Analysis. *Appl Environ Microbiol* 69:444–451. doi: 10.1128/AEM.69.1.444-451.2003
- Ercolini D (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J Microbiol Methods* 56:297–314.
- Ferrari Junior E, Paulino VT, Possenti R a., Lucenas TL (2009) Aditivos em silagem de capim elefante paraíso (*Pennisetum hybridum* cv. *Paraíso*). *Arch Zootec* 58:185–194. doi: 10.4321/S0004-05922009000200003
- Giraffa G, Chanishvili N, Widyastuti Y (2010) Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Res Microbiol* 161:480–7. doi: 10.1016/j.resmic.2010.03.001
- Gollop N, Zakin V, Weinberg ZG (2005) Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. *J Appl Microbiol* 98:662–6. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02504.x
- Gomes NCM, Heuer H, Schönfeld J, Costa R, Mendonça-Hagler L, Smalla K (2001) Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil* 232:167–180. doi: 10.1023/A:1010350406708
- Hammer O, Harper DA., Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4:9.
- Hammes WP, Hertel C (2006) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The prokaryotes*.
- Hartmann M, Widmer F (2006) Community structure analyses are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. *Appl Environ Microbiol* 72:7804–12. doi: 10.1128/AEM.01464-06
- Head IM, Bailey MJ (2003) Environmental biotechnology: Methodological advances spawn new concepts in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 14:245–247.
- Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington E (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Envir Microbiol* 63:3233–3241.
- Holzer M, Mayrhuber E, Danner H, Braun R (2003) The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends Biotechnol* 21:282–287.
- Jonsson A, Pahlow G (1984) Systematic classification and biochemical characterization of yeasts growing in grass silage inoculated with *Lactobacillus* cultures. *Anim Res Dev* 20:7–22.
- Kempton A G, Clemente CL (1959) Chemistry and Microbiology of Forage-Crop Silage. *Appl Microbiol* 7:362–7.
- Lachance M-A, Bowles JM, Starmer WT, Barker JSF (1999) *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Can J Microbiol* 45:172–177. doi: 10.1139/w98-225
- Li Y, Nishino N (2011) Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. *Grassl Sci* 57:184–191. doi: 10.1111/j.1744-697X.2011.00226.x
- Lin C, Bolsen KK, Brent BE, Fung DY (1992) Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. *J Appl Microbiol* 73:375–387.
- Lopes J, Evangelista AR, Rocha GP (2007) Valor nutricional da silagem de cana-de-açúcar acrescida de uréia e aditivos absorventes de umidade. *Rev Bras Zootec* 36:1155–1161. doi: 10.1590/S1516-35982007000500024
- Maeda EM, Zeoula LM, Jobim CC, Bertaglia F, Jonker RC, Geron LJV, Henrique DS (2011) Chemical composition, fermentation, in vitro digestibility and in situ degradability of sugar cane silages with *Lactobacillus*, urea and agricultural byproduct. *Rev Bras Zootec* 40:2866–2877.

- McDonald P, Henderson A, Heron S (1991) *The Biochemistry of Silage*, Chalcombe.
- Mcgarvey J a., Franco RB, Palumbo JD, Hnasko R, Stanker L, Mitloehner FM (2013) Bacterial population dynamics during the ensiling of medicago sativa (alfalfa) and subsequent exposure to air. *J Appl Microbiol* 114:1661–1670. doi: 10.1111/jam.12179
- Muhling M, Woolven-Allen J, Murrell JC, Joint I (2008) Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J* 2:379–392.
- Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Envir Microbiol* 59:695–700.
- Oude Elferink SJ, Krooneman J, Gottschal JC, Spoelstra SF, Faber F, Driehuis F (2001) Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl Environ Microbiol* 67:125–32. doi: 10.1128/AEM.67.1.125-132.2001
- Oude Elferink SJWH, Driehuis F, Gottschal JC, Spoelstra SF (2015) Paper 2.0: Silage fermentation processes and their manipulation. In: <http://www.fao.org/docrep/005/x8486e/x8486e09.htm>. <http://www.fao.org/docrep/005/x8486e/x8486e09.htm>. Accessed 29 Dec 2015
- Pahlow G (1982) Verbesserung der aeroben stabilitat von silagen durcimpfpreparate. *Das Wirtschaftseigene Futter* 28:107–122.
- Pahlow G, Muck R, Driehuis F, Elferink S, Spoelstra S (2003) Microbiology of ensiling. *Silage Sci Technol* 31–94. doi: 10.2134/agronmonogr42.c2
- Parvin S, Nishino N (2010) Succession of lactic acid bacteria in wilted rhodesgrass silage assessed by plate culture and denaturing gradient gel electrophoresis. *Grassl Sci* 56:51–55. doi: 10.1111/j.1744-697X.2009.00173.x
- Parvin S, Wang C, Li Y, Nishino N (2010) Effects of inoculation with lactic acid bacteria on the bacterial communities of Italian ryegrass, whole crop maize, guinea grass and rhodes grass silages. *Anim Feed Sci Technol* 160:160–166. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.07.010>
- Pedroso A de F, Nussio LG, Paziani S de F, Loures DRS, Igarasi MS, Coelho RM, Packer IH, Horii J, Gomes LH (2005) Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. *Sci Agric* 62:427–432. doi: 10.1590/S0103-90162005000500003
- Pedroso ADF, Nussio LG, Loures DRS, Paziani SDF, Ribeiro JL, Mari LJ, Zopollatto M, Schmidt P, Mattos WRS, Horii J (2008) Fermentation, losses, and aerobic stability of sugarcane silages treated with chemical or bacterial additives. *Sci Agric* 65:589–594. doi: 10.1590/S0103-90162008000600004
- Santos MC, Nussio LG, Mourão GB, Schmidt P, Mari LJ, Ribeiro JL (2008) Influência da utilização de aditivos químicos no perfil da fermentação, no valor nutritivo e nas perdas de silagens de cana-de-açúcar. *Rev Bras Zootec* 37:1555–1563.
- Santos RV, Evangelista AR, Pinto JC, Filho CC de CC, de Souza RM (2006) Composição química da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) e das silagens com diferentes aditivos em duas idades de corte. *Ciência e Agrotecnologia* 30:1184–1189.
- Schmidt P, Rossi Junior P, Junges D, Dias LT, de Almeida R, Mari LJ (2011) Novos aditivos microbianos na ensilagem da cana-de-açúcar: Composição bromatológica, perdas fermentativas, componentes voláteis e estabilidade aeróbia. *Rev Bras Zootec* 40:543–549. doi: 10.1590/S1516-35982011000300011
- Stevenson DM, Weimer PJ (2007) Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:165–174.
- Williams KP, Gillespie JJ, Sobral BWS, Nordberg EK, Snyder EE, Shallom JM, Dickerman AW (2010) Phylogeny of gammaproteobacteria. *J Bacteriol* 192:2305–2314. doi: 10.1128/JB.01480-09

## CONCLUSÕES GERAIS

- Quatro gêneros e dez espécies de leveduras foram isoladas e identificadas na silagem de cana-de-açúcar fermentada por 28 dias;
- As espécies *Pichia kudriavzevii* e *Candida glabrata* permaneceram abundantes em todos os tempos de amostragem demonstrando serem resistentes às condições do processo de ensilagem;
- A população de BAL foi maior do que a população de leveduras durante todo o processo de fermentação;
- A população de levedura nos tempos finais de fermentação foi maior quando comparada com a cana *in natura* e e os tempos iniciais;
- Foram identificados 21 gêneros de bactérias da cana *in natura* e da silagem de cana-de-açúcar, sendo 8 gêneros pertencentes ao grupo de bactérias do ácido lático;
- Isolados pertencentes ao grupo de BAL apresentaram atividade inibitória contra *L. monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*;
- A espécie *W. cibaria* se destacou dentre as avaliações realizadas, demonstrando potencial como inoculante biológico para a ensilagem da cana-de açúcar;
- Encontrou-se alta diversidade entre os grupos microbianos avaliados;
- Não foram observadas variações expressivas entre os períodos de fermentação em relação ao índice de diversidade, exceto entre a cana *in natura* e o último dia de amostragem;
- O perfil de diversidade entre os Filos Firmicutes e  $\gamma$ -Proteobacteria foram contrários em relação ao aumento e diminuição da diversidade de espécies. O mesmo comportamento foi observado para o Domínio Bacteria e leveduras.