**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Efeito da ensilagem de milho na modulação da comunidade
bacteriana endógena**

Paula de Almeida Carvalho Estrada

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2019**

Paula de Almeida Carvalho Estrada
Zootecnista

Efeito da ensilagem de milho na modulação da comunidade bacteriana endógena
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Prof. Dra. **MARIA CAROLINA QUECINE VERDI**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Estrada, Paula de Almeida Carvalho

Efeito da ensilagem de milho na modulação da comunidade bacteriana endógena / Paula de Almeida Carvalho Estrada. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

83 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Ensilagem 2. Comunidade bacteriana 3. Grão de milho reconstituído 4. Gene 16S rRNA 5. Tecnologia de sequenciamento de nova geração I. Título

Antonio,

amor da minha vida,

fonte inesgotável de força da mamãe.

DEDIÇÃO

À minha família,

Que desperta o melhor de mim.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me fortificar diariamente, proteger e me abençoar com uma família incrível que sempre está presente na minha vida, amo vocês e sou grata por tudo, sempre.

Ao meu filho Antonio, por inundar minha vida do maior amor que já pude experimentar. Mamãe não cansa de agradecer por este presente maravilhoso!

À minha mãe Beth e irmã Roberta, base sólida onde encontro meu refúgio. Os grandes amores da minha vida.

Ao meu amado esposo German, não canso de agradecer a Deus pela família que construímos juntos.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Carolina Quecine-Verdi pelos ensinamentos, motivação e acima de tudo confiança no meu trabalho. Você foi muito mais que orientadora, é um exemplo de ser humano, profissional, mãe e mulher. Terá minha eterna admiração e carinho.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela experiência e sabedoria compartilhada, sempre com uma presença motivadora.

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Nussio pelos direcionamentos iniciais no desenvolvimento de meu projeto de doutorado e viabilizar a parceria com as bases experimentais para a coleta do material utilizado no experimento.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo": Andréa, Bia, Bruna, Bruno, Carol Silva, Daniel, Fábio, Giulia, Giulio, Gustavo, Isaneli, Jaqueline, Jéssica, Joelma, Mariana, Patrícia, Pedro, Rafael, Renata, Renatinha, Sarina, Tiago e Zezo pelo auxílio no experimento e convivência diária que deixaram meus dias mais felizes.

Em especial ao amigo Pedro pelo auxílio na etapa de sequenciamento e análises de bioinformática. Sua disponibilidade e empenho, foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA): Pólo Regional Nordeste

Paulista – Mococa e Pólo Regional Sudoeste Paulista – Tatuí. Em especial aos pesquisadores: Solidete Paziani, Paulo Gallo e Marcelo Ticelli, pelo auxílio na condução do experimento à campo, pelo apoio na coleta e infraestrutura oferecida. Agradeço também à todos os funcionários envolvidos, sempre prestativos quando solicitados.

À Embrapa Meio Ambiente, nas pessoas do Prof. Dr. Itamar Soares de Melo e Dr. Rodrigo Taketani, pelo auxílio na realização do sequenciamento.

À instituição Esalq/ USP pela infraestrutura oferecida e qualidade inigualável de ensino na pós graduação.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pelo apoio em minha formação profissional.

Aos professores e funcionários do departamento de genética da Esalq/USP pelos ensinamentos e convivência.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro concedido.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu Muito Obrigada!

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."

Cora Coralina

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	14
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 A ensilagem de grãos úmidos de milho	21
2.2 Microbiologia da silagem	22
2.2.1 Bactérias ácido lácticas (BAL)	23
2.2.2 Clostrídeos	24
2.2.3 Enterobacterias.....	24
2.2.4 Listeria	25
2.2.5 Fungos e Leveduras	25
2.3 Estudos de diversidade em silagens.....	26
2.4 Evolução dos métodos de sequenciamento de DNA	27
2.4.1 NGS aplicado ao estudo da ecologia microbiana durante a ensilagem	28
2.5 Medidas de diversidade biológica aplicadas ao estudo de comunidades de microrganismos em silagens.....	33
3 OBJETIVOS E HIPÓTESE	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.1.1 Objetivos específicos	39
3.2 Hipóteses.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Procedimento experimental	41
4.2 Determinação de pH e matéria seca (MS) das amostras frescas e das silagens.....	45
4.3 Extração do DNA total	45
4.4 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	46
4.5 Processamento das sequências.....	47
4.6 Análises estatísticas aplicadas ao estudo da comunidade bacteriana.....	48
5 RESULTADOS	51

5.1	Caracterização das silagens	51
5.2	Estimativas da diversidade bacteriana.....	52
5.3	Estrutura da comunidade bacteriana das silagens	53
5.4	Composição da comunidade bacteriana	55
5.5	Principais grupos bacterianos influenciando as variações na estrutura da comunidade bacteriana	57
5.6	Relação entre os principais grupos bacterianos e as características da silagem.....	59
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	73

RESUMO

Efeito da ensilagem de milho na modulação da comunidade bacteriana endógena

Compreender a ecologia microbiana durante a ensilagem é fundamental para neutralizar pontos críticos relacionados à produção de silagens de qualidade por meio da prevenção do crescimento de bactérias oportunistas que possam comprometer a segurança da cadeia alimentar animal e o rendimento da forragem ensilada. Ensilar GSR de milho possibilita a compra estratégica em momentos de baixa nos preços do grão. O objetivo deste estudo foi avaliar por meio de sequenciamento massivo do gene 16S rRNA o efeito da reconstituição da umidade do grão de milho na dinâmica da comunidade bacteriana para confecção dessa silagem. Foram amostrados milhos plantados em dois distintos locais. As plantas usadas no estudo incluíram dois híbridos contrastantes, “dent” (AG 1051) e outro “flint” (IAC 8390) ensilados de duas maneiras: grão úmido (GU), com a umidade original e grãos secos reconstituídos (GSR) à 30 % U, ambos ensilados por 0 ou 120 dias. Utilizando a plataforma de sequenciamento Ion Torrent, foi possível observar uma redução significativa ($P < 0,05$) no número de OTUs ao se comparar silagens GSR aos 0 dias em relação aos 120 dias em ambos os híbridos e locais de cultivo do milho. As PCoAs evidenciaram variação na estrutura da comunidade bacteriana em função do período de estocagem do grão com separação nítida das comunidades provenientes de amostras recém colhidas daquelas provenientes de silagens estocadas por 120 dias. Também foi revelado que Proteobacteria (41,8 %), Firmicutes (41,6 %) e Actinobacteria (13,2 %) foram os filos mais abundantes nas silagens, tendo sido evidenciado a ocorrência de sucessão de um microbioma dominado por Proteobacteria e Actinobacteria (aos 0 dias) para um microbioma dominado por Firmicutes, representado principalmente pela ordem Lactobacillales nas silagens terminais (120 dias). Observamos o mesmo efeito ao considerar a amostra local, híbrido e maturidade fisiológica. Os fatores que apresentaram maior influência na distribuição da comunidade bacteriana foram o período de estocagem (36,16 %) e o estágio de maturação do milho (13,3 %). A ordem Lactobacillales foi diferencialmente abundante no milho estocado por 120 dias (70 % da variação) e Enterobacteriales (45 % da variação) aos 0 dias. Em relação ao estágio de maturação do grão observamos variação significativa na abundância relativa de Enterobacteriales em GU (25 % da variação) e Actinomycetales em GSR (21 % da variação). Houve correlação ($P = 0,002$) do pH com a estrutura da comunidade das silagens, sendo que as maiores variações de pH se deram comparando as amostras no tempo 0 - 120 dias de estocagem. A ordem Lactobacillales foi negativamente correlacionada com o pH ($r = -0,85$), enquanto que Enterobacteriales ($r = 0,58$) e Actinomycetales ($r = 0,46$) foram positivamente correlacionadas com o pH. A reconstituição do grão de milho não exerceu efeito negativo sobre a população bacteriana das silagens terminais, destacando a viabilidade desta técnica. Até o momento, não há trabalhos publicados apresentando a estrutura e composição da comunidade bacteriana de silagens de GSR por meio de sequenciamento massivo do gene 16S rRNA, confirmando a importância e o ineditismo deste trabalho.

Palavras-chave: Ensilagem; Comunidade bacteriana; Grão de milho reconstituído; Gene 16S rRNA; Tecnologia de sequenciamento de nova geração

ABSTRACT

Effect of maize ensiling on the modulation of the endogenous bacterial community

Understanding microbial ecology during ensiling is critical to neutralize critical points related to optimal silage making by preventing the growth of opportunistic bacteria that may compromise the safety of the animal food chain and the yield of silage fodder. Ensiling GSR makes it possible to buy strategically at times of low grain prices. The objective of this study was to evaluate the effect of reconstitution of corn grain on the dynamics of the bacterial community aiming high moisture corn silage processing by means of a massive sequencing of the 16S rRNA gene. Harvest was performed in two different locations. The plants used in the study included two contrasting hybrids, dent (AG 1051) and another flint (IAC 8390) hybrids, ensiled in two ways: wet grain (GU), ensiled with the original moisture or rehydrated dry grains (GSR) ensiled with 30 % of moisture, both ensiled for 0 or 120 days. Using the Ion Torrent sequencing platform, a significant reduction ($P < 0.05$) in the number of OTUs was observed when comparing GSR silages at day 0 versus 120 days in both hybrids and maize growing sites. The PCoAs evidenced variation in the structure of the bacterial community as a function of the storage period of the grain with clear separation of the communities coming from freshly harvested samples from silage stored for 120 days. It was also revealed that Proteobacteria (41,8 %), Firmicutes (41,6 %) and Actinobacteria (13,2 %) were the most abundant phyla in the silages, evidencing the occurrence of succession of a microbiome dominated by Proteobacteria and Actinobacteria (at 0 day) for a microbiome dominated by Firmicutes, represented mainly by the order Lactobacillales in the terminal silages (120 days). We observed the same effect when considering the local sample, hybrid and physiological maturity. The factors that had the greatest influence on the distribution of the bacterial community were the storage period (36,16 %) and the stage of maturity of the plant (13,3 %). The Lactobacillales order was differentially abundant in the corn stored for 120 days (70% of the variation) and Enterobacteriales (45 % of the variation) at day 0. In relation to the stage of maturity we observed a significant variation in the relative abundance of Enterobacteriales in GU (25 % of the variation) and Actinomycetales in GSR (21 % of the variation). There was a correlation ($P = 0.002$) of the pH with the community structure of the silages, and the highest pH variations were obtained by comparing the samples in the 0 - 120 days of storage. The order Lactobacillales was negatively correlated with pH ($r = -0.85$), while Enterobacteriales ($r = 0.58$) and Actinomycetales ($r = 0.46$) were positively correlated with pH. The reconstitution of the corn grain did not have a negative effect on the bacterial population of the terminal silages, highlighting the viability of this technique. To date, there are no published papers presenting the structure and composition of the bacterial community of GSR silages by means of massive sequencing of the 16S rRNA gene, confirming the importance and novelty of this work.

Keywords: Silage; Bacterial community; Reconstituted dry corn; 16S rRNA gene; New generation sequencing technology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1– Temperatura média e precipitação mensal nas estações experimentais de Tatuí e Mococa – SP.....44
- Figura 2 – *Mini bags* utilizados como silos experimentais no estudo (A), pesagem dos *mini bags* (B).....44
- Figura 3 – pH de silagens de grãos de milho de acordo com o período de estocagem. Médias de 4 repetições.....51
- Figura 4– Análise de coordenadas principais (PCoA) da estrutura da comunidade bacteriana em silagens de grão de milho confeccionadas com diferentes híbridos (A), nas bases experimentais de Tatuí e Mococa (B), em tempos de maturidade da planta distintos (C), durante zero ou 120 dias de fermentação (D). Os valores nos eixos indicam a porcentagem de variância explicada pela soma dos dois principais eixos.....54
- Figura 5 – Classificação taxonômica das OTUs de acordo com a abundância relativa das ordens de bactérias em silagens de grão de milho. Híbrido (HA= IAC-8390 (grão duro -" Flint "); HB= AG-1051 (grão macio -" Dent "). Estágio de Maturação (GSR= Grão seco reconstituído; GU= Grão úmido. Período de Estocagem (0 e 120 dias). Local de Cultivo (T= Tatuí; M= Mococa).....56
- Figura 6 – Abundância média de sequências das OTUs mais responsivas a dissimilaridade observada entre os períodos de estocagem do milho. Os grupos que apresentaram baixa média de abundância reativa (< 5%) em proporção não foram mencionados no texto. Dados obtidos por meio do teste Post-Hoc com nível de significância 95% corrigido com Bonferroni.....58

Figura 7 – Abundância média de sequências das OTUs mais responsivas a dissimilaridade observada entre os estágios de maturação do milho. Os grupos que apresentaram baixa média de abundância reativa ($< 5\%$) em proporção não foram mencionados no texto. Os dados foram obtidos por meio de Teste Post-Hoc com nível de significância 95% corrigido com Bonferroni.....59

Figura 8 – Abundância média de sequências dos grupos bacterianos mais responsivos a dissimilaridade entre o período de estocagem (0 e 120 d) e estágios de maturação do milho (GU e GSR) obtida por meio do teste de Post HocHSD. Os grupos que apresentaram baixa média de abundância relativa ($< 5\%$) em proporção não foram mencionados no texto. Letras distintas significam que as médias apresentam diferença estatística $p\text{-value} \leq 0,05$, corrigido com Bonferroni. A – Comparação das médias da abundância relativa de ordem Lactobacillales. B – Comparação das médias da abundância relativa de ordem Enterobacteriales. C – Comparação das médias da abundância relativa de ordem Actinomycetales. D – Comparação das médias da abundância relativa de ordem Burkholderiales.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos de metagenômica em silagens usando NGS.....	30
Tabela 2 – Descrição dos tratamentos e amostras.....	42
Tabela 3 – Cronograma de colheita nas bases experimentais de Tatuí e Mococa.....	43
Tabela 4 – Média dos teores de umidade (%) originais e após reconstituição de grãos de híbridos de milho em diferentes pontos de maturidade na ensilagem.....	45
Tabela 5 – Média dos teores de matéria seca (%), umidade (%) e pH das silagens.....	52
Tabela 6 – Estimativa da α diversidade (Shannon) e índice de Dominância (Simpson 1-D) das silagens analisadas no estudo.....	53
Tabela 7 – Influência dos tratamentos na distribuição e ocorrência de OTUs nas amostras.....	55
Tabela 8 – Correlação de Pearson entre as características da silagem e os principais grupos bacterianos associados mais responsivos a variações de período de estocagem e estágio de maturação do grão.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

GSR – Grão Seco Reconstituído

GS – Grão Seco

GU – Grão Úmido

% - Porcentagem

°C - Grau Celsius

µg - Micrograma

µL - Microlitro

BAL – Bactéria Ácido Lática

cm – Centímetro

CO₂ – Dióxido de Carbono

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

dNTPs - Desoxirribonucleosídeo Trifosfato

EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetracético

g - Grama

H₂O - Água

L - Litros

M - Molar

mg - Miligrama

min - Minutos

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

MS - Matéria Seca

ng – Nanograma

NGS – *Next Generation Sequencing*

NH₃ – Amônia

OTUs – *Operational Taxonomix Units*

O₂ – Oxigênio

pb - Pares de Base

PCOA – Análise de Coordenadas Principais

PCR - “Polymerase Chain Reaction” (Reação de polimerase em cadeia)

pH - Potencial Hidrogeniônico

pmol - Picomoles

rpm - Rotações por Minuto

rRNA - Ácido Ribonucléico Ribossomal

s - Segundos

SDS - “Sodium Dodecil Sulfate” (Dodecil Sulfato de Sódio)

TAE - Tris-acetato-EDTA

TE - Tris-EDTA

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

U - Unidade

UV - Radiação Ultravioleta

V - Volts

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho e o segundo maior exportador (USDA, 2018), sendo que na última década, o Brasil foi responsável por aproximadamente 8% da produção mundial de milho (CONAB, 2018). Sua produção se destina aos mais variados fins, passando desde sua função alimentar até a utilização na indústria e produção de combustível, implicando no atendimento de uma grande e diversificada demanda mundial. Acerca de sua função alimentar, seguindo a tendência mundial em que a alimentação animal consome a maior parte do milho produzido, o Brasil tem nesse segmento seu grande mercado, onde cerca de 60% da demanda interna está associada à cadeia produtiva da alimentação de aves, suínos e bovinos (ABIMILHO, 2018).

Considerando que o principal destino do milho é a nutrição animal e que o amido representa 60 a 70% da maioria dos grãos de cereais (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986), otimizar o uso deste nutriente é fundamental para se obter alta eficiência alimentar dos animais alimentados com dietas ricas em cereais (HUNTINGTON, 1997; OWENS; ZINN, 2005; THEURER, 1986) e a melhor maneira de otimizar seu uso é garantir elevada digestibilidade através do processamento de grãos. Para Theurer (1986), são considerados grãos processados aqueles tratados com aquecimento a vapor, extrusados, moídos, ensilados e/ou reconstituídos. Nesse sentido, ensilar grãos com alta umidade e/ou reconstituí-los é uma estratégia eficiente de processamento e conservação dos grãos.

As vantagens da ensilagem de grãos úmidos podem ser várias, em comparação com a colheita, armazenamento e fornecimento de milho seco para bovinos (COSTA et al., 2002; JOBIM; REIS, 2001; OWENS; SODERLUND, 2006; SELF, 1976;), tais como: a) redução nas perdas até a colheita por ataque de pragas e roedores, b) redução nas perdas pelo ataque de ratos e insetos durante o armazenamento, c) baixas perdas de matéria seca (DA SILVA et al., 2015; DAWSON et al., 1998; KUNG JUNIOR. et al., 2007), d) menor custo de produção (JASPER et al., 2009), e) antecipação da retirada da cultura da área permitindo o plantio antecipado da nova cultura no final do verão, e finalmente, f) maior valor nutricional, principalmente em função da maior digestibilidade do amido, tanto no rúmen quanto nos intestinos e trato digestivo total (OWENS; BASALAN, 2012; OWENS; SODERLUND, 2006). A melhora na

digestibilidade do amido é decorrente da proteólise desencadeada por diversas fontes no silo, sobretudo por proteases bacterianas (JUNGES et al., 2015).

Entretanto, o pequeno intervalo para colheita dos grãos de milho no estágio de grão úmido (GU) tem sido visto como uma desvantagem do processo por alguns produtores. Uma vez que a maturidade fisiológica tenha sido atingida, os grãos de milho do tipo “dent”, híbridos de endosperma farináceo, perderão em torno de 0,5 a 1% de umidade por dia dependendo das condições ambientais, resultando em janela curta de corte. Ao considerarmos que a maior parte dos híbridos cultivados no Brasil são do tipo “flint”, ou seja híbridos de endosperma duro ou vítreo, esta janela é ainda menor, uma vez que a perda de umidade parece ser mais rápida nestes cultivares (DA SILVEIRA, 2009) resultando em janela de corte ainda mais curta para esses materiais, fator este que se constitui em grande desafio para o processo em larga escala. Uma alternativa para contornar este contratempo na ensilagem de grãos úmidos de milho seria a prática da reidratação, utilizando para a ensilagem grãos secos reconstituídos (GSR).

A reidratação ou reconstituição do grão de milho consiste em devolver ao grão já seco a umidade adequada para que o mesmo seja fermentado no silo, implicando em adição de água suficiente para elevar a umidade do grão seco para valores em torno de 28 a 35% (BENTON et al., 2005; COSTA et al., 1999). O uso desta técnica pode beneficiar os produtores que não possuem equipamentos para a colheita do milho no ponto de maturação em torno da linha negra e aqueles que não possuem área suficiente para plantar milho para a colheita de grãos, pois podem comprar o milho grão e ensilá-lo na fazenda, possibilitando inclusive, a compra estratégica em momentos de baixa nos preços do grão. Dentre as limitações da técnica, tem-se o uso restrito ao local de produção e possível desbalanço entre as velocidades de moagem e de abastecimento do moinho com grãos inteiros (MORAIS, 2016).

Como o processo fermentativo é extremamente dependente da comunidade de microrganismos associados, o estudo dessa diversidade torna-se essencial. As primeiras técnicas independentes de cultivo utilizadas para acessar a comunidade microbiana de silagens foram: a) gel de eletroforese em gradiente desnaturante - DGGE (LI et al., 2011; NAOKI; YUJI, 2008; PARVIN; NISHINO, 2009, 2010; PARVIN et al., 2010), b) PCR quantitativo em tempo real - qPCR (DUNIÈRE et al., 2015; LYNCH et al., 2012; KLOCKE et al., 2006; SCHMIDT et al., 2008; STEVENSON et al., 2006), c) heterogeneidade de dimensão de fragmentos de PCR - LH-PCR (BRUSETTI et al., 2006, 2008), d) polimorfismo do tamanho e composição de bases de fragmentos

terminais de restrição - T-RFLP (McENIRY et al., 2008, 2010), e, e) análise automatizada do espaço intergênico ribossomal – ARISA (BRUSETTI et al., 2008).

A metagenômica de maneira rápida e relativamente barata com o advento do sequenciamento de nova geração (NGS – next generation sequencing), vem superando estes métodos, sendo capaz de determinar de maneira minuciosa as comunidades de microrganismos compondo as silagens. Por meio do sequenciamento em larga escala tem-se descoberto espécies nunca antes reportadas em silagens, assim como, revelando alterações nas comunidades de microrganismos em função de diferentes híbridos de milho, tempo de estocagem e maturidade fisiológica das plantas ensiladas (CARVALHO, 2014).

As peculiaridades entre silagens de grãos úmidos e de grãos secos restituídos envolvem tanto questões nutricionais, quanto fermentativas. Fernandes (2014) obteve perfis fermentativos distintos entre silagens de grãos secos restituídos e silagens de grãos úmidos, aos 120 dias de fermentação. Além de menor teor de ácido lático e maior valor de pH, as silagens de grãos seco reconstituídos apresentaram maiores perdas fermentativas comparado ao grão colhido com umidade ideal.

Trabalhando com as mesmas amostras, Carvalho (2014), acessou a comunidade bacteriana por meio de NGS (Illumina Miseq) e identificou em silagens de GU a predominância dos gêneros *Lactobacillus* e *Acetobacter*, com destaque para *Lactobacillus* aos sete dias (49,6%) e *Acetobacter* aos 120 dias (15,4%). Para as amostras de GSR, os grupos predominantes foram os gêneros *Clostridium* e *Enterococcus*, com destaque para *Clostridium* aos 120 dias (37,7%) e *Enterococcus* aos 120 dias (20,5%). Tais achados, conferiram às silagens de GSR uma qualidade higiênica inferior à de GU, tornando necessário maiores estudos que contrastem reconstituição e ensilagem com alta umidade. Claramente, a ensilagem de GSR constitui uma ferramenta importante para o aumento do valor nutritivo do milho, porém é necessário o entendimento das peculiaridades dessa fermentação pelos microrganismos envolvidos neste processo.

Até o momento, não há trabalhos publicados acerca da estrutura e composição da comunidade bacteriana de silagens de grãos úmidos de milho (GU) e silagens de grão seco reconstituído de milho (GSR) acessados por meio de sequenciamento massivo do gene 16S rRNA, o que possibilita a publicação de dados inéditos. Nesse cenário, objetivou-se avaliar o efeito da reconstituição de grãos de milho sobre a dinâmica da comunidade bacteriana associada às silagens de GSR de milho, visando seu

beneficiamento. Um maior entendimento da ecologia microbiana durante a ensilagem, por meio da caracterização da comunidade bacteriana presente, colaborará com um maior controle do processo, e finalmente direcionará estratégias para que ocorra a modulação e persistência de um microbioma mais favorável ao processo fermentativo desejado, o que de fato fomentou o presente estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A ensilagem de grãos úmidos de milho

A ensilagem de GU consiste na colheita dos grãos logo após a maturação fisiológica, moagem ou não do material, colocação no silo, compactação e vedação para manter a anaerobiose (COSTA et al., 2002; FOX, 1976; JOBIM; REIS, 2001; MADER; RUST, 2006). Os grãos são considerados maduros fisiologicamente quando a produção de matéria seca atinge seu ponto máximo. Embora o trigo e o sorgo também sejam oferecidos na forma de silagem de grãos úmidos, o milho se destaca como principal cultura armazenada na forma de silagem com alta umidade (MADER; RUST, 2006).

Otimizar o uso do milho pelos ruminantes significa minimizar o teor de amido nas fezes e isso implica em mitigar a principal limitação à digestão do amido, através do processamento de grãos, que pode envolver: ação mecânica, temperatura e umidade. Segundo Biagi (1990), processamento é qualquer tratamento que uma ração ou ingrediente de uma ração recebe antes de ser consumida pelos animais. Segundo Hale (1973), os métodos são classificados em processamentos a seco ou úmido. Desta forma quebrar, moer, tostar e peletizar são exemplos de processamentos a seco; ensilar grão com alta umidade, flocular e cozer sob pressão são exemplos de processamentos úmidos.

No processamento úmido como é o caso da ensilagem de grãos, o aumento na digestibilidade do amido ocorre principalmente em virtude da solubilização da matriz protéica dos grãos, principalmente das prolaminas, por ação tanto de enzimas proteolíticas microbianas assim como pela ação de ácidos orgânicos, durante o processo de fermentação no silo (DEFOOR et al., 2006; OWENS; ZINN, 2005; PRIGGE, 1976; ROONEY; PFLUGFELDER, 1986).

Na América do Norte, de onde provém o maior número de estudos relacionados ao processamento do milho e sua relação com o desempenho animal, o milho mais cultivado é do tipo dentado (Dent - *Zea mays* ssp. *Indentata*) enquanto que na América do Sul predomina a produção e utilização de milho do tipo duro ou “flint” com alta proporção de endosperma vítreo (flint - *Zea mays* ssp. *Indentura*) (CORREA et al., 2002).

Ao comparar híbridos brasileiros (duro “Flint”) com híbridos de milho cultivados nos Estados Unidos (macio “Dent”), Correa et al. (2002) relatou que a vitreosidade dos

híbridos brasileiros no estágio maduro variou de 64,2 a 80,0% do endosperma, com média de 73,1%. Enquanto que nos híbridos norte-americanos a vitreosidade variou de 34,9 a 62,3% do endosperma, com média de 48,2%. Ou seja, o híbrido brasileiro menos vítreo ainda apresentou maior vitreosidade que o mais vítreo dos híbridos americanos. Semelhante ao observado por Philippeau e Michalet-Doureau (1998) houve correlação alta e negativa entre vitreosidade e degradabilidade ruminal. Nesse sentido, o efeito do processamento úmido é ainda mais significativo ao se considerar o grupo genético das cultivares de milho predominantemente cultivados nas condições brasileiras, fazendo da ensilagem de grãos de milho úmidos e/ou reconstituídos uma estratégia de processamento e armazenamento vantajosa, economicamente viável e que melhora a digestibilidade do amido (MORAIS, 2016).

2.2 Microbiologia da silagem

Existem diferenças consideráveis entre as espécies de microrganismos dominantes no processo fermentativo ao se comparar diferentes estudos, mas na maioria dos casos, bactérias ácido lácticas (BAL) como *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Lactococcus* costumam ser as predominantes (BRUSETTI et al., 2006, 2008; LI et al., 2011; McENIRY et al., 2010; NAOKI; YUJI, 2008; PARVIN; NISHINO, 2009, 2010; PARVIN et al., 2010; SCHMIDT et al., 2008; VILLA et al., 2010; WANG et al., 2011). As BAL são predominantes pois constituem a microbiota essencial para a fermentação da silagem, sendo geralmente presentes nas forragens em população 1000 vezes menor que seus principais competidores, fungos e enterobactéria (McDONALD et al., 1991).

Dentre os microrganismos encontrados nas plantas antes da ensilagem, além das BAL, destacam-se enterobactérias, fungos e leveduras, clostrídeos, bacilos, bactérias ácido acéticas e do ácido propiônico (McDONALD et al., 1991; PAHLOW et al., 2003).

De maneira geral, o ambiente do silo por si só é um fator limitante ao crescimento de certos microrganismos, podendo ser explicado em função da alteração das condições presentes no interior do silo, sendo a primeira delas a condição de anaerobiose. Muitas das espécies presentes no material ensilado são bactérias aeróbias facultativas e não contribuem com a preservação da silagem, tendo seu crescimento inibido logo após o fechamento do silo (PAHLOW et al., 2003). Segundo Sprague (1974), citado por Woolford (1984) e Pahlow et al. (2003), após o fechamento, em 15 minutos cerca de

90% do oxigênio é removido e menos de 0,5% permanece após 30 minutos. Os microrganismos aeróbios, degradam o ácido láctico com facilidade após abertura do silo, gerando CO₂, etanol e ácido acético, além de grande liberação de calor (LINDGREN, 1999), reduzindo a estabilidade aeróbia da silagem.

Além disso, o teor de matéria seca (MS) também auxilia na determinação de uma comunidade mais apta a prosperar em uma condição de ambiente com maior ou menor atividade de água (Aw). A redução do teor de umidade da planta está diretamente associada com a redução da Aw e aumento da pressão osmótica, como consequência, microrganismos presentes na cultura a campo e no material ensilado podem ser mais ou menos sensíveis à estas situações de desafio, sendo esses denominados microrganismos osmotolerantes (DRIEHUIS, 2015).

Finalmente, o pH baixo (em torno de 4,0) faz com que os ácidos em solução estejam na forma não dissociada. A maior parte dos ácidos orgânicos possui constante de dissociação (pKa) situada entre pH 3 e 5 (SALMINEN et al., 2004). Para a supressão de microrganismos, o ácido não dissociado é de primordial importância, e as moléculas dissociadas tem efeitos menores (COURTIN; SPOELSTRA, 1990, MUCK et al., 1991).

2.2.1 Bactérias ácido lácticas (BAL)

As BALs apresentam atuação essencial no processo fermentativo, para a conservação da massa ensilada, incluindo principalmente, os gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Como produto da fermentação de açúcares produzem principalmente ácido láctico (MUCK, 2013).

As BAL podem ser diferenciadas em função de seu metabolismo sobre a glicose em condições não limitantes de crescimento. Podendo ser divididas em homofermentativas, que convertem glicose em ácido láctico, ou heterofermentativas, que fermentam glicose a ácido láctico, etanol, ácido acético e CO₂, que pode ser medido por um teste de produção de gás (SHARPE, 1979). Por apresentarem plasticidade metabólica em função do nível de oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento presentes no meio (CONDON, 1987; KANDLER, 1983) podem ainda ser classificadas como heterofermentativas facultativas (HOLZER et al., 2003).

Enterococcus, *Lactococcus* e *Pediococcus*, são gêneros geralmente associados ao início do processo fermentativo, enquanto que nos estágios seguintes espécies mais

ácido tolerantes de *Lactobacillus*, como *L. plantarum* e *L. brevis* os substituem. Segundo Beck (1978) a eventual dominância de estirpes heterofermentativas após os primeiros dias de fermentação pode estar associada a maior tolerância ao ácido acético. Destaca-se que diferentemente das BALs, a presença de bactérias ácido acéticas na silagem é indesejável por poder iniciar a deterioração aeróbica e degradação de ácido láctico e acético com produção de CO₂ e H₂O (SPOELSTRA et al., 1988).

2.2.2 Clostrídeos

Bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium* podem ter efeitos negativos sobre a qualidade da silagem pois fermentam açúcares, ácido láctico e aminoácidos produzindo ácido butírico e aminas, resultando em perda de MS, e os produtos de sua fermentação reduzem a aceitação pelo animal, além de diminuir a estabilidade da silagem (MAHANNA, 1994, ROTZ; MUCK, 1994). Os clostrídeos podem ser divididos em três grupos: sacarolíticos (ex. *C. butyricum*), que produzem ácido butírico a partir da fermentação de açúcares e ácido láctico; proteolíticos (ex. *C. sporogenes*) que fermentam aminoácidos com produção de ácidos (butírico, acético, propiônico), amônia, aminas (histamina, putrescina, cadaverina) e CO₂; e sacaro-proteolíticos (ex. *C. perfringens*) que fermentam ambos, açúcares e aminoácidos (McDONALD et al., 1991).

O crescimento clostridial é estimulado por temperaturas de estocagem elevadas, baixo teor de MS, baixo teor de carboidrato solúvel, alto poder tampão da cultura e lento fechamento do silo. O desenvolvimento de clostrídeos na silagem é indesejável, pois age contra a preservação da massa ensilada, por meio da destruição do ácido láctico, permitindo a elevação do pH, além de reduzir o valor nutritivo da silagem pelo catabolismo de aminoácidos (McDONALD et al., 1991).

Os clostrídeos podem ser inibidos durante os primeiros dias de ensilagem pela queda do pH. Entretanto, podem retomar o crescimento, pelo tamponamento do meio ao longo da fermentação, pelos compostos produzidos (BERNARDES, 2006).

2.2.3 Enterobactérias

As enterobactérias, pertencentes a família Enterobacteriaceae, inclui patógenos

capazes de afetar animais, plantas e humanos. Entretanto o pequeno grupo que exerce algum efeito sobre o processo fermentativo não é patogênico. Segundo Henderson (1993) as enterobactérias são bactérias Gram-negativas, anaeróbios facultativos que competem por açúcares com as BAL, logo no início da fermentação, produzindo principalmente ácido acético, sendo geralmente inibidas em pH abaixo de 5,0. A proliferação destes microrganismos ocasiona perdas de MS e pequenas perdas de energia (ROTZ; MUCK, 1994), além de perdas de proteínas, pois, algumas cepas são capazes de deaminar e descarboxilar aminoácidos.

2.2.4 *Listeria*

É importante ressaltar também a presença de *Listeria*, bactérias Gram-positivas, que se apresentam na forma de bastonetes curtos e regulares, com alta patogenicidade ao homem e aos animais (JOBIM; GONÇALVES, 2003). A contaminação de *Listeria* spp. nas silagens ocorre principalmente nas regiões periféricas do silo e seu desenvolvimento está diretamente associado ao pH. Quando o pH é inferior a 5,2 a *Listeria monocytogenes* não se desenvolve, porém só é inibida em pH ainda mais ácido. Em silagens com pH elevado poderá ocorrer desenvolvimento de *Listeria* spp., exceto se o teor de MS for muito elevado, ao redor de 70% (JOBIM; GONÇALVES, 2003).

2.2.5 Fungos e Leveduras

As forragens conservadas também estão sujeitas a contaminações por fungos, como leveduras (unicelulares) e mofos (colônias multicelulares filamentosas). Algumas leveduras são anaeróbias facultativas promovendo a fermentação alcoólica de açúcares. Outros produtos também são formados pela atuação das leveduras em anaerobiose, incluindo os ácidos acético, butírico e isobutírico, isopentanol, isobutanol, e traços de ácido láctico (McDONALD et al., 1991). Entretanto, na presença de O₂ o ácido láctico é transformado em ácido acético, CO₂ e H₂O.

Os fungos, principalmente espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, crescem em aerobiose, levando à formação de toxinas, que quando ingeridas podem prejudicar os animais (LAZZARI, 1997). Os fungos metabolizam açúcares e ácidos orgânicos com formação de CO₂ e H₂O com aumento da temperatura do silo,

além de degradar proteínas resultando em produção de NH_3 que impede o abaixamento do pH da silagem.

2.3 Estudos de diversidade em silagens

A incorporação de dados de diversidade ao estudo da microbiologia de silagens tem sido útil em responder de que maneira vários fatores podem afetar a fermentação. O fator mais comum é o uso de inoculante bacteriano, entretanto alguns estudos indicam a influência de outros fatores no curso da fermentação de silagens (MUCK, 2013).

Usando a técnica de T-RFLP, McEniry et al. (2010) compararam a comunidade microbiana em azevém perene enfardado ou ensilado durante 0 e 14 dias. As enterobactérias prevaleceram na fase anterior à ensilagem e nas silagens mais secas, enquanto que BAL prevaleceram ao final do processo fermentativo.

DGGE tem sido utilizado para definir as comunidades bacterianas de silagens de azevém, alfafa e milho (DOLCI et al., 2011; NAOIKI; YUJI, 2008; NI et al., 2017aOTUs; PARVIN; NISHINO 2009, 2010; WU et al., 2014). Parvin e Nishino (2009) usaram o DGGE para avaliar alterações microbianas decorrentes do período de estocagem a partir da ensilagem de capim guiné com duas concentrações de MS (286 e 443 g kg⁻¹).

Brusetti et al. (2006, 2008) usaram da técnica de LH-PCR para examinar alterações da comunidade de BAL ao acompanharem o progresso fermentativo da ensilagem de milho. *Pediococcus pentosaceus* e *W. confusa* foram as espécies mais prevalentes presentes na ensilagem.

A tecnologia de sequenciamento por Sanger, embora seja mais laboriosa por exigir a etapa de clonagem, também tem sido utilizada em estudos de comunidade em silagens. Wu et al. (2014) acessaram a comunidade bacteriana de silagens de alfafa e de milho provenientes de diferentes tipos de silo. McGarvey et al. (2013) reportaram que Proteobacteria e Firmicutes foram os filos mais abundantes em silagens de alfafa correspondendo a 89,6 e 8,1% do total de sequências afiliadas.

O PCR quantitativo também já foi usado para estudar a diversidade de bactérias e leveduras em silagens (DUNIÈRE et al., 2015; KLOCKE et al., 2006; LYNCH et al., 2012; SCHMIDT et al., 2008; STEVENSON et al., 2006). Dunière et al. (2015) usaram qPCR para monitorar o destino de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces paradoxus* durante a ensilagem e após a exposição aeróbica. Embora este estudo tenha mostrado que o número de

cópias dessas leveduras não aumentou durante o período de ensilagem, os aumentos dessas espécies durante a exposição aeróbica demonstraram que as mesmas foram capazes de sobreviver ao processo de ensilagem.

Entretanto, nos casos em que genes 16S rRNA não sejam suficientes para diferenciar espécies mais próximas devido à alta similaridade, outros *loci* mais divergentes podem ser usados para caracterizar a diversidade bacteriana, como a chaperonina-60 (CPN-60; LINKS et al., 2012) e o gene *recA* (HOFSTATTER et al., 2016; PANG et al., 2011, STEVENSON et al., 2006). A caracterização molecular de leveduras e populações de fungos em silagens tem utilizado regiões do 18S rRNA (LI; NISHINO, 2011), 26S rRNA (LIU et al., 2013) ou ITS (ROSSI; DELLAGLIO, 2007). O estudo da diversidade em silagens vem acompanhando a evolução dos métodos de sequenciamento de DNA.

2.4 Evolução dos métodos de sequenciamento de DNA

Após a publicação do *draft* do genoma humano (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001), houve um avanço nas tecnologias de sequenciamento culminando no surgimento da tecnologia denominada sequenciamento de nova geração (NGS). Atualmente existem diversas tecnologias voltadas para o sequenciamento do DNA em larga escala, sendo a Roche a primeira empresa a desenvolver esta estratégia em 2005 com o sequenciador 454 GS20, que se baseia na tecnologia de pirosequenciamento. O princípio desta tecnologia foi inicialmente proposto por Hyman (1988).

A partir deste período, outros métodos foram desenvolvidos, sendo os mais importantes: o método Polony (SHENDURE et al., 2005) utilizado no sequenciador SOLID (Applied Biosystems) e o método de amplificação em ponte (BENNETT et al., 2005) utilizado no sequenciador Genome Analyser (Illumina). Com isso, a ênfase passou do sequenciamento de pequenos fragmentos de DNA ao estudo de genomas inteiros (FIETTO; MACIEL, 2015). Atualmente, as principais plataformas de sequenciamento incluem: Ion Torrent PGM, Pacific Biosciences e Illumina MiSeq.

Diferentemente do sequenciamento tipo Sanger, NGS não requer uma etapa de clonagem. Na verdade, o DNA a ser sequenciado é usado na construção de uma biblioteca de fragmentos cujas extremidades estão covalentemente acopladas à DNAs sintéticos, ou seja, adaptadores por ação de uma enzima ligase. Cada plataforma possui uma sequência universal de adaptadores específicos que permitem a amplificação dos

fragmentos em etapas específicas do processo. O NGS dispensa o uso de microplacas, permitindo que o sequenciamento e a detecção ocorram simultaneamente ao invés de em processos distintos (MARDIS, 2013).

Outra diferença marcante entre ambas as tecnologias se refere ao tamanho (em pares de bases – pb) dos *reads* gerados, que são maiores no sequenciamento Sanger. Mesmo assim, grande volume de dados gerados em um curto intervalo de tempo e a um custo razoável, tem estimulado o emprego desta tecnologia em grandes estudos, como por exemplo o Projeto do Microbioma Humano. Neste projeto utilizou-se NGS para caracterizar a diversidade de bactérias e vírus que habitam as mais diversas áreas do corpo humano em milhares de indivíduos saudáveis (ABUBUCKER et al., 2012; GEVERS et al., 2012; HUM. MICROBIOME PROJ. CONSORT., 2012). Estudos como este tem permitido definir qual o tipo de microbioma prevalece em um corpo saudável de forma a relacionar alterações na estrutura da comunidade microbiana com quadros de doença.

2.4.1 NGS aplicado ao estudo da ecologia microbiana durante a ensilagem

Embora NGS já tenha sido usado para caracterizar a ecologia microbiana do solo (KESHRI et al., 2013), da rizosfera (BULGARELLI et al., 2012) e do rúmen bovino (HESS et al., 2011), apenas recentemente esta tecnologia foi utilizada para caracterizar a ecologia microbiana durante a ensilagem (EIKMEYER et al., 2013). Estudos de metagenômica em silagens tem sido usados para descrever mudanças na população microbiana no decorrer do processo de ensilagem, principalmente com o intuito de comparar a população mais abundante nas plantas recém colhidas com a população dominante após o processo fermentativo. Considerando as plataformas de sequenciamento NGS disponíveis as frequentemente utilizadas para estudos de metagenômica de silagem são: Illumina Miseq, SMRT (PacBio), 454 e Ion Torrent (Tabela 1).

Alguns estudos, respaldados por sequenciamento em larga escala tem descrito o efeito de inoculantes para silagem (BAO et al., 2016; EIKMEYER et al., 2013; OGUNADE et al., 2017; ROMERO et al., 2017), enquanto outros tem acessado alterações da população bacteriana de silagens provenientes de diferentes culturas (DUNIÈRE et al., 2017; MOGODINIYAI-KASMAEI et al., 2016; NI et al., 2017a, b)

ou inclusive a variação das comunidades microbianas em função de diferentes áreas do silo, como por exemplo, extremidades e centros de silos tipo trincheira em fazendas comerciais (KRAUT-COHEN et al., 2016).

Tabela 1 - Estudos de metagenômica em silagens usando NGS

(continua)

Plataforma de sequenciamento	Nº de reads*	Preparação da amostra para extração de DNA	Extração de DNA	Região alvo do DNA ribossômico	Tipo de silagem	Referência
<i>Single-Molecule Real-Time</i> (SMRT) PacBio	8,399	-	OMEGA DNA Isolation Kit (Omega)	16S rRNA	Alfalfa	Bao et al. (2016)
Illumina Miseq	704,764****	Maceração com N ₂	Protocolo laboratorial	V4 do 16S rRNA	Grão úmido de milho	Carvalho (2014)
Illumina Miseq	526,210 (bactéria) 70,219 (fungo) **	-	Protocolo laboratorial	V3-V4 do 16S rRNA e V4 e V5 do SSU rDNA de fungo	Aveia, cevada e tritcale	Dunier et al. (2017)
454 Pirosequenciamento	30,000	Lavagens com NaCl e centrifugações seriadas	Easy DNA Kit (Invitrogen)	V3 e V4 do 16S rRNA	Capim	Eikmeyer et al. (2013)
Illumina Miseq	5,740	-	Protocolo laboratorial com CTAB	V4 do 16S rRNA	Capim, trevo vermelho e milho	Mogodiniyai-Kasmaei et al. (2016)
Illumina Miseq	2,431,567 (bactéria) 770,513 (fungo)	Lavagem com H ₂ O destilada estéril + incubação em shaker por 2h	Powersoil DNA Isolation Kit (Mo Bio)	V3 e V4 do 16S rRNA e ITS	Milho	Keshri et al. (2018)
Ion Torrent (PGM) 318	19,396	Maceração com N ₂ ; bead beating (fastprep FP120)	Geneall Exgene Soil DNA Isolation Kit (Geneall Biotechnology)	V4 do 16S rRNA	Milho, sorgo e trigo	Kraut-Cohen et al. (2016)
Illumina Miseq	76,000	PBS Tris EDTA e lisozima	Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)	V3-V4 do 16S rRNA	Alfafa, milho e azevém italiano	Ni et al. (2017a)

(conclusão)

Plataforma de sequenciamento	N° de reads*	Preparação da amostra para extração de DNA	Extração de DNA	Região alvo do DNA ribossômico	Tipo de silagem	Referência
Illumina Miseq	60,438	-	Centrifugações com NaCl 0,85%	V3-V4 do 16S rRNA	Soja	Ni et al. (2017b)
Illumina Miseq	62,504 ± 2,642	PBS + Tween-80 0.01% e sonicação	Powerlyzer Powersoil DNA Isolation Kit (Mo Bio)	V3-V4 do 16S rRNA	Milho	Ogunade et al. (2017)
Illumina Miseq	85,136 ± 4,522	PBS + Tween-80 0.01% e sonicação	Powerlyzer Powersoil DNA Isolation Kit (Mo Bio)	V3-V4 do 16S rRNA	Alfalfa	Ogunade et al. (2018)
Illumina Miseq	***	Tampão de fosfato de potássio 10mm + Tween-20 0.05% e sonicação	Powerlyzer Powersoil DNA isolation kit (Mo Bio)	V4 do 16S rRNA e ITS1	Aveia	Romero et al. (2017)

Aparentemente a estrutura da comunidade microbiana capaz de proliferar durante a ensilagem é fortemente influenciada pelo tipo de forragem utilizada (DUNIÈRE et al., 2017; MOGODINIYAI-KASMAEI et al., 2016), uma vez que as características do ambiente levam a seleção de um grupo mais propenso a se desenvolver neste nicho. Entretanto, na maior parte das vezes as espécies encontradas nos estudos são geralmente as usualmente relatadas.

Normalmente, observa-se a predominância de indivíduos pertencentes ao gênero *Lactobacillus* no decorrer do processo de ensilagem, principalmente no caso da ensilagem de grãos. Ni et al. (2017a) relatou que anteriormente à ensilagem, *Operational Taxonomic Units* (OTUs) pertencentes à família Lactobacillaceae associadas às silagens de azevém italiano e milho representou 1 a 2% da população bacteriana, entretanto, após a ensilagem perfizeram de 15 a 25% e até 70% da população bacteriana, respectivamente.

Contrariamente, a população bacteriana durante a ensilagem de aveia foi dominada por Leuconostocaceae (83 %) antes da ensilagem, com a abundância relativa dessa família correspondendo a 95,8 % da população bacteriana na silagem após 217 dias de fermentação (ROMERO et al., 2017). Finalmente, estudos de Dunière et al. (2017) relataram que aos 0 dias de estocagem, BAL corresponderam a 2% do core bacteriano de silagens de aveia, cevada e triticales, alcançando uma abundância relativa de 83 % do microbioma core nessas silagens após 90 dias de fermentação. A dominância de BAL no final da ensilagem corrobora pesquisas anteriores, que não utilizaram NGS para acessar a comunidade microbiana associadas à silagem, como por exemplo estudos de McEniry et al. (2008, 2010) com T-RFLP e de Parvin e Nishino (2009) com DGGE.

O gênero *Enterococcus* predominou sobre as demais populações bacterianas associadas à silagem de alfafa representando quase 50 % da população bacteriana na silagem ao final do período de estocagem (NI et al., 2017b). No entanto, em estudo de McGarvey et al. (2013), membros da família Lactobacillaceae representaram 72,2% da população microbiana na alfafa ensilada por 40 dias, em detrimento da família Enterococaceae. É importante ressaltar, que neste estudo, a população de microrganismos foi acessada por meio de sequenciamento de Sanger.

Geralmente, a adição de um inoculante na silagem diminui a diversidade bacteriana do material ensilado ao final do período de estocagem, como observado na silagem de capim após 58 dias de ensilagem (EIKMEYER et al., 2013), silagem de milho após 120 dias de ensilagem (OGUNADE et al., 2017), alfafa após 35 dias de ensilagem (BAO et

al., 2016) e aveia após 217 dias de ensilagem (ROMERO et al., 2017). É importante salientar que quando se aplicou um inoculante misto contendo *Pediococcus acidilactici*, a abundância relativa desta espécie foi a mais alta (74 a 86%) nas silagens terminais (BAO et al., 2016). Em contrapartida, a aplicação de *Pediococcus pentosaceus* à silagem de aveia não fez com que esta espécie fosse predominante na silagem terminal (ROMERO et al., 2017).

Assim, fica evidente a importância do estudo da ecologia microbiana durante a ensilagem, e inclusive vislumbrar as possibilidades do uso da meta-transcriptômica para caracterizar o processo de ensilagem, esclarecendo por exemplo, a expressão de genes codificadores de enzimas envolvidas na produção de ácidos e metabolismo, na proteólise, ou na produção de micotoxinas durante a deterioração aeróbia da silagem (McALLISTER et al., 2018).

2.5 Medidas de diversidade biológica aplicadas ao estudo de comunidades de microrganismos em silagens

As comunidades de microrganismos podem ser descritas em função de sua composição. Para descrever a composição é necessário realizar a avaliação taxonômica das espécies compondo uma comunidade biológica, produzindo uma lista de espécies. A determinação do número de espécies que coexistem dentro da comunidade é um conceito conhecido como riqueza de espécies (BEGON et al., 2006).

Para que a amostragem seja representativa e de fato permita quantificar o maior número de espécies é fundamental que o desenho amostral seja apropriado, pois o número de espécies acessadas vai depender do número de amostras que serão colhidas ou do tamanho do hábitat que está sendo explorado (PERONI; HERNÁNDEZ, 2011). Partindo desta necessidade, pesquisadores lançam mão de ferramentas que o auxiliem nas tomadas de decisões, como é o caso da análise das curvas de acumulação de espécies. Com o auxílio desta ferramenta o pesquisador pode observar se o número de coletas realizadas foi suficiente para obter um número de espécies próximo ao que existe realmente no ambiente estudado. Nesse caso, a suficiência amostral é atingida quando o número de espécies alcança um valor constante, formando um platô na curva de acumulação (PERONI; HERNÁNDEZ, 2011).

A riqueza de espécies não é por si só, suficiente para descrever uma comunidade

biológica por não levar em consideração a abundância de indivíduos, considerando apenas o número de espécies. Ignorar a abundância de indivíduos significa também ignorar o fato de que existem espécies raras e outras mais abundantes, e, portanto, deve-se considerar a abundância relativa ao invés da abundância total. Dessa forma, além da riqueza, análises complementares incluem diagramas de abundância relativa de cada uma das espécies, constituindo uma ferramenta útil para comparar comunidades (PERONI; HERNÁNDEZ, 2011).

Os índices de diversidade se baseiam na estrutura da comunidade, ou seja, na distribuição de abundância das espécies para descrever comunidades. Os mais utilizados incluem o índice de Simpson e o índice de Shannon-Wiener. Este índice considera os conceitos de riqueza e equitabilidade para determinar se uma comunidade é mais diversa que a outra. Isso porque comunidades com o mesmo número de espécies podem ter distribuições de abundância distintas, sendo uma mais equitativa que a outra, e, comunidades com uma equitabilidade maior são mais diversas.

Além disso, os índices de diversidade podem ser classificados em diferentes níveis de acordo com a escala utilizada (PERONI; HERNÁNDEZ, 2011): a diversidade alfa (α), ou local, é aquela que se refere à diversidade local de uma comunidade; a diversidade beta (β) ou diversidade diferencial, é uma medida da diferença (ou da semelhança) entre comunidades de habitats diferentes, em termos da variação de espécies encontradas neles, isto é, mede o quanto a composição de espécies varia de um lugar para outro. Quanto menos espécies as diferentes comunidades compartilham, mais alta é a diversidade β ; e a diversidade gamma (γ) ou regional, diz respeito à diversidade regional, incluindo a riqueza de espécies do conjunto de comunidades que integram uma paisagem, correspondendo à diversidade de uma grande área, bioma, continente, ilha, entre outros. Assim, para medir a similaridade entre comunidades são utilizadas medidas de similaridade, que analisam a β -diversidade.

Em todos os casos os índices devem ser testados estatisticamente para assegurar uma informação mais refinada sobre suas diferenças. Obtendo-se medidas de diversidade para diversas amostras em cada comunidade, pode-se utilizar métodos paramétricos ou não-paramétricos para validar estatisticamente as diferenças. A maior parte dos estudos de comunidades em silagens desenvolvem uma rota de tratamento das amostras e apresentação dos resultados de maneira semelhante incluindo: curvas de rarefação das OTUs, índice de riqueza de CHAO1, índices de diversidade de Simpson e Shannon-Wiener, e classificação taxonômica para α -diversidade; as métricas de β –

diversidade por sua vez incluem geralmente análises de coordenadas principais PCoA baseada na distância Unifrac (Monte Carlo) ou Bray-Curtis. Atualmente estão disponíveis uma enorme gama de plataformas e programas para a análise dos dados e obtenção dos gráficos de resultados como: Qiime, Pynast, Primer, R, Mothur, Origin, Past, entre outros.

Ogunade et al. (2018) visaram determinar alterações na composição da comunidade bacteriana durante a ensilagem de alfafa por meio de NGS. Após 100 dias de estocagem os filos mais predominantes foram Firmicutes ($74,1 \pm 4,86\%$), com destaque para as famílias Lactobacillaceae e Leuconostocaceae, e gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, e *Weissella*; e Proteobacteria ($20,4 \pm 3,80\%$), com destaque para as famílias Enterobacteriaceae, Xanthomonadaceae, Sphingomonadaceae, e Aurantimonadaceae, e para os gêneros *Sphingomonas*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, e *Stenotrophomonas*.

Comparado com o controle, adicionar *E. coli* sozinha na ensilagem não afetou a diversidade nem a composição da comunidade bacteriana, entretanto, a adição de *E. coli* + *L. plantarum* e *E. coli* + *L. buchneri* reduziram a diversidade (Shannon 3,21 vs. 2,63 e 2,80 respectivamente). A riqueza (índice de Chao1) não foi afetada ($P > 0,10$) pelos tratamentos. Para comparação dos tratamentos realizaram o teste não paramétrico de Monte Carlo revelando que a variação entre tratamentos foi maior ($P < 0,01$) que a variação dentro dos tratamentos. Os dados de α -diversidade e de β -diversidade foram obtidos com o uso do QIIME.

Ogunade et al. (2017) realizaram o mesmo procedimento descrito acima para analisar as sequências provenientes do sequenciamento com Illumina, entretanto, neste trabalho visaram determinar se a adição de ácido propiônico ou aditivo microbiano inibiria o crescimento de *E. coli* durante a ensilagem, no pós abertura e após exposição aeróbia. A comunidade bacteriana só foi acessada aos 120 dias de estocagem. De forma similar, a riqueza (índice de Chao1) não foi afetada ($P > 0,10$) pelos tratamentos. A análise das PCoAs destacou diferenças na composição das silagens comparadas sendo que a variação entre tratamentos foi maior ($P < 0,01$) que a variação dentro dos tratamentos. E ao serem comparadas com as silagens controle, silagens adicionadas do aditivo microbiano *Lactobacillus buchneri* resultaram em menor ($P < 0,05$) diversidade.

Romero et al. (2018) avaliaram alterações nas comunidades de bactérias e fungos em função do tratamento ou não com aditivos (*Lactobacillus buchneri* e *Pediococcus pentosaceus*) em 4 híbridos de milho (sendo dois deles mutantes *brown mid-rib*) em condições sub ótimas (menor teor de umidade que o recomendado com MS maior que

38%). Fizeram a mesma sequência de tratamento dos dados que os autores anteriores, entretanto, para o cálculo da β -diversidade no QIIME utilizaram UniFrac para 16S rRNA e Bray-Curtis para ITS1 (LOZUPONE; KNIGHT, 2005).

Ni et al. (2017a) compararam a microbiota de silagens de alfafa, milho e azevém italiano utilizando Illumina Miseq e DGGE. Os perfis de banda do gel de DGGE foram convertidos em uma matriz binária de presença/ausência de banda usando um sistema de análise de imagem (ImageJ; NIH, Bethesda, MD, USA). Também foi gerado uma PCoA baseada em uma matriz de similaridade de Bray-Curtis. Para os dados provenientes do NGS calculou-se o índice de diversidade de Shannon e PCoA. O software utilizado foi o Primer 7 Permanova+ (Primer-E, Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, UK). Os autores relataram que a curva de rarefação não atingiu um platô, mesmo com 50.000 *reads* para todas as amostras, indicando que o número de *reads* alcançado não foi suficiente para identificar as OTUs.

Ni et al. (2017b) utilizaram Mothur (v.1.34.4) para descartar sequências menores que 200 pb e eliminaram quimeras com apoio do software USEARCH 8.0 (EDGAR, 2010). Similar ao seu trabalho anterior as sequências foram agrupadas em OTUs usando QIIME (v1.8.0). A tabela de OTUs foi utilizada para o cálculo da curva de rarefação com o apoio do software R (v.22) e também para o cálculo da α -diversidade (Chao1 e Shannon) com apoio do Mothur (v1.34.4).

Trabalhando com silagens de aveia Romero et al. (2017) utilizaram QIIME para estabelecer as OTUs usando UCLUST, com 97% de similaridade. Utilizaram a distância UniFrac para determinar a β -diversidade dentro dos tratamentos inoculados e não inoculados. As OTUs foram classificadas taxonomicamente utilizando um procedimento descrito por Bokulich et al. (2012). Para detectar diferenças significativas na β -diversidade entre os tratamentos aplicaram ANOVA. As PCoAs de Jackknifed foram calculadas a partir dessas estimativas. A α -diversidade também foi estimada a partir de tabelas de OTUs rarefeitas com o intuito de avaliar a cobertura da profundidade de amostragem (CAPORASO et al., 2011; COLE et al., 2007, 2009; LOZUPONE; KNIGHT, 2005).

Eikmeyer et al. (2013) acessaram a comunidade bacteriana de silagem de capim inoculada ou não com *L. buchneri* e estocada por 14 e 58 dias. Realizaram o agrupamento das OTUs usando o software ESPRIT (SUN et al., 2009) e os índices de diversidade de Simpson (MAGURRAN, 2010) foram calculados usando o pacote de software estatístico R (v 2.9.10-R Development Core Team, 2010) e o pacote R vegan

(DIXON, 2003). Os autores relataram que o índice de diversidade de Simpson foi maior para a silagem não inoculada após 58 dias de fermentação. Finalmente, as *reads* foram taxonomicamente classificadas por meio do RDP (WANG et al., 2007). Geralmente a adição de um inoculante microbiano diminui a diversidade bacteriana nas silagens terminais (BAO et al., 2016; DUNIÈRE et al., 2017; NI et al., 2017; ROMERO et al., 2017), como observado pelos autores nas silagens submetidas a 58 dias de estocagem.

Aos 14 dias a silagem inoculada e não inoculada apresentaram uma abundância relativa dos grupos bacterianos muito similares com *Lactobacillus* e *Lactococcus* sendo os gêneros dominantes. A diferença maior foi observada ao se comparar as silagens após 58 dias de ensilagem. Neste caso, além de haver uma alteração da estrutura da comunidade de ambas as silagens (inoculada ou controle) em função do domínio de *Lactobacillus* em relação a *Lactococcus*, isso foi muito mais evidente na silagem inoculada (EIKMEYER et al., 2013).

Mogodiniyai-Kasmaei et al. (2016) e Kraut-Cohen et al. (2016) utilizaram o software PAST (HAMMER et al., 2001) para a análise de β -diversidade, sendo que no primeiro trabalho apresentaram na forma de análise de componentes principais (PCA) e no segundo trabalho utilizaram a matriz de OTUs e aplicaram a distância UniFrac para determinação da β -diversidade, usando NMDS no PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past/index.html>). Os autores analisaram a microbiota de silagem provenientes de um silo trincheira em escala agrícola e descobriram que, embora a silagem bem preservada apresentasse baixa diversidade taxonômica, a silagem estragada apresentava uma microbiota altamente diversificada, com baixa abundância de BAL e altos níveis de representantes da família Enterobacteriaceae.

3 OBJETIVOS E HIPÓTESE

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da reconstituição da umidade do grão de milho na modulação da comunidade bacteriana durante a ensilagem por meio de sequenciamento massivo do gene 16S rRNA, correlacionando os parâmetros físicos % MS e pH com os dados de α e β -diversidade visando o melhor entendimento do processo.

3.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do local de cultivo, tipo de híbrido ensilado e maturidade fisiológica da planta sobre a comunidade bacteriana na ensilagem de grãos úmidos de milho;
- Determinar a modulação das comunidades bacterianas com base no sequenciamento da região V6 do gene 16S rRNA por meio da análise de coordenadas principais e classificação taxonômica das OTUs atribuídas no estudo;

3.2 Hipóteses

- As comunidades bacterianas das silagens de grão úmido de milho diferem das comunidades provenientes de grão seco restituído
- As comunidades bacterianas das silagens não são afetadas pelo local de colheita
- As comunidades bacterianas são moduladas pelo tipo de híbrido de milho ensilado

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedimento experimental

As amostras de milho usadas neste experimento foram provenientes das Estações Experimentais de Mococa (21 ° 28'04" S - 47 ° 00 '17 "W) e Tatuí (23 ° 21'24 "S - 47 ° 51 '27' "W), pertencentes à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), no estado de São Paulo. A APTA tem parceria com a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP e com o IAC (Instituto Agrônômico de Campinas), sendo que anualmente realiza-se uma avaliação de cultivares de milho para produção de silagem.

A região de Tatuí possui clima mesotérmico úmido (Cwa) e Mococa possui clima tropical chuvoso (Aw) segundo a classificação de Koeppen, sendo que ambos municípios possuem altitude média de 620 metros. Cwa é caracterizado como clima tropical de altitude, com chuvas no verão e seca no inverno, com a temperatura média do mês mais quente superior a 22°C. Enquanto Aw se caracteriza como um clima tropical chuvoso com inverno seco e mês mais frio com temperatura média superior a 18°C, sendo que o mês mais seco tem precipitação inferior a 60mm

Os tratamentos foram constituídos por híbridos de milho IAC-8390 (grão duro - "flint"), que neste trabalho será representado pela sigla HA e AG-1051 (grão macio - "dent"), representado pela sigla HB. O experimento foi realizado em um delineamento em blocos ao acaso com esquema fatorial 2×2×2×2: dois locais, dois genótipos (híbridos), dois pontos de maturação (milho úmido e milho seco reconstituído) e dois períodos de armazenamento (0 e 120 dias), com 4 repetições (parcelas no campo), como descrito na Tabela 2. A parcela experimental foi constituída por quatro linhas de 10 m espaçadas de 80 cm entre linhas.

Tabela 2 – Descrição dos tratamentos e amostras

¹ Tratamento	² Híbrido	³ Estágio de Maturidade	⁴ Período de Estocagem	⁵ Local de Cultivo
HAGU0d T	HA	GU	0 dias	Tatuí
HBGU0d T	HB	GU	0 dias	Tatuí
HAGU120d T	HA	GU	120 dias	Tatuí
HBGU120d T	HB	GU	120 dias	Tatuí
HAGSR0d T	HA	GSR	0 dias	Tatuí
HBGSR0d T	HB	GSR	0 dias	Tatuí
HAGSR120d T	HA	GSR	120 dias	Tatuí
HBGSR120d T	HB	GSR	120 dias	Tatuí
HAGU0d M	HA	GU	0 dias	Mococa
HBGU0d M	HB	GU	0 dias	Mococa
HAGU120d M	HA	GU	120 dias	Mococa
HBGU120d M	HB	GU	120 dias	Mococa
HAGSR0d M	HA	GSR	0 dias	Mococa
HBGSR0d M	HB	GSR	0 dias	Mococa
HAGSR120d M	HA	GSR	120 dias	Mococa
HBGSR120d M	HB	GSR	120 dias	Mococa

Notas: ¹Tratamento; ²Híbrido (HA= IAC-8390 (grão duro -" Flint "); HB= AG-1051 (grão macio -" Dent "); ³Estágio de Maturidade (GSR= Grão seco reconstituído; GU= Grão úmido; ⁴Período de Estocagem (0 e 120 dias); ⁵Local de Cultivo (T= Tatuí; M= Mococa).

A semeadura do milho ocorreu em novembro de 2014 e, para instalação do experimento, utilizou-se uma semeadora adubadora de 4 linhas para a formação dos sulcos e demarcação das linhas da parcela. A semeadura realizou-se por meio do uso de uma matraca “bengala” tomando-se o cuidado de semear duas sementes por cova a cada 20 cm. As sementes de milho foram tratadas com o inseticida contra pragas do solo, *Cropstar* (Thiodicarb + Imidacloprid). Efetuou-se adubações de semeadura de acordo com o resultado de análise do solo e posteriormente adubações de cobertura. Adicionalmente, realizou-se o controle da lagarta-do-cartucho por meio de pulverizador costal. A população média de plantas nas parcelas experimentais de Tatuí foi de 56.230 pl/ha, enquanto que em Mococa foi de 61.387 pl/ha.

As plantas de milho de onde foram obtidas as amostras de grãos, foram colhidas em dois estágios de maturidade: ponto de silagem de grão úmido (28 a 33 % de umidade no grão) e ponto de grão seco (15 a 20 % de umidade no grão). As colheitas foram definidas de acordo com o teor de umidade do grão (Tabela 3), para sua determinação foi realizada a triagem do teor de MS a cada sete dias, por meio de um medidor de umidade portátil, sendo confirmado em estufa a 55°C. As etapas seguintes foram realizadas no campus da ESALQ-USP, em Piracicaba-SP.

Tabela 3 – Cronograma de colheita nas bases experimentais de Tatuí e Mococa

Local	¹GU	²GSR
Tatuí	17/03/2015	16/04/2015
Mococa	31/03/2015	12/05/2015

Notas: ¹Grão úmido; ²Grão seco reconstituído

Foram realizadas coletas em dois períodos (GU e GSR), uma no dia 17 de março de 2015 (verão) em Tatuí, e no dia 31 de março de 2015 (outono) em Mococa, para GU e outra no dia 16 de abril de 2015 (outono) em Tatuí e no dia 12 de maio de 2015 (outono) em Mococa, para GSR. É possível observar que nos meses que antecederam as primeiras coletas (março de 2015) houve uma maior precipitação do que nos meses que ocorreram a segunda coleta (abril e maio de 2015) (Figura 1). As temperaturas pouco variaram, porém foram ligeiramente menores no mês de maio do que nos demais meses (Figura 1).

Figura 1 – Temperatura média e precipitação mensal nas estações experimentais de Tatuí e Mococa – SP.

Os grãos resultantes da debulha manual das espigas foram moídos em picador estacionário, com peneira de 12 mm. Como silos experimentais foram utilizados *mini bags* (Figura 2) com dimensões 22×35 cm; 0,18 mm de espessura e 3 soldas, selados à vácuo para garantir a ausência de oxigênio no interior dos mini silos. Os grãos de milho colhidos no ponto de “grão úmido” (GU) foram ensilados com sua umidade original. Os grãos secos, colhidos com 15 a 20 % de umidade, foram reconstituídos (GSR) com adição de água destilada até atingir 30% de umidade. As médias dos teores de umidade dos híbridos avaliados estão apresentadas na Tabela 4.

Figura 2 – *Mini bags* utilizados como silos experimentais no estudo (A), pesagem dos *mini bags* (B).

Tabela 4 – Média dos teores de umidade (%) originais e após reconstituição de grãos de híbridos de milho em diferentes pontos de maturidade na ensilagem

	¹ Híbrido	² GU	³ GSR
Mococa	HA	26,7	23,5
	HB	27,3	24,8
Tatuí	HA	30,4	30,4
	HB	33,0	31,6

Notas: ¹Híbrido (HA= IAC-8390 (grão duro -" Flint "); HB= AG-1051 (grão macio -" Dent "); ^{2,3}Estágio de Maturidade (GSR= Grão seco reconstituído; GU= Grão úmido; Os teores de umidade dos grãos secos antes da reconstituição foram 16% (HA Mococa), 18,2% (HA Tatuí), 15,8% (HB Mococa) e 19,3% (HB Tatuí).

Confeccionou-se um *mini bag* por tempo de abertura (0 e 120 dias), para cada repetição (parcelas no campo). O critério para o enchimento dos mino silos foi o peso, aproximadamente 500 g (Figura 2 b). Os *mini bags* correspondentes ao tempo 0 foram congelados, imediatamente após o preparo, em freezer a -80°C. Os demais *mini bags* foram mantidos em temperatura ambiente até o dia correspondente às aberturas planejadas. Em cada período de abertura foram colhidas sub-amostras para: extração de DNA, determinação de pH e determinação da MS à 55°C (realizada no mesmo dia da abertura).

4.2 Determinação de pH e matéria seca (MS) das amostras frescas e das silagens

Anteriormente à ensilagem, e após os 120 dias do período de estocagem, foram realizadas sub amostragens para determinação do pH e do teor de matéria seca (MS) das amostras. Para a determinação do pH o método empregado foi o descrito por Kung Junior et al. (1984). Inicialmente obteve-se um extrato aquoso através do processamento de 25 g de amostra fresca em liquidificador com 225 mL de água deionizada, por cerca de 1 minuto. O pH foi medido em pHmetro digital. Para a determinação da matéria seca foram coletadas aproximadamente 100 g de amostra, acondicionadas em sacos de papel, pesadas e levadas para estufas de ventilação forçada a 55°C, por cerca de 72 horas.

4.3 Extração do DNA total

Para extração do DNA total da silagem, foram realizadas amostragens de

aproximadamente 1 g de silagem por repetição. As amostras foram maceradas com nitrogênio líquido em cadinhos de porcelana até apresentarem textura farinácea. Então, aproximadamente 0,3 g de amostra foram pesadas em um microtubos (2 mL), em seguida adicionou-se 500 µL de TE (10 µl de Tris 1 M pH 8,0; 2 µl EDTA 0,5 M pH 8,0); 10 µL de SDS 10% e aproximadamente 200 mg de pérolas de vidro (0,1 mm), sendo agitado em *vortex* por 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de solução fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), seguido de centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm, sendo o sobrenadante transferido para um novo microtubo. Ao sobrenadante acrescentou-se 10 µL de acetato de sódio 5 M (pH 5,2) e 400 µL de isopropanol.

Os microtubos foram invertidos algumas vezes para homogeneização da mistura e incubados à -20°C por 5 minutos. Em seguida foram submetidos a centrifugação, o sobrenadante descartado e, por último, o DNA foi precipitado com a adição de 500 µL de etanol 70 % gelado. Uma nova centrifugação foi realizada por 15 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi novamente descartado e após a evaporação completa do etanol, o DNA foi então ressuspensionado em 50 µL de água Mili-Q autoclavada.

A integridade do DNA extraído, bem como a sua quantificação, foi determinada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v), preparada em tampão TAE (Tris 400 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM), onde 5 µl do produto da extração foram aplicados em conjunto com 3 µl de um tampão de carregamento 6x [Azul de Bromofenol 0,05 % (p / v); Sacarose 40 % (p/v); EDTA 0,1 M (pH 8)]. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e visualizada em luz ultravioleta (DNr Bio-imaging Systems Minibis pro 16mm). As quantidades de DNA extraídas das amostras variaram entre 5 e 10 µg/µl de DNA.

4.4 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

A geração do fragmento a ser utilizado para o sequenciamento da região hipervariável V6 do gene 16S rRNA ocorreu em duas etapas. Primeiramente, as amostras do DNA extraído das silagens foram submetidas à amplificação utilizando os iniciadores 799F (5'-AAC MGG ATT AGA TAC CCK G-3 ') e 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG-3') (CHELIUS; TRIPLETT, 2001), que foram utilizados para evitar a amplificação do DNA cloroplastidial dos milho. As condições de amplificação foram determinadas para reações volumétricas finais de 50 µl, composta por tampão de PCR 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 0,2 µM, 0,2 µM de cada iniciador, BSA 0,4 mM, 2 U de Taq polimerase (Fermentas, São Paulo, Brasil). O ciclo de amplificação foi realizado

em um termociclador Veriti (Applied Biosystems, Waltham, EUA), programado para fazer o seguinte processo térmico: 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 53°C durante 40 segundos e 72°C durante 40 segundos; e uma extensão final a 72°C durante 7 minutos. Os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose a 1% e submetidos a eletroforese. Foram geradas duas bandas, uma de tamanho maior de aproximadamente 1090 pb, correspondente ao gene 16S rRNA mitocondrial; e um de menor tamanho de aproximadamente 735 pb correspondente ao gene 16S rRNA da comunidade bacteriana desejada. A banda menor foi excisada do gel e purificada usando o kit de purificação do DNA Genomic Wizard (Promega, EUA). Após a purificação, essas amostras foram utilizadas como molde em uma nova reação usando o conjunto de iniciadores 967F (CAA CGC GAA GAA CCT TAC C) (SOGIN et al., 2006) e 1193R (CGT CRT CCC CRC CTT CC) (WANG; QIAN, 2009), que geram fragmentos de aproximadamente 230 pb. Ao primer 967F foi adicionado “barcodes” contendo um conjunto de 5 nucleotídeos, que foram sintetizados separadamente e utilizados como marcadores para cada uma das amostras (<http://vamps.mbl.edu/>).

As condições de amplificação foram determinadas para reações volumétricas finais de 50 µl, composta por 1X PCR Buffer, 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,2 µM iniciador, 0,02 U / µL Taq Platinum DNA polimerase (Fermentas, São Paulo, Brasil) de acordo com (KAVAMURA et al, 2013). Após a amplificação, todos os fragmentos contendo os "barcodes" foram misturados em concentrações equimolares e purificados com o kit ChargeSwitch® PCR Clean-Up Kit (Invitrogen, Brasil). Posteriormente, uma PCR de emulsão foi realizada usando o Ion OneTouch 2™ com o Kit Ion Template PGM™ OT2 400 (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. As bibliotecas de fragmentos do gene 16S rRNA foram sequenciadas usando um Ion Chip 316™ Kit v2, usando o sistema Ion Torrent (Personal Genome Machine™). Todos os procedimentos para a preparação das bibliotecas, desde a PCR de emulsão até o sequenciamento (. Fastq), foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP).

4.5 Processamento das sequências

A análise do arquivo (fastq) contendo as sequências foi realizada usando a versão 1.9 do Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) (CAPORASO et al., 2010). Inicialmente, as sequências foram separadas por amostra de acordo com o

barcode inserido na PCR. Posteriormente, as sequências foram separadas dos *primers* e foram filtradas por qualidade (Qual.score = 25, tamanho dos *barcodes* = 5, amortecedor máximo = 2, uma janela de qualidade 50 e número máximo de homopolímeros = 6). Além disso, as sequências menores que 180 pb foram descartadas.

As sequências válidas foram agrupadas em OTUs com 97% de similaridade usando o método SortMeRNA (KOPYLOVA et al., 2012) e alinhadas com o método PyNAST (CAPORASO et al., 2010). A filiação taxonômica de cada sequência representativa de OTUs foi realizada em comparação com as sequências disponíveis no banco de dados Greengenes (DESANTIS et al., 2006). As sequências quiméricas foram removidas usando o método UCHIME (EDGAR et al., 2011). OTUs de baixa abundância (por exemplo, *singletons* e *doubletons*) foram removidos do conjunto de dados. Ainda assim, todas as sequências referentes à classe "Chloroplast" foram filtradas do conjunto de dados, pois estas não foram objeto de estudo. Após essas etapas, realizou-se a normalização das amostras, usando o comando Qiime "single_rarefaction", que realiza uma seleção aleatória dos dados, gerando um novo arquivo normalizado, onde todas as amostras são analisadas com o mesmo número de sequências. Ao final da análise foi gerada uma tabela "OTU_table", descrita pela Taxonomia X Amostras X OTUs.

4.6 Análises estatísticas aplicadas ao estudo da comunidade bacteriana

A compreensão das mudanças na composição da comunidade bacteriana associada à ensilagem foi obtida através do cálculo dos índices de α e β diversidade das amostras. As estimativas de α diversidade foram realizadas usando o software Qiime, onde foram medidos o número de OTUs observadas, diversidade (Shannon-H') e cobertura. Esses índices de estimativas dependem da riqueza, abundância e uniformidade da taxonomia OTUs X Amostras. Para entender a variação entre os valores obtidos, foi realizado um teste de análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$), seguido do teste de comparação de médias Skott-Knott, considerando o nível de significância em 5%.

Para o cálculo da β diversidade, as matrizes de distância foram geradas com base no algoritmo de Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957), que apoiou a análise de coordenadas principal (PCoA). Isso permitiu a observação da distribuição das comunidades bacterianas entre as amostras em uma escala bidimensional. No entanto, para testar a significância dos agrupamentos encontrados na PCoA e na distribuição bacteriana, uma PERMANOVA ($p < 0,05$) foi gerada com um teste de Monte Carlo, sob um modelo

reduzido baseado em 999 permutações e corrigido com o algoritmo de Bonferroni. Além disso, uma análise de similaridade (ANOSIM) foi utilizada para testar as semelhanças entre os padrões de agrupamento. Finalmente, realizou-se um teste de dissimilaridade (SIMPER), que visava destacar OTUs mais sensíveis à dissimilaridade entre os grupos encontrados, no nível de ordem. Esses testes foram desenvolvidos usando os programas PRIMER 6+ e STAMP (CLARKE; GORLEY, 2006, PARKS; BEIKO, 2010).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das silagens

Os parâmetros avaliados das amostras foram: teor de matéria seca (% MS), umidade (U %) e o pH da silagem. Amostras GU e GSR apresentaram teores de umidade similares ($\bar{x}$ GU = 31,8% U; $\bar{x}$ GSR = 31,0% U), devido a reconstituição dos grãos secos. As análises de comparação de médias usando o teste Skott-Knott ($p\text{-value} < 0,05$), demonstraram que as silagens HAGSR0dM = 23,5% U; HAGU0dM = 26,7% U; HBGSR0dM = 24,8% U e HBGU0dM = 27,3% U apresentaram maiores valores de MS comparativamente aos outros tratamentos. Com exceção das referidas amostras, todas as restantes estavam dentro do intervalo de umidade recomendado para silagens de grãos úmidos de milho (28 a 32% U ou 68 a 72% MS). Como esperado, os valores de pH variaram de acordo com o período de estocagem (Figura 3), sendo que as amostras 0 dias apresentaram um pH estatisticamente maior que as amostras de 120 dias (Tabela 5).

Figura 3 – pH de silagens de grãos de milho de acordo com o período de estocagem. Médias de 4 repetições.

Tabela 5 – Média dos teores de matéria seca (%), umidade (%) e pH das silagens

¹ Tratamentos	% Matéria Seca	% Umidade	pH
HAGSR0dM	76,5 ^a	23,5 ^d	6,4 ^b
HAGSR0dT	69,6 ^c	30,4 ^b	6,3 ^b
HAGSR120dM	71,1 ^c	28,9 ^b	4,2 ^d
HAGSR120dT	68,1 ^d	31,9 ^a	4,0 ^d
HAGU0dM	73,3 ^b	26,7 ^c	6,5 ^a
HAGU0dT	69,6 ^c	30,4 ^b	6,3 ^b
HAGU120dM	68,5 ^d	31,5 ^a	4,2 ^d
HAGU120dT	69,6 ^c	30,4 ^b	4,2 ^d
HBGSR0dM	75,2 ^a	24,8 ^d	6,5 ^a
HBGSR0dT	68,4 ^e	31,6 ^a	6,4 ^b
HBGSR120dM	69,3 ^c	30,7 ^b	4,1 ^d
HBGSR120dT	67,5 ^d	32,5 ^a	4,2 ^d
HBGU0dM	72,7 ^b	27,3 ^c	6,6 ^a
HBGU0dT	67,0 ^e	33,0 ^a	6,3 ^b
HBGU120dM	68,2 ^d	31,8 ^a	4,3 ^c
HBGU120dT	66,1 ^e	33,9 ^a	4,3 ^c

Notas: ¹Tratamentos: Híbridos (HA= IAC-8390 (grão duro -" Flint "); HB= AG-1051 (grão macio -" Dent "); Estágio de Maturidade (GSR= Grão seco reconstituído; GU= Grão úmido; ¹Os teores de umidade dos grãos secos antes da reconstituição foram 16% (HA Mococa). 18.2% (HA Tatuí). 15.8% (HB Mococa) e 19.3% (HB Tatuí). Médias de 4 repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

5.2 Estimativas da diversidade bacteriana

De forma geral, foi obtido um total de aproximadamente 2.000.000 *reads*, assim, após os processos de trimagem, descarte de “*singletons*”, “*doubletons*” e sequências “*Chimera*”, a biblioteca foi normalizada em 3451 sequências por amostra. A profundidade/coertura do sequenciamento foi calculada e a média geral considerando todas as amostras foi 99 % $\pm$ 0.01. A partir desses dados de qualidade do sequenciamento, foi possível observar que os índices de estimativa de α -diversidade de cada amostra, não apresentaram variância significativa considerando os tratamentos analisados, mesmo considerando o número de OTUs observadas, o índice de diversidade “Shannon - *H*” e o índice de Dominância “Simpson 1-D” (Tabela 6).

Tabela 6 – Estimativa da α diversidade (Shannon) e índice de Dominância (Simpson 1-D) das silagens analisadas no estudo

¹ Tratamentos	Número de OTUs (S)	Dominância (“1-D”)	Diversidade (“H”)
HBGSR0dM	366,33 ^a	0,83 ^a	0,53 ^a
HAGSR0dT	361,33 ^a	0,78 ^a	0,48 ^a
HBGSR0dT	340,66 ^a	0,88 ^a	0,55 ^a
HAGSR0dM	338,33 ^a	0,85 ^a	0,50 ^a
HAGU0dM	272,66 ^b	0,64 ^a	0,36 ^a
HBGU0dM	180,66 ^c	0,66 ^a	0,27 ^a
HBGSR120dT	175,00 ^c	0,89 ^a	0,47 ^a
HAGU120dM	172,66 ^c	0,75 ^a	0,37 ^a
HBGU120dT	165,00 ^c	0,66 ^a	0,29 ^a
HBGU120dM	164,66 ^c	0,85 ^a	0,44 ^a
HAGSR120dT	152,33 ^c	0,61 ^a	0,27 ^a
HAGU120dT	148,33 ^c	0,68 ^a	0,30 ^a
HBGU0dT	78,33 ^d	0,39 ^b	0,15 ^b
HBGSR120dM	69,00 ^d	0,16 ^b	0,34 ^b
HAGU0dT	59,00 ^d	0,66 ^a	0,11 ^a
HAGSR120dM	37,00 ^d	0,11 ^b	0,73 ^c

Notas: ¹Tratamentos: Híbrido (HA= IAC-8390 (grão duro -" Flint "); HB= AG-1051 (grão macio -" Dent "). Estágio de Maturidade (GS= Grão seco; GSR= Grão seco reconstituído; GU= Grão úmido. Período de Estocagem (0 e 120 dias). Local de Cultivo (T= Tatuí; M= Mococa). Média de 4 repetições. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade

5.3 Estrutura da comunidade bacteriana das silagens

De forma exploratória e holística, nas análises de coordenadas principais baseadas no algoritmo de Bray-curtis (PCoAs) foi possível observar três pontos importantes relativos a estrutura da comunidade bacteriana associada: i) não houve dissimilaridade considerando os híbridos de origem dos grãos utilizados na silagem (Figura 4 a); ii) apesar de ser observado separação entre as amostras considerando os fatores local de cultivo das plantas de milho e o estágio de maturação do milho coletado, existe uma alta sobreposição na estrutura da comunidade bacteriana (Figura 4 b e 4 c), de certa forma esta separação pode estar relacionada a interação de fatores ambientais; iii) foi observado efeito do período de estocagem do grão na dissimilaridade da comunidade bacteriana (Figura 4 d).

Figura 4 – Análise de coordenadas principais (PCoA) da estrutura da comunidade bacteriana em silagens de grão de milho confeccionadas com diferentes híbridos (A), nas bases experimentais de Tatuí e Mococa (B), em tempos de maturidade da planta distintos (C), durante zero ou 120 dias de fermentação (D). Os valores nos eixos indicam a porcentagem de variância explicada pela soma dos dois principais eixos.

As afirmações observadas nas PCoAs corroboram os resultados observados na análise de Permanova. Nesta última análise foi possível observar resultados significativos sobre o período de estocagem ($F = 36,16$; $p\text{-value} = 0,001$); estágio de maturação do grão ($F = 13,30$; $p\text{-value} = 0,001$) e local de cultivo do milho ($F = 7,87$; $p\text{-value} = 0,001$). Também foi observado que a interação entre estágio de maturação, período de estocagem e local de cultivo do milho foi estatisticamente significativa influenciando a dissimilaridade das amostras ($F = 5,86$; $p\text{-value} = 0,001$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Influência dos tratamentos na distribuição e ocorrência de OTUs nas amostras

Fonte	Permanova			
	df	Teste F	Permutações	p-valor
Híbrido (Hi)	1	1,7614	999	0,091
Estágio de Maturação (Es)	1	1,3304	999	0,001
Local (Lo)	1	7,8792	997	0,001
Período de Estocagem (Pe)	1	36,16	999	0,001
<i>HixEs</i>	1	1,5849	999	0,115
<i>HixLo</i>	1	1,8497	999	0,055
<i>HixPe</i>	1	1,8249	998	0,064
<i>EsxLo</i>	1	9,7122	999	0,001
<i>EsxPe</i>	1	10,809	999	0,001
<i>LoxPe</i>	1	8,556	999	0,001
<i>HixEsxLo</i>	1	1,886	999	0,05
<i>HixEsxPe</i>	1	1,3759	997	0,19
<i>HixLoxPe</i>	1	1,4506	999	0,145
<i>EsxLoxPe</i>	1	5,8635	998	0,001
<i>HixEsxLoxPe</i>	1	1,1763	998	0,279

Notas: Híbrido (HA= IAC-8390 (grão duro -" Flint "); HB= AG-1051 (grão macio -" Dent "). Estágio de Maturação (GSR= Grão seco reconstituído; GU= Grão úmido. Período de Estocagem (0 e 120 dias). Local de Cultivo (T= Tatuí; M= Mococa).

Ainda avaliando a distribuição da comunidade bacteriana, foi possível observar por meio do teste de ANOSIM que especificamente as amostras de GSR e GU considerando o mesmo tempo (0 dias), híbrido (HA) e local (M) apresentam estrutura de comunidade distintas ($R = 0,75$; $p\text{-value} = 0,001$). Por outro lado, as amostras de GSR e GU considerando o mesmo tempo (120 dias), ambos os híbrido (HA e HB) e local (Local 1 e 2) apresentaram elevada sobreposição de grupos ($R = 0,33$; $p\text{-value} = 0,002$).

5.4 Composição da comunidade bacteriana

De forma geral a profundidade taxonômica dos grupos bacterianos associados a silagem foi caracterizada pela ocorrência de 18 filos bacterianos, sendo que os mais abundantes foram Proteobacteria (41,8 %), Firmicutes (41,6 %) e Actinobacteria (13,2 %). Esses filos foram divididos em cinco classes: Gammaproteobacteria (37 %), Bacilli (40 %), Actinobacteria (13 %), Betaproteobacteria (3 %), e Alphaproteobacteria (2 %), representando uma abundância média superior a 2%. A nível de classe as mais

abundantes foram: Gammaproteobacteria (37 %), Bacilli (40 %), Actinobacteria (13 %), Betaproteobacteria (3 %) e Alphaproteobacteria (2 %). Aumentando a cobertura do sequenciamento foi possível observar a ocorrência de cinco ordens (Figura 5): Lactobacillales (39,5 %), Enterobacteriales (31,2 %), Actinomycetales (13,1 %), Burkholderiales (2,9 %) e Xanthomonadales (1,7 %).

Figura 5 – Classificação taxonômica das OTUs de acordo com a abundância relativa das ordens de bactérias em silagens de grão de milho. Híbrido (HA= IAC-8390 (grão duro -" Flint "); HB= AG-1051 (grão macio -" Dent "). Estágio de Maturidade (GSR= Grão seco reconstituído; GU= Grão úmido. Período de Estocagem (0 e 120 dias). Local de Cultivo (T= Tatuí; M= Mococa).

Foi possível observar uma sucessão de grupos bacterianos, principalmente relacionado ao período de ensilagem com Lactobacillales dominando as silagens aos 120 dias (75 %). Amostras de GSR apresentaram elevada abundância relativa de Actinomycetales (24,0 %) e menor de Enterobacteriales (18,3 %), enquanto que as amostras GU apresentaram elevada abundância relativa de Enterobacteriales (44,2 %) e baixa de Actinomycetales (2,2 %) principalmente aos zero dias, independentemente do híbrido de origem e do local de cultivo do milho.

5.5 Principais grupos bacterianos influenciando as variações na estrutura da comunidade bacteriana

Os resultados observados no teste de “post-hoc” usando o teste de Tukey, com nível de significância de 95% corrigido com Bonferroni, para comparação de médias demonstrou de forma geral e congruentemente aos resultados anteriormente apresentados, que as ordens Lactobacillales e Enterobacteriales foram os grupos que apresentaram elevada variação quando considerado o período de estocagem do grão, aproximadamente 70 % e 45 % de variação da abundância desses grupos respectivamente (Figura 6).

Figura 6 – Abundância média de sequências das OTUs mais responsivas a dissimilaridade observada entre os períodos de estocagem do milho. Os grupos que apresentaram baixa média de abundância relativa (< 5%) em proporção não foram mencionados no texto. Dados obtidos por meio do teste Post-Hoc com nível de significância 95% corrigido com Bonferroni.

Apenas os tratamentos período de estocagem e estágio de maturação do grão apresentaram grupos bacterianos com variação estatisticamente significativa com nível de significância 95% corrigido com Bonferroni.

Relativo ao estágio de maturação do grão pode-se observar que congruentemente com as afirmações acima mencionadas, Enterobacterales e Actinomycetales foram os grupos que apresentaram variação significativa na abundância relativa considerando a estrutura e composição da comunidade bacteriana. Especificamente, Enterobacterales apresentou variação de aproximadamente 25% na abundância relativa considerando o grão úmido (GU) e grão seco reconstituído (GSR) (Figura 7). De mesma forma,

Actinomycetales apresentou variação de aproximadamente 21% na abundância relativa considerando o grão seco reconstituído (GSR) e grão úmido (GU) (Figura 7).

Figura 7 – Abundância média de sequências das OTUs mais responsivas a dissimilaridade observada entre os estágios de maturidade do milho. Os grupos que apresentaram baixa média de abundância relativa (< 5%) em proporção não foram mencionados no texto. Os dados foram obtidos por meio de Teste Post-Hoc com nível de significância 95% corrigido com Bonferroni.

5.6 Relação entre os principais grupos bacterianos e as características da silagem

Buscando indicar as relações existentes entre as características das silagens GU e GSR e a abundância relativa dos principais grupos (Lactobacillales, Enterobacteriales, Actinomycetales e Burkholderiales) inicialmente usamos o teste de comparação de médias (Tukey; p -value < 0,05), para demonstrar as variações em relação aos tratamentos e posteriormente um teste de correlação direta de Pearson. Assim, foi possível observar que a abundância relativa de bactérias pertencentes a ordem Lactobacillales foi estatisticamente maior nas silagens após 120 dias de estocagem, para ambos os híbridos, períodos de maturidade e local de coleta do milho (figura 8 a), sendo possível observar que as amostras

coletadas previamente à estocagem do material, apresentaram abundância baixa e similar de Lactobacillales. A abundância relativa da ordem Enterobacteriales, foi significativamente maior nas amostras de GU antes da estocagem do material (0 dias). Comparativamente não houveram diferenças significativas entre as demais amostras de GSR 0 dias e GSR/GU 120 dias (figura 8 b). Em relação a ordem Actinomycetales, foi observado maior abundância nos tratamentos com GSR antes do período de estocagem (0 dias) (figura 8 c). Finalmente para a ordem Burkholderiales não foi observada diferenças estatísticas entre os tratamentos das silagens (figura 8 d).

Figura 8 – Abundância média de sequências dos grupos bacterianos mais responsivos a dissimilaridade entre o período de estocagem (0 e 120 d) e estágios de maturidade do milho (GU e GSR) obtida por meio do teste de Post HocHSD. Os grupos que apresentaram baixa média de abundância relativa (< 5%) em proporção não foram mencionados no texto. Letras distintas significam que as médias apresentam diferença estatística $p\text{-value} \leq 0,05$, corrigido com Bonferroni. A – Comparação das médias da abundância relativa de ordem Lactobacillales. B – Comparação das médias da abundância relativa de ordem Enterobacteriales. C – Comparação das médias da abundância relativa de ordem Actinomycetales. D – Comparação das médias da abundância relativa de ordem Burkholderiales.

Foi possível observar que essas variações na abundância relativa dos grupos bacterianos apresentam correlação direta com as características de estabilidade das silagens, baseado no coeficiente de Pearson ($p\text{-value} < 0,05$) (Tabela 8). Primeiramente foi possível observar correlação positiva da ordem Lactobacillales com a U % ($R^2 = 0,39$; p -

value < 0,001) e negativa com % MS ($R^2 = -0,42$; *p-value* < 0,001) e pH da silagem ($R^2 = -0,85$; *p-value* < 0,001). Houve correlação baixa da distribuição da ordem Enterobacterales com pH ($R^2 = 0,58$; *p-value* < 0,001). Existe uma relação inversa entre % U ($R^2 = -0,28$; *p-value* < 0,001) e bactérias da ordem Actinomycetales e positiva com o pH ($R^2 = 0,46$; *p-value* < 0,001). A abundância da ordem Burkholderiales apresenta relação positiva com % MS ($R^2 = 0,44$; *p-value* < 0,001) e pH ($R^2 = 0,37$; *p-value* < 0,001) e negativa com % U ($R^2 = -0,47$; *p-value* < 0,001), ainda assim vale ressaltar que a abundância deste grupo é baixa (aproximadamente 4 %).

Tabela 8 – Correlação de Pearson entre as características da silagem e os principais grupos bacterianos associados mais responsivos a variações de período de estocagem e estágio de maturação do grão

Correlação de Pearson	Matéria Seca (%)	Umidade (%)	pH
Lactobacillales	-0,42***	0,40***	-0,85***
Enterobacterales	0,04 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	0,58***
Actinomycetales	0,31***	-0,28***	0,46***
Burkholderiales	0,44***	-0,41***	0,37***

Notas: Os três asteriscos sobrescrito aos valores de R², demonstram que a correlação é positiva *p-value* < 0,001.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi utilizada a técnica de NGS para acessar a população bacteriana em silagens de grãos úmidos de milho visando o melhor entendimento da modulação dessas populações mediante a reconstituição da umidade do grão. O uso de NGS vem superando outros métodos independentes de cultivo, como: DGGE (LI et al., 2011; NAOKI; YUJI, 2008; PARVIN; NISHINO, 2009, 2010; PARVIN et al., 2010), qPCR (DUNIÈRE et al., 2015; LYNCH et al., 2012; KLOCKE et al., 2006; SCHMIDT et al., 2008; STEVENSON et al., 2006), LH-PCR (BRUSETTI et al., 2006, 2008), T-RFLP (McENIRY et al., 2008, 2010), e ARISA (BRUSETTI et al., 2008), sendo capaz de determinar com uma maior abrangência as comunidades de microrganismos que compõe as silagens, possibilitando inclusive a identificação de espécies nunca antes reportadas em silagens.

O uso de sequenciamento massivo para análises da microbiota de silagens é ainda uma abordagem recente, entretanto, já foram relatados estudos de metagenômica em silagens de: milho, sorgo, alfafa, azevém, soja, capim, trevo vermelho e cereais (aveia, cevada, trigo e triticale). Entretanto, ainda há poucos estudos apresentando a estrutura e composição da comunidade bacteriana de silagens de GSR de milho por meio de sequenciamento massivo do gene 16S rRNA através da plataforma Ion-Torrent, confirmando a importância e o ineditismo deste trabalho. Vale ressaltar que a identificação dos principais grupos bacterianos e a compreensão dos processos e interações biológicas associados à produção de silagem de alta qualidade são essenciais para projetar ensilagem mais eficiente, a fim de facilitar a produção de rações mais nutritivas e estáveis para os ruminantes (KESHRI et al., 2018).

Com uma profundidade de sequenciamento de $99 \% \pm 0.01$ e com uma biblioteca normalizada em 3451 sequências por amostra, foi observada a redução significativa ($P < 0,05$) no número de OTUs ao se comparar tratamentos das silagens GSR aos 0 dias com as silagens GSR terminais (após 120 dias de estocagem) em ambos os híbridos e locais de cultivo do milho, indicando a ocorrência de um intenso processo de seleção no decorrer da ensilagem. Estudos recentes têm relatado resultados semelhantes aos observados no presente trabalho, em que se observa um elevado número de OTUs no material vegetal antes da ensilagem comparativamente com a silagem após o período de estocagem, evidenciando uma diminuição do número de grupos bacterianos nas silagens terminais

(KESHRI et al., 2018; NI et al., 2017a).

Ni et al. (2017a) compararam a comunidade bacteriana de silagens de milho, alfafa e azevém antes da ensilagem (0 dias), e após 60 dias. Em milho, o número de OTUs nas silagens terminais correspondeu a aproximadamente $\frac{1}{4}$ das OTUs detectadas nas amostras de 0 dias. De maneira similar o índice de Shannon diminuiu (3,002 aos 0 dias) após 60 dias de estocagem (0,935), embora os autores não tenham salientado se a diferença foi significativa. Outros estudos de diversidade de silagens têm relatado a ocorrência de redução nos índices de diversidade, ao se comparar comunidades bacterianas de forragens recém colhidas (0 dias) com as silagens terminais, (EIKMEYER et al., 2013, MCGARVEY et al., 2013, OGUNADE et al., 2018). No presente trabalho tal efeito não foi verificado, uma vez que a redução do número de OTUs nas silagens não foram acompanhadas por redução significativa do índice de diversidade de Shannon. Provavelmente isso se deva à elevada frequência de espécies raras nas amostras, contribuindo para diluição do efeito da diversidade entre amostras contrastantes (milho recém colhido vs silagem estocada por 120 dias).

Além disso, a estrutura da comunidade bacteriana associada às silagens variou e foi evidenciada nas análises de coordenadas principais (PCoAs). Foi observado efeito do período de estocagem do grão na dissimilaridade da comunidade bacteriana, com separação nítida das comunidades provenientes de amostras recém colhidas daquelas provenientes de silagens estocadas por 120 dias, assim como o descrito por Bao et al. (2016). Esta variação conforme o avanço do período de estocagem, pode ser devido ao estabelecimento de uma condição de anaerobiose que possibilitou a dominância de grupos específicos e altamente especializados de BAL, resultando em redução de pH a valores suficientemente baixos para estabilizar a silagem, levando a seleção de grupos altamente ácido-tolerantes. Esses dados corroboram estudo anterior que demonstrou que as condições de baixo pH eram o principal fator determinando a limitada diversidade microbiana em ambientes impactados pela drenagem de minas ácidas (MENDEZ-GARCIA et al., 2015).

Foi clara a variação da estrutura das comunidades bacterianas compondo amostras contrastantes (0 dias ou 120 dias), uma vez que aos 120 dias houve maior abundância de BALs. A reduzida população de BALs encontradas nas forragens a nível de campo já é bem conhecida (McDONALD et al., 1991, PAHLOW; WEISSBACH, 1996). Duniere et al. (2017) relatou baixa abundância de Lactobacillales no microbioma core de silagens de cereais. Mogodiniyai-Kasmaei et al. (2016) observaram uma baixa abundância relativa

inicial de BAL em capim, trevo vermelho e milho variando entre 0,18 e 3,77%. Entretanto, após o estabelecimento de uma condição de anaerobiose, bactérias anaeróbias facultativas iniciam o declínio do pH favorecendo o desenvolvimento de BALs ácido tolerantes, cujo domínio foi observado neste estudo em silagens após 120 dias de fermentação.

Foi também observada no presente trabalho a correlação ($P = 0,002$) do pH com a estrutura da comunidade das silagens. As maiores variações de pH se deram entre amostras de 0 dias ou 120 dias de estocagem. Aos 0 dias todas as amostras apresentaram um pH próximo da neutralidade, ao redor de 6,5 como esperado. Em contrapartida, após 120 dias de estocagem, após a ocorrência de um processo fermentativo, todas as amostras apresentaram um pH dentro do intervalo 3,8 a 4,2 intervalo este tido como ideal em fermentação de silagens. Isto ocorreu independente de híbrido, local de cultivo ou maturidade fisiológica. O processo de fermentação láctica que ocorre nas silagens de grãos úmidos é essencialmente similar ao que ocorre em outros tipos de silagens, com o desenvolvimento de uma população de BAL que convertem açúcares em ácido láctico como principal produto de fermentação, resultando em redução do pH (DRIEHUIS, 2015), corroborando os dados obtidos.

No caso de silagens de planta inteira de milho bem conservadas, valores de pH entre 3,8 e 4,2 são considerados adequados, pois nessa faixa há restrição da atividade de microrganismos indesejáveis sendo suficiente para preservar o material ensilado (McDONALD et al., 1991; TOMICH et al., 2004). Segundo Woolford (1984) embora o pH entre 3,8 e 4,2 seja ideal, em silagens úmidas este indicador não pode ser considerado como critério único para avaliação da fermentação, pois seu efeito inibidor sobre as bactérias depende da velocidade do declínio da concentração iônica e do grau de umidade do meio. Hoffman et al. (2011) encontraram valores similares de pH para silagens de grãos de milho dentado ($pH = 4,3$).

Assim como o pH, a microbiota é outro indicador que reflete a qualidade da silagem. O sequenciamento massivo do gene 16S rDNA revelou que os filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria foram os mais abundantes nas silagens GU e GSR. Considerando isoladamente o período de estocagem, foi verificado que Proteobacteria variou de 66 % a 17,8 %, Firmicutes de 5,2 % a 78,2 % e Actinobacteria variou de 23,3 % a 3,1 % dos 0 aos 120 dias de estocagem. Esses valores foram similares aos observados por Romero et al. (2018) em silagens de milho com aproximadamente 38 a 44% MS. Neste trabalho Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria foram os filos predominantes aos 0

dias, entretanto, aos 100 dias de estocagem Firmicutes passou a ser o filo dominante (86 %), seguido de Proteobacteria (14,5 %). Em silagens de alfafa, Firmicutes correspondeu a 74,1% e Proteobacteria a 20,4%, após 100 dias de estocagem (OGUNADE et al., 2018). Já McGarvey et al. (2013) relataram que Proteobacteria variou de 89,6% para 26,9% e Firmicutes variou de 8,1% para 70,6% após 40 dias de estocagem. Este estudo também relatou a ocorrência de Actinobacteria (0,2%) aos 0 dias.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com a literatura, onde normalmente membros das Proteobacteria dominam o microbioma bacteriano de silagens aos 0 dias (forragens recém colhidas) demonstrando a existência de uma correlação negativa da proporção do grupo Proteobacteria com o avanço do período de estocagem. De maneira lógica o inverso ocorre ao se considerar o filo Firmicutes. A exceção parece ser o relatado por Romero et al. (2017) em silagem de aveia, que reportou maior predominância de Firmicutes (83,6%), seguido de Proteobacteria (16,2%) aos zero dias. Após 217 dias de estocagem Firmicutes passou a representar 99,8% do total de sequências, enquanto que Proteobacteria e Actinobacteria representaram apenas 0,07% e 0,03% do total das sequências afiliadas, respectivamente.

Em nível de ordem os principais grupos associados às silagens avaliadas foram: Lactobacillales, Enterobacteriales, Actinomycetales, Burkholderiales e Xanthomonadales. Evidenciou-se uma clara sucessão a favor de Lactobacillales em função do período de estocagem (0 ou 120 dias), uma vez que aos 0 dias Lactobacillales somava apenas 3,9 % da abundância total, enquanto os demais grupos representavam juntos aproximadamente 82 % da abundância total. Conforme o período de estocagem avançou, após 120 dias, Lactobacillales passou a representar 75% da abundância total. Analisando as amostras individualmente pudemos notar que em algumas delas essa inversão foi ainda mais pronunciada, com Lactobacillales representando 0,45% da abundância relativa aos 0 dias e 98,9% aos 120 dias, independentemente do híbrido utilizado e do local de cultivo do milho.

Romero et al. (2018) também relatou elevada abundância de Enterobacteriales, representado pela família Enterobacteriaceae (61,4%) aos zero dias em silagens de milho. Assim como Ni et al. (2017), onde os gêneros mais abundantes de Enterobacteriales foram *Enterobacter*, *Pantoea* e *Serratia*, os quais também foram relatados dominando capim guiné e alfafa aos zero dias (PARVIN et al., 2010, LI; NISHINO, 2011). Ogunade et al. (2018) relatou composição semelhante em silagens de alfafa com gêneros pertencentes a

ordem Lactobacillales dominando o processo fermentativo após 100 dias de estocagem, com destaque para as famílias Lactobacillaceae e Leuconostocaceae (Ordem Lactobacillales), e gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, e *Weissella*. Famílias Enterobacteriaceae (ordem Enterobacteriales), Xanthomonadaceae (Xanthomonadales), Sphingomonadaceae, e Aurantimonadaceae, e para os gêneros *Sphingomonas*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, e *Stenotrophomonas*.

A ordem Lactobacillales compreende o grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) englobando as famílias Enterococcaceae (*Enterococcus* sp.), Lactobacillaceae (*Lactobacillus* sp. e *Pediococcus* sp.), Leuconostocaceae (*Leuconostoc* sp e *Weissella* sp.) e Streptococcaceae (*Lactococcus* sp.). Enquanto que a ordem Enterobacteriales compreende o grupo das enterobactérias, que apresentam efeito negativo sobre a qualidade da silagem. A família Enterobacteriaceae inclui patógenos capazes de afetar animais, plantas e humanos, entretanto o pequeno grupo que exerce algum efeito sobre o processo fermentativo não é patogênico. Segundo Henderson (1993) as enterobactérias são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos que competem por açúcares com as BAL, logo no início da fermentação, produzindo principalmente ácido acético, sendo geralmente inibidas em pH abaixo de 5,0. A proliferação destes microrganismos ocasiona perdas de MS e pequenas perdas de energia (ROTZ; MUCK, 1994), além de perdas de proteínas, pois, algumas linhagens são capazes de desaminar e descarboxilar aminoácidos.

A ordem Actinomycetales não é reportada com frequência em estudos sobre diversidade de silagens, constando apenas de referências pontuais, mas sempre que esta ordem foi mencionada esteve associada a forragens frescas, no tempo 0 de estocagem tendo seu crescimento reduzido com o avançar do período de estocagem, demonstrando o mesmo comportamento que o relatado nesta tese e portando corroborando nossos resultados. Duniere et al. (2017) relataram que durante a ensilagem de cereais, a abundância relativa da ordem Actinomycetales diminuiu após 90 dias de estocagem, variando de 11,2 a 32%, enquanto a abundância de Lactobacillales aumentou.

Neste estudo, a ocorrência de sucessão dos grupos Enterobacteriales e Actinomycetales no milho recém colhido, para Lactobacillales aos 120 dias de estocagem foi corroborada pela determinação do principais grupos bacterianos influenciando as variações na estrutura das comunidades. Lactobacillales e Enterobacteriales foram os grupos que apresentaram elevada variação quando considerado o período de estocagem do grão, correspondendo a 70 % e 45 % de variação na abundância desses grupos

respectivamente, o que foi corroborado por nós ao detectarmos elevada abundância de Enterobacteriales no material recém colhido e elevada abundância de Lactobacillales nas silagens terminais (McENIRY et al., 2010, NI et al., 2017a).

Em relação ao estágio de maturação do grão observamos variação significativa na abundância relativa de Enterobacteriales e Actinomycetales. Sendo que Enterobacteriales foi mais abundante em silagens de GU correspondendo a aproximadamente 25 % da variação, no entanto, Actinomycetales foi mais abundante em GSR correspondendo a 21 % da variação. Provavelmente, este grupo de bactérias possua a vantagem de ser mais osmotolerante e portanto possuem maior probabilidade de prosperar nas silagens GSR. No entanto, com o estabelecimento de uma condição de anaerobiose e baixo pH, este grupo teve o crescimento inibido após 120 dias de estocagem (DUNIERE et al., 2017; ROMERO et al., 2017).

A correlação de Pearson corroborou as afirmações anteriores, uma vez que a abundância de Lactobacillales foi negativamente correlacionada com o pH ($r = -0,85$), enquanto que o pH foi positivamente correlacionado com a abundância de Enterobacteriales ($r = 0,58$). Actinomycetales por sua vez apresentou abundância positivamente correlacionada com pH ($r = 0,46$) e negativamente correlacionada com % U ($r = -0,28$), o que explicaria a ocorrência preferencial deste grupo em silagens GSR aos 0 dias. Ogunade et al. (2018) também evidenciou que o pH foi negativamente correlacionado com a abundância de Lactobacillus ($r = -0,59$) em silagens de alfafa.

As principais mudanças na comunidade bacteriana cultiváveis que ocorrem na ensilagem são bem descritas (WOOLFORD; PAHLOW, 1997). Bactérias aeróbias permanecem ativas na silagem até que o oxigênio seja completamente esgotado e a acidificação do meio passe a inibir o metabolismo de alguns microrganismos. Em forragens bem fermentadas, bactérias anaeróbias facultativas reduzem o pH da silagem de forma gradual, promovendo o crescimento de BAL ácido tolerantes, que normalmente passam a dominar o microbioma da silagem terminal, como evidenciado no presente estudo, onde após 120 dias de estocagem representantes da ordem Lactobacillales passaram a dominar as silagens GU e GSR independente do híbrido ou local de colheita. Um possível mecanismo pelo qual Lactobacillales pode modular a população bacteriana durante o processo fermentativo, além da redução do pH, pode ter sido devido a habilidade das bactérias ácido lácticas em liberar compostos de ação antagonista (BAO et al., 2016).

Interessantemente, existem diferenças consideráveis entre as espécies dominantes ao

se comparar diferentes estudos, principalmente em função do tipo de forragem ensilada, mas na maioria dos casos espécies de *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Lactococcus* costumam ser as predominantes (MCENIRY et al., 2010, MUCK, 2012, MUCK, 2013). Outros autores acrescentam à essa lista os gêneros *Enterococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (PAHLOW et al., 2003, PANG et al., 2011). Embora a classificação filogenética em nível de gênero não seja possível utilizando os *amplicons* que foram gerados neste estudo, a maior parte dos *reads* detectados foram altamente similares a *Lactobacillus*, sugerindo que provavelmente, este foi o gênero de BAL mais dominante nas silagens terminais avaliadas (KRAUT-COHEN et al., 2016).

Provavelmente a ocorrência de sucessão de um microbioma dominado por Proteobacteria e Actinobacteria para um microbioma dominado por Firmicutes, principalmente pela ordem Lactobacillales é fundamental para garantir a conservação de silagens de grãos úmidos e grão seco reconstituído de milho, conforme o verificado neste estudo, e, corroborado por estudos de McGarvey et al. (2013), Bao et al. (2016), Mogodiniyai-Kasmaei et al. (2016), Duniere et al. (2017), Ogunade et al. (2017; 2018) e Romero et al. (2018).

7 CONCLUSÕES

O presente estudo apresenta resultados inéditos acerca da população bacteriana habitando naturalmente silagens de grãos úmidos e grãos secos reconstituídos de milho, ambos com predominância de BALs no final do processo fermentativo, sugerindo que a reconstituição de grãos é realmente uma alternativa viável na ensilagem de milho.

REFERÊNCIAS

- ABIMILHO. **Associação Brasileira das Indústrias do Milho**, 2018. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/estatisticas>>. Acesso em: 19 set. 2018.
- ABUBUCKER, S.; SEGATA, N.; GOLL, J.; SCHUBERT, A.M.; IZARD, J. et al. Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome. **PLOS Computational Biology**, 8:e1002358, 2012.
- BAO, W.; MI, Z.; XU, H.; ZHENG, Y.; YU KWOK, L.; ZHANG, H.; ZHANG, W. Assessing quality of Medicago sativa silage by monitoring bacterial composition with single molecule, real-time sequencing technology and various physiological parameters. **Scientific Reports**, 6, 28358; doi: 10.1038/srep28358, 2016.
- BECK, T. Fermentation of silage. In: McCULLOUGH, M.E. (Ed.). **Fermentation of silage: a review**. Ames: National Feed Ingredients Association, 1978. p. 61-115.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C.R.; HARPER, J. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. Oxford: Blackwell, 2006. 759 p.
- BENNETT, S.T.; BARNES, C.; COX, A.; DAVIES, L.; BROWN, C. Toward the 1,000 dollars human genome. **Pharmacogenomics**, v. 6, n. 4, p. 373-82, 2005.
- BENTON, J.R.; KLOPFENSTEIN, T.J.; ERICKSON, G.R. Effects of corn moisture and lenght of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. **Nebraska Beef Cattle Reports**. Lincoln, v. 151. p. 31-33, 2005.
- BERNARDES, T.F. **Controle da deterioração aeróbia de silagens**. 2006. 116 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.
- BIAGI, J. D. Tecnologia de peletização de rações. **Simpósio do colégio brasileiro de nutrição animal**, Campinas: CBNA, 1990. 37-59 p.
- BOKULICH, N.A.; JOSEPH, C.M.L.; ALLEN, G.; BENSON, A.; MILLS, D.A. Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. **PLoS One**, v. 7, n. 5, e36357, 2012.
- BRAY, J.R.; CURTIS, J.T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. **Ecological Monographs**. v. 27. p. 325-349, 1957.
- BRUSETTI, L.; BORIN, S.; MORA, D.; RIZZI, A.; RADDADI, N.; SORLINI, C.; DAFFONCHIO, D. Usefulness of length heterogeneity-PCR for monitoring lactic acid bacteria succession during maize ensiling. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 56, p. 154-164, 2006.
- BRUSETTI, L.; BORIN, S.; RIZZI, A.; MORA, D.; SORLINI, C.; DAFFONCHIO, D. Exploration of methods used to describe bacterial communities in silage of maize (*Zea mays*) cultivars. **Environmental Biosafety Research**, Les Ulis, v. 7, p. 25-33, 2008.

BULGARELLI, D.; ROTT, M.; SCHLAEPPI, K.; VER LOREN VAN THEMAAT, E.; AHMADINEJAD, N.; ASSENZA, F.; et al. Revealing structure and assembly cues for *arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. **Nature**, v. 488, p. 91–95, 2012.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C.A.; TURNBAUGH, P.J.; et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **PNAS**, USA, v. 108, p. 4516–4522, 2011.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**. v. 7, p. 335-336, 2010.

CARVALHO, P.A. **Influência de genótipo e maturidade na diversidade microbiológica em milho grão para silagem**. Piracicaba. 2014. 95p: il. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2014.

CHELIUS, M.K.; TRIPLET, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays*. **Letters Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 252-263, 2001.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. PRIMER v6: User Manual/Tutorial. Primere, Plymouth, 2006.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDDEN, A.S.; MACGARREL, D.M.; et al. The ribosomal database project (RDP-II): introducing my RDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 169-172, 2007.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B. The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 141–145, 2009.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**, 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 19 set. 2018.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology**, Lausanne, v. 46, p. 269-280, 1987.

CORREA, C.E.S.; SHAVER, R.D.; PEREIRA, M.N.; LAUER, J.G.; KOHN, K. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p. 3008-3012, 2002.

COSTA, C.; ARRIGONI, M.D.B.; SILVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, H. N. Desempenho de bovinos superprecoces alimentados com silagem de milho ou feno de aveia e grãos de milho ensilados ou secos. **Acta Scientiarum of animal Science**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 1175-1183, 2002.

COSTA, C.; ARRIGONI, M.B.; SILVEIRA, A.C.; CHARDULO, L.A.L. Silagem de grãos úmidos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS. 7.. 1999. Local. **Anais...** local: editora. 1999. p. 69-87.

COURTIN, M.G.; SPOELSTRA, S.F. A simulation model of the microbiological and chemical changes accompanying the initial stage of aerobic deterioration of silage. **Grass Forage Science**, Malden, v. 45, p. 153-165, 1990.

DA SILVA, T.C.; SMITH, M.L.; BARNARD, A.M.; KUNG JUNIOR, L. The effect of a chemical additive on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn. **Journal of Dairy Science**. Champaign. v. 98. p. 8904-8912, 2015.

DAWSON, T.E.; RUST, S.R.; YOKOYAMA, M.T. Improved fermentation and aerobic stability of ensiled high moisture corn with the use of *Propionibacterium acidipropionici*. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 81. p. 1015-1021, 1998.

DA SILVEIRA, J.P.F. **Consumo e digestibilidade de silagem de híbridos de milho em função do estágio fisiológico e processamento**. 2009. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” UNESP, Botucatu, 2009.

DEFOOR, P.J.; BROWN, M.S.; OWENS, F.N. **Reconstitution of grain sorghum for ruminants. Invited Presentation**. In: OKLAHOMA CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM. p. 93-98, 2006.

DESANTIS, T.Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E.L. Greengenes a chimera-checked 16 S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72. p. 5069–5072, 2006.

DIXON, R.P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. **Journal of Vegetation Science**, v. 14, n. 6, p. 927–930, 2003.

DOLCI, P.; TABACCO, E.; COCOLIN, L.; BORREANI, G. Microbial dynamics during aerobic exposure of corn silage stored under oxygen barrier or polyethylene films. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, p. 7499-7507, 2011.

DRIEHUIS, F. Mycotoxins in high moisture grain silages and ensiled grain by-products. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE. 17, 2015, Piracicaba. **Proceedings...** Rio das Pedras, SP: Gráfica Riopedrense, 2015. p. 186-199.

DUNIERE, L.; JIN, L.; SMILEY, B.; QI, M.; RUTHERFORD, W.; WANG, Y.; McALLISTER, T. Impact of adding *Saccharomyces* strains on fermentation, aerobic stability, nutritive value, and select lactobacilli populations in corn silage. **Journal of Animal Science**, v.93, p. 2322–2335, 2015.

DUNIERE, L.; XU, S.; LONG, J.; ELEKWACHI, C.; WANG, Y.; TURKINGTON, K.; FORSTER, R.; McALLISTER, T. Bacterial and fungal core microbiomes associated with small grain silages during ensiling and aerobic spoilage. BioMedCentral, **BMC Microbiology** v. 17, n. 50, p.1-16., 2017.

EDGAR, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, Oxford, England, v. 26, n. 19, p. 2460–1, 2010.

EDGAR, R.C.; HAAS, B.J.; CLEMENTE, J.C.; QUINCE, C.; KNIGHT, R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**. Oxford. England. v. 27 n. 16, p. 2194-2200, 2011.

EIKMEYER, F.G.; KÖFINGER, P.; POSCHENEL, A.; JÜNEMANN, S.; ZAKRZEWSKI, M.; HEINL, S.; et al. Metagenome analyses reveal the influence of the inoculant *Lactobacillus buchneri* CD034 on the microbial community involved in grass ensiling. **Journal of Biotechnology**, v. 167, p. 334–43, 2013.

FERNANDES, J. **Influência de genótipo maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**. Piracicaba. 2014. 97p: il. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2014.

FIETTO, J.L.R.; MACIEL, T.E.F. Sequenciando genomas. In: Moreira, L.M. (Org.). **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015. p. 27-64. Disponível em: <<http://moreiralab.net/Livro/>>. Acesso em: 24 ago. 2018.

FOX, D.G. **Systems for Storing and Handling High Moisture Corn**. Invited Presentation. In: OKLAHOMA HIGH MOISTURE GRAINS SYMPOSIUM. p. 15-22, 1976.

GEVERS, D.; KNIGHT, R.; PETROSINO, J.F.; HUANG, K.; McGUIRE, A.L. et al. The human microbiome project: a community resource for the healthy human microbiome. **PLoS Biology**, v. 10, n. 8: e1001377. doi:10.1371/journal.pbio.1001377, 2012.

HALE, W.H. Influence of processing of the utilization of grains (starch) by ruminants. Tucson. **Journal of Animal Science**, Albany, v.37, n.4, p.1075-1083, 1973.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontological Electronica**, Boulder, v. 4, p. 1-9, 2001.

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

HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R.; KIM, T-W.; CHOKHAWALA, H.; SCHROTH, G.; LUO, S.; et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science**, v. 331, p. 463–467. [https:// doi .org/ 10 .1126/ science .1200387](https://doi.org/10.1126/science.1200387), 2011.

HOFFMAN, P.C.; ESSER, N.M.; SHAVER, R.D.; COBLENTZ, W.H.; SCOTT, M.P.; BODNAR, A.L.; SCHMIDT, R. J.; CHARLEY, R.C. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p. 2465–2474, 2011.

HOFSTATTER, P.G.; TICE, A.K.; KANG, S.; BROWN, M.W.; LAHR, D.J.G. Evolution of bacterial recombinase A (*recA*) in eukaryotes explained by addition of genomic data by key microbial lineages. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences B**, 283: 20161453, 2016.

HOLZER, M.; MAYRHUBER, E.; DANNER, H.; BRAUN, R. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. **Trends Biotechnology**, v. 21, p. 282–287, 2003.

HUNTINGTON, G.B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.75, p. 852–867, 1997.

HUM. MICROBIOME PROJ. CONSORT. Structure function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, p. 207–14, 2012.

HYMAN, E. D. A new method of sequencing DNA. **Analytical Biochemistry**, v. 174, p. 423-436, 1988.

JASPER, S.P.; SEKI, A.S.; SILVA, P.R.A.; BIAGGIONI, M.A.M.; BENEZ, S.H.; COSTA, C. Comparação econômica da produção de grãos secos e silagem de grãos úmidos de milho cultivado em sistema de plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 33. p. 1385-1391, 2009.

JOBIM, C.C.; GONÇALVES, G.D. Microbiologia de forragens conservadas. In: REIS, R.A.; BERNARDES, T.F.; SIQUEIRA, G.R.; MOREIRA, A.L. (Ed.). **Volumosos na produção de ruminantes: valor alimentício de forragens**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. p. 1-26.

JOBIM, C.C.; REIS, R.A. Produção e utilização de silagem de grãos úmidos de milho. In: MATTOS, W.R.S.(Ed.) **SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA: A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 912-927.

JUNGES, D.; MORAIS, G.; DANIEL, J.L.P.; SPOTTO, M.H.F.; NUSSIO, L.G. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE. 17. 2015. Piracicaba. **Proceedings...** Rio das Pedras. SP: Gráfica Riopedrense. 2015. p. 566-567.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, London, v. 49, p. 209-224, 1983.

KAVAMURA, V.N.; TAKETANI, R.G.; LANÇONI, M.D.; ANDREOTE, F.D.; MENDES, R.; MELO, I.S. Water regime influences bulk soil and Rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PLoS One**, v. 8, n. 9, e73606, 2013.

KESHRI, J.; MISHRA, A.; JHA, B. Microbial population index and community structure in saline–alkaline soil using gene targeted metagenomics. **Microbiological Research**. v. 168, p. 165–173, 2013.

KESHRI, J.; CHEN, Y.; PINTO, R.; KROUPITSKI, Y.; WEINBERG, Z.G.; SALDINGER, S.S. Microbiome dynamics during ensiling of corn with and without *Lactobacillus plantarum* inoculant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 4025–4037, 2018.

KLOCKE, M.; MUNDT, K.; IDLER, C.; McENIRY, J.; O’KIELY, P.; BARTH, S. Monitoring *Lactobacillus plantarum* in grass silages with the aid of 16S rDNA-based quantitative real-time PCR assays. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 49–58, 2006.

KOPYLOVA, E.; NOE, L.; TOUZET, H. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 24, p. 3211–3217, 2012.

KRAUT-COHEN, J.; TRIPATHI, V.; CHEN, Y.; GATICA, J.; VOLCHINSKI, V.; SELA, S.; WEINBERG, Z.; CYTRYN, E. Temporal and spatial assessment of microbial communities in commercial silages from bunker silos. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 6827–6835, 2016.

KUNG JUNIOR, L.; SCHMIDT, R.J.; EBLING, T.E.; HU, W. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of ground and whole high moisture corn. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v. 90, p. 2309-2314, 2007.

KUNG JUNIOR, L.; GRIEVE, D.B.; THOMAS, J.W.; HUBER, J.T. Added ammonia or microbial inocula for fermentation and nitrogenous compounds of alfalfa ensiled at various percents of dry matter. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.299-306, 1984.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, p. 860-921, 2001.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Paranaset, 1997. 134p.

LINDGREN, S. Can HACCP principles be applied for silage safety? In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE. Uppsala. **Proceedings...** Uppsala: Swedish University of Agricultural Science, 1999. p. 51-66.

LI, Y.; NISHINO, N. Bacterial and fungal communities of wilted Italian ryegrass silage inoculated with and without *Lactobacillus rhamnosus* or *Lactobacillus buchneri*. **Letters in Applied Microbiology**, Bedford, v. 52, p. 314-321, 2011.

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

LINKS, M.G.; DUMONCEAUX, T.J.; HEMMINGSEN, S.H.; HILL, J.E. The Chaperonin-60 universal target is a barcode for bacteria that enables de novo assembly of metagenomic sequence data. **PLoS One** 7:e49755, 2012.

LIU, Q.H.; SHAO, T.; ZHANG, J.G. Determination of aerobic deterioration of corn stalk silage caused by aerobic bacteria. **Animal Feed Science Technology**, v. 183, p. 124–131, 2013.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8228–8235, 2005.

LYNCH, J.P.; O'KIELY, P.; WATERS, S.M.; DOYLE, E.M. Conservation characteristics of corn ears and stover ensiled with the addition of *Lactobacillus plantarum* MTD-1, *Lactobacillus plantarum* 30114 or *Lactobacillus buchneri* 11A44. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2070–2080, 2012.

MADER, T.; RUST, S. High moisture grains: harvesting, processing and storage. In: CATLLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM, Oklahoma. **Proceedings...** Oklahoma: Oklahoma State University, 2006. p. 88-92.

MAGURRAN, A.E. **Measuring biological diversity**, 8th ed. Blackwell, Malden, MA, pp. 256. 2010.

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

MARDIS, E. R. Next-generation sequencing platforms. **Annual Review of Analytical Chemistry**. Palo Alto California, v. 6, p. 287–303, 2013.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2nd. Ed. Lincoln: Chalcombe Publ., 1991. 340p.

McALLISTER, T.A.; DUNIÈRE, L.; DROUIN, P.; XU, S.; WANG, Y.; MUNNS, K.; ZAHEER, R. Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4060–4074, 2018.

McENIRY, J.; O'KIELY, P.; CLIPSON, N.J.W.; FORRISTAL, P.D.; DOYLE, E.M. Bacterial community dynamics during the ensilage of wilted grass. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 105, p. 359-371, 2008.

McENIRY, J.; O'KIELY, P.; CLIPSON, N.J.W.; FORRISTAL, P.D.; DOYLE, E.M. Assessing the impact of various ensilage factors on the fermentation of grass silage using conventional culture and bacterial community analysis techniques. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 1584–93, 2010.

McGARVEY, J.A.; FRANCO, R.B.; PALUMBO, J.D.; HNASKO, R.; STANKER, L.; MITLOEHNER, F.M. Bacterial population dynamics during the ensiling of *Medicago sativa* (alfalfa) and subsequent exposure to air. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 1661—1670, 2013.

MOGODINIYAI-KASMAEI, K.; DICKSVED, J.; SPÖRNDLY, R.; UDÉN, P. Separating the effects of forage source and field microbiota on silage fermentation quality and aerobic stability. **Grass and Forage Science**, v. 72, p. 281–289, 2016.

MORAIS, G. **A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela aplicação de aditivos: aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas leiteiras**. Piracicaba. 2016. 111p: il. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2016.

MUCK, R.E.; PITT, R.E.; LEIBENSPERGER, R.Y. A model of aerobic fungal growth in silage: microbial characteristics. **Grass Forage Science**, Malden, v. 46, n. 3, p. 283-290, 1991.

MUCK, R.E. Microbiology of ensiling. Finland: **Proceedings XVI International Silage Conference**. Hameenlinna, 2012. p. 75–86.

MUCK, R.E. Recent advances in silage microbiology. **Agricultural and Food Science**, Helsinki, v. 22, p. 3-15, 2013.

NAOKI, N.; YUJI, T. Variations in bacterial communities in laboratory-scale and big bale silos assessed by fermentation products, colony counts and denaturing gradient gel electrophoresis profiles. **Letters in Applied Microbiology**, Bedford, v. 46, p. 283-288, 2008.

NI, K.; THUY MINH, T.; MINH TU, T. T.; TSURUTA, T.; PANG, H.; NISHINO, N. Comparative microbiota assessment of wilted Italian ryegrass, whole crop corn, and wilted alfalfa silage using denaturing gradient gel electrophoresis and next-generation sequencing **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 1385–1394, 2017a.

NI, K.; WANG, F.; ZHU, B.; YANG, J.; ZHOU, G.; PAN, Y.; TAO, Y.; ZHONG, J. Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 706–715, 2017b.

OGUNADE, I.M.; JIANG, Y.; KIM, D.H.; PECH CERVANTES, A.A.; ARRIOLA, K.G.; VYAS, D.; WEINBERG, Z.G.; JEONG, K.C.; ADESOGAN, A.T. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and bacterial diversity in corn silage contaminated with the pathogen and treated with chemical or microbial additives. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1780–1794, 2017.

OGUNADE, I.M.; JIANG, Y.; PECH CERVANTES, A.A.; KIM, D.H.; OLIVEIRA, A.S.; VYAS, D.; WEINBERG, Z.G.; JEONG, K.C.; ADESOGAN, A.T. Bacterial diversity and composition of alfalfa silage as analyzed by Illumina MiSeq sequencing: Effects of *Escherichia coli* O157:H7 and silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 2048–2059, 2018.

OWENS, F.N.; SODERLUND, S. Ruminal and postruminal starch digestion by cattle. In: CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM. Stillwater. **Proceeding...** 2006, Stillwater. Disponível em: <http://beefextension.com/proceedings/cattle_grains06/06-17.pdf>. Acesso: 24 set. 2018.

OWENS, F.N.; ZINN, R.A. Corn grain for cattle: influence of processing on site and extent of digestion. In: SOUTHWEST NUTRITION CONFERENCE. 2005. Nebraska. **Proceedings...** Nebraska. 2005. p. 86-112.

OWENS, F.N.; BASALAN, M. Limits to ruminal and postruminal starch digestion and energetic efficiency. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON BEEF CATTLE. 2012, São Pedro, SP. **Proceedings...** 2012, São Pedro, SP. Disponível em CD-ROM. 2012, 21p.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: **Silage Science and Technology**. D. R. Buxton, R. E. Muck, and R. E. Harrison, ed. Am. Soc. Agron., Crop Sci. Soc. Am., Soil Sci. Soc. Am., Madison, WI. 2003. p. 31–93.

PAHLOW, G.; WEISSBACH, F. Effect of numbers of epiphytic lactic acid bacteria (LAB) and of inoculation on the rate of pH-decline in direct cut and wilted grass silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth: Aberystwyth University, 1996. p. 104-105.

PANG, H.; QIN, G.; TAN, Z.; LI, Z.; WANG, Y.; CAI, Y. Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and *recA* gene analysis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 235–241, 2011.

PARKS, D.H.; BEIKO, R.G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, v. 26, p. 715–721, 2010.

PARVIN, S.; NISHINO, N. Bacterial community associated with ensilage process of wilted guinea grass. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 107, p. 2029-2036, 2009.

_____. Succession of lactic acid bacteria in wilted rhodes grass silage assessed by plate culture and denaturing gradient gel electrophoresis. **Grassland Science**, Tochigi, v. 56, p. 51-55, 2010.

PARVIN, S.; WANG, C.; LI, Y.; NISHINO, N. Effects of inoculation with lactic acid bacteria on the bacterial communities of italian ryegrass, whole crop maize, guinea grass and rhodes grass silages. **Animal Feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 160, p. 160-166, 2010.

PERONI, N.; HERNÁNDEZ, M.I.M. **Ecologia de populações e comunidades**. Florianópolis: CCB/EAD/UFSC, 2011. 123p.

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

PRIGGE, E.C. Ensiling conditions and soluble nitrogen and high moisture corn utilization. Invited Presentation. In: OKLAHOMA HIGH MOISTURE GRAINS SYMPOSIUM. p. 76-93. 1976.

ROMERO, J.J.; ZHAO, Y.; BALSECA-PAREDES, M.A.; TIEZZI, F.; GUTIERREZ-RODRIGUEZ, E.; CASTILLO, M.S. Laboratory silo type and inoculation effects on nutritional composition, fermentation, and bacterial and fungal communities of oat silage. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1812-1828, 2017.

ROMERO, J.J.; JOO, Y.; PARK, J.; TIEZZI, F.; GUTIERREZ-RODRIGUEZ, E.; CASTILLO, M.S. Bacterial and fungal communities, fermentation, and aerobic stability of conventional hybrids and brown midrib hybrids ensiled at low moisture with or without a homo- and heterofermentative inoculant. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3057–3076, 2018.

ROONEY, L.W.; PFLUGFELDER, R.L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. **Journal of Animal Science**. Albany, v.63, p.1607-1623, 1986.

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

ROTZ, C.A.; MUCK, R.E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: NATIONAL CONFERENCE ON FORAGE QUALITY, EVALUATION, AND UTILIZATION, Lincoln. **Proceedings...** Lincoln: Nebraska University, 1994. p. 828-868.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. New York: Marcel Dekker, 2004. 633p.

SCHMIDT, R. J.; EMARA, M.G.; KUNG JUNIOR, L. The use of quantitative real-time polymerase chain reaction assay for identification and enumeration of *Lactobacillus buchneri* in silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 920–929, 2008.

SELF, H. L. **Storage and use of high moisture grains**. Invited Presentation. In: OKLAHOMA HIGH MOISTURE GRAINS SYMPOSIUM. p. 93-97, 1976.

SHARPE, M.E. (1979). Identification of the lactic acid bacteria. In: **Identification Methods for Microbiologists**. 2nd ed. SKINNER, F.A.; LOVELOCK, D.W. (Ed.). London: Academic Press, 1979. p.246-255.

SHENDURE, J.; PORRECA, G. J.; REPPAS, N. B. et al. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. **Science**, v. 309, p. 1728-1732, 2005.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings...** In: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA. v. 103, n. 32, p. 12115-12120, 2006.

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

STEVENSON, D.M.; MUCK, R.E.; SHINNERS, K.J.; WEIMER, P.J. Use of real time PCR to determine population profiles of individual species of lactic acid bacteria in alfalfa silage and stored corn stover. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 329–338, 2006.

SUN, Y.; CAI, Y.; LIU, L.; YU, F.; FARRELL, M.L.; McKENDREE, W.; FARMERIE, W. ESPRIT: estimating species richness using large collections of 16S rRNA pyrosequences. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 10, e76. 2009.

THEURER, C.B. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, Albany, v.63, p.1649-1662, 1986.

TOMICH, T.R.; GONÇALVES, L.C.; TOMICH, R.G.P. et al. Características químicas e digestibilidade in vitro de silagens de girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1672-1682, 2004.

USDA. **Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – Serviço Agrícola Estrangeiro**, 2018. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso: 19 set. 2018.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W. et al. The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, p. 1304-1351, 2001.

VILLA, A.F.; MELENDEZ, A.P.; CARULLA, J.E.; PABON, M.L.; CARDENAS, E.A. Study of microbiological and nutritional quality of corn silage in two Colombian ecosystems. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 23, p. 65-77, 2010.

WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied Environmental Microbiology** v. 73, p. 5261–5267, 2007.

WANG, P.; BAI, C.S.; LIU, L.; CAO, B.H. Effects of lactic acid bacteria inoculant on the fermentation quality of reed grass (*Phragmites australis* Cav. Trin. ex Sterd.) at low temperature. **Acta Agrestia Sinica**, Mainland China, v. 19, p. 127-131, 2011.

WANG, Y.; QIAN, P-Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS One**, v. 4, n. 10. e7401, 2009.

WOOLFORD, M.K. **The silage fermentation**. New York: Marcel Dekker, 1984. 350p.

WOOLFORD, M.K.; PAHLOW, G. **The silage fermentation. Microbiology of fermented foods**. Wood, BJB, ed. USA: Springer; 1997. p. 73-102.

WU, B.; ZHANG, Q.; LIU, Z.; YU, Z.; NISHINO, N. Bacterial communities in alfalfa and corn silages produced in large-scale stack and bunker silos in China. **Japanese Society of Grassland Science**, v. 60, p. 247–251, 2014.