UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Instituto de Ciências Agrárias
Medicina Veterinária

Alessandra Boy Isidoro Vasconcelos

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE DIFERENTES SILAGENS

UNAÍ
2023

Alessandra Boy Isidoro Vasconcelos

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE DIFERENTES SILAGENS

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof ª. Drª. Cláudia Braga Pereira Bento

UNAÍ
2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por todas as suas bençãos em minha vida.

Aos meus pais, Siomara Nilson Isidoro de Vasconcelos e Alexandre Gomes Rodrigues de Vasconcelos, pela dedicação, esforço e apoio. Sem vocês, não seria possível a conclusão dessa etapa na minha vida. Aos meus irmãos Lara e Alex. Aos meus avós, Sebastião Nilson (*In memorian*), Marina Nilson (*In memorian*), José Gomes de Vasconcelos Filho e Floripes Rodrigues de Vasconcelos. Aos meus tios e tias, em especial Maria Aparecida Nilson, por todo o apoio.

À minha orientadora, Profª Cláudia Braga Pereira Bento, pela paciência e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos componentes da Banca, Prof. Paulo Roberto Ramos Barbosa e Profª Marília Cristina Sola, pelas contribuições.

Aos colegas e amigos que fiz ao longo do curso, especialmente Igor Calmon, Deise Ane, Mayara Nogueira, Mariana Bogado e meu namorado Lázaro Vieira pela ajuda e companheirismo.

Às técnicas do Laboratório de Microbiologia, Débora e Lorena, e a colega Natália Gonçalves, pelos ensinamentos e paciência.

E, por fim, a todos que me ajudaram chegar até aqui.

RESUMO

A silagem é o produto da fermentação de carboidratos solúveis da forragem por bactérias que causam redução do pH da massa ensilada pela produção de ácidos orgânicos através do processo de ensilagem. Neste processo, inoculantes microbianos têm sido amplamente utilizados com intuito de favorecer a fermentação da silagem, reduzir a ação de microrganismos indesejáveis, aumentar a produção de ácido lático e garantir a sua qualidade por um período maior. Objetivou-se com o presente trabalho isolar, identificar e caracterizar bactérias lácticas de diferentes silagens do município de Unaí-MG. Para tanto, cinco amostras de diferentes silagens (sorgo e milho) foram coletadas, diluídas e plaqueadas. As colônias foram selecionadas e caracterizadas a partir da coloração diferencial de Gram, morfologia celular, e testes bioquímicos de reações de catalase e produção de ácido em meio MRS com púrpura de bromocresol. Oito isolados caracterizados como Gram-positivos, catalase negativa e produtores de ácido foram selecionados e submetidos aos testes bioquímicos de produção de CO_2, crescimento em caldo MRS com diferentes concentrações de NaCl (3,0% e 6,5%) e diferentes valores de pH (3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 8,5; e 9,0). Os isolados selecionados foram testados quanto à atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e quanto à sensibilidade a antibióticos em meio de cultura ágar MRS (cefalexina, tetraciclina, amoxicilina + ácido clavulânico e ácido nalidíxico). A contagem bacteriana nas amostras de silagens variou de $1,57 \times 10^4$ a $1,05 \times 10^7$ UFC/g. Foram obtidos 159 isolados bacterianos, a partir dos quais se selecionaram 123 colônias para serem caracterizadas morfologicamente. Todos os isolados foram caracterizados como Gram-positivos, 50,4% apresentaram forma de bacilos e 49,6% de cocos. Em relação à catalase e produção de ácido láctico, 88,6% foram identificados como catalase negativa e 87,8% produziram ácido em meio ágar MRS adicionado de púrpura de bromocresol e carbonato de cálcio. Dos oito isolados selecionados, apenas um produziu CO_2, sendo caracterizado como heterofermentativo. Todos os isolados cresceram em caldo MRS nas concentrações de 3,0% e 6,5% de NaCl e pH de 4,5, 8,5 e 9,0. Todos apresentaram potencial de ação antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*, sendo dois deles caracterizados como susceptíveis à amoxicilina + ácido clavulânico e um à tetraciclina. Sendo assim, foi possível caracterizar fenotipicamente sete bactérias ácido lácticas homofermentativas e uma heterofermentativa com potencial inoculante para o processo de ensilagem.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, fermentação láctica, microrganismos, milho, sorgo.

ABSTRACT

Silage is the product of the fermentation of soluble carbohydrates of the forage by bacteria that cause a reduction in the pH of the ensiled mass by producing organic acids through the ensiling process. In this process, microbial inoculants have been widely used to favor silage fermentation, reduce the action of undesirable microorganisms, increase lactic acid production and ensure its quality for a longer period. The objective of this study was to isolate, identify and characterize lactic acid bacteria from different silages in the municipality of Unaí-MG. For this purpose, five samples of different silages (sorghum and corn) were collected, diluted, and plated. Colonies were selected and characterized from Gram differential staining, cell morphology, and biochemical tests of catalase reactions and acid production in MRS medium with bromocresol purple. Eight isolates characterized as Gram-positive, catalase negative and acid producing were selected and subjected to biochemical tests of CO_2 production, growth in MRS broth with different NaCl concentrations (3.0% and 6.5%) and different pH values (3.0; 3.5; 4.0; 4.5; 8.5; and 9.0). The selected isolates were tested for antimicrobial activity against Escherichia coli and Staphylococcus aureus and for antibiotic sensitivity on MRS agar culture medium (cephalexin, tetracycline, amoxicillin + clavulanic acid and nalidixic acid). Bacterial counts in silage samples ranged from 1.57×10^4 to 1.05×10^7 CFU/g. A total of 159 bacterial isolates were obtained from which 123 colonies were selected for morphological characterization. All isolates were characterized as Gram-positive, 50.4% were bacilli and 49.6% cocci. Regarding catalase and lactic acid production, 88.6% were identified as catalase negative and 87.8% produced acid on MRS agar medium added bromocresol purple and calcium carbonate. Of the eight selected isolates, only one produced CO_2, being characterized as heterofermentative. All isolates grew in MRS broth at concentrations of 3.0% and 6.5% NaCl and pH of 4.5, 8.5 and 9.0. All of them showed potential antimicrobial action against S. aureus and E. coli, two of them being characterized as susceptible to amoxicillin + clavulanic acid and one to tetracycline. Thus, it was possible to phenotypically characterize seven homofermentative and one heterofermentative lactic acid bacteria with inoculant potential for the ensiling process.

Keywords: Antimicrobial activity, lactic fermentation, microorganisms, corn, sorghum.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ---------- 5

2 OBJETIVOS ---------- 7

2.1 Objetivo Geral ---------- 7

2.2 Objetivos Específicos ---------- 7

3 REFERENCIAL TEÓRICO ---------- 8

3.1 Importância da produção de silagem ---------- 8

3.2 Ensilagem e processo fermentativo ----------10

3.3 Uso de inoculantes microbiológicos em silagens----------10

3.4 Propriedades biológicas das bactérias ácido lácticas----------12

3.5 Uso de BALs em silagens para alimentação animal----------13

4 MATERIAL E MÉTODOS ---------- 16

4.1 Isolamento e enumeração ---------- 16

4.2 Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos ----------17

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana de BALs----------17

4.4 Teste de susceptibilidade a antibióticos ----------18

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ----------19

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS ----------39

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ----------40

1 INTRODUÇÃO

A principal fonte de alimentos para produção animal são as pastagens. No entanto, elas não se mantêm com alta qualidade nutricional durante todo o ano devido à instabilidade das características climáticas relacionadas principalmente à temperatura e pluviosidade (GEREY, 2018). Dessa forma, as alternativas de conservação de forragens com alto valor nutritivo por um período longo se mostram cada vez mais importantes. Diante disso, a oferta de silagem como fonte de alimento para esses animais tem sido uma das principais alternativas para atravessar eventuais períodos de escassez de pastagens (LEHMEN, 2014).

A silagem é produzida através do processo de ensilagem, no qual o oxigênio da massa ensilada é eliminado, criando um meio anaeróbico que favorece a fermentação dos carboidratos solúveis por bactérias ácido lácticas (BALs) epífitas ou introduzidas através de inoculantes (GHARECHAHI, 2017). O resultado é a produção de ácidos orgânicos que reduzem o pH da massa ensilada, assim inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis como fungos, leveduras, enterobactérias e clostrídios, além de reduzir a ação de enzimas proteolíticas da própria forragem que interferem no valor nutritivo final da silagem (WILKINSON; DAVIES, 2013; ZIELINSKI *et al*., 2021). Além disso, vários fatores intrínsecos de cada forragem influenciam na fermentação do processo incluindo o teor de matéria seca, capacidade tamponante, pH e a microbiota residente. Por isso, a utilização de técnicas que busquem otimizar o processo de fermentação e diminuir ou evitar a perda nutricional é fundamental (ERTEKİN, 2023; WANG, 2023).

A adição de inoculantes bacterianos durante o processo de ensilagem tem sido adotada com intuito de reduzir as perdas nutricionais e proporcionar uma silagem de qualidade por um período maior (MACHADO *et al*., 2012; MEJÍA-AVELLANEDA *et al*., 2022). De acordo com Muck *et al*. (2018), os diferentes inoculantes disponíveis para adição em silagens podem ser classificados como inibidores da fermentação, estimulantes da fermentação, inibidores da deterioração aeróbica, nutrientes e absorventes. Além disso, são classificados de acordo com a sua constituição como inoculantes de BAL homofermentativas, BAL heterofermentativas obrigatórias, inoculantes de combinação de BALs, aditivos químicos, aditivos enzimáticos e outros inoculantes. Inoculantes contendo BALs atuam favorecendo a fermentação homoláctica, a qual resulta em maior produção de ácido láctico que causa uma rápida redução do pH, assim permitindo a preservação do material ensilado e minimizando as perdas de nutrientes (NIKKHAH, 2013).

As BALs são bactérias Gram-positivas, com morfologia de cocos ou bastonetes, catalase negativa e produção predominante de ácido láctico. Sua classificação em diferentes grupos depende do metabolismo fermentativo e características individuais, como crescimento em diferentes concentrações de NaCl e diferentes valores de pH. De acordo com a via fermentativa, as BALs podem ser classificadas em homofermentativas e heterofermentativas. As primeiras possuem uma taxa fermentativa mais rápida, produzindo maiores concentrações de ácido láctico e promovendo maior recuperação de matéria seca (MS). Já as heterofermentativas, além de produzirem ácido láctico, também podem produzir ácido acético, etanol e gás carbônico (SANTOS, 2019; KIM *et al*., 2021). O tipo de forragem utilizado e o objetivo desejado são os principais fatores que determinam as características do inoculante bacteriano a ser utilizado no processo de ensilagem e o resultado da ação das BALs na qualidade da silagem (OLIVEIRA *et al*., 2017).

Sendo assim, pode-se destacar que os estudos voltados à identificação de BALs com potencial para utilização como inoculantes no processo de ensilagem se tornam cada vez mais importantes e necessários. Objetivou-se com este estudo isolar e caracterizar BALs de diferentes silagens no município de Unaí, com potencial de serem utilizadas como inoculantes em processos de ensilagem.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar fenotipicamente BALs isoladas de diferentes silagens.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar BALs de diferentes silagens;
- Caracterização os isolados fenotipicamente;
- Avaliar o espectro de ação e o perfil de resistência dos isolados a diferentes antimicrobianos;
- Selecionar os isolados bacterianos com potencial de utilização como inoculantes em silagens.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Importância da produção de silagem

Sendo o Brasil um país de clima tropical, maior parte do seu território é marcada por dois períodos caracterizados por alta e baixa pluviosidade e que afetam diretamente a produção de forragens. Por esse motivo, as pastagens não ficam disponíveis de forma homogênea ao longo do ano e a produção destinada à alimentação animal acaba sendo afetada. Durante os períodos de seca, a alta demanda e baixa disponibilidade de forragens de boa qualidade resulta em perdas no desempenho da produção animal (PEREIRA, 2017; GEREI, 2018; PUBLIO, 2023). Dessa forma, a conservação de forragens se mostra como uma ótima alternativa para contornar a escassez de alimentos nos períodos de seca e, assim, evitar as limitações no desempenho produtivo dos rebanhos (COUTINHO *et al*., 2013; OLIVEIRA *et al.,* 2015; RIGUEIRA *et al*., 2017; MONÇÃO *et al*., 2020).

Neste cenário, a ensilagem e a fenação são as estratégias de conservação mais utilizadas e eficazes para compensar a queda na produtividade das forrageiras no período de estiagem (RIGUEIRA *et al.,* 2017). A ensilagem se mostra como uma estratégia melhor de armazenamento para a conservação da forragem úmida e tem sido bastante utilizada devido às vantagens apresentadas, como ausência de risco de incêndio, independência do clima e maior recuperação da biomassa em comparação ao feno (REN *et al*., 2020).

3.2 Ensilagem e processo fermentativo

A ensilagem é o processo que envolve a conservação das plantas forrageiras em ambientes com baixa concentração de oxigênio, com a finalidade de diminuir as perdas nutricionais e de energia, sem alterar seu valor nutritivo e características originais. Assim, a preocupação com a preservação dos nutrientes durante o processo de ensilagem deve começar na colheita e terminar com o fornecimento para o animal. Este processo pode ser dividido em 4 fases principais (Figura 1) (WILKINSON; DAVIES, 2013).

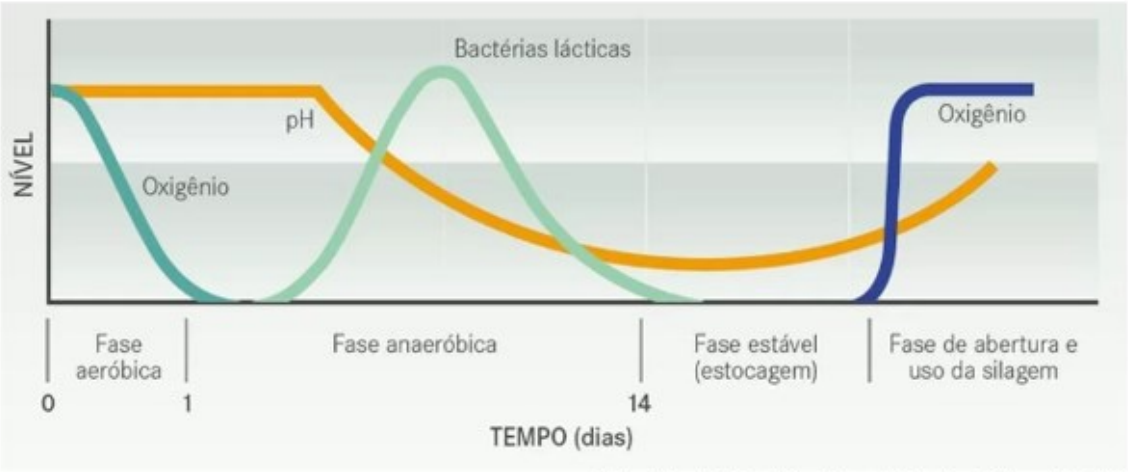
A primeira fase é a fase aeróbica e inicia a partir da colheita, seguida do enchimento do silo, até algumas horas após o seu fechamento. O oxigênio residual dentro do silo é utilizado por microrganismos aeróbios obrigatórios ou facultativos, enterobactérias e leveduras. Nesta fase, o pH é mantido entre 6,0 e 6,5 e se tem a ação das enzimas proteolíticas e de degradação de carboidratos, além de ser uma faixa de pH adequada para o crescimento de microrganismos deteriorantes como enterobactérias e clostrídios (CÂNDIDO, 2020).

A segunda fase tem início com o processo de fermentação anaeróbica, no qual BALs epífitas convertem os carboidratos solúveis em ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico. Essa fase pode variar de dias até semanas. A maior produção de ácido láctico é responsável pela redução do pH para valores entre 3,8 e 5,0, condição que garante a preservação da forragem desde que não haja entrada de oxigênio no silo. O pH elevado ou a presença de oxigênio na silagem favorecem a proliferação de microrganismos indesejáveis, como *Listeria monocytogenes, Clostridium botulinum, Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, além de leveduras e outros fungos (DRIEHUIS *et al*., 2017, CÂNDIDO, 2020). Esses autores ressaltam que a produção de micotoxinas pelos fungos e ácido butírico pelas bactérias prejudica a qualidade nutricional da silagem e a saúde dos animais. De acordo com Santos *et al*. (2013), o pH da silagem abaixo de 4,73 mantém o ácido acético em sua forma dissociada, o que promove a permeabilidade das membranas de leveduras e fungos filamentosos, contribuindo para o seu controle.

Na terceira fase da ensilagem acontece a estabilidade do material ensilado, quando o pH atinge e deve se manter entre 3,8 a 4,2. Nesta fase, os microrganismos começam a diminuir sua atividade (WILKINSON; DAVIES, 2013).

A quarta e última fase é a de abertura do silo para fornecimento da silagem aos animais e tem como consequência a exposição da massa ensilada ao oxigênio. A partir desse momento começa a deterioração da silagem pelo aumento da temperatura e ação de microrganismos produtores de ácido acético e leveduras que agem na presença de oxigênio. O nível e o tempo dessa ação vão depender da quantidade e da natureza dos microrganismos presentes na silagem (WILKINSON; DAVIES, 2013; CÂNDIDO, 2020).

Figura 1 - Fases da fermentação durante o processo de ensilagem.



Fonte: Adaptação de Pitt e Shaver, University of Wisconsin, 1990

É importante ressaltar que, no processo de ensilagem, o tamanho da partícula é um fator que está diretamente ligado à qualidade da silagem. As partículas pequenas auxiliam no aumento da produção de ácido láctico e na diminuição das concentrações de ácido butírico, o qual é indicativo de uma silagem que não possui boa qualidade. As proporções de ácidos são indispensáveis para correlacionar a eficiência da fermentação e o pH da silagem, que são os responsáveis por dar as características de uma silagem estável (GALLEGOS *et al*., 2017).

Assim, quando realizada de forma adequada, a ensilagem realiza o controle da atividade microbiana através da formação de um ambiente anaeróbico, proporcionando a fermentação natural dos açúcares pelas bactérias epífitas, ou introduzidas, produtoras de ácido lático. Essa fermentação acontece de forma simultânea com a redução no pH, inibindo o crescimento de microrganismos anaeróbios indesejáveis (CHECOLI, 2014). Dessa forma, o processo de fermentação que ocorre na ensilagem é indispensável para diminuir as perdas e garantir a conservação do valor nutricional da forragem ensilada (MACÊDO *et al*., 2012).

Diante disso, a adição de inoculantes no processo de ensilagem se mostra uma boa alternativa para potencializar o processo fermentativo, evitar perdas de matéria seca, garantir a redução adequada do pH através da presença de BALs previamente identificadas, ou através da adição de aditivos à base de ácido ou enzimas que melhorem o processo de fermentação durante a ensilagem (MUCK *et al*., 2018; KÖKTEN, 2023).

3.3 Uso de inoculantes microbiológicos em silagens

Os aditivos são substâncias de natureza química, enzimática ou microbiológica que podem ser adicionados à forragem durante o processo de ensilagem com a finalidade de aperfeiçoar a fermentação e evitar perdas nutritivas durante a produção e na fase aeróbica da ensilagem, sendo utilizados principalmente quando as forrageiras não possuem características ideais para serem ensiladas (LIMA JÚNIOR *et al*., 2014; ZANELLA, 2022). A adição desses aditivos melhora o processo de fermentação, reduz as perdas de matéria seca, a fermentação indesejada e as perdas nutricionais provocadas pela entrada de oxigênio após a abertura do silo, melhorando a qualidade e aumentando o valor nutritivo da silagem (YITBAREK; TAMIR, 2014; OLADOSU *et al*., 2016).

Os aditivos podem ser classificados de acordo com a sua finalidade em aditivos químicos, microbiológicos e sequestradores de umidade. Além disso, também podem ser classificados a partir dos efeitos promovidos na conservação da silagem em: inibidores da fermentação, como

as BALs, o melaço de cana de açúcar em pó e as hexaminas; inibidores da deterioração aeróbica, como o benzoato de sódio e nutrientes; e absorventes, como a ureia e o farelo de milho (MUCK *et al*., 2018; ZANELLA, 2022). Ademais, de acordo com Zanella (2022), para que o aditivo promova o efeito desejado, algumas características devem ser consideradas, incluindo facilidade de manejo, não produzir resíduos tóxicos, facilidade de aquisição, disponibilidade comercial e contribuir para a melhoria das condições higiênicas da silagem.

Os aditivos microbianos classificados como estimulantes da fermentação podem ser compostos por BALs homofermentativas, heterofermentativas, ou a associação das duas (CARVALHO *et al*., 2014). Segundo Sá Neto (2012), os inoculantes bacterianos apresentam algumas vantagens em relação aos de natureza química, como uma manipulação mais fácil, menor contaminação ambiental e proporcionam menor corrosão do maquinário utilizado no processo de ensilagem.

Os inoculantes contendo BALs homofermentativas proporcionam uma queda mais rápida do pH, levando a uma preservação do material ensilado através da redução da proliferação de microrganismos indesejáveis (fungos , leveduras, clostrídios e enterobactérias) que promovem uma fermentação de açúcares inadequada resultando em perdas na conversão de matéria seca e recuperação de energia e em fermentação etanólica, que podem afetar o consumo do produto acarretando em perdas na produção animal (NIKKHAH, 2013; KUNG, 2018). Por esse motivo, as BALs homofermentativas como as pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* têm sido as principais constituintes dos inoculantes utilizados em ensilagens (ÁVILA; CARVALHO, 2019; CARVALHO *et al*., 2020; DA HYE KIM *et.al*., 2021).

Já os inoculantes à base de BALs heterofermentativas podem favorecer a estabilidade aeróbica das silagens, pois a produção de ácido acético possui potencial antifúngico, atuando no controle de leveduras e outros fungos presentes nessa fase do processo de ensilagem. Como exemplo de um dos principais representantes comerciais dessa categoria está o *Lactobacillus buchneri* (KUNG, 2018). Vale ressaltar que os inoculantes comerciais compostos pela combinação de BALs homofermentativas e heterofermentativas podem apresentar vantagens, visto que o potencial estimulador da fermentação láctica promovido pelas primeiras se soma à possibilidade da promoção da estabilidade aeróbica através da produção de ácido acético pelas heterofermentativas (KUNG, 2018; ZANELLA, 2022).

De modo geral, os inoculantes à base de BALs estão disponíveis no mercado como pó ou granulado e podem ser aplicados na forma líquida ou em pó seco. Quando aplicados na forma líquida são diluídos em água no momento do uso. Já na forma seca, podem ser misturados em

veículos, como o carbonato de cálcio, sacarose e leite desnatado, podendo ser aplicados através de medidores ou manualmente, por meio de instrumentos como regadores ou pulverizadores de líquido, este apresentando a vantagem de dispersar o inoculante de forma mais uniforme. A adição do inoculante pode ser realizada em qualquer etapa da ensilagem, porém a adição no momento da picagem da forragem se mostra mais eficiente, pois permite aos microrganismos terem contato por mais tempo com os substratos fermentáveis (KUNG, 2018).

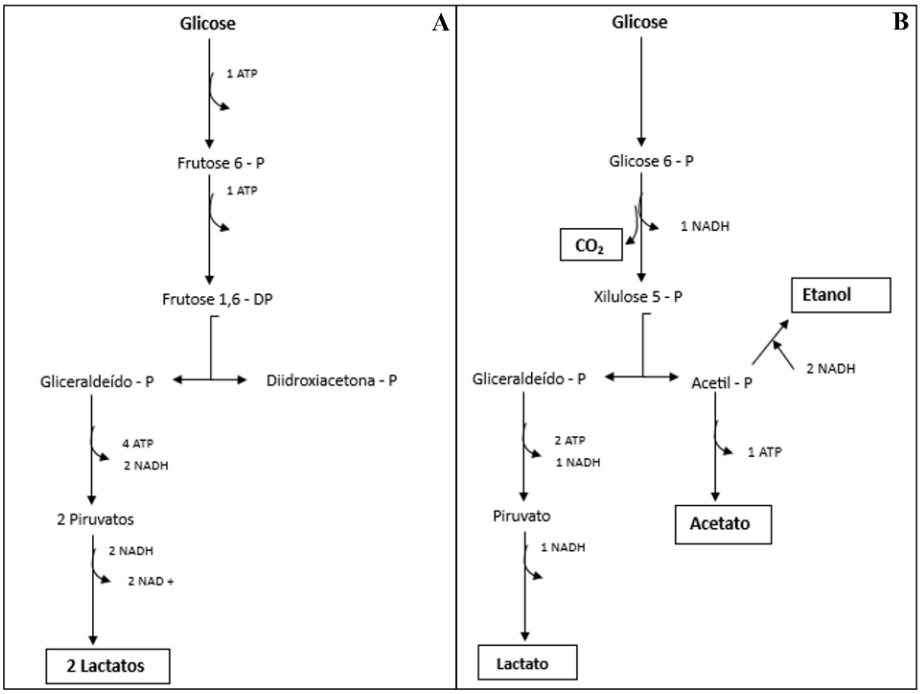
3.4 Propriedades biológicas das bactérias ácido lácticas

As BALs são bactérias Gram-positivas, não esporuladas, em forma de cocos ou bastonetes, catalase negativa, com temperatura ótima de crescimento entre 25 ºC e 40 ºC e que produzem predominantemente ácido láctico como produto do metabolismo de carboidratos. Dessa forma, elas são classificadas de acordo com o crescimento em diferentes temperaturas, diferentes valores de pH e concentrações NaCl, morfologia celular e produtos da fermentação de açúcares.

As BALs fazem parte de vários gêneros, principalmente, *Lactobacillus, Lactococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Streptococcus, Aerococcus, Carnobacterium, Dolosigranulum, Enterococcus* e *Bifidobacterium,* sendo que os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* os mais empregados com fins probióticos na alimentação humana e de outros animais (MOKOENA, *et al*., 2017; WU, *et al*., 2019; DA HYE KIM, *et al*., 2021).

De acordo com as características fermentativas, as BALs podem ser classificadas em homofermentativas e heterofermentativas. As BALs homofermentativas têm como produto da fermentação de carboidratos, quase que exclusivamente ácido láctico, a partir da fermentação de uma molécula de glicose no qual são produzidas duas moléculas de ácido láctico. As BALs heterofermentativas, além de converter uma molécula de glicose em apenas uma molécula de ácido láctico como produto da fermentação, também produzem etanol e CO_2 (Figura 2). Adicionalmente, algumas BALs produzem compostos antimicrobianos, principalmente as heterofermentativas que possuem potencial de produção de substâncias antifúngicas e antibacterianas, exploradas tanto na fermentação da silagem como na indústria de medicamentos e alimentação humana (MUCK *et al*., 2018; BARTKIENE *et al*., 2019).

Figura 2 - Vias metabólicas de fermentação realizadas por (A) BALs homofermentativas e (B) BALs heterofermentativas.



Fonte: Lopes (2008) adaptado de Hofvendahl e Hägerdal (2000).

As BAL são parte constituinte da microbiota de vários alimentos fermentados, como queijos e iogurtes e forragens como milho e sorgo, além de fazer parte da microbiota do sistema digestivo de humanos e outros animais. Assim, por apresentarem perfil probiótico para diversos processos como conservação de forragens, produção de alimentos fermentados, produção de substâncias antibacterianas e antifúngicas, o uso dessas características das BALs vem sendo intensificado (DA HYE KIM, *et al*., 2021; SZUTOWSKA, *et.al*., 2021; WANG, *et al*., 2021).

3.5 Uso das BALs em silagens para alimentação animal

O uso de inoculantes à base de BALs no processo de ensilagem vem aumentando cada vez mais (GALLO *et al*., 2021; HAN *et al.*, 2022; JATKAUSKAS *et al*., 2022; LI *et al.*, 2022). Estudos bioquímicos e filogenéticos realizados em amostras de silagem de arroz forrageiro com casca para identificação de BALs, revelaram a presença de vários gêneros de bactérias, incluindo *Lactobacillus, Lactococcus, Pediococcus, Enterococcus* e *Leuconostoc.* Além disso, foi constatado que a bactéria *Lactobacillus casei*, isolada e identificada em silagem, apresentou melhor potencial para ser utilizada como inoculante e manter os valores nutricionais da silagem,

por produzir maiores taxas de ácido láctico e manter menores valores de pH durante a fase anaeróbica da fermentação no processo de ensilagem (NI; KUIKUI, *et al*., 2015).

Santos *et al*. (2013), ao isolarem BALs com potencial para serem utilizadas como inoculantes em silagens de milho, identificaram que *Lactobacillus buchneri* apresentou maior potencial inoculante por favorecer o processo de fermentação e promover maior estabilidade aeróbia após exposição da silagem ao oxigênio. De acordo com Ogunade *et al*. (2019), as espécies *Pediococcus pentosaceus, Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus faecium* são comumente encontradas na composição de inoculantes comerciais à base de BALs. Dentre estas, *L. plantarum* foi identificada como a principal espécie utilizada em aditivos comerciais utilizados em silagens à base de milho, sorgo e azevém (FABABISZEWSKA *et. al*., 2019).

Além disso, a inoculação de *L. plantarum* em silagem de alfalfa com alta umidade levou a queda rápida de pH, melhorando a qualidade, além de inibir o crescimento de microrganismos pertencentes ao gênero *Clostridium* (YANG, 2020). No isolamento de BALs com potencial de uso como inoculante em silagem de palma forrageira, Pereira Alves (2018) também identificaram a presença *L. plantarum* além das espécies de *Weissella cibaria, Weissella confusa* e *Weissella paramesenteroides,* sendo a espécie *W. cibaria* a que apresentou maiores condições de ser selecionada como potencial inoculante entre as heterofermentativas, e *L. plantarum* se destacou entre as homofermentativas. Além disso, a presença de *W. cibaria* também se mostra vantajosa devido à sua capacidade antimicrobiana e antifúngica, característica importante no controle de fungos e leveduras indesejados durante e após o processo de ensilagem (PEREIRA ALVES, 2018).

Em um estudo de meta-análise no qual foram analisados 140 artigos científicos para avaliar o efeito da adição de BALs na fermentação, estabilidade aeróbia e composição da silagem de milho, constatou-se que a adição de inoculantes à base de BALs homofermentativas aumentou a produção de ácido láctico em praticamente 60% contribuindo para uma queda expressiva do pH da silagem. Além disso, observou-se que 27,6% dos estudos analisados utilizaram *L. plantarum* de forma isolada e 54,8% dos estudos utilizaram *L. plantarum* em combinação com *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobcillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentosaceus* (BERNARDI *et al*., 2019).

Algumas bactérias como *P. acidilactici, E. faecium* e *L. plantarum* conseguem produzir ácido láctico a partir de valores de pH próximo de 5,0. Essas bactérias são consideradas eficientes para auxiliar na inibição do crescimento de microrganismos deteriorantes como os

do gênero *Clostridium*, que possuem pH ótimo de crescimento próximo a 4,5 (BERNARDI *et al*., 2019; MONTEIRO, 2019). Por fim, a conclusão do estudo de meta-análise foi que a adição de qualquer tipo de inoculante a base de BALs em silagens de milho aumentou as perdas fermentativas no silo, sem relação com aditivo específico, e que as silagens tratadas com aditivos à base de bactérias heterolácticas tiveram maior estabilidade aeróbia. Além disso, foram observados benefícios da adição de inoculantes à base de BALs homolácticas apenas para alimentação de ovelhas, não tendo efeito significativo na alimentação de vacas leiteiras e bovinos de corte (BERNARDI *et al*., 2019).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Agrárias – ICA, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, Campus Unaí. As amostras de silagens foram obtidas em uma propriedade rural do município de Unaí-MG e na Fazenda Experimental Santa Paula (FESP), pertencente à UFVJM.

4.1 Isolamento e enumeração

Foram realizadas coletas de amostras de cinco silagens de forma asséptica e em períodos diferentes. A primeira amostra, constituída por silagem de planta inteira de milho, foi coletada na FESP. A segunda amostra, proveniente de uma propriedade rural do município de Unaí, consistiu de silagem de sorgo adicionado de sal. As três últimas amostras foram representadas por silagens de grão úmido moído de três diferentes híbridos de milho cultivados na FESP: Híbrido 1 – Ag 7098 – semidentado amarelo-alaranjado, empresa Agroceres; híbrido 2 – K 9555 – semiduro alaranjado, empresa KWS; e Híbrido 3 – MG607 – semiduro amarelo-alaranjado, empresa Morgan. Foram realizadas coletas pontuais das duas primeiras silagens, enquanto as coletas das três últimas silagens foram realizadas após 15, 30 e 45 dias de ensilagem.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do ICA e, de cada uma, retirou-se 25 g que foram homogeneizadas em 225 ml de solução salina (0,85% e pH 7,0). Em seguida, diluições seriadas foram realizadas até a diluição 10^{-4} e as diluições 10^{-2} a 10^{-4} foram plaqueadas em triplicata por *spread plate* em meio de cultura ágar *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS). As placas foram incubadas a 37 ºC por 48 horas até a formação de colônias, que foram caracterizadas fenotipicamente e enumeradas. As colônias que apresentaram características fenotípicas diferentes foram transferidas para caldo MRS e acondicionadas para crescimento em estufa bacteriológica a 37 ºC por 48 horas.

4.2 Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos

As colônias selecionadas foram testadas a partir da coloração diferencial de Gram, morfologia celular, reações de catalase e produção de ácido em meio MRS adicionado de púrpura de bromocresol e carbonato de cálcio (Kozaki *et al*., 1992).

De todos os isolados caracterizados como Gram-positivos, catalase negativos e com capacidade de produção de ácido, oito foram selecionados para serem avaliados quanto à

capacidade de crescimento em caldo MRS em diferentes concentrações de NaCl (3,0% e 6,5%), diferentes valores de pH (3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 8,5; e 9,0) e capacidade de produção de CO_2.

Os isolados foram transferidos para caldo MRS com diferentes concentrações de NaCl e em diferentes valores de pH e incubados a 37 ºC por 48 horas em triplicata. O ajuste do pH foi realizado utilizando-se soluções de NaOH (50%) e de HCl (50%).

Para avaliar a produção de CO_2, os isolados foram cultivados em caldo MRS contendo tubos de Durham. A presença de bolha de ar no interior do tudo de Durham foi considerado resultado positivo para a produção de gás e os que não possuíam bolha no interior foram considerados negativos, caracterizando-os em heterofermentativos e homofermentativos, respectivamente.

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana de BALs

A atividade antimicrobiana dos isolados de BALs contra *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213 foi avaliada pelo método de sobrecamada (Booth *et al*., 1977). A avaliação do potencial inibitório contra esses dois microrganismos patogênicos é importante, pois a *E. coli* está presente nas fezes de todos os animais, assim como o *S. aureus* também está presente nas mucosas, pele e trato respiratório de todos os animais, dessa forma são possíveis fontes de contaminação nas silagens. Para a avaliação, as BALs foram crescidas por 24 horas em caldo MRS a 37 ºC. Após esse período, alíquotas de 5 µL foram retiradas de cada isolado e colocados em apenas um ponto da placa, sem movimentação para que se formasse uma colônia. As placas foram incubadas a 37 ºC por 24 horas. Após 24 horas de crescimento, foram preparados tubos de ensaio com 10 ml de BHI semi-sólido (0,75%) previamente inoculados com 200 µL de *S. aureus* ATCC 29213 ou *E. coli* ATCC 25922 e vertidos nas placas que continham as colônias. As placas foram incubadas na estufa bacteriológica por 24 horas a 37 ºC.

A atividade antimicrobiana foi determinada pela presença de halos de inibição do crescimento contra *S. aureus* ATCC 29213 ou *E. coli* ATCC 25922 em torno das colônias das BALs (diâmetro acima de 6 mm). Os ensaios antimicrobianos foram realizados em triplicata.

4.4 Teste de susceptibilidade a antibióticos

A suscetibilidade das bactérias aos antibióticos foi determinada por uma modificação do método de difusão em sobreposição de ágar (CHARTERIS *et al.,* 1998). Foram utilizados discos comerciais de antibióticos, sendo Cefalexina (CFE-30 mcg), Tetraciclina (TET-30mcg), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (AMC- 30 mcg) e Ácido Nalidíxico (NAL-30 mcg). Para

realização do teste foram espalhadas alíquotas de 80 µL de cada isolado sobre ágar MRS. Sobre as placas foram adicionados um disco de cada antibiótico de forma equidistante, totalizando quatro discos em cada placa. As placas foram incubadas a 37 ºC por 48 h. A susceptibilidade aos antibióticos foi analisada através do diâmetro (em milímetros) da zona de inibição do crescimento ao redor dos discos de antimicrobiano (CHARTERIS *et al.*, 1998).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o isolamento das bactérias foram utilizadas amostras de cinco diferentes silagens, sendo uma amostra de silagem de milho planta inteira, uma amostra de silagem de sorgo adicionado de sal e três amostras de silagem de grão úmido moído de diferentes híbridos de milho em três diferentes tempos de abertura dos silos (15, 30 e 45 dias). A contagem bacteriana nas silagens variou de 1,57 x 10^4 UFC/g (4,19 log UFC/g) a 1,05 x 10^7 UFC/g (7,02 log UFC/g) (Tabela 1).

Tabela 1 – Contagem bacteriana em diferentes silagens.

Silagens	**Contagem bacteriana**
Milho planta inteira	7,14 x 10^4 UFC/g (4,85 log UFC/g)
Sorgo adicionado de sal	1,16 x 10^6 UFC/g (6,06 log UFC/g)
Milho grão úmido - Híbrido 1 (15 dias)	1,05 x 10^7 UFC/g (7,02 log UFC/g)
Milho grão úmido - Híbrido 1 (30 dias)	1,71 x 10^6 UFC/g (6,23 log UFC/g)
Milho grão úmido - Híbrido 1 (45 dias)	2,85 x 10^5 UFC/g (5,45 log UFC/g)
Milho grão úmido - Híbrido 2 (15 dias)	2,24 x 10^6 UFC/g (6,35 log UFC/g)
Milho grão úmido - Híbrido 2 (30 dias)	6,78 x 10^5 UFC/g (5,83 log UFC/g)
Milho grão úmido - Híbrido 2 (45 dias)	4,35 x 10^4 UFC/g (4,63 log UFC/g)
Milho grão úmido - Híbrido 3 (15 dias)	1,78 x 10^4 UFC/g (4,25 log UFC/g)
Milho grão úmido - Híbrido 3 (30 dias)	1,61 x 10^5 UFC/g (5,20 log UFC/g)
Milho grão úmido - Híbrido 3 (45 dias)	1,57 x 10^4 UFC/g (4,19 log UFC/g)

A presença de BALs em silagens é importante durante o processo fermentativo para elevar as concentrações de ácido láctico e acético, diminuindo assim as perdas de matéria seca, aumentando a digestibilidade da fibra e controlando microrganismos deteriorantes, como fungos, leveduras, clostrídios e enterobactérias. Esses microrganismos deteriorantes prejudicam a qualidade da silagem, resultando em perdas tanto das características nutricionais quanto em relação à palatabilidade do produto para o consumo animal (MEJÍA-AVELLANEDA *et al*., 2022).

Em silagens de quatro diferentes forrageiras, Li *et al*. (2019) observaram uma população média de BALs de 5,0 log UFC/g, enquanto Zhou *et al*. (2016) observaram uma população de 9,09 log UFC/g de silagem de milho. Em silagens de caule de sorgo analisadas em diferentes períodos de abertura do silo, Zhang *et al*. (2022) obtiveram 6,97 log UFC/g com 0 dias, 9,05

log UFC/g com 7 dias e 6,42 log UFC/g com 56 dias do processo de ensilagem. Dessa forma, pode-se perceber que a contagem bacteriana de diferentes silagens apresenta variações significativas, assim como foi percebido na contagem das silagens analisadas no presente estudo. Além disso, foi possível notar uma diminuição na população bacteriana com o passar dos dias do processo de ensilagem.

Em relação a essa comunidade bacteriana presente nas diferentes silagens, em análise de silagem de sorgo forrageiro após 60 dias de ensilagem Nazar *et al.* (2020) observaram a dominância do gênero *Lactobacillus,* seguido pelo gênero *Weissella* e *Leuconostoc*. Dez dias depois, os gêneros identificados em maior proporção passaram a ser *Weissella, Pediococcus* e *Lactobacillus*. Analisando silagem de milho de planta inteira, Zhou *et al*. (2016) identificaram a diferentes espécies de BALs, *como Lactobacillus plantarum, Leuconostoc citreum, Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus brevis, Leuconostoc lactis, Lactobacillus sakei, Lactobacillus coryneformis, Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus curvatus, Pediococcus pentosaceus* e *Lactobacillus buchneri*, observando que a silagem desse tipo de forrageira apresenta grande variedade de BALs epífitas. Por outro lado, Puntillo *et al*. (2020), ao realizarem o isolamento de BALs com potencial inoculante em diferentes silagens, identificaram como principais espécies em silagem de sorgo *L. plantarum, L. pentosus* e *L. brevis.* Dessa forma, pode-se ter uma caracterização das principais espécies de BALs passíveis de serem encontradas em silagens de milho e sorgo.

Das amostras de silagem coletadas no presente estudo foram obtidos 159 isolados bacterianos, sendo 29 da silagem de milho planta inteira; 59 da silagem de sorgo adicionado de sal; e 71 das três amostras de silagem de grão úmido dos híbridos de milho, sendo 24 isolados do híbrido 1, 25 do híbrido 2 e 22 do híbrido 3. Após sucessivas repicagens em meio caldo MRS, 22,6% dos isolados não apresentaram crescimento, restando 10 isolados da silagem de milho planta inteira, 44 da silagem de sorgo adicionado de sal e 69 isolados das três amostras de silagem de grão úmido dos diferentes híbridos de milho (Tabela 2).

Todas as colônias dos isolados bacterianos obtidos foram caracterizadas morfologicamente quanto ao tamanho, cor, aparência e brilho, presença de halo e formato da borda (Tabela 2). Quanto ao tamanho, das 123 colônias isoladas, 58,5% foram pequenas, 22% médias e 19,5% grandes. Quanto à cor e aparência, 91,1% foram brancas e cremosas, restando 8,9% translúcidas e secas. Em relação ao brilho, 88,6% foram positivas e 11,4% eram opacas. Quanto à formação de halo, apenas 8,9% o formaram ao crescerem em MRS ágar e em relação

ao formato da borda das colônias, 87,8% apresentaram-se regular, enquanto 12,2% tinham bordas irregulares (Tabela 2, Figura 3).

Tabela 2 – Características morfológicas das colônias obtidas de diferentes tipos de silagens.

Isolado	Tamanho	Cor	Aparência	Brilho	Presença de halo	Borda
S1	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Irregular
S2	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Irregular
S3	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Irregular
S5	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Irregular
S6	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Irregular
S8	Pequena	Branca	Cremosa	+	+	Irregular
S9	Média	Branca	Cremosa	+	+	Irregular
S10	Pequena	Branca	Cremosa	+	+	Irregular
S14	Pequena	Branca	Cremosa	+	+	Regular
S23	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S33	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S35	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S36	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S39	Pequena	Translúcida	Seca	-	-	Regular
S40	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S41	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S42	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S43	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S44	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S45	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S47	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S48	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S51	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Irregular
S52	Pequena	Translúcida	Seca	-	-	Regular
S53	Média	Translúcida	Seca	-	+	Regular
S54	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Irregular
S56	Pequena	Translúcida	Seca	-	-	Regular
S58	Média	Translúcida	Seca	-	+	Regular

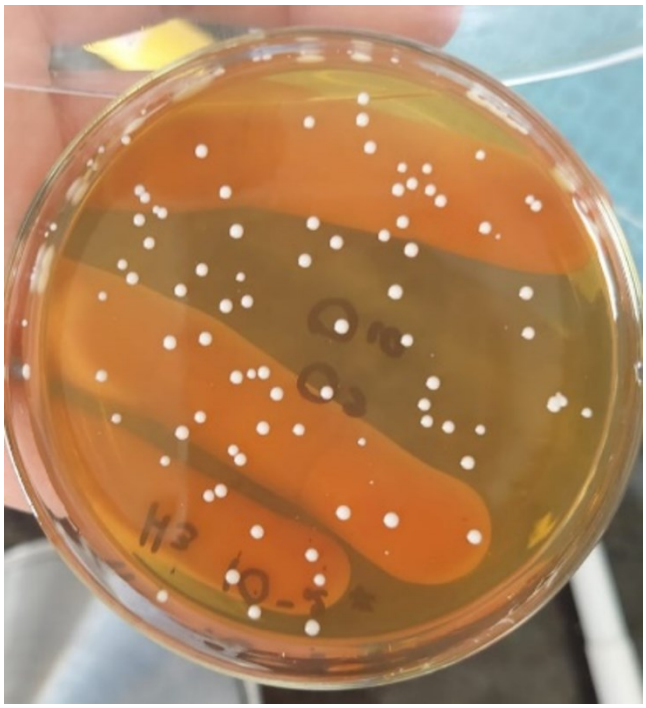
S59	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S60	Média	Translúcida	Seca	-	-	Irregular
S61	Pequena	Translúcida	Seca	-	+	Regular
S62	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S65	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S66	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S67	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S68	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S69	Pequena	Translúcida	Seca	-	-	Regular
S70	Grande	Branca	Cremosa	+	+	Regular
S71	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S72	Média	Translúcida	Seca	-	+	Regular
S74	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S75	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S76	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S78	Pequena	Translúcida	Seca	-	-	Regular
S79	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S80	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S81	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S82	Pequena	Translúcida	Seca	-	-	Regular
S83	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S84	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S85	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S86	Pequena	Branca	Cremosa	+	+	Irregular
S87	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
S88	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-1	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-2	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-3	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Irregular
H1-4	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-5	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-6	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-7	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular

H1-8	Média	Branca	Cremosa	+	-	Irregular
H1-9	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-10	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-11	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-12	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-13	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-14	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-15	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-16	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-17	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-18	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-19	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-20	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-21	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-22	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-23	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H1-24	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-1	Pequena	Branca	Cremosa	-	-	Regular
H2-2	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-3	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-4	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-5	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-6	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-7	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-8	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Irregular
H2-9	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-10	Pequena	Branca	Cremosa	-	-	Regular
H2-11	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-12	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-13	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-14	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-16	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-17	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular

H2-18	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-19	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-20	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-21	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-22	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-23	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-24	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H2-25	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-1	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-2	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-3	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-4	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-5	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-6	Pequena	Branca	Cremosa	-	-	Regular
H3-7	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-8	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-9	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-10	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-12	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-13	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-14	Média	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-15	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-16	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-17	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-18	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-19	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-20	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-21	Grande	Branca	Cremosa	+	-	Regular
H3-22	Pequena	Branca	Cremosa	+	-	Regular

S1 a S23 – silagem de milho planta inteira; S23 a S88 – silagem de sorgo adicionado de sal; H1-1 a H3-22 – silagens de diferentes tipos de híbridos de milho.

Figura 3 - Colônias obtidas durante o plaqueamento da silagem de grão úmido de milho do híbrido 3 em meio ágar MRS.



Em relação às características fenotípicas dos isolados, 100% foram caracterizados como gram-positivos, 50,4% apresentaram forma de bacilos e 49,6% de cocos (Tabela 3). O arranjo das colônias variou entre bacilos isolados, estreptobacilos e estafilococos. Em relação a catalase, 88,6% foram identificados como catalase negativa. Dos isolados, 87,8% produziram ácido em meio de cultura ágar MRS acrescido de púrpura de bromocresol e carbonato de cálcio, produção identificada por meio da mudança na coloração do meio de cultura de roxo para amarelo (Tabela 3, Figura 4).

Dos isolados obtidos a partir da silagem de sorgo adicionado de sal, 100% apresentaram forma de bacilos Gram-positivos e catalase negativa. Resultados semelhantes são relatados por Puntillo (2020), no qual os isolados obtidos de silagem de sorgo apresentaram as mesmas características e espécies de *Lactobacillus* predominantes na identificação de BALs. Da mesma maneira, os isolados em forma de cocos foram todos provenientes das silagens de milho, corroborando com as características observadas no estudo de Zhou *et al.* (2016), no qual várias espécies de BALs isoladas possuíam forma de cocos, eram Gram-positivos e catalase negativa e foram identificados como *Leuconostoc citreum* e *Pediococcus pentosaceus* (Tabela 3, Figuras 4, 5 e 6).

Tabela 3 – Caracterização fenotípica dos isolados obtidos de diferentes silagens.

Isolado	Gram	Formato	Arranjo	Catalase	Produção de ácido
S1*	+	Bacilos	Isolados	-	-
S2*	+	Cocos	Estafilococos	-	-
S3*	+	Bacilos	Bacilo isolado	-	-
S5*	+	Bacilos	Bacilo isolado	+	-
S6*	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S8	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S9	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S10	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S14	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S23	+	Bacilos	Estreptobacilos	+	+
S33	+	Bacilos	Bacilo isolado	-	+
S35	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S36	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S39*	+	Bacilos	Bacilo isolado	+	+
S40	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S41	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S42	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S43	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S44	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S45	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S47	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S48	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S51	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S52*	+	Bacilos	Bacilo isolado	+	-
S53*	+	Bacilos	Bacilos isolado	+	-
S54*	+	Bacilos	Estreptobacilos	+	-
S56*	+	Bacilos	Bacilo isolado	+	-
S58*	+	Bacilos	Estreptobacilos	+	-
S59	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S60*	+	Bacilos	Estreptobacilos	+	-
S61*	+	Bacilos	Estreptobacilos	+	-

S62	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S65	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S66	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S67	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S68	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S69	+	Bacilos	Bacilo isolado	-	+
S70*	+	Bacilos	Bacilo isolado	-	+
S71	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S72*	+	Bacilos	Estreptobacilos	+	-
S74	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S75	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S76	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S78*	+	Bacilos	Bacilo isolado	+	+
S79	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S80	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S81	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S82	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S83	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S84	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S85*	+	Bacilos	Estreptobacilos	+	-
S86*	+	Bacilos	Estreptobacilos	+	-
S87	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
S88	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
H1-1	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-2	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-3	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-4	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-5	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-6	+	Cocos	Estreptococos	-	+
H1-7	+	Cocos	Isolados	-	+
H1-8	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-9	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-10	+	Cocos	Estafilococos	-	+

H1-11	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-12	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-13	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-14	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-15	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-16	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-17	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-18	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-19	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
H1-20	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-21	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-22	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
H1-23	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H1-24	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-1	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-2	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-3	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-4	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-5	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-6	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-7	+	Cocos	Isolados	-	+
H2-8	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-9	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-10	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-11	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-12	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-13	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-14	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-16	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-17*	+	Cocos	Estafilococos	-	-
H2-18	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
H2-19	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
H2-20	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+

H2-21	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H2-22	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
H2-23	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
H2-24	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
H2-25	+	Bacilos	Estreptobacilos	-	+
H3-1	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-2	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-3	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-4	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-5	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-6	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-7	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-8	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-9	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-10	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-12	+	Cocos	Isolados	-	+
H3-13	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-14	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-15	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-16	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-17	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-18	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-19	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-20	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-21	+	Cocos	Estafilococos	-	+
H3-22	+	Cocos	Estafilococos	-	+

*Isolados descartados por não apresentarem características de BALs.

Figura 4 - Coloração Diferencial de Gram do isolado S88 Gram-positivo em forma de bacilos (A), isolado S35 Gram-positivo em forma de bacilos (B) e isolado H3-4 Gram-positivo em forma de cocos (C).

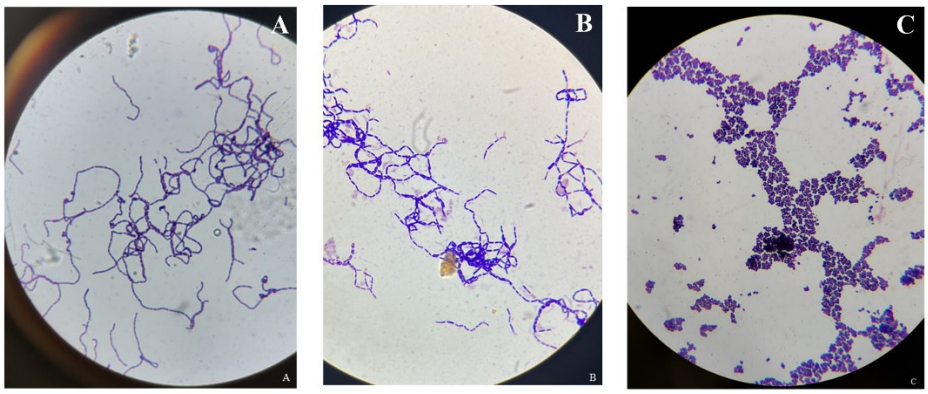


Figura 5 - Produção de ácido láctico pelos isolados por meio da mudança de coloração do meio ágar MRS adicionado de púrpura de bromocresol e carbonato de cálcio de roxo para amarelo.

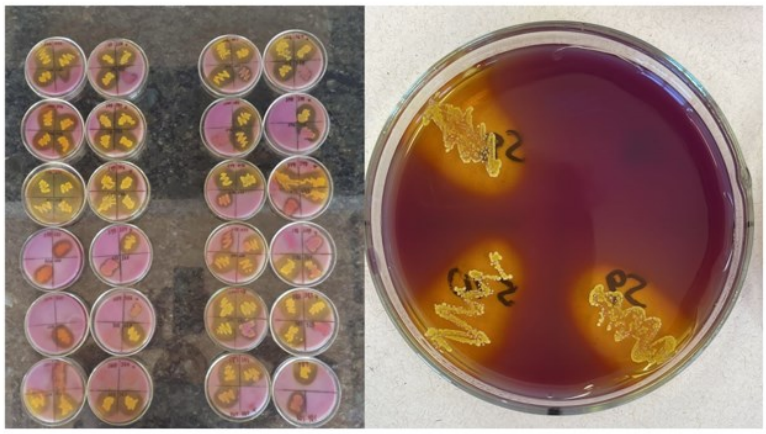
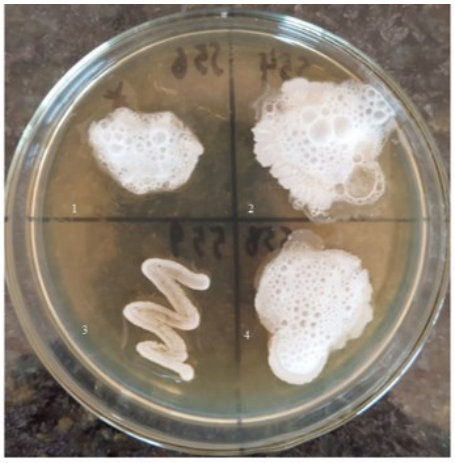


Figura 6 - Reação de catalase de isolados obtidos de silagem de sorgo adicionado de sal.



De acordo com as características fenotípicas observadas nos 123 isolados quanto à coloração diferencial de Gram, produção de ácido e teste de catalase, eles se caracterizam como possíveis BALs por apresentarem coloração de Gram positiva, catalase negativa e produção de ácido lático (KIM *et al*., 2021). Dessa forma, oito isolados (S35, S88, H1-6, H1-20, H2-4, H2-21, H3-4 e H3-20) foram selecionados para serem submetidos ao teste de produção de CO_2 e serem caracterizados como homofermentativos (isolados que apresentaram crescimento, mas que não apresentaram gás no interior do tubo de Durham) e heterofermentativos (isolados que apresentaram crescimento e presença de gás no interior do tubo de Durham). Dos oito isolados avaliados, sete foram classificados como homofermentativos e apenas um (S88) como heterofermentativo (Tabela 4, Figura 7).

Muck *et al.* (2018) destaca que os principais grupos de bactérias heterofermentativas identificadas no processo de fermentação de silagem são pertencentes aos gêneros *Lactobacillus, Leuconostoc* e *Weissella*, sendo que as espécies pertencentes ao grupo *Lactobacillus buchneri*, são as principais BALs heterofermentativas identificadas, sendo grandes promotoras da estabilidade aeróbica nas silagens. Resultados que se assemelham também aos observados por Puntillo *et al*. (2020), que identificaram como principais espécies de BALs em silagem de sorgo, lactobacilos tanto heterofermentativos (*L. brevis*), como homofermentativos (*L. pentosus* e *L. plantarum*) que se assemelham as características do isolado S35.

Assim como o isolado S88, o *L. buchneri* e o *L. brevis* possuem forma de bacilos, coloração Gram-positiva e catalase negativa e por ter metabolismo heterofermentativo obrigatório, produzem CO_2 como um dos seus produtos da fermentação (MUCK *et al*., 2018; PUNTILLO *et al*., 2020).

Em relação ao crescimento dos isolados nas diferentes concentrações de NaCl, foi possível observar que todos os isolados apresentaram de moderado a forte crescimento na concentração de 3,0 % de NaCl, e fraco crescimento na concentração de 6,5%. De acordo com o observado por Engelhardt *et al*. (2018), a espécie *L. plantarum* apresentou crescimento em caldo MRS com concentração de NaCl 6%. Já Wang *et al*. (2017) analisaram quatro isolados de bactérias lácticas de diferentes silagens quanto ao crescimento em concentrações de NaCl 3,0% e 6,5%. Houve crescimento dos quatro isolados, que posteriormente foram identificados como *L. plantarum, L. coryniformis, P. pentosaceus* e *P. acidilactici* por sequenciamento de RNA ribossômico 16S.

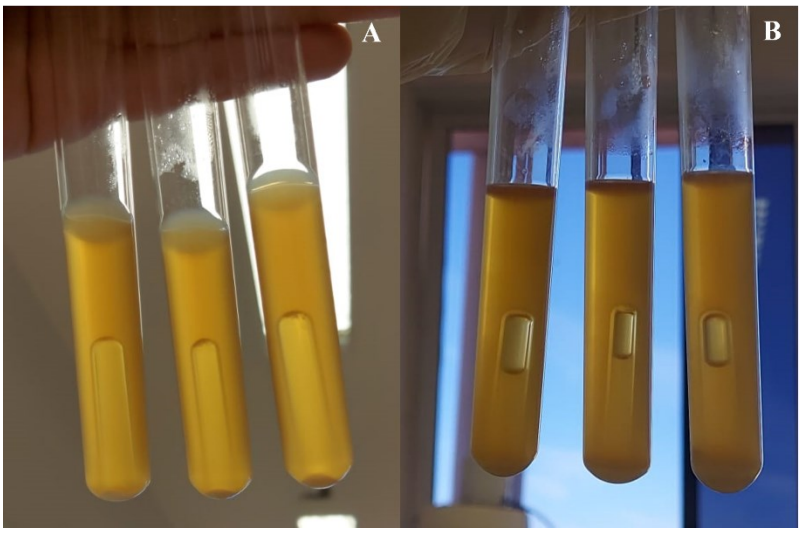
Ainda de acordo com Wang *et al.* (2018), do isolamento de 8 cepas de 5 silagens fermentadas naturalmente, foi possível obter 5 colônias em forma de bacilos e 3 em forma de cocos, sendo que todos os isolados foram capazes de crescer em concentrações de NaCl 3,0% e 6,5%. Por meio de análises filogenéticas, estas cepas foram identificadas como *L. plantarum, L. coryniformis, P. pentosaceus, P. acidilactici e L. casei.* Tais resultados corroboram com os achados no presente estudo, visto que os isolados em forma de bacilos tiveram crescimento em NaCl 3,0 % e 6,5% e as características dos dois são semelhantes às de alguns representantes citados pelos autores acima. O isolado S88 por exemplo, se assemelha ao heterofermentativo *L. casei* e o isolado S35 se assemelha aos homefermentativos, como *L. corynoformis*, por exemplo. Assim como os isolados em forma de cocos também possuem características que se assemelham aos isolados homofermentativos *P. pentosaceus* e *P. acidilactici*, por exemplo.

Tabela 4 - Caracterização fenotípica por meio da produção de CO_2 e crescimento em MRS com NaCl a 3,0 % e 6,5%.

Isolados	**[1]Produção de gás**	**[2]NaCl 3%**	**[2]NaCl 6,5%**
S35	-	+++	+
S88	+	+++	+
H1-6	-	++	+
H1-20	-	++	+
H2-4	-	++	+
H2-21	-	++	+
H3-4	-	++	+
H3-20	-	++	+

[1]Produção de gás → + (positivo) e – (negativo); [2]NaCl 3% e 6,5% → - não houve crescimento; + - pouco crescimento, ++ - crescimento mediano, e +++ - forte crescimento.

Figura 7 - Caracterização dos isolado em ágar MRS com tubo de Durham. (A) Tubos com turvação e ausência de gás no tubo de Durham, isolado homofermentativo e (B) tubos com turvação e formação de gás no tubo de Durham, isolado heterofermentativo.



Em relação ao crescimento dos oito isolados em meio líquido MRS com diferentes valores de pH, pôde-se observar que em pH 3,0 houve um leve crescimento de apenas dois isolados. Em pH 3,5 houve crescimento mediano do isolado S35, além de leve crescimento de outros três isolados. Em pH 4,0 é possível notar crescimento mediano de quatro isolados. Ademais, todos os isolados apresentaram crescimento de pequeno a forte nos valores de pH 4,5; 8,5 e 9,0 (Tabela 5).

Silva *et al.* (2020) isolaram BALs de silagem de alfafa que foram identificadas como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus* e *Pediococcus acidilactici*. Esses isolados foram crescidos em pH 3,5; 4,0; 4,5 e 8,5, no qual foi possível observar crescimento das três cepas de BALs em todos os valores (SILVA *et al.*, 2020). Estes resultados os resultados obtidos no presente trabalho no qual foi possível verificar o crescimento de todos os isolados em valores de pH acima de 4,5 (Tabela 5).

Tabela 5 – Crescimento dos isolados em MRS líquido com diferentes valores de pH.

Isolados	pH 3,0	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 8,5	pH 9,0
S35	+	++	++	+	+++	++
S88	+	+	-	+++	++	+++
H1-6	-	-	+	++	++	++
H1-20	-	-	++	++	++	++
H2-4	-	-	++	+++	++	++
H2-21	-	-	-	+	++	++
H3-4	-	+	-	+++	++	++
H3-20	-	+	++	++	++	++

- - não houve crescimento; + - pouco crescimento, ++ - crescimento mediano, e +++ - forte crescimento.

Shah *et al*. (2018) realizaram o isolamento de 76 bactérias lácticas de capim-rei com o objetivo de obter um isolado que melhorasse a qualidade da fermentação de sorgo sacarino. Dos 76 isolados, cinco foram identificados, dos quais um foi caracterizado como *L. plantarum* e quatro como *P. acidilactici.* Os cinco isolados foram caracterizados quanto à capacidade de crescer em diferentes valores de pH (3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,5 e 8,0). Todos apresentaram crescimento nos diferentes valores de pH, sendo que o crescimento em pH 3,0 foi fracamente positivo para *L. plantarum* e para três *P. acidilactici.* Os isolados S35 e S88 também foram os únicos que apresentaram pouco crescimento em pH 3,0, resultado semelhante ao de Shah *et al* (2018). No entanto, no estudo de Shah *et al*. (2018) todos os isolados foram caracterizados como homofermentativos. Sendo assim, os resultados encontrados por Shah *et al.* (2018) são semelhantes às características apresentadas pelo isolado S35.

Ni Kuikui *et al*. (2015) observaram que BALs isoladas de silagens de arroz em casca foram capazes de crescer em diferentes valores de pH (3,5 a 7,0), porém nenhum isolado foi capaz de crescer em pH 3,0. Resultado que difere dos observados no crescimento dos oito isolados do trabalho, no qual dois isolados apresentaram um sutil crescimento em pH 3,0.

A atividade antimicrobiana das BALs foi determinada pela presença de halos de inibição do crescimento contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922 em torno das colônias das BAL. Os isolados S35, H1-20 e H3-4 apresentaram halos de inibição maior que 20 mm e todos os isolados apresentaram halos de inibição maior que 16,7 mm quando testados contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.Em relação a *Escherichia coli* ATCC

25922, todos os isolados apresentaram halos de inibição maior que 20 mm (Tabela 6, Figuras 8 e 9).

Tabela 6 - Avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados pelo método de sobrecamada.

Isolados BAL	*Staphylococcus aureus* ATCC 29213(mm)	*Escherichia coli* ATCC 25922 (mm)
S35	19,3 ± 1,5	26,3 ± 2,1
S88	20,7 ± 0,6	26,3 ± 4,7
H1-6	19,7 ± 4,2	23,3 ± 2,5
H1-20	21,0 ± 1,7	22,0 ± 3,6
H2-4	17,7 ± 2,3	23,7 ± 1,5
H2-21	16,7 ± 0,6	27,0 ± 1,0
H3-4	22,0 ± 2,0	26,0 ± 2,6
H3-20	19,7 ± 2,5	21,7 ± 2,3

Figura 8 - Halos de inibição dos isolados contra *Staphylococcus aureus.*

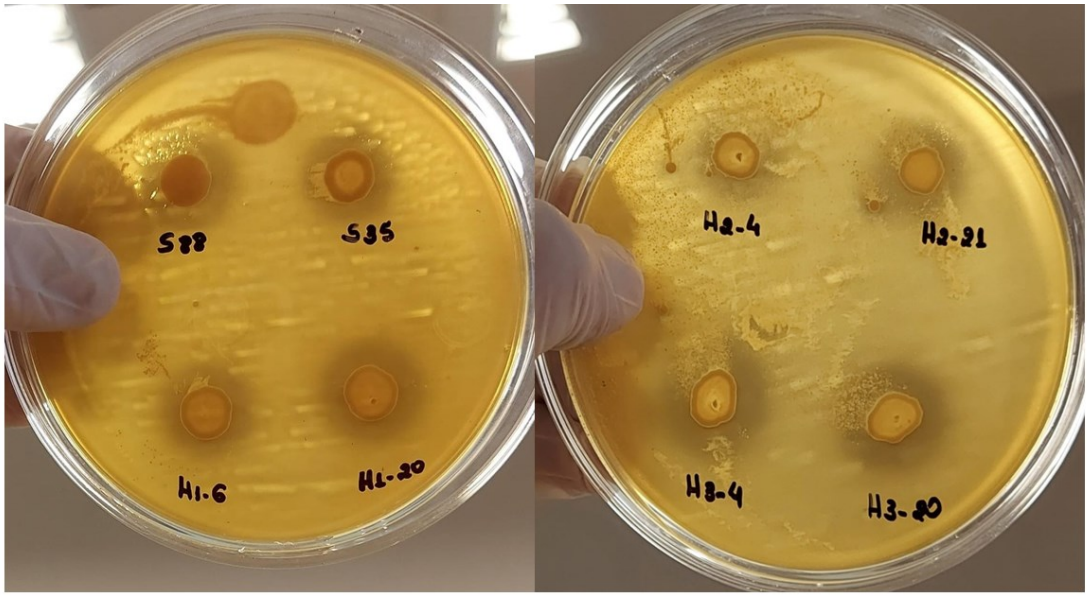
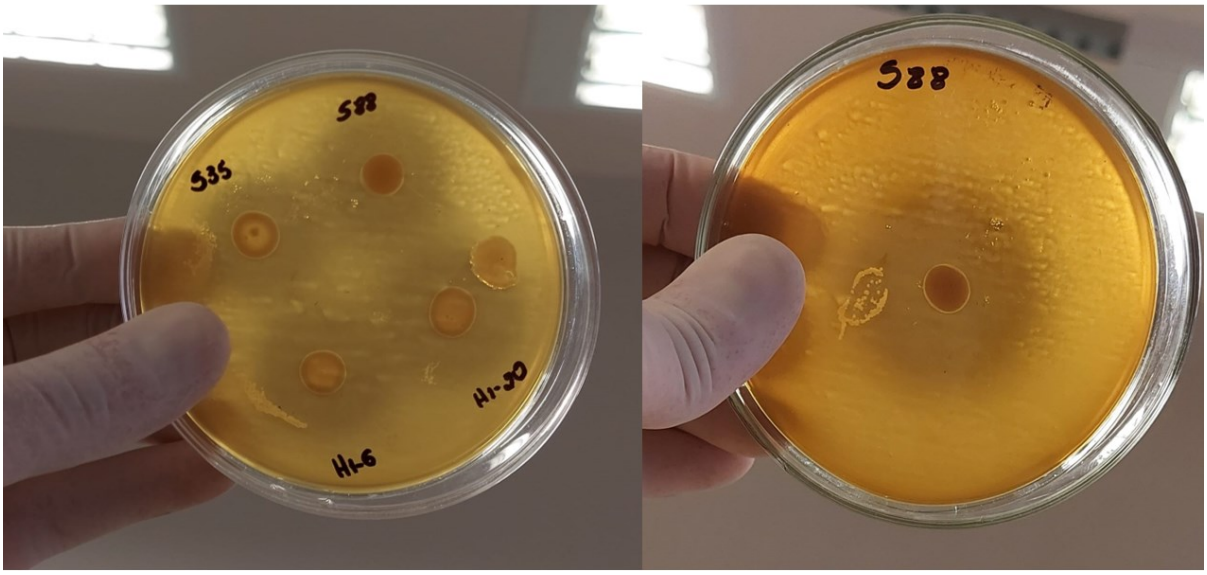


Figura 9 - Halos de inibição dos isolados contra *Escherichia coli.*



Hashemi *et al.* (2017) ao analisar a atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de três cepas probióticas de *Lactobacillus plantarum* isolados de queijo, observaram grande capacidade de inibição desses microrganismos com o maior diâmetro de inibição no valor de 20,1 mm e 25,7 mm para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Estes resultados se assemelham aos encontrados na de espectro de ação dos isolados do presente estudo, onde foram observados valores de halos de inibição semelhantes para os dois patógenos.

Ao avaliarem a atividade antibacteriana de 59 BALs isoladas de silagem de sobras de milho, Li *et al.* (2015) demostraram que 39 deles apresentaram potencial antibacteriano contra *Escherichia coli* com halos de inibição superiores a 8 mm de diâmetro. Soundharrajan *et al*. (2019) ao avaliar o potencial antibacteriano de duas cepas de BALs, sendo elas *Pediococcus pentosaceus* e *Lactobacillus brevis* isoladas de silagem de triticale fermentado, observaram halos de inibição contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de 18 a 25 mm. Ademais, em uma análise de inibição realizada com cepas de *Lactobacillus brevis, Lactobacillus pentosus* e *Pediococcus acidilactici* isoladas de silagem de alfafa de área tropical contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* foi observada formação de halos de inibição contra todos os microrganismos patogênicos testados (SILVA *et al*., 2020).

Em relação ao teste de resistência a antibióticos, todos os isolados apresentaram resistência aos antimicrobianos cefalexina, tetraciclina e ao ácido nalixídico. O isolado S88 foi

susceptível a amoxicilina + ácido clavulânico e a tetraciclina e o isolado H2-4 foi susceptível apenas a amoxicilina + ácido clavulânico (Tabela 7 e Figura 10).

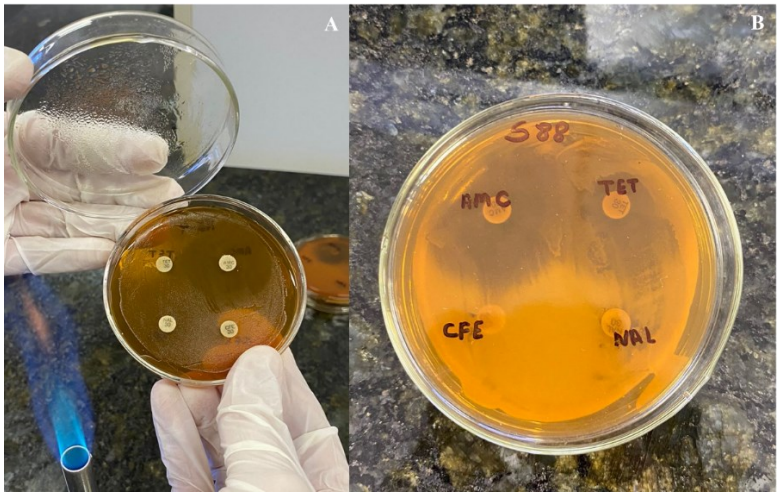
Em um estudo realizado por Domingo *et al*. (2017), no qual foram testados 114 isolados de BALs obtidas de queijo artesanal, com prevalência dos gêneros *Enterococccus* e *Lactobacillus* foi possível observar que todos os isolados eram sensíveis aos antimicrobianos beta-lactâmicos como amoxicilina + clavulanato, carbenicilina e penicilina. No entanto, a maior taxa de resistência foi observada para o ácido nalidíxico, o que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho, visto que dois isolados foram sensíveis a amoxicilina + clavulanato e os oito isolados testados foram resistentes ao ácido nalidíxico (Tabela 7).

Tabela 7 - Suscetibilidade antimicrobiana pelo método de difusão em sobreposição de ágar.

Isolados	CEF	TET	AMC	NAL
S35	R	R	R	R
S88	R	S	S	R
H1-6	R	R	R	R
H1- 20	R	R	R	R
H2-4	R	R	S	R
H2-21	R	R	R	R
H3-4	R	R	R	R
H3-20	R	R	R	R

R= Resistência; S= sensibilidade; CEF= Cefalexina; TET= Tetraciclina; AMC= Amoxicilina + ácido clavulânico; NAL= ácido nalidíxico.

Figura 10 - Susceptibilidade dos isolados de BAL a diferentes antimicrobianos. Placa de Petri após o crescimento da BAL (A), sensibilidade do isolado S88 aos antimicrobianos, amoxicilina + clavulanato e tetraciclina.



A amoxicilina + ácido clavulânico é considerado um antimicrobiano de amplo espectro, sendo um β-lactâmico que interfere na integridade da parede celular das bactérias, porém os grandes índices de resistência apresentados por bactérias capazes de degradar o anel beta-lactâmico, fez com que a associação da amoxicilina com ácido clavulânico fosse necessária, pois o ácido clavulânico impede a ação das enzimas produzidas pelas bactérias que causam a degradação do anel beta-lactâmico. Já a tetraciclina afeta o metabolismo proteico das bactérias, através da interferência no funcionamento dos ribossomos possuindo ação bacteriostática (CASTELLANO, 2022).

A importância da característica de resistência das BALs a antibióticos está relacionada, principalmente, a capacidade de compartilhamento horizontal desses genes com microrganismos patogênicos (STEFAŃSKA *et al*; 2021). Colombo *et al.* (2020) observaram em um estudo de resistência a antimicrobianos utilizando 15 cepas de BALs, entre elas *Lactobacillus casei, L. nagelli, L. harbinensis, L. fermentum, Lactobacillus plantarum e Pediococcus acidilactici* isoladas de silagens, que todas as cepas apresentaram resistência contra sulfa com trimetropim e oxacilina, e a maioria das cepas apresentaram resistência a ampicilina e a vancomicina e susceptibilidade a gentamicina, clorofenicol e rifampicina.

Por fim, Srinivash *et al.* (2023) também destacaram que, de forma geral as BALs apresentam susceptibilidade aos antimicrobianos inibidores de proteínas, como tetraciclina, cloranfenicol, clindamicina e eritromicina, e resistência aos mediados por glicopeptídeos, como gentamicina e estreptomicina, o que se assemelha aos resultados observados na susceptibilidade do isolado S88 a tetraciclina.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se uma variedade de BALs isoladas das diferentes silagens. Após testes de caracterização, os oito isolados selecionados e caracterizados apresentaram potencial inoculante para silagens, por apresentarem caracterização necessária para serem classificados como bactérias ácido lácticas, principalmente pela produção de ácido.

Dessa forma, foi possível caracterizar fenotipicamente sete BALs homofermentativas e uma BAL heterofermentativa com potencial inoculante para os processos de ensilagem na região de Unaí.

Ademais, esses isolados precisam ser submetidos a testes de caracterização genotípica, como extração de DNA e amplificação do gene do RNA ribossomal 16S para que seja determinada a qual família eles pertencem, assim como testes para verificar os efeitos da inoculação desses isolados no processo de ensilagem.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PEREIRA, ALVES, JOYCE. **Isolamento, Identificação e Caracterização de bactérias lácticas na ensilagem de palma forrageira**. 2018.

ÁVILA, C. L. S.; CARVALHO, B. F. **Silage fermentation: updates focusing on the performance of micro-organisms.** Journal of Applied Microbiology, v. 128, n. 4, p. 966-984, 2019.

BARTKIENE, E. *et al*. **Lactic Acid Bacteria Isolation from Spontaneous Sourdough and Their Characterization Including Antimicrobial and Antifungal Properties Evaluation**. v. 8, n. 1, p. 64–65, 2019.

BERNARDI, *et al*. **A meta-analysis examining lactic acid bacteria inoculants for maize silage: Effects on fermentation, aerobic stability, nutritive value and livestock production**. Grass and Forage Science. v. 74, n. 4, p. 596-612, 2019.

BOOTH, S.J.; JOHNSON, J.L.; WILKNNS, T.D**. Bacteriocin production by strains of Bacteroides isolated from human feces and the role of theses strains in the bacterial ecology of the colon.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.11, n.4, p. 718-724, 1977.

CÂNDIDO, Magno José Duarte; FURTADO, Rafael Nogueira**. Estoque de forragem para a seca: produção e utilização da silagem**. 2020.

CARVALHO, B. F. *et al*. **Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality**. Journal of Applied Microbiology. v. 130, n. 2, p. 341-355, 2020.

CARVALHO, B.F. *et al.* **Microbiological and Chemical profile of sugar cane silage fermentation inoculated with wild strains of lactic acid bacteria**. Animal Feed Science and Tecnology. v. 195, p. 1-13, 2014.

CASTELLANO, S. **Antibióticos sistêmicos adjuvantes ao tratamento periodontal não-cirúrgico: revisão de literatura**. 2022.

CHARTERIS, W. P. *et al*. **Suscetibilidade a antibióticos de espécies de Lactobacillus potencialmente probióticas.** Journal of Food Protection, v. 61, n. 12, pág. 1636-1645, 1998.

CHECOLI, M. B. **Silagens de cana-de-açúcar tratadas com Lactobacillus kefiri e L. brevis: Efeitos no perfil fermentativo e na estabilidade aeróbia.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Animais Domésticos; Nutrição e Alimentação Animal; Pastagens e Forragicultura). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

COLOMBO, *et al*. **Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems.** Brazilian Journal of Microbiology. v. 51, p. 787-795, 2020.

COUTINHO, M. J. F. *et al.* **A pecuária como atividade estabilizadora no Semiárido Brasileiro.** Vet. Zootec. v. 20, n. 3, p. 9–17, 2013.

DA HYE KIM; KYUNG DONG LEE; KI CHOON CHOI. **Role of LAB in Silage Fermentation: Effect on Nutritional Quality and Organic Acid Production—An Overview.** UKnowledge. 2021.

DOMINGO, M. F. P. *et al.* **Diversidade genética, segurança e caracterização tecnológica de bactérias lácticas isoladas de queijo artesanal do Pico**. Microbiologia de Alimentos, v. 63, p. 178-190, 2017.

DRIEHUIS, F. *et al.* **Silage review: Animal and human health risks from silage**. Journal of Dairy Science, v. 101, n. 5, p. 4093–4110, 2017.

ENGELHARDT, TEKLA *et al*. **Combined effect of NaCl and low temperature on antilisterial bacteriocin production of Lactobacillus plantarum ST202Ch**. LWT, v. 89, p. 104-109, 2018.

ERTEKİN**. Inoculants, enzymes, and Other aditives in silage production: a review of the literature**. Research Topics in Agriculture, p. 125, 2023.

FABISZEWSKA, A. U. *et al*. **Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: a minireview**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 35, p. 1-8, 2019.

GALLEGOS, D. *et al.* **Effect of particle size reduction and ensiling fermentation on biogas formation and silage quality of wheat straw**. Bioresource technology, v. 245, p. 216-224, 2017.

GALLO, A. *et al.* **Effects of several lactic acid bacteria inoculants on fermentation and mycotoxins in corn silage**. Animal Feed Science and Technology, v. 277, p. 114962, 2021.

GEREI, J. C. **Qualidade da silagem de milho na produção de leite no município de Pitanga-PR**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2018.

GHARECHAHI, J. *et al*. **The dynamics of the bacterial communities developed in maize silage**. Microbial Biotechnology, v. 10, n. 6, p. 1663-1676, 2017.

HAN, H. *et al.* **Effects of Lactic Acid Bacteria-Inoculated Corn Silage on Bacterial Communities and Metabolites of Digestive Tract of Sheep**. Fermentation, v. 8, n. 7, p. 320, 2022.

HASHEMI, S. M. B. *et al.* **Fermentation of sarshir (kaymak) by lactic acid bacteria: Antibacterial activity, antioxidant properties, lipid and protein oxidation and fatty acid profile.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 97, n. 13, p. 4595-4603, 2017.

HOFVENDAHL, Karin; HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. **Fatores que afetam a produção fermentativa de ácido lático a partir de recursos renováveis**. Tecnologia enzimática e microbiana, v. 26, n. 2-4, pág. 87-107, 2000.

JATKAUSKAS, J. *et al.* **The effects of three silage inoculants on aerobic stability in grass, clover-grass, lucerne and maize silages. Agricultural and Food Science**, v. 22, n. 1, p. 137-144, 2022.

KIM, D.; LEE, KD & Choi, K. C. **Papel do LAB na fermentação da silagem: efeito na qualidade nutricional e na produção de ácidos orgânicos - Uma visão geral.** AIMS Agricultura e Alimentação, v. 6, p. 220–234, 2021.

KÖKTEN, K.; ÖZDEMIR, S. **Vantagens dos sistemas de consorciação na agricultura sustentável.** Tópicos de Pesquisa em Agricultura, p. 3, 2023.

Kozaki, M., Uchimura, T., & Sanae, O**. Laboratory manual for identification of lactic acid bacteria**. Tokyo. Japan: Asakura Bookshop (1992).

KUNG J. R. LIMIN *et al.* **Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages.** Journal of dairy Science, v. 101, n. 5, p. 4020-4033, 2018.

LEHMEN, R. I. *et al*. **Rendimento, valor nutritivo e características fermentativas de silagens de cereais de inverno.** Ciência Rural, v. 44, n. 7, p. 1180-1185, 2014.

LI, *et al.* **Identificação e detecção da atividade antimicrobiana de bactérias láticas isoladas de silagem de palha de milho**. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, v. 28, n. 5, p. 620, 2015.

Li, Mao *et al*. **Silagem de fermentação e degradação ruminal de folhagem de mandioca preparada com aditivo microbiano**. AMB Express, v. 9, n. 1, pág. 1-6, 2019.

LI, YNBING *et al.* **Effect of homo-fermentative lactic acid bacteria inoculants on fermentation characteristics and bacterial and fungal communities in alfalfa silage.** Fermentation, v. 8, n. 11, p. 621, 2022.

LIMA JÚNIOR, D.M. *et al.* **Silagem de gramíneas tropicais não-graníferas.** ACSA, v.10, n. 2, p. 1-11, 2014.

LOPES, A. R**. Produção de ácido lático por lactobacilos em diferentes meios de cultivo**. 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, SP, 2008.

MACÊDO, A. J. S. *et al.* **Potencialidades e limitações de plantas forrageiras para ensilagem: Revisão de Literatura**. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 15, n. 1, p. 1 – 17, 2021.

MACHADO, F. S. *et al.* **Qualidade da silagem de híbridos de sorgo em diferentes estádios de maturação**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 64, p. 711-720, 2012.

MEJÍA-AVELLANEDA, L. F. *et al*. **Challenges and opportunities for the production of lactic acid bacteria inoculants aimed for ensiling processes**. Critical Reviews in Biotechnology, v. 42, n. 7, p. 1028-1044, 2022.

MOKOENA, M. P. **Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini review.** Molecules, v. 22, n. 8, p. 1255, 2017.

MONÇÃO, F. P. *et al.* **Nutritional Value of BRS Capiaçu Grass (Pennisetum purpureum) silage associated with cactos pear.** Iranian Journal of Applied Animal Science, v. 10(1), p. 25-29, 2020.

MONTEIRO, C. R. *et al*. **In vitro antimicrobial activity and probiotic potential of Bifidobacterium and Lactobacillus against species of Clostridium**. Nutrients, v. 11, n. 2, p. 448, 2019.

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

NAZAR, M. *et al.* **The feasibility and effects of exogenous epiphytic microbiota on the fermentation quality and microbial community dynamics of whole crop corn.** Bioresource technology, v. 306, p. 123106, 2020.

SÁ NETO, Adir de. **Caracterização microbiológica, parâmetros fermentativos e estabilidade aeróbia em silagens de forragens tropicais com aditivos microbianos**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NI, K. *et al.* **Characterization, Identification and Application of Lactic Acid Bacteria Isolated from Forage Paddy Rice Silage**. v. 10, n. 3, p. e0121967–e0121967, 2015.

NIKKHAH, A. **Chronophysiology of ruminant feeding behavior and metabolism: an evolutionary review**. Biological Rhythm Research, v. 44, p. 197-218, 2013.

OGUNADE, I. M. *et al*. **Lactic Acid Bacteria and Silage Fermentation. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**, p. 275, 2019.

OLADOSU, Y. *et al*. **Fermentation quality and additives: a case of rice straw silage**. BioMed Research International, v. 2016, p. 1-14. 2016.

OLIVEIRA, O. F. *et al*. **Características quantitativas e qualitativas de Caatinga raleada sob pastejo de ovinos, Serra Talhada (PE).** Caatinga, v. 28, n. 3, p. 223 -229, 2015.

OLIVEIRA, *et al.* **Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows**. Journal of dairy science, v. 100, n. 6, p. 4587-4603, 2017.

PEREIRA, L. A. G.; SANTOS, I. J. F**. Mercado de commodities agrícolas e exportações de soja no cenário mundial. V Colóquio Cidade e Região**. Universidade Estadual de Montes Claros, 2017.

PUBLIO, P. P. P. *et al.* **Uso de pastagem diferida e não diferida no período seco**. Brazilian Journal of Science, v. 2, n. 10, p. 70-82, 2023.

PUNTILLO, M. *et al.* **Potential of lactic acid bacteria isolated from different forages as silage inoculants for improving fermentation quality and aerobic stability**. Frontiers in Microbiology, v. 11, p. 586716, 2020.

REN, H. *et al.* **Decreased amylolytic microbes of the hindgut and increased blood glucose implied improved starch utilization in the small intestine by feeding rumen-protected leucine in dairy calves.** Journal of Dairy Science, v. 103, p. 4200-4243, 2020.

RIGUEIRA, J. P. S., *et al*. **Níveis de glicerina bruta na ensilagem de capim Tifton 85 (Cynodondactylon): perfil fermentativo e valor nutricional**. Revista de Ciências Agrárias, v. 40, n. 3, p. 645-655, 2017.

SANTOS *et al.* **Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage.** Journal of Dairy Science, v. 96, n. 12, p. 7757-7782, 2013.

SANTOS, Vinicius da Silva. **Perfil fermentativo e estabilidade aeróbia de silagens de cana-de-açúcar inoculadas com cepas autóctones de bactérias láticas heterofermentativas**. 2019.

SHAH, Assar Ali *et al*. **Isolamento e identificação molecular de bactérias láticas de capim-rei e sua aplicação para melhorar a qualidade da fermentação do sorgo sacarino**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 34, p. 1-13, 2018.

SILVA, Vanessa P. *et al.* **Seleção de bactérias lácticas da silagem de alfafa e seus efeitos como inoculante na fermentação da silagem**. Agricultura, v. 10, n. 11, pág. 518, 2020.

SOUNDHARRAJAN, *et al.* **Probiotic and Triticale silage fermentation potential of Pediococcus pentosaceus and Lactobacillus brevis and their impacts on pathogenic bacteria.** Microorganisms, v. 7, n. 9, p. 318, 2019.

SRINIVASH, *et al.* **Potencial probiótico de bactérias lácticas produtoras de exopolissacarídeos isoladas de produtos alimentícios fermentados caseiros**. Journal of Agriculture and Food Research, v. 11, p. 100517, 2023.

STEFAŃSKA, I. *et al.* **Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria strains of potential use as feed additives-the basic safety and usefulness criterion**. Frontiers in Veterinary Science, v. 8, p. 687071, 2021.

SZUTOWSKA; GWIAZDOWSKA**. Probiotic potential of lactic acid bacteria obtained from fermented curly kale juice.** v. 203, n. 3, p. 975–988, 2021.

WANG, S. *et al*. **Isolating and evaluating lactic acid bacteria strains for effectiveness on silage quality at low temperatures on the Tibetan Plateau.** Animal Science Journal, v. 88, n. 11, p. 1722-1729, 2017.

WANG, Siran *et al.* **Melhoria do perfil fermentativo e da composição estrutural de carboidratos em silagens mistas ensiladas com enzimas fibrolíticas, melaço e Lactobacillus plantarum MTD-1.** Revista Italiana de Ciência Animal, 2018.

WANG, S. *et al.* **Influences of growth stage and ensiling time on fermentation profile, bacterial community compositions and their predicted functionality during ensiling of Italian ryegrass**. v. 298, p. 115606–115606, 2023.

WANG, Y. *et al*. **Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry**. Frontiers in bioengineering and biotechnology, v. 9, p. 612-285, 2021.

WILKINSON, J. M.; DAVIES, D. R. **The aerobic stability of silage: key findings and recent developments.** Grass and forage Science, v. 68, n. 1, p. 1-19, 2013.

WU, Z. *et al.* **Effect of 3-phenyllactic acid and 3-phenyllactic acid-producing lactic acid bacteria on the characteristics of alfalfa silage**. Agriculture, v. 10, n. 1, p. 10, 2019.

YANG, F. *et al*. **Lactobacillus plantarum inoculants delay spoilage of high moisture alfalfa silages by regulating bacterial community composition**. Frontiers in Microbiology, v. 11, p. 1989, 2020.

YITBAREK, M. B.; TAMIR, B. **Silage additives.** Open Journal of Applied Sciences, v.2014.

ZANELLA, J. B. **Aditivos químicos ou microbiológico na silagem de milho**. 2022.

ZHANG, Y. *et al.* **Succession changes of fermentation parameters, nutrient components, and bacterial community of sorghum stalk silage**. Frontiers in Microbiology, v. 13, p. 982489, 2022.

ZHOU, Y. *et al.* **Effect of temperature (5–25° C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage**. Journal of Applied Microbiology, v. 121, n. 3, p. 658-671, 2016.

ZIELIŃSKI, M. *et al*. **Influence of preparation of sida hermaphrodita silages on its conversion to methane**. Renewable Energy, v. 163, p. 438-454, 2021.