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

**Influência do genótipo e maturidade na diversidade microbiana em
milho grão para silagem**

Paula de Almeida Carvalho

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2014**

Paula de Almeida Carvalho
Zootecnista

Influência do genótipo e maturidade na diversidade microbiana em milho grão para silagem

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ GUSTAVO NUSSIO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2014**

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

Carvalho, Paula de Almeida

Influência do genótipo e maturidade na diversidade microbiana em milho
grão para silagem / Paula de Almeida Carvalho.- - Piracicaba, 2014.
95 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Silagem de grãos úmidos 2. Silagem de grãos úmidos reconstituídos 3. Diversidade
bacteriana 4. Milho grão dentado 5. Milho grão duro 6. DGGE 7. Sequenciamento Illumina
I. Título

CDD 636.08552
C331i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

*A minha Mãe Maria Elizabeth,
por me dar a vida e ensinar o significado do amor incondicional,
esta é uma vitória que conquistamos juntas!*

*A minha irmã Roberta,
por me apoiar em todas as decisões
e estar sempre ao meu lado, mesmo distante;*

DEDICO

*À memória de meu Pai Paulo Rogério,
e Avô Geraldo Rodrigues,
a distância não diminui a presença de vocês em minha vida;*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Gustavo Nussio pela orientação, confiança e auxílio no trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote pelos conselhos e total apoio durante este período, sempre acessível para discutir e contornar contratempos, que não foram poucos...

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, pelo auxílio no trabalho, principalmente na etapa de sequenciamento.

Ao programa de pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens e a Fapesp pelo apoio e bolsa concedida.

Aos funcionários da APTA Centro Norte, no município de Pindorama sempre prestativos quando solicitados.

À pesquisadora Solidete de Fátima Paziani, pelo auxílio na condução do experimento à campo.

Aos funcionários e colegas do departamento de Zootecnia da Esalq/USP.

Aos colegas do grupo de Qualidade e Conservação de Forragens, em especial aos amigos: Max, João Pedro e Janielen, pela ajuda, ensinamentos e bons momentos nestes anos de convivência.

Aos colegas e técnicos do laboratório de Microbiologia da Esalq. Em especial ao colega Diogo, pela ajuda na confecção dos géis de DGGE, e Ademir, que com sua disponibilidade e empenho, foi fundamental para a conclusão das análises de bioinformática.

À todos os meus familiares por me amarem e apoiarem sempre, a união e o amor de nossa família me motiva a seguir adiante!!

Ao meu noivo, German Estrada, por estar ao meu lado desde o início dessa jornada, me amparando nos momentos difíceis com palavras de amor e estímulo, sempre confiante de meu sucesso e da minha capacidade de seguir adiante.

Por fim, agradeço à Deus, pelo dom da vida em primeiro lugar, e por ter me enviado verdadeiros anjos, nas mais diversas formas, nos momentos mais incertos desta jornada, fazendo com que eu me sentisse forte e capaz de superar qualquer provação.

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

Só é lutador quem sabe lutar consigo mesmo.”

(Carlos Drummond de Andrade)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 A cultura do milho.....	23
2.2 Silagem de grão úmido de milho.....	24
2.3 Microbiologia da silagem.....	25
2.4 Fatores que influenciam na composição das comunidades bacterianas da silagem.....	27
2.4.1 Impacto do genótipo da planta sobre comunidades bacterianas.....	30
2.4.2 Impacto do estágio de maturidade da planta sobre comunidades bacterianas.....	32
2.5 Métodos de estudo das comunidades bacterianas.....	33
2.5.1 Métodos dependentes de cultivo.....	33
2.5.2 Métodos independentes de cultivo.....	34
2.5.2.1 Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante.....	35
2.5.2.2 Análise de Restrição do DNA Ribossomal.....	36
2.5.2.3 PCR Quantitativo em Tempo Real.....	36
2.5.2.4 Heterogeneidade de Dimensão de Fragmentos de PCR.....	37
2.5.2.5 Polimorfismo do Tamanho e Composição de Bases de Fragmentos Terminais de Restrição.....	38
2.5.3 Técnicas independentes de cultivo aplicadas ao estudo da microbiologia de silagens.....	38
3 OBJETIVOS E HIPÓTESE.....	43
3.1 Objetivo geral.....	43
3.1.1 Objetivos específicos.....	43
3.2 Hipótese.....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Implantação do experimento em campo.....	45

4.2 Momento da colheita.....	47
4.3 Confeção dos mini silos.....	48
4.4 Estudos de diversidade microbológica.....	49
4.4.1 Extração de DNA.....	49
4.4.2 Análise da estrutura bacteriana por meio da técnica de PCR-DGGE.....	49
4.4.2.1 Análise multivariada aplicada aos perfis de PCR-DGGE.....	52
4.4.3 Análise da diversidade filogenética pelo sistema MiSeq TM (Illumina).....	53
4.4.3.1 Procedimentos de bioinformática para avaliação dos dados do sequenciamento.....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Diversidade bacteriana associada ao milho grão para silagem.....	57
5.1.2 Análise dos perfis de DGGE.....	57
5.1.3 Estudo da diversidade bacteriana em milho grão para silagem por meio do sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq TM	62
6 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	83

RESUMO

Influência do genótipo e maturidade na diversidade microbiológica em milho grão para silagem

O histórico agronômico da cultura, em geral, explica a comunidade microbiana presente na massa ensilada, entretanto, a diversidade e o grau de contaminação da população microbiana epifítica pode auxiliar na compreensão do padrão de fermentação da silagem e da estabilidade desse produto quando em exposição ao ambiente aeróbio. No presente trabalho, foram avaliados a influência do genótipo, maturidade e período de estocagem na composição da comunidade bacteriana em silagens de grãos de milho. Para isso, dois cultivares de milho AG 1051 (“dent”) e IAC 8390 (“flint”) foram colhidos em três estágios de maturidade (ponto de silagem de planta inteira, ponto de silagem de grão úmido e ponto de grão seco), moídos e ensilados por 0, 7 e 120 dias. Atualmente, a aplicação de técnicas de microbiologia molecular permite acessar alterações causadas nestas comunidades de maneira independente do cultivo bacteriano, por esse motivo, a comunidade bacteriana foi avaliada por meio da técnica de Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) e sequenciamento dos produtos de PCR via sistema MiSeqTM Illumina. Foi demonstrado que em silagens de grãos de milho contendo alta umidade, os diferentes estágios de desenvolvimento da cultura, e por conseguinte, do grão, são os principais determinantes da composição da comunidade bacteriana deste, sendo menos importantes o genótipo das plantas e os tempos de estocagem das silagens. Aos 120 dias de estocagem nas amostras de grão seco reconstituído, as sequências afiliadas ao gênero *Clostridium* representaram total de aproximadamente 40% das sequências afiliadas aos gêneros encontrados, enquanto o gênero *Lactobacillus* representou menos de 7% das sequências afiliadas a este gênero. Provavelmente, grãos secos sofrem mais estresse a campo, o que consequentemente, pode interferir na qualidade higiênico sanitária das silagens desses grãos. Com base nestes resultados fica evidenciada a possibilidade de realização de recomendações potenciais de aditivos específicos para ensilagem de grãos de milho, direcionados para cada ponto de maturidade da cultura.

Palavras-chave: Silagem de milho; Grão úmido de milho; Diversidade bacteriana; 16S DNAr; DGGE; Sequenciamento; Sistema MiSeqTM Illumina

ABSTRACT

Influence of genotype and maturity in microbiological diversity in corn grain for silage

The agronomic background of crops in general, explains the microbial community present in silage, however, diversity and contamination status may help on understanding the silage fermentation profile and aerobic stability. In the present work, the influence of factors such as different genotypes, different stages of plants development and storage time in the composition of bacterial communities were evaluated. On this way, maize cultivars AG 1051 ("dent") and IAC 8390 ("flint") were harvested in three physiological stages (whole plant silage, wet grain silage and dry grain), the grain were grounded and ensiled for 0, 7 and 120 days. Nowadays, the applications of techniques of molecular microbiology allow assessing the shifts caused on these communities by a culture independent approach, therefore, bacterial community were evaluated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis technique (DGGE), and PCR products were sequenced by Illumina MiSeqTM System. It was demonstrated that in high moisture corn silage, different stages of plants development are main determinants of bacterial community composition rather than the plants genotypes and storage time. In addition in the samples of reconstituted dry grain, it was demonstrated that after 120 days of storage, sequences affiliated to the gender *Clostridium* accounted for a total of approximately 40% of total sequences affiliated to genera found, while the genus *Lactobacillus* represented less than 7% of sequences affiliated to this gender. Probably dried grains suffer more stress at field conditions, which in turn can interfere with the sanitary hygienic quality of silages obtained from these grains. At least, based on these results it is clear the possibility of performing potential specific additives recommendations, unique at each stage of maize plants development.

Keywords: Corn silage; High moisture corn; Bacterial diversity; 16S DNAr; DGGE; sequencing; Illumina MiSeqTM System

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação da parcela experimental, mostrando a distribuição das linhas para colheita nos pontos de maturação. Os prefixos PI, GU e GSR referem-se aos pontos de maturidade de planta inteira, ponto de grão úmido e ponto de grão seco reconstituído, respectivamente.....46
- Figura 2 - Análise de PCR-DGGE em amostras provenientes dos grãos de milho no momento da ensilagem e na silagem. Perfis de DGGE das amostras aos zero dias de estocagem (A), aos sete dias (B) e aos 120 dias (C), onde os marcadores de corrida são representados por M. Os prefixos HA e HB referem-se aos híbridos IAC-8390 e AG-1051, respectivamente. Os prefixos PI, GU e GSR referem-se aos pontos de maturidade de planta inteira, ponto de grão úmido e ponto de grão seco reconstituído.....58
- Figura 3 - Análise de coordenadas principais (*PCoA*) para os grupos formados com base na análise de DGGE para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA) aos zero dias (A); sete dias (B) e 120 dias (C). Os prefixos HA e HB referem-se aos híbridos IAC-8390 e AG-1051, respectivamente. Os prefixos PI, GU e GSR referem-se aos pontos de maturidade de planta inteira, ponto de grão úmido e ponto de grão seco reconstituído. Análise realizada com apoio do software PAST 1.90.....59
- Figura 4 - Abundância dos filos Firmicutes e Proteobacteria em relação aos híbridos de milho (A); pontos de maturidade (B) e períodos de estocagem (C). Os prefixos (PI), (GU) e (GSR) referem-se aos pontos de maturidade de planta inteira; ponto de grão úmido e ponto de grão seco reconstituído. Os valores são apresentados em porcentagem.....64
- Figura 5 - Abundância das principais ordens bacterianas identificadas nos diferentes híbridos (A), pontos de maturidade (B) e períodos de estocagem (C). Os prefixos (PI), (GU) e (GSR) correspondem a ponto de planta inteira; ponto de grão úmido e ponto de grão seco reconstituído, respectivamente. Os valores são apresentados em porcentagem.....68
- Figura 6 - Abundância das principais ordens bacterianas identificadas nas amostras de grão seco reconstituído (GSR), evidenciando a grande participação da ordem Clostridiales. As abreviações correspondem respectivamente às ordens: Enterobacteriales (Entero), Burkholderiales (Burk), Sphingomonadales (Sphingo),

Rhodospirillales (Rhodos), Clostridiales (Clost) e Lactobacillales (Lacto). Os valores são apresentados em porcentagem.....69

Figura 7 - Análise de coordenadas principais (*PCoA*) para os grupos formados com base na matriz de UTOs para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA) em função do período de estocagem (A); híbrido (B) e ponto de maturidade (C). As elipses foram estabelecidas a 95% de similaridade. Os prefixos PI, GU e GSR referem-se aos pontos de maturidade de planta inteira, ponto de grão úmido e ponto de grão seco reconstituído, respectivamente. Análise realizada com apoio do software PAST 1.90.....71

Figura 8 - Diversidade dos principais gêneros bacterianos obtidos a partir dos dados da matriz de UTOs, para os diferentes pontos de maturidade, evidenciando a contribuição dos grupos mais abundantes nos pontos de planta inteira (A); grão úmido (B) e grão seco reconstituído (C). Os gêneros englobados na categoria Outros, representam menos de 1% da população total em cada um dos períodos de estocagem avaliados. Análise realizada com apoio do software QIIME.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies microbianas recentemente isoladas de silagem.....	39
Tabela 2 - Espécies bacterianas recentemente isoladas de silagem.....	41
Tabela 3 - Características agronômicas das cultivares de milho utilizadas no experimento.....	47
Tabela 4 - Média dos teores de umidade (%) de grãos de híbridos de milho IAC-8390 e AG-1051 nos diferentes pontos de maturidade.....	48
Tabela 5 - Primers usados para amplificação do gene 16S a partir de amostras de silagens analisadas no estudo.....	51
Tabela 6 - Mix de <i>primers</i> utilizados na reação de PCR para sequenciamento da região V4 ribossomal.....	54
Tabela 7 - Valores de R da análise de similaridade de ANOSIM.....	61
Tabela 8 - Número de sequências e de unidades taxonômicas operacionais provenientes de amostras de silagens analisadas no estudo.....	63
Tabela 9 - Valores de pH críticos para silagens anaerobicamente estáveis conforme o teor de matéria seca.....	77
Tabela 10 - Principais grupos bacterianos que contribuíram para a separação observada entre as comunidades nos diferentes pontos de maturidade.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C - Grau Celsius

µg - Micrograma

µL - Microlitro

APS - “Ammonium Persulphate” (Persulfato de amônio)

BAL - Bactéria Láctica

cm - Centímetro

CO₂ - Dióxido de Carbono

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

dNTPs - Desoxirribonucleosídeo Trifosfato

EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetracético

g - Grama

H₂O - Água

L - Litros

m - Metro

M - Molar

mg - Miligrama

min - Minutos

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

MS - Matéria Seca

ng - Nanograma

NH₃ - Amônia

O₂ - Oxigênio

pb - Pares de Base

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

TEMED - Tetra metiletilenodiamina

Tris - Tris (hidroximetil) aminometano

U - Unidade

UTOs - Unidades Taxônomicas Operacionais

UV - Radiação Ultravioleta

V - Volts

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, totalizando aproximadamente 80 milhões de toneladas na safra 2012/2013 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB) e o principal destino dos grãos são as indústrias de rações para animais. Seguindo a tendência mundial, em que a alimentação animal consome 70% do milho produzido, o Brasil tem nesse segmento o grande mercado desse cereal, com variação de 70% a 80% da demanda interna. No consumo de milho destinado a animais, estima-se que, no ano de 2011, 56,6% deste total foi direcionado ao setor avícola; 28,6% à suinocultura; 9% à pecuária; e 5,7% foi usado para fazer ração para os outros animais (MIRANDA; DUARTE, GARCIA, 2014a).

Entretanto, o fornecimento deste cereal para os animais é dificultado pois a armazenagem de grãos em fazendas enfrenta alguns problemas antes mesmo da colheita. Como a produção do milho grão exige que a planta seque no campo, ocorrem perdas ainda na lavoura. Além disso, na fase pós-colheita, durante o armazenamento, o material colhido sofre o ataque de pragas e roedores reduzindo ainda mais a quantidade e a qualidade do produto (JOBIM; BRANCO; SANTOS, 2003).

A exploração pecuária, principalmente os rebanhos de alta produção, dependem muito do uso do milho como principal fonte de energia. Dado ao alto valor desse cereal, os custos com alimentação são bastante significativos. Nesse sentido, a ensilagem de grãos úmidos de milho tem se constituído em importante tecnologia para reduzir os custos com alimentação em criações, inclusive durante os períodos desfavoráveis do ano, por proporcionar antecipação na retirada da cultura da lavoura com grandes benefícios ampliando o uso da terra, além de reduzir significativamente as perdas no campo (JOBIM; BRANCO; SANTOS, 2003).

Como o processo de conservação de alimentos na forma de silagem é extremamente dependente da comunidade de microrganismos epifíticos, o estudo dessa diversidade torna-se essencial. Uma melhor compreensão da microbiologia da silagem pode permitir melhor manejo do processo, além da possibilidade de desenvolver melhores inoculantes para aumentar a qualidade do produto a ser oferecido ao animal. Em decorrência da comunidade microbiana ser diretamente influenciada pelas condições do meio, a escolha de híbridos a serem cultivados, a maturidade da planta no momento da colheita, o tempo de estocagem e a presença de espécies bacterianas no ambiente podem ser determinantes na presença de comunidades distintas e mais favoráveis ou não a conservação da massa ensilada.

Para determinar estas alterações algumas metodologias estão disponíveis, dentre as quais as técnicas moleculares compõem alternativa de grande interesse por permitir a avaliação total da comunidade bacteriana, não limitando-se à análise da fração cultivável de espécies bacterianas.

Desta maneira no presente trabalho foram verificados os efeitos de genótipos e de maturidade de plantas de milho na composição de comunidades, além da descrição de grupos bacterianos presentes em silagens de grão úmido de milho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho

O cultivo do milho (*Zea mays*) é praticado em todas as superfícies aptas para a agricultura no planeta. Em algumas regiões, como em países da Ásia e África, o milho é a principal fonte de alimento para a maioria das pessoas (HULSHOF et al., 2007). Entretanto em países desenvolvidos industrialmente, o milho se destina principalmente a alimentação animal e apenas 10% ao consumo humano.

Os maiores produtores mundiais de milho são os Estados Unidos, a China e o Brasil, que, em 2011/12, produziram: 313,9; 191,8; e 72,8 milhões de toneladas, respectivamente (MIRANDA; DUARTE; GARCIA, 2014b). Na safra de 2012/2013 a produção brasileira alcançou a marca de 80 milhões de toneladas de milho. Sendo cultivado em diferentes sistemas produtivos, o milho é plantado principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul.

Como o principal destino da safra são as indústrias de rações para animais, o desenvolvimento da produção e do mercado do milho deve ser analisado sob a ótica das cadeias produtivas ou dos sistemas agroindustriais. O milho é insumo para produção de uma centena de produtos porém, na cadeia produtiva de suínos e aves são consumidos aproximadamente 70% do milho produzido no mundo e entre 70 e 80% do milho produzido no Brasil.

Neste ponto, a cadeia produtiva do milho passa a se inserir na cadeia produtiva do leite, de ovos e da carne bovina, suína e de aves sendo este canal por onde os estímulos do mercado são transferidos aos agricultores. Mudanças nestas cadeias passam a ser de vital importância como incentivadoras do processo produtivo do milho. Três grandes derivações ocorrem neste ponto: **a)** a produção de silagem, para alimentação de vacas em produção de leite e de gado confinado para engorda no período de inverno. **b)** a industrialização do grão de milho em ração; **c)** o emprego do grão em mistura com concentrados proteicos para a alimentação de suínos e de aves.

Todas as derivações têm se desenvolvido consideravelmente em diferentes regiões do Brasil, com a criação de polos regionais de consumo de milho, que não necessariamente estão próximos aos locais de produção. Ao contrário da industrialização de milho para o consumo humano, este setor apresenta grande dinamismo, com grande incremento do número de indústrias processadoras (MIRANDA; DUARTE; GARCIA, 2014b).

Trata-se de uma cultura largamente empregada na alimentação humana e animal como fonte energética, devido ao seu alto conteúdo em amido. No entanto, em termos de fonte protéica, apesar de seu potencial, contendo cerca de 10% de proteína na matéria seca do grão, ele é considerado um alimento energético para seres humanos e animais não ruminantes, pois sua principal fração protéica (zeína) é deficiente em aminoácidos essenciais, como a lisina e o triptofano (LOPES; LARKINS, 1993).

A composição bromatológica do grão de milho varia de acordo com o tipo de semente, solo, fertilidade e condições climáticas. Normalmente os grãos de milho contém cerca de 70-75% de carboidratos, 9-11% de proteínas e 3-5% de lipídios (BAJAJ, 1990). Sendo composto por: endosperma (82,3%), embrião (11,5%), pericarpo (5,3%) e ponta (0,8%). Nessas porções da semente são encontradas as proteínas, que em média representam 8,5% do endosperma, 18,5% do embrião, 5,0% do pericarpo e 9,1% da ponta (TOSELLO, 1987).

2.2 Silagem de grão úmido de milho

O emprego da silagem de grãos úmidos de milho tem se constituído em importante tecnologia para reduzir os custos com alimentação em criações de suínos e bovinos leiteiros (JOBIM; BRANCO; SANTOS, 2003). Silagens de grãos úmidos, podem ser uma fonte de alimento econômica quando aliadas a alta produtividade de grãos e eliminação de custos com secagem. 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).

A produção de grãos de alta umidade apresenta diversas vantagens agrônomicas e econômicas que incluem: antecipação da colheita em várias semanas em comparação com a armazenagem à seco, além de reduzir significativamente as perdas no campo em 3 a 6%; soluciona graves problemas de armazenagem de grãos nas fazendas, onde normalmente ocorrem grandes perdas qualitativas e quantitativas, em função do ataque de insetos e de ratos; eliminação dos custos de secagem; e redução no custo da *commoditie* associado com os preços dos grãos sazonais e descontos equivalentes à secagem e outros encargos (MADER; RUST, 2006).

O rendimento da cultura de milho é resultado da interação do potencial genético do cultivar, das práticas de manejo e das condições climáticas durante o desenvolvimento da planta (ZOPOLLATTO, 2007). Dentre as práticas de manejo, a época de semeadura, espaçamento adequado, densidade de plantio, profundidade de semeadura, associados à

adubação e controle de pragas e doenças, juntamente com as condições climáticas, respondem por mais de 50% do potencial produtivo da cultura e, portanto, a fase de estabelecimento da cultura corresponde a uma das etapas mais importantes do processo produtivo. Todos estes fatores podem, de forma isolada ou conjuntamente, atuar nos estádios de desenvolvimento da planta influenciando seu processo produtivo (FILHO; CRUZ, 2001).

2.3 Microbiologia da silagem

A população microbiana das culturas presentes no campo ou daquelas recentemente colhidas é consideravelmente diferente da população encontrada durante o processo de fermentação da silagem ou no produto final, tanto numericamente quanto taxonomicamente (PAHLOW et al., 2003). Muitas destas espécies são bactérias aeróbias facultativas e não contribuem com a preservação da silagem, tendo seu crescimento inibido logo após o fechamento do silo.

Entretanto, as bactérias láticas (BAL) apresentam atuação essencial no processo fermentativo, para a conservação da massa ensilada. As BAL incluem, principalmente, os gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*, produzindo principalmente ácido lático como produto da fermentação dos açúcares.

Além dos microrganismos desejáveis, bactérias anaeróbias do gênero *Clostridium* podem ter efeitos negativos sobre a qualidade da silagem pois fermentam açúcares, ácido lático 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 lático; 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; HENDERSON; HERON, 1991).

Além dos problemas causados com a contaminação por clostrídeos, que se faz, sobretudo durante a colheita, é importante ressaltar também a contaminação com *Listéria*, ocorrendo principalmente nas regiões periféricas do silo. Trata-se de bactérias gram-positivas, que se apresentam na forma de bastonetes curtos e regulares, com alta patogenicidade ao homem e aos animais (JOBIM; GONÇALVES, 2003). O desenvolvimento de *Listéria* nas silagens está diretamente associada à resistência de declínio do pH. Quando o pH for inferior a 5,2 a

Listeria monocytogenes não se desenvolve, sendo inibida em pH mais ácido. Em silagens com pH elevado poderá ocorrer desenvolvimento de *Listéria*, exceto se o teor de MS for muito elevado, ao redor de 70% (JOBIM; GONÇALVES, 2003).

Adicionalmente, outro grupo de microrganismos apresenta efeito negativo sobre a qualidade da silagem. Trata-se das enterobactérias, pertencentes a família *Enterobacteriaceae* que 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 cepas são capazes de deaminar e descarboxilar aminoácidos.

Finalmente, as forragens conservadas também estão sujeitas a contaminações por fungos, como leveduras (unicelulares) e mofo (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; HENDERSON; HERON, 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 a 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 NH₃ que impede o abaixamento do pH da silagem. Os microrganismos aeróbios, como fungos, leveduras e bacilos, degradam o ácido láctico com facilidade após abertura do silo, gerando dióxido de carbono, etanol e ácido acético, além de grande liberação de calor (LINDGREN, 1999), reduzindo a estabilidade aeróbia da silagem.

A estabilidade aeróbia da silagem pode ser definida como a resistência da massa de forragem a degradação após a abertura do silo. Alguns autores definem como o tempo que a silagem leva para atingir temperatura superior a 2°C acima da temperatura ambiente (TAYLOR; KUNG Jr., 2002). Vale ressaltar que a deterioração da silagem está associada principalmente ao desenvolvimento de leveduras e fungos (MUCK; PITT;

LEIBENSPERGER, 1991), embora algumas bactérias possam estar associadas à esse processo (LI; NISHINO, 2011a).

Em conclusão, melhor compreensão da microbiologia da silagem pode nos permitir aperfeiçoar o manejo do processo de conservação, além da possibilidade de desenvolver inoculantes mais apropriados para aumentar a qualidade da silagem.

2.4 Fatores que influenciam na composição das comunidades bacterianas da silagem

A interação entre bactérias e plantas resulta na ocorrência de vários processos biológicos no ambiente e pode ser regulada por diferentes fatores. Considerando que o recíproco reconhecimento ocorre entre as espécies de bactérias e plantas, alterações nos fatores bióticos e abióticos interferem diretamente nesta interação levando a modificações na composição das comunidades bacterianas associadas às plantas (ANDREOTE, 2007).

As comunidades bacterianas associadas às plantas são compostas de grande número de espécies (ARAUJO et al., 2001; CHELIUS; TRIPLETT, 2001; LAMBAIS et al., 2006). Estes grupos bacterianos estão em associação e equilíbrio compondo estas comunidades. As interações estabelecidas entre as diversas espécies bacterianas e as plantas determinam a composição das comunidades bacterianas, que são sensíveis dentre outros fatores, à alterações nos genótipos da planta (HEUER et al., 2002; DUNFIELD; GERMIDA, 2004), do microrganismo (ANDREOTE et al., 2004) ou da presença de patógenos (ARAUJO et al., 2002).

A incorporação de técnicas de biologia molecular ao estudo da microbiologia de silagens também 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).

McEniry et al. (2010) compararam a comunidade microbiana em azevém perene enfardado ou ensilado com duas concentrações de MS (185 e 406 g MS kg⁻¹) durante 0 e 14 dias usando a técnica de T-RFLP. Utilizando um banco de dados apropriado, atribuíram os fragmentos observados a grupos gerais, como por exemplo, BAL, enterobacteria, etc. O fragmento mais abundante foi associado a enterobacteria e foi mais prevalente na fase anterior à ensilagem e nas silagens mais secas, enquanto que os fragmentos associados às BAL se comportaram na direção contrária em relação a estes dois fatores. Apenas três espécies minoritárias foram afetadas pelo sistema de ensilagem.

Em um segundo experimento, azevém perene foi ensilado com e sem compactação e com e sem infiltração de ar, durante 100 dias. Para os 20 fragmentos principais, a maioria não foi afetada por nenhum dos fatores (compactação ou infiltração de ar). Seis fragmentos foram afetados pela compactação, que teve efeito negativo sobre BAL e enterobactérias e efeito positivo sobre clostrídios. Apenas 4 fragmentos foram afetados pela infiltração de ar: duas espécies de clostrídios foram afetadas negativamente e uma espécie de clostrídio e uma de bacilo foram afetadas positivamente.

Naoki e Yuji (2008) compararam a comunidade microbiana de silagem de azevém em mini-silos embalados a vácuo com silagens tipo fardo usando DGGE. As bandas específicas obtidas no gel não foram excisadas e sequenciadas, entretanto verificou-se que o padrão de bandas na porção exterior do fardo foi similar ao padrão encontrado nas silagens armazenadas nos mini-silos. Entretanto, houve diferenças na comunidade microbiana entre fardos e diferentes locais dentro de um mesmo fardo, sugerindo que a variabilidade de campo afetou as espécies microbianas dominantes.

Brusetti et al. (2006) investigaram a utilidade da técnica de LH-PCR ao acompanharem o progresso fermentativo de silagens de milho após 30 dias. *Pediococcus pentosaceus* e *W. confusa* foram as espécies mais prevalentes presentes na ensilagem ambas as espécies estiveram presentes durante todo o período de 30 dias. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* também esteve presente na ensilagem, atingindo seu nível mais alto no sexto dia. Espécies de *Lactobacillus* foram reportadas em vários períodos de tempo durante os 30 dias: *L. plantarum*, em níveis menores durante todo o período; *L. brevis*, dias 6-30; *L. paraplantarum*, dias 13 e 20.

Parvin e Nishino (2009) usaram o DGGE para avaliar alterações microbianas decorrentes do período de estocagem (15 a 180 dias) a partir da ensilagem de capim guiné com duas concentrações de MS (286 e 443 g kg⁻¹). Na silagem mais úmida, *Lactococcus lactis* e *L. brevis* foram as espécies dominantes aos 15 dias, mas a partir do dia 180, *Lactococcus lactis* era representado por uma banda fraca e *L. pentosus* prevaleceu. Esta mudança coincide com a redução da razão lactato: acetato na silagem com o passar do tempo. Na silagem mais seca, duas estirpes de *L. plantarum* foram observadas em adição ao *Lactococcus lactis* e *L. brevis*, previamente mencionados. A banda de *Lactococcus lactis* não diminuiu com o passar do tempo, entretanto surgiu uma banda referente a *L. pentosus* próximo ao dia 180. Nesta silagem a razão lactato: acetato não se alterou com o passar do tempo, mas as concentrações de ambos os ácidos aumentaram.

Parvin e Nishino (2010) avaliaram as alterações na comunidade microbiana durante o período de estocagem (15 a 180 dias) em capim *Rhodes* usando a técnica de DGGE e as bandas proeminentes foram sequenciadas. *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. pentosus* estiveram presentes em todos os períodos mencionados, embora *L. plantarum* tenha parecido ser uma cepa distinta nos primeiros dias em relação aos períodos finais. Aos 15 dias de estocagem, *Lactococcus lactis* aparecia como uma forte banda, bem destacada que se tornou cada vez mais fraca com o decorrer do tempo de estocagem. Aos 90 dias, verificou-se a presença de uma banda fraca de *Escherichia coli*.

Villa et al. (2010) compararam a ensilagem de duas variedades de milho, uma crescida em clima quente e outra em clima frio, na Colômbia. O milho proveniente do clima quente apresentou uma contagem inicial de BAL maior, resultando em um rápido declínio do pH. Na variedade proveniente do clima frio por sua vez, a fermentação foi dominada por espécies de *Lactobacillus* e *Pediococcus* com as populações de ambos os gêneros chegando a um pico ao atingir pH 3,8 aos 7 dias. Na variedade tropical, ambos os gêneros alcançaram o pico populacional aos 2 dias com pH abaixo de 4,0. Entretanto espécies de *Leuconostoc* também contribuíram, atingindo seu pico aos 5 dias quando o pH havia atingido um valor de 3,7.

Estudos recentes tem investigado os efeitos de baixas temperaturas sobre a ensilagem. Wang et al. (2011) avaliaram silagens ensiladas a 0 e 4°C e fizeram amostragens semanais no período de 3 a 8 semanas. Por volta da quinta semana o pH caiu significativamente em ambas as temperaturas avaliadas. Na quinta semana o pH da silagem ensilada a 4°C equivalia a 4,2, significativamente menor que no material ensilado a 0°C. Do mesmo modo, a concentração de ácido acético foi menor do que a de ácido láctico a 4°C.

Pauly e Spörndly (2011) investigaram silagens de milho confeccionadas a 6°C, 12°C e 18°C no primeiro ano e 2,6°C, 6°C, 12°C e 20°C no segundo ano. O valor de pH esteve abaixo de 4,0 por volta dos 20 dias nas duas temperaturas mais altas. A fermentação a 6°C se estabilizou aos 60 dias a um pH de 4,1 em ambos os anos, com uma fermentação com concentração mais baixa de ácidos láctico e acético e maior em etanol do que o ocorrido em temperaturas mais altas. Quando algumas silagens confeccionadas em temperatura de 6°C foram submetidas a temperatura de 18°C após 45 dias e estocadas por período adicional de 61 dias, ocorreu fermentação mais intensa, seguida por redução de pH similar ao verificado em silagens confeccionadas a 18°C, mas com maiores concentrações de ácidos láctico, acético e etanol do que os tratamentos expostos a 18°C.

Aparentemente, o tipo de silo (escala de campo vs. escala laboratorial) ou densidade apresentam apenas pequenos efeitos sobre as espécies dominantes durante a ensilagem

(MUCK, 2013). Existem diferenças consideráveis entre as espécies dominantes ao se comparar diferentes estudos, mas na maioria dos casos espécies de *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Lactococcus* costumam ser as predominantes. O caso mais particular parece ser o ocorrido com a silagem de milho de clima quente mencionada anteriormente, onde espécies de *Weissella* e *Leuconostoc* contribuíram para os estágios iniciais da fermentação.

2.4.1 Impacto do genótipo da planta sobre comunidades bacterianas

O endosperma do milho é um tecido de armazenamento composto principalmente de grânulos de amido, encapsulados em uma matriz protéica, que corresponde a aproximadamente 85% do peso seco do grão (ECKHOFF; PAULSEN, 1996). O amido é um polissacarídeo heterogêneo composto principalmente de moléculas de amilose e de amilopectina, ligadas por pontes de hidrogênio (ROONEY; PFLUGFELDER, 1986). A amilose é um polímero linear de unidades de D-glucose unidas com ligações tipo α -1,4, enquanto que a amilopectina é um polímero ramificado, formado por uma cadeia linear de resíduos de glucose (α -1,4) com pontos de ramificação α -1,6 a cada 20 a 25 unidades. Segundo Kotarski, Wanisha e Thur (1992) a proporção de amilose no grânulo de amido varia de 14 a 34%, enquanto que a amilopectina representa cerca de 70 a 80% do amido nos grãos de milho.

Cerca de 74% da proteína bruta do grão está localizada na matriz protéica do endosperma, sendo os 26% restantes localizados no gérmen do grão (WATSON, 1994). Por constituírem a maior parte do grão, os componentes do endosperma são essenciais na definição de suas propriedades químicas e físicas.

A qualidade nutricional da silagem começa pela escolha do híbrido a ser cultivado, onde a produtividade ainda é fator determinante. O híbrido deve ser adaptado a cada região observando-se o ciclo da cultura. No entanto, deve-se ressaltar que a escolha também deve ser baseada na qualidade do grão, além de serem considerados, sobretudo fatores relativos a sanidade do grão (JOBIM; BRANCO; SANTOS, 2003).

Levando-se em consideração o tipo de endosperma, dois grupos genéticos de cultivares de milho predominam: “*Flint*” (*Zea mays* ssp. *Indentura*), material genético que predomina no Brasil e “*Dent*” (*Zea mays* ssp. *Indentata*), que corresponde à maior parte do milho cultivado nos Estados Unidos. No milho “*Flint*”, as camadas mais externas do endosperma encontram-se totalmente ligadas pela proteína zeína, formando camadas vítreas e extremamente duras, enquanto que nas camadas mais internas há uma pequena proporção de endosperma farináceo,

apresentando núcleo arredondado e não dentado (PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1997).

O grupo genético “*Dent*” é caracterizado pela presença de certa quantidade de zeína, entretanto, as camadas córneas não cobrem toda a superfície do endosperma, conferindo aspecto vítreo apenas nas laterais do grão, e o centro do grão que se estende à coroa apresenta textura farinácea. Ao desidratar, a parte central do grão se endurece para formar uma conformação distinta dentada (BRIEGER; BLUMENSCHNEIN, 1966).

São grandes as variações existentes entre os materiais atualmente disponíveis no mercado, no que diz respeito à produção de MS e composição química. No entanto, algumas características são fundamentais no momento da escolha da cultivar, entre elas o ciclo vegetativo da planta e o tipo de endosperma do grão, o que torna patente, a necessidade de avaliações criteriosas e constantes do material genético disponível e de novos cultivares (FERNANDES et al., 2004).

Além de estar diretamente relacionado com o caráter produtivo, o genótipo das plantas cultivadas é considerado como importante fator para determinar a composição das comunidades bacterianas associadas à estas. A presença de espécies bacterianas no ambiente também é um importante fator na determinação da composição da comunidade bacteriana.

Para determinar tais alterações alguns protocolos estão disponíveis, dentre os quais, as técnicas de microbiologia molecular compõem uma alternativa de grande interesse por permitir a avaliação total da comunidade bacteriana, não limitando a análise à fração cultivável de espécies bacterianas.

Os possíveis efeitos de plantas transgênicas sobre a diversidade bacteriana associada tem sido estudados em várias espécies vegetais, utilizando diferentes plantas transgênicas, com diversas características como por exemplo, a resistência a bacteriose expressando o gene da lisozima (RASCHE et al., 2006). Estas plantas mostraram ter aumento na densidade populacional de *Erwinia* spp. e diminuição na densidade populacional de *Agrobacterium* spp. (HEUER; SMALLA, 1997b). Porém, depois de utilizar técnicas independentes de cultivo, os mesmos autores descrevem fatores ambientais, como por exemplo, a época do ano, como principais fatores determinantes da comunidade bacteriana, ao invés da transgenese (HEUER et al., 2002). Adicionalmente, Andreote (2007) utilizando plantas transgênicas e convencionais de eucalipto de diferentes genótipos, verificou que diferentes plantas não transgênicas podem apresentar comunidades bacterianas mais distintas do que quando os clones não transgênicos são comparados com os transgênicos.

Deve-se notar que a detecção de uma mudança na composição da comunidade bacteriana não indica necessariamente um impacto negativo, mas sim alterações resultantes das diferentes propriedades das cultivares, sendo necessário um maior aprofundamento sobre como diferentes cultivares interagem com suas comunidades associadas.

2.4.2 Impacto do estágio de maturidade da planta sobre comunidades bacterianas

O processo de maturação da planta está associado com o aumento no teor de MS, partindo de menos de 20% no florescimento para mais de 40% quando atinge a maturidade plena (WILKINSON; NEWMAN; ALLEN, 1998). A composição química da silagem de grãos úmidos de milho pode variar em função do teor de umidade no momento da ensilagem, da proporção de sabugo presente, da composição química dos grãos, entre outros fatores. Teores de umidade acima de 35% favorecem as perdas de MS, podendo alterar significativamente os conteúdos de nitrogênio e de carboidratos solúveis (JOBIM; REIS; RODRIGUES, 1997).

O ponto ideal de colheita para grãos úmidos ocorre quando o grão apresenta entre 32 a 36% de umidade, com um mínimo de 26 e um máximo de 40%. O milho muito seco é propenso a rápida deterioração quando retirado do silo ou mesmo durante a armazenagem, se a intensidade e a qualidade de fermentação forem inadequadas. Quando seco demais, o pericarpo em torno dos grãos de milho apresenta-se endurecido, o que acarreta maiores perdas na passagem pelo trato digestório, conseqüentemente, baixo aproveitamento do amido disponível para fermentação no rúmen. Adicionalmente, quanto mais seco o grão, maior será o gasto com energia para moagem. Em contrapartida, o milho muito úmido (mais de 40% de umidade) pode não ter atingido a maturação fisiológica com conseqüente perda do valor nutricional, além de dificultar a debulha levando a maiores perdas na lavoura. A maturação fisiológica (máximo peso e qualidade) ocorre quando o grão atinge entre 36 e 40% de umidade, dependendo do híbrido, clima e outros fatores relacionados ao desenvolvimento da cultura (LAZZARI; LAZZARI, 2001).

A degradabilidade do amido do grão normalmente diminui com o avanço da maturidade. Philippeau e Michalet-Doreau (1997), encontraram redução de 14,4 pontos percentuais (62,2 para 47,8%) e de 18,0 pontos percentuais (87,0 para 69,0%) quando o teor de MS da planta passou de 30 para 35%, respectivamente, para milho duro e milho dentado.

Na produção de silagem de grão úmido em grande escala é crucial que haja sincronia entre o plantio e as atividades relacionadas a ensilagem, para evitar o risco de colher os grãos

muito secos e prejudicar a qualidade da silagem. Na prática, no ponto de colheita, a espiga apresenta-se com as brácteas (palha) secas e o grão já completou a maturação fisiológica. No milho a maturação fisiológica pode ser visualizada pela formação de uma camada preta na base dos grãos, que ocorre normalmente 50 dias após a polinização (JOBIM; BRANCO; SANTOS, 2003).

O conhecimento da dinâmica populacional da comunidade bacteriana da silagem é de grande interesse para determinar os fatores que determinam qualitativa e quantitativamente a composição destas comunidades. Por exemplo, o perfil de espécies que se associam a rizosfera ou a uma raiz vegetal pode ser afetado por diversos fatores como os compostos exsudados pela raiz ou a disponibilidade de água e nutrientes (BAUDOIN; BENIZRI; GUCKERT, 2003). Estes fatores são alterados ao longo do desenvolvimento da planta, o que sugere a ocorrência de uma sucessão de espécies bacterianas colonizando e interagindo com a planta. Deve-se ainda somar a esta complexidade os fatores de interação entre espécies colonizando a mesma planta em dado momento do desenvolvimento vegetal. Diferentes bactérias atuam na competição por nutrientes, colonização de nichos, além de produzirem compostos como antibióticos, sideróforos ou bacteriocinas, que podem atuar de maneira decisiva neste ambiente competitivo.

Andreote (2007) demonstrou que na rizosfera de plantas de tabaco, os diferentes estágios de desenvolvimento foram os principais determinantes da composição da comunidade bacteriana, sejam estas trangênicas ou convencionais.

2.5 Métodos de estudo das comunidades bacterianas

A análise detalhada da diversidade microbiana dentro de um ambiente pode ser dividida em duas categorias amplas: estudos dependentes e independentes de cultivo (JUCK et al., 2000).

2.5.1 Métodos dependentes de cultivo

Em métodos dependentes de cultivo, bactérias são isoladas de amostras ambientais em meio de cultura. Neste caso, a diversidade das comunidades acessadas é normalmente determinada por caracterização fenotípica e genotípica dos isolados obtidos. O problema intrínseco a este tipo de análise é a seleção que ocorre no isolamento para bactérias que possuem a capacidade de se desenvolver nas condições aplicadas, como meio de cultura,

temperatura e atmosfera de incubação. Com isto foi determinado que apenas uma pequena porção da diversidade microbiana total é acessada por meio de técnicas baseadas em cultivo (TYSON; BANFIELD, 2005).

Apesar do avanço em técnicas de cultivo, ainda não é possível cultivar a grande maioria de espécies bacterianas em condições comuns de laboratório, estando dessa forma, a caracterização desses isolados microbianos sujeita a críticas, pois depende de condições ambientais específicas (BAKONYI et al., 2003).

De maneira geral, uma melhor culturabilidade de comunidades bacterianas é de grande interesse, sendo a suplementação de moléculas essenciais e a mimetização do ambiente os pontos mais explorados para obter melhor representação das comunidades bacterianas do ambiente por meio de isolamento e cultivo de seus componentes. No entanto, a combinação de técnicas independentes de cultivo são atualmente, essenciais em estudos que visam acessar alterações nas comunidades bacterianas devido à alterações no ambiente (ANDREOTE, 2007).

2.5.2 Métodos independentes de cultivo

As análises dependentes de meios de cultura são limitadas pelo fato de menos de 1% dos microrganismos presentes no solo serem cultiváveis sob as condições laboratoriais atuais, esse baixo índice é provavelmente muito similar a outros nichos microbianos (SCHMEISSER; STEELE; STREIT, 2007). Considerando que as técnicas de isolamento normalmente utilizadas para avaliar a comunidade microbiana não permitem o estudo de microrganismos não cultiváveis, ocorre uma restrição do estudo somente a grupos já conhecidos. A busca por novas estratégias e ferramentas capazes de analisar essa parcela bastante significativa da comunidade microbiana ocasionou o desenvolvimento de técnicas baseadas em PCR, como T-RFLP, FISH, RISA, ARISA, DGGE, entre outros. O uso de sequências previamente conhecidas leva a detecção de organismos e enzimas com grande similaridade aos já existentes em bancos de dados.

A maioria das técnicas moleculares aplicadas a estudos microbiológicos baseia-se nas diferenças de composição dos genes ribossomais. Em bactérias, o gene 16S ribossomal (16SDNA_r) é o mais amplamente utilizado (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995), sendo considerado uma das mais importantes moléculas para o estudo de filogenia e ecologia microbiana (LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999). O sequenciamento desse gene permite a identificação de microrganismos a nível de gênero e possivelmente no nível de

espécie, como também pode permitir correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHENEY et al., 2000). A diversidade bacteriana foi acessada em vários ambientes baseando-se nos genes 16S DNAr dos seus componentes, revelando a grande diversidade que deixa de ser explorada quando apenas os métodos baseados em cultivo são aplicados (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998; PROSSER et al., 2007).

Neste aspecto, as técnicas independentes de cultivo tem contribuído para o conhecimento da diversidade desses microrganismos e do potencial biotecnológico das comunidades microbianas e processos ainda não explorados (LEE; WONG, 2009; MARQUES et al., 2008). Algumas destas técnicas permitem a obtenção de uma fotografia da comunidade bacteriana, e então, a aplicação de técnicas de estatística, como a análise de componentes principais para determinar se existem diferenças significativas nas comunidades.

2.5.2.1 Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

Considerando a análise direta de amostras ambientais, das metodologias baseadas no gene 16S DNAr para o estudo de populações microbianas complexas, o DGGE identifica diferenças baseadas no comportamento desnaturante da dupla fita de DNA. Neste caso, o ambiente desnaturante é criado pela combinação uniforme de temperatura de corrida à 60°C e um gradiente desnaturante linear de uréia e formamida (MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993; HEUER; SMALLA, 1997a). Apresenta alta resolução na qual um grande número de amostras pode ser rapidamente comparado revelando a dinâmica de comunidades microbianas (MUYZER; SMALLA, 1998).

Moléculas de DNA com o mesmo tamanho, mas, com sequências diferentes de nucleotídeos, apresentam comportamento eletroforético distinto quando expostas ao gradiente de agentes desnaturantes (MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993). A sequência de nucleotídeos de um fragmento de DNA definirá a posição no gradiente em que o DNA de fita dupla irá desnaturar-se passando a fita simples, interrompendo sua migração no gel. Uma vez que moléculas de DNA, com sequências diferentes, apresentam taxas de migração diferentes em géis desnaturantes, essa metodologia é ferramenta poderosa para estudos ecológicos com microrganismos, incluindo levantamentos e comparações na composição e diversidade de comunidades microbianas (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000).

O DGGE tem recebido atenção especial por ter sido utilizado em diferentes habitats naturais com sucesso na detecção de variações na comunidade microbiana decorrente da

presença de agroquímicos (FANTROUSSI et al., 1999), poluentes (BRIM et al., 1999), variação nutricional e fisiológica da planta hospedeira (HENCKEL; FRIEDRICH; CONRAD, 1999), para estudar a comunidade microbiana associada às plantas transgênicas (HEUER; SMALLA, 1997b) e endofítica (GARBEVA et al., 2001), além de acessar a comunidade microbiana de silagens (NAOKI; YUJI, 2008; PARVIN; NISHINO, 2009; PARVIN; NISHINO, 2010; PARVIN et al., 2010; LI; NISHINO; LI, 2011), tendo como limite de detecção, grupos que representam ao menos 1% da comunidade bacteriana total (ANDREOTE, 2007). Adicionalmente, a técnica vem apresentando alta eficiência em demonstrar variabilidade dentro das comunidades e fazer comparações entre amostras e tratamentos específicos (THIES, 2007; GABRIEL, 2010).

2.5.2.2 Análise de Restrição do DNA Ribossomal (ARDRA – *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)

Esta técnica é baseada no grau de conservação dos sítios de restrição do rDNA que reflete padrões filogenéticos. Consiste na amplificação e posterior digestão do DNAr com enzimas de restrição, formando grupos de acordo com a similaridade das bandas observadas. Estas alterações nos perfis de bandas mostram a diversidade entre e dentro dos grupos bacterianos cultivados, agrupando os indivíduos de genótipos semelhantes (MOCALI et al., 2003; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Esta técnica pode também ser utilizada de maneira complementar aos dados de isolamento, como por exemplo, na caracterização de isolados por padrões de restrição de determinados genes, onde o polimorfismo de genes ribossomais é acessado. Tal técnica tem sido usada como ferramenta molecular rápida, barata e eficaz no intuito de filtrar, agrupar e diferenciar o grande número de colônias obidas em isolamento (HEYNDRIX et al., 1996; RAMSING et al., 1996; TESKE et al., 1996; VAN ELSAS et al., 1998; MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993; OVERMANN; COOLEN; TUSCHAK, 1999; GURTNER et al., 2001).

2.5.2.3 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR – *Real Time Quantitative PCR*)

A PCR em tempo real é ferramenta altamente sensível, capaz de detectar e quantificar os produtos de amplificação de reações de PCR. Esta detecção é realizada por meio de marcadores fluorescentes presentes na reação de amplificação. O marcador fluorescente mais comumente utilizado é o corante SYBR Green I, o qual possui a capacidade de se intercalar à

dupla fita de DNA e emitir o sinal fluorescente, quando excitado, no comprimento de onda de 494 a 521 nm (ANDREOTE, 2007). O sinal emitido é então quantificado e utilizado para determinar a quantidade de amplificação presente neste momento na reação. Com o decorrer da amplificação, quando um valor arbitrário de amplificação é atingido, se alcança o valor chamado de Ct (limiar do ciclo de detecção – *cycle threshold*). Este valor de Ct é utilizado na estimativa de quantidade de DNA presente inicialmente na reação de PCR.

Quando se pretende quantificar espécies específicas presentes em uma amostra, pode-se utilizar a técnica de PCR quantitativo em tempo real. Metodologia como esta é muito útil para acompanhar espécies que você já espera encontrar em determinado ambiente, como por exemplo, no estudo realizado por Schmidt, Emara e Kung (2008) em que os autores realizaram comparações entre os níveis de *L. buchneri* em silagens tratadas ou não com inoculantes. A técnica de PCR quantitativo foi bem sucedida em identificar e quantificar a população de *L. buchneri* nas amostras de silagens de milho.

2.5.2.4 Heterogeneidade de Dimensão de Fragmentos de PCR (LH-PCR – *Length Heterogeneity PCR*)

A técnica de LH-PCR usa a variação no comprimento de um gene entre diferentes espécies microbianas afim de determinar quantas espécies podem estar ativas em um ambiente. A separação do DNA amplificado é realizada via eletroforese. A análise dos perfis baseia-se na variação inerente aos tamanhos das sequências das regiões variáveis do gene 16S rRNA (TALBOT et al., 2008). Os polimorfismos naturais das moléculas refletem os tamanhos dos fragmentos obtidos na amplificação por PCR. Num eletroferograma de LH-PCR, os picos correspondem a genes de rRNA que foram amplificados. A abundância relativa do gene (medida como fluorescência relativa) é representada em função do tamanho das moléculas.

A maior vantagem deste método é o fato de ser uma forma rápida de analisar e comparar comunidades considerando um grande número de amostras (BERNHARD et al., 2005). Entretanto, uma desvantagem é que múltiplos organismos, que não se relacionam filogeneticamente, podem originar fragmentos com o mesmo tamanho e não se distinguem uns dos outros no perfil. No entanto, o objetivo de um método como este é fornecer um padrão global da comunidade, em vez de identificar cada espécie ou gênero em termos individuais. A heterogeneidade dos tamanhos de fragmentos tem sido usada para estimar a diversidade bacteriana numa variedade de ecossistemas e analisar a dinâmica da comunidade

microbiana (BERNHARD et al., 2005; KOLEHMAINEN; TIIROLA; PUHAKKA, 2008; MILLS et al., 2003; RITCHIE et al., 2000), inclusive em silagens (BRUSETTI et al., 2006, 2008).

2.5.2.5 Polimorfismo do Tamanho e Composição de Bases de Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP - *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*)

O T-RFLP é um método molecular quantitativo para análises rápidas de comunidades microbianas complexas (LIU et al., 1997). Nessa técnica, os passos iniciais de extração do DNA, amplificação por PCR e restrição assemelham-se aos utilizados na técnica de ARDRA. No entanto, um dos *primers* utilizados é marcado com fluorocromo. Com o sequenciamento do material, o tamanho dos fragmentos terminais de restrição (T-RF) pode ser determinado, e a sua quantidade, estimada.

Com base na localização terminal do marcador fluorescente nos produtos de PCR, pode-se garantir que apenas os fragmentos terminais sejam medidos. A riqueza de espécies de comunidades microbianas é estimada pela determinação do número de fragmentos terminais, observados com a digestão dos rDNAs totais das comunidades amplificadas por PCR. O padrão de T-RFLP percebido é um conjunto do número de fragmentos com tamanho único e a abundância relativa de cada fragmento é refletida pelo tamanho de cada pico no eletroferograma. As amostras são corridas em gel de poliacrilamida e cada banda fluorescente corresponde a uma única população, a intensidade de cada banda é diretamente proporcional à quantidade do produto de PCR, dando indicação aproximada da abundância da população na comunidade.

2.5.3 Técnicas independentes de cultivo aplicadas ao estudo da microbiologia de silagens

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

Pelo menos quatro técnicas tem sido usadas em estudos sobre comunidades microbianas em silagens: *length heterogeneity PCR* (LH-PCR), *terminal restriction fragment length polymorphism* (T-RFLP), *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) and *automated*

ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). Todas as quatro técnicas utilizam a PCR para amplificar uma porção do DNA microbiano e então vários métodos podem ser utilizados para separar o DNA amplificado (MUCK, 2013).

Graças ao acesso mais abrangente à microbiologia de silagens, as novas técnicas de análise de comunidade possibilitam melhor entendimento sobre a dinâmica da população microbiana dentro do silo com o passar do tempo, permitem também, a identificação de novas espécies no material ensilado (Tabelas 1 e 2), além das BAL comumente reportadas. Apesar disso, tais técnicas tem corroborado que na maioria dos casos, as espécies predominantes na massa ensilada são as espécies tradicionalmente associadas com a silagem.

Tabela 1 - Espécies microbianas recentemente isoladas de silagens

(continua)

Espécies	Tipo de silagem	Referência
BAL		
<i>Enterococcus flavescens</i>	Milho	Brusetti et al. (2006)
<i>Enterococcus mundti</i>	Palhada de Milho	Pang et al. (2011b)
<i>Lactobacillus acetolerans</i>	Milho	Li e Nishino (2011b)
<i>Lactobacillus panis</i>	Milho	Li e Nishino (2011b)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Milho	Li e Nishino (2011b)
<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	Desconhecida	Wang et al. (2009)
<i>Lactobacillus zeae</i>	Alfafa	Rossi e Dellaglio (2007)
<i>Leuconostoc lactis</i>	Palhada de Milho	Pang et al. (2011b)
<i>Paralactobacillus selangorensis</i>	Azevém Italiano	Parvin et al. (2010)
<i>Pediococcus dextrinicus</i>	Azevém Italiano	Parvin et al. (2010)
<i>Pediococcus lolii</i>	Azevém	Doi et al. (2009)
<i>Pediococcus parvulus</i>	Milho	Li, Nishino e Li (2011)
<i>Weissella cibaria</i>	Milho e Palhada de milho	Pang et al. (2011a,b)
<i>Weissella kimchii</i>	Milho	Brusetti et al. (2006)
<i>Weissella paramesenteriodes</i>	Milho	Li, Nishino e Li (2011)
Anaeróbios Formadores		
de Esporos		
<i>Clostridium baratii</i>	Milho	Rossi e Dellaglio (2007)
<i>Paenibacillus macerans</i>	Milho	Rossi e Dellaglio (2007)
Bacilos		

Tabela 1 - Espécies microbianas recentemente isoladas de silagens

(conclusão)

Espécies	Tipo de silagem	Referência
<i>Bacillus megaterium</i>	Milho	Brusetti et al. (2006)
<i>Enterobacteria</i>		
<i>Erwinia persicina</i>	Azevém Italiano	Li e Nishino (2011a)
<i>Pantoea agglomerans</i>	Azevém Italiano	Li e Nishino (2011a)
<i>Rahnella aquatilis</i>	Azevém Italiano	Li e Nishino (2011a)
Bactéria Ácido Acética		
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Milho	Li e Nishino (2011b)
Leveduras		
<i>Candida apicola</i>	Milho e Azevém Italiano	Rossi e Dellaglio (2007)
<i>Candida intermedia</i>	Milho	Li, Nishino e Li (2011)
<i>Candida glabrata</i>	Milho	Li, Nishino e Li (2011)
<i>Candida magnolia</i>	Milho	Li, Nishino e Li (2011)
<i>Candida mesenterica</i>	Milho	Rossi e Dellaglio (2007)
<i>Candida quercitrusa</i>	Milho	Li, Nishino e Li (2011)
<i>Saccharomyces martiniae</i>	Milho	Li, Nishino e Li (2011)
<i>Pichia deserticola</i>	Milho	Li, Nishino e Li (2011)
<i>Pichia fermentans</i>	Milho	Rossi e Dellaglio (2007)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Milho	Li, Nishino e Li (2011)

Fonte: adaptada de Muck (2013)

Brusetti et al. (2006) utilizaram LH-PCR para acompanhar o desenvolvimento de BAL durante a ensilagem de milho obtendo sucesso em identificar a maioria das espécies normalmente encontradas em silagens. Entretanto duas das espécies identificadas, *Weissella confusa* e *W. kimchii*, apresentaram fragmentos de comprimento idênticos e portanto não puderam ser diferenciados por LH-PCR. Da mesma maneira, espécies de *Enterobacter* identificadas no estudo apresentaram o mesmo comprimento de fragmentos. Adicionalmente, um número substancial de picos (29-58%) não foram identificados. Em 2008, o mesmo grupo utilizou ARISA e LH-PCR para acessar comunidades bacterianas em silagem de milho, tendo utilizado a técnica de PCR para identificar 388 isolados a partir de placas de MRS ágar, identificando 11 espécies diferentes. No entanto, nenhuma tentativa foi feita para comparar estes isolados com qualquer pico de qualquer uma das técnicas ARISA ou LH-PCR. Dessa

forma os autores não foram capazes de determinar qual método foi mais acurado em descrever diferenças entre as silagens (BRUSETTI et al., 2008).

Para investigar a dinâmica da comunidade microbiana de silagens McEniry et al. (2008, 2010) utilizaram a técnica de T-RFLP. O gene 16S rRNA foi amplificado, digerido com a endonuclease *MspI*, e então separado por eletroforese. A técnica detectou mudanças na comunidade com o tempo (0, 2, 6, 14, 35 e 98 dias) e com o método de ensilagem (enfardado ou silagem picada). Entretanto, devido ao fato de múltiplas espécies poderem apresentar fragmentos de igual comprimento, a diferenciação destas espécies não foi possível (McENIRY et al., 2008).

Li, Nishino e Li (2011) amplificaram a região V3 do gene bacteriano 16S rRNA e o gene fúngico 18S rRNA e analisaram por DGGE. A vantagem deste procedimento é a possibilidade de excisão das bandas do gel e então proceder ao uso de técnicas de PCR/BLAST para identificar as espécies que produziram cada banda. Outros autores também procederam a análise de comunidade por meio da técnica de DGGE em silagens (NAOKI; YUJI, 2008; PARVIN; NISHINO, 2009, 2010; PARVIN et al., 2010; Li; NISHINO, 2011a, 2011b).

Muitas novas espécies identificadas em silagens já tiveram nomes propostos, como *Lactobacillus taiwanensis* (WANG et al., 2009) e *Pediococcus lolii* (DOI et al., 2009), além de muitas outras espécies identificadas ainda mais recentemente (Tabela 2) como: *L. nasuensis*, *L. coryniformis* ssp. *torquens*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. hokkaidonensis*, *L. iwatensis* e *L. backii*.

Tabela 2 - Espécies bacterianas recentemente isoladas de silagem

Espécies	Tipo de silagem	Referência
<i>Lactobacillus nasuensis</i>	<i>Sorghum sudanense</i> (Sudan grass)	Cai et al. (2012)
<i>Lactobacillus coryniformis</i> ssp. <i>torquens</i>	Azevém italiano	Tohno et al. (2012)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	Azevém italiano	Tohno et al. (2012)
<i>Lactobacillus hokkaidonensis</i>	<i>Phleum pratense</i> L. (Timothy grass)	Tohno et al. (2013)
<i>Lactobacillus iwatensis</i>	<i>Dactylis glomerata</i> L. (orchardgrass)	Tohno et al. (2013b)
<i>Lactobacillus backii</i>	<i>Dactylis glomerata</i> L. (orchardgrass)	Tohno et al. (2013b)

Em geral, estudos baseados na técnica de PCR possibilitaram a descoberta destas novas espécies. Como era de se esperar, na maioria dos casos representantes dos grupos das BAL

dominam dentre outras espécies presentes na comunidade bacteriana de silagens. Entretanto, a contribuição das novas espécies para o processo fermentativo que ocorre no interior do silo ainda é desconhecida (MUCK, 2013).

Todas as técnicas descritas acima permitem uma comparação rápida das comunidades nos diferentes tratamentos. Dentre as três técnicas descritas que separam o DNA em função de seu comprimento (LH-PCR, T-RFLP e ARISA), pode parecer que ARISA provavelmente seja a técnica que apresenta a menor probabilidade de obter múltiplas espécies possuindo fragmentos de mesmo comprimento, o que está associado a hipervariabilidade existente no espaço intergênico de bactérias. Entretanto existe a possibilidade de uma mesma espécie produzir mais de uma banda na técnica de ARISA, fazendo com que a diversidade de uma determinada comunidade pareça maior do que realmente é. Já a análise de DGGE, por ser dependente de eletroforese em gel, apresenta caráter qualitativo e, portanto, variável ao se analisar um gel com outro, ao se comparar com as técnicas que utilizam a eletroforese capilar. Por outro lado, a técnica possui a vantagem de permitir a excisão e clonagem de bandas por PCR para posterior identificação de espécies.

3 OBJETIVOS E HIPÓTESE

3.1 Objetivo geral

Determinar a influência de genótipo, estágio de maturidade e tempo de estocagem na composição de comunidades bacterianas em silagens de grãos úmidos de milho.

3.1.1 Objetivos específicos

- Extração de DNA e amplificação do gene 16S DNAr por PCR.
- Determinar a alteração nas comunidades bacterianas com base em análises independentes de cultivo (DGGE e sequenciamento da região V6 do gene ribossomal 16S DNAr).

3.2 Hipótese

O presente trabalho teve como hipótese o fato de que a comunidade bacteriana em silagem de grão úmido de milho é afetada pelo tempo de estocagem, genótipo e estágio de maturidade da planta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Implantação do experimento em campo

A fase de campo do experimento foi conduzida na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) no município de Pindorama, no Estado de São Paulo. A cidade de Pindorama está localizada na latitude 21° 11' 12'' Sul e longitude 48° 54' 34'' Oeste, com altitude de 542 m. O clima da região é Aw (clima tropical com estação seca) segundo classificação de Köppen-Geiger.

A semeadura do milho ocorreu em novembro de 2012 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).

Efetuuou-se adubações de semeadura (30 kg/ha de N e 60 a 70 kg/ha de K₂O) de acordo com o resultado de análise do solo e posteriormente adubações de cobertura, sendo a primeira com 300 kg/ha da fórmula NPK 20-0-20 (até o estágio de 4/6 folhas, aproximadamente 21 dias após a semeadura) e a segunda com 40 kg/ha de nitrogênio na forma de sulfato de amônio (até o estágio de 8 folhas, aproximadamente 35 dias após a semeadura). Adicionalmente, realizou-se o controle da lagarta-do-cartucho por meio de pulverizador costal.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com esquema fatorial 2×3×5: dois genótipos (duro e macio), três pontos de maturação (ponto de planta inteira, ponto de grão úmido e ponto de grão seco “reconstituído”) e três períodos de estocagem (0, 7 e 120 dias), com 4 repetições como parcelas no campo. A parcela experimental foi constituída por seis linhas (duas linhas para ponto de planta inteira, duas linhas para grão úmido e duas linhas para grão seco) de 5 m espaçadas de 80 cm entre linhas (Figura 1).

Figura 1 - Representação da parcela experimental, mostrando a distribuição das linhas para colheita nos pontos de maturação. Os prefixos PI, GU e GSR referen-se aos pontos de maturidade de planta inteira, ponto de grão úmido e ponto de grão seco reconstituído, respectivamente

As colheitas foram definidas de acordo com o teor de MS da planta ou teor de umidade do grão. Os tratamentos foram constituídos por híbridos de milho AG-1051, que neste trabalho será representado pela sigla HB e IAC-8390, representado pela sigla HA, representantes dos grupos “dent” (macio) e “flint”, (duro) respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Características agronômicas das cultivares de milho utilizadas no experimento

Características	AG-1051 (HB)	IAC-8390 (HA)
Transgênica/Convencional	Convencional	Convencional
Tipo	Híbrido duplo	Híbrido intervarietal
Ciclo	Semiprecoce	Normal
Graus dia/dia ¹	950	860
Época de plantio ²	C/N/T/S	C/N/S
Uso ³	G/SPI/MV	G/SPI
Cor do grão	Amarelo	Alaranjado
Densidade (pl/ha) ⁴	45-50	55-60
Textura do grão	Dentado	Semiduro
Resistência ao acamamento	Alta	Alta
Altura da espiga (m)	1,60	1,30
Altura da planta (m)	2,60	2,40
Nível de tecnologia	Média/Alta	Média/Alta
Empresa	Sementes Agrocere	Agro-Sena

Fonte: Embrapa Milho e Sorgo

¹ Graus Dias/dias: valores sem especificação se referem a graus dias em °C

² Época de Plantio : C - Cedo; N - Normal; T - Tarde; S – Safrinha

³ Uso : G - Grãos; SPI - Silagem da planta inteira; Milho verde

⁴ Densidade de plantas : mil plantas na safra/mil plantas na safrinha

4.2 Momento da colheita

As plantas de milho de onde foram obtidas as amostras de grãos, foram colhidas em três estágios de maturidade distintos: ponto de silagem de planta inteira (30 a 35% de MS na planta inteira), ponto de silagem de grão úmido (28 a 33% de umidade no grão) e ponto de colheita de grão seco (15 a 20% de umidade no grão). Para a determinação do ponto de colheita a triagem do teor de MS foi realizada a cada sete dias. As avaliações dos teores de matéria seca para determinação do momento da colheita dos grãos foram realizadas em estufa a 55°C. As etapas subsequentes foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da ESALQ-USP, em Piracicaba-SP.

4.3 Confeção dos mini silos

Os grãos resultantes da debulha manual das espigas colhidas nos três momentos de colheita foram moídos em triturador estacionário TRF 70 (Metalúrgica Trapp Ltda.) com peneira de 12 mm. Após a moagem, 500 g do material foi acondicionado em sacos plásticos (mini-bags) com 0,18 mm de espessura e dimensões 22 cm x 35 cm, tendo sido selados a vácuo por embaladora modelo JET 25 (JETVAC^R) para garantir a ausência de oxigênio no interior dos “mini bags”.

Os grãos de milho colhidos nos pontos “planta inteira” e “grão úmido” foram ensilados com umidade original. Os grãos secos, colhidos com 15 a 20% de umidade, foram reconstituídos com adição de água destilada até atingir 30 a 33% de umidade. As médias dos teores de umidade dos híbridos avaliados estão apresentadas na Tabela 4.

Confeccionou-se um mini bag por tempo de abertura (0, 7 e 120 dias), para cada repetição (parcelas no campo), totalizando 24 mini bags. Os mini bags correspondentes ao tempo zero foram congelados, imediatamente após o preparo, em freezer a -20°C. Os demais mini bags foram mantidos no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, onde permaneceram armazenados em temperatura ambiente até o dia correspondente às aberturas planejadas. Em cada momento de abertura foram realizadas amostragens para os estudos da diversidade microbiológica, sendo que as amostras foram mantidas a -20°C até o momento das análises laboratoriais pertinentes.

Tabela 4 - Média dos teores de umidade (%) de grãos de híbridos de milho IAC 8390 e AG1051 nos diferentes pontos de maturidade

Híbrido	Planta inteira ¹	Grão úmido	Grão seco reconstituído ²
IAC8390	45,22	28,87	32,09
AG1051	49,37	32,95	31,11

¹Os teores de MS das plantas no ponto “planta inteira” foram 33,6% (IAC8390) e 31,5% (AG1051)

²Os teores de umidade dos grãos secos antes da reconstituição foram 16,96% (IAC8390) e 20,30% (AG1051)

4.4 Estudos de diversidade microbiológica

4.4.1 Extração de DNA

Para extração do DNA total da silagem, foram realizadas amostragens de aproximadamente 300 mg de silagem referente a cada repetição. Estas amostras foram então submetidas à extração do DNA por meio de um protocolo laboratorial. Neste, 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 tubo Eppendorf de 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 Eppendorf. Ao sobrenadante acrescentou-se 10 µL de acetato de sódio 5 M (pH 5,2) e 400 µL de isopropanol.

Os tubos foram invertidos algumas vezes para homogeneização da mistura e armazenados em freezer 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. Em seguida, 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 eficiência da extração foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA), onde foram aplicados 5 µl do DNA extraído, adicionado de 3 µl de *Loading buffer* 6x (Azul de bromofenol 0,05% (p/v); Sacarose 40% (p/v); EDTA 0,1 M (pH 8,0); SDS 0,025% (p/v). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo, sendo visualizado e fotodocumentado em luz UV. Em média, as extrações resultaram numa concentração de 50 ng de DNA por µL.

4.4.2 Análise da estrutura bacteriana por meio da técnica de PCR-DGGE

A amplificação do fragmento de interesse ocorreu em duas etapas sendo a primeira efetuada com os *primers* 799F e 1492R (CHELIUS; TRIPLETT, 2001), descritos na tabela 5. As condições da reação de PCR foram as seguintes: 95°C por 3 min; 35 ciclos de 94°C por 20

s; 53°C por 40 s e 72°C por 40 s; seguido de uma extensão final de 72°C por 7 min. Utilizando-se 2 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM dNTP (Invitrogen Corporation, USA); 0,03 U/ μ L de Taq polimerase (Invitrogen Corporation, USA); tampão para Taq polimerase 1X (Tris-HCl 1 mmol. l^{-1} , pH 9,0 e KCl 5 mmol. L^{-1}) (Invitrogen Corporation, USA); 0,40 pmol/ μ L de cada *primer*; 50 ng de DNA molde e água Mili-Q para completar o volume da reação. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Uma segunda reação de PCR (*nested*) foi efetuada, utilizando-se os *primers* U968-GC e R1378 (HEUER et al., 1997), descritos na tabela 5. As condições empregadas na reação de PCR foram: 94°C por 4 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min; 56°C por 1 min e 72°C por 2 min; seguido de uma extensão final de 72°C por 10 min. Utilizando-se 2,5 mM de $MgCl_2$; 0,2 mM de dNTP (Invitrogen Corporation, USA); 0,05 U/ μ L de Taq polimerase (Invitrogen Corporation, USA); tampão para Taq polimerase 1X (Tris-HCl 1 mmol. l^{-1} , pH 9,0 e KCl 5 mmol. L^{-1}) (Invitrogen Corporation, USA); 0,40 pmol/ μ L de cada *primer* e 1 μ L do produto da PCR anterior diluído 10X e água Mili-Q para completar o volume da reação. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

A confirmação dos produtos de amplificação, de ambas as reações, foram analisados em géis de agarose 1% (p/v) em tampão TAE, utilizando 5 μ L de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, Brasil) como padrão molecular. O gel foi submetido a um campo elétrico de 100 V por aproximadamente 40 min e, posteriormente, fotodocumentado.

Tabela 5 - *Primers* usados para amplificação do gene 16S a partir das amostras de silagens analisadas no estudo

Primer	Sequências (5'→ 3')	Alvo	Referência
27F	GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG	Gene 16S DNAr bacteriano	Lane et al. (1985)
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Gene 16S DNAr bacteriano	Chelius e Triplett (2001)
799F	AAC MGG ATT AGA TAC CCK G	Gene 16S DNAr bacteriano	Chelius e Triplett (2001)
1378R	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG	Gene 16S DNAr bacteriano	Heuer et al. (1997)
U968_GC	.gc- CGA ACG CGA AGA ACC TTA C	Gene 16S DNAr bacteriano (análise de DGGE)	Heuer et al. (1997)
.gc	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	Gene 16S DNAr bacteriano (análise de DGGE)	Heuer et al. (1997)

*M: A ou C; K: G ou T

Os procedimentos utilizados nas análises de DGGE foram adaptados com base na metodologia adotada por Haichar et al. (2008). As análises foram efetuadas com o apoio do equipamento *phorU2* (Ingeny, Goes, Holanda) em gel de acrilamida 6%, com gradiente de desnaturação de 45-65% e campo elétrico de 100 V por 16 h à 60°C.

Para o preparo do gel os respectivos gradientes de 45% (*Low*) e 65% (*High*) foram obtidos misturando-se as soluções A (Acrilamida 6%) e B (Acrilamida 6%, Uréia 5,6 M e Formamida deionizada 32%) e adicionando 75 µL de APS 20% e 12 µL de TEMED, em cada uma das soluções. Em seguida, as soluções foram preparadas com o auxílio de bomba misturadora e aguardou-se a polimerização do gel por aproximadamente 50 min.

Em seguida, o gel *Stacking* foi confeccionado com: 7 mL de poliacrilamida da solução A, 45 μ L de APS 20% e 10 μ L de TEMED, aguardando-se 60 min para a polimerização do mesmo. Aproximadamente 9 μ L do produto de PCR, juntamente com 3 μ L de tampão de carregamento foram aplicados no gel e, então, este foi submetido às condições de voltagem, temperatura e tempo acima citadas.

Os géis foram corados com 15 mL de TAE 0,5X e 3 μ L de gel red por 30 min e, então, fotodocumentados em um *Scanner HP G4050* (HP Hewlett Packard), sendo a imagem salva no formato *tif*. As imagens resultantes foram usadas para conversão dos géis em matrizes de presença e ausência de bandas com o software *ImageQuant TL unidimensional* (Amersham Biosciences, Amersham, UK, v. 2003) (McCAIG; GLOVER; PROSSER, 2001).

4.4.2.1 Análise multivariada aplicada aos perfis de PCR-DGGE

Com a ampla utilização da técnica de PCR-DGGE no estudo de comunidades bacterianas, a simples comparação visual entre os perfis das comunidades passou a não fornecer toda a informação possível de ser obtida por meio da aplicação desta técnica. Desta maneira os perfis de DGGE podem ser utilizados para a aplicação de diferentes técnicas de análise, que se iniciou por comparação das curvas densitométricas e, posteriormente, na utilização dos dados (qualitativos ou quantitativos) gerados em análise multivariada.

A aplicação da análise multivariada em estudos de comunidades bacterianas é recente, tendo como principal vantagem a avaliação conjunta de vários fatores envolvidos na composição das comunidades bacterianas. Os fatores determinantes da comunidade de bactérias de solo foram os primeiros a serem estudados utilizando esta estratégia (STEENWERTH et al., 2002). Da mesma forma, este tipo de análise também tem sido aplicada em estudos sobre a composição microbiana em silagens (ROSSI; DELLAGLIO, 2007; McENIRY et al., 2008; NAOKI; YUJI, 2008; BRUSETTI et al., 2008; McENIRY et al., 2010; DOLCI et al., 2011; LI; NISHINO, 2011b).

Para aplicação da técnica de análise multivariada em dados de PCR-DGGE, as imagens dos géis, normalizadas e convertidas, são transformadas em matrizes de presença/ausência de bandas que passam a ser tratadas como espécies. Da mesma maneira, as intensidades relativas das bandas são consideradas a frequência de ocorrência destas espécies nas comunidades bacterianas a serem avaliadas (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004). O software PAST 1.90 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001) foi utilizado para a análise dos dados do DGGE. Com a finalidade de avaliar a similaridade entre os grupos observados, procedeu-se a

utilização da análise multivariada por meio da Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinates Analysis – PCoA*), a partir dos números obtidos com base na elaboração das matrizes de presença e ausência. Para se testar a ocorrência de significância para as separações das comunidades agrupadas na *PCoA*, procedeu-se a análise de similaridade de ANOSIM. Trata-se de um teste não paramétrico usado para observar diferenças significativas entre dois ou mais grupos, obtendo-se um R estatístico significativo para qualquer medida de distância (CLARKE, 1993).

4.4.3 Análise da diversidade filogenética pelo sistema MiSeq™ (Illumina)

As amostras foram submetidas ao sequenciamento por meio da plataforma de nova geração MiSeq™ System (Illumina) realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ-USP, Piracicaba-SP. Esta técnica baseia-se na identificação dos grupos bacterianos presentes nas amostras ambientais por meio do sequenciamento de regiões específicas do gene codificador para o RNA funcional da sub-unidade 16S do ribossomo.

A variação na sequência do gene ribossomal 16S é largamente utilizada para caracterizar diversidades taxonômicas presentes em comunidades bacterianas (AMANN et al., 1995). O gene 16S é composto por 9 regiões hipervariáveis que são interpostas por regiões conservadas. A sequência do gene 16S RNAr e suas regiões hipervariáveis tem sido determinada em vários grupos de organismos e está disponível em bancos de dados como por exemplo o *Ribosomal database project*.

A fim de sequenciar a região V4, os *primers* a serem utilizados foram desenhados de forma a não amplificar as regiões vizinhas da sequência alvo. Para tanto, o DNA extraído das amostras foi amplificado com *primers* flanqueadores da regiões V4 deste gene, usando um mix de 4 *primers forward* e um mix de 4 *primers reverse* (Tabela 6). Esta mistura contém pré adaptadores que visam amostrar o maior número de grupos bacterianos possíveis dentro da amostra a ser analisada, como descrito no *Ribosomal Data Project*.

Tabela 6 - Mix de *primers* utilizados na reação de PCR para sequenciamento da região V4 ribossomal

Primer	Sequências (5'→ 3')
16SV4FPCR1_1 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4FPCR1_2 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGNAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4FPCR1_3 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGNNAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4FPCR1_4 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAA GAGACAGNNNAYTGGGYDTAAAGNG
16SV4RPCR1_1 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGCCGTCAATTCMTTTRAGT
16SV4RPCR1_2 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGNCCGTCAATTCMTTTRAGT
16SV4RPCR1_3 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGNNCCGTCAATTCMTTTRAGT
16SV4RPCR1_4 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGNNNCCGTCAATTCMTTTRAGT

Sequenciamento realizado na plataforma da Illumina pelo sistema MiSeq™

Entretanto, em um teste prévio da reação de PCR com os primers mencionados anteriormente, nem todas as amostras foram capazes de amplificar os fragmentos. Dessa forma optou-se por realizar uma PCR prévia com os primers universais para o gene 16S RNAr (domínio bactéria) 27F e 1492R, descritos na tabela 5. As condições da reação foram as seguintes: 94°C por 4 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s; 63°C por 1 min e 72°C por 1 min; seguido de uma extensão final de 72°C por 10 min. Utilizando-se 3,75 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP (Invitrogen Corporation, USA); 0,05 U/μL de Taq polimerase (Invitrogen Corporation, USA); tampão para Taq polimerase 1X (Tris-HCl 1 mmol.L⁻¹, pH 9,0 e KCl 5 mmol.L⁻¹) (Invitrogen Corporation, USA); 0,2 μM de cada *primer*; 1 μL de DNA (50 ng) e água Mili-Q para completar o volume da reação. Após esta etapa procedeu-se a reação de PCR com o mix de *primers* contendo os pré-adaptadores (PCR 2), conforme recomendações do fabricante.

Após a purificação da reação 2, realizou-se outra reação de PCR, dessa vez para a ligação dos adaptadores (*index*) compostos por 8 bases. Cada amostra sequenciada recebeu um par de *index* distinto, para identificação da origem de cada uma das sequências obtidas.

4.4.3.1 Procedimentos de bioinformática para avaliação dos dados do sequenciamento

Para análise das sequências obtidas, inicialmente foi necessário efetuar o comando *join_paired_ends.py* com base no programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). Este comando permite que as leituras *forward* e *reverse* geradas no equipamento da Illumina se juntem, formando uma leitura única (*single read*). Em seguida foi realizada a seleção dos dados com base no valor de qualidade (*quality value*), fixado em 20 utilizando-se o programa *CLC Genomics Workbench 6* (*CLCbio*). Cada base pertencente às sequências FASTA possui um valor de qualidade; aquelas avaliadas em valores inferiores a 20 foram excluídas das análises posteriores. Em seguida, o restante das análises das sequências foi realizado utilizando-se o programa QIIME.

Para as análises no QIIME foram empregadas linhas de comando específicas, conforme as análises desejadas. Deste modo, o agrupamento das UTOs foi realizado para o nível de distância de 3%, ou seja, as UTOs foram estabelecidas a 97% de similaridade pela metodologia *uclust* empregando-se, para isso, o comando *pick_OTUs.py*. O comando *align_seqs.py* foi empregado para o alinhamento das sequências pelo método PYNAST. A classificação taxonômica foi realizada com base no comando *assing_taxonomy.py*, pelo RDP *classifier* (COLE et al., 2007), utilizando o banco de dados do *Greengenes* chamado *Caporoso Reference OTUs* (GREENGENES, 2012).

A tabela de UTOs foi obtida por meio do comando *make_otu_table.py*. Em seguida procedeu-se a retirada de sequências pertencentes a DNA mitocondrial e cloroplastidial por meio do comando *filter_taxa_from_OTU_table.py*. Os gráficos de classificação taxonômica foram obtidos por meio do comando *summarize_taxa_through_plots.py*. Os *softwares* descritos foram implementados na plataforma Linux (Ubuntu 12.10, 2012).

O software PAST 1.90 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001) foi utilizado para a análise estatística dos dados do sequenciamento. Com a finalidade de avaliar a similaridade entre os grupos bacterianos observados, procedeu-se a utilização da análise multivariada por meio da Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinates Analysis – PCoA*), a partir da matriz de UTOs obtida por meio do software QIIME. Também, associado às análises atribuídas aos tratamentos experimentais, foi realizado um teste de dissimilaridade de

SIMPER, utilizando o software PAST. A matriz de UTOs gerada foi submetida ao teste, afim de revelar os principais grupos bacterianos que contribuíram para a separação observada entre os grupos de amostras testadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diversidade bacteriana associada ao milho grão para silagem

5.1.2 Análise dos perfis de DGGE

A técnica de DGGE permitiu inferir sobre a estrutura das comunidades bacterianas pelo número e intensidade das bandas encontradas, tendo como limite de detecção grupos que representam ao menos 1% da comunidade bacteriana total (ANDREOTE, 2007). A literatura recomenda realizar ampla amostragem para garantir boa representatividade dos ambientes estudados (BOA-SORTE, 2009), sendo assim, no presente trabalho realizou-se amostragem de dois híbridos de milho com quatro repetições como parcelas no campo, afim de se obter um maior número de dados para análise comparativa da diversidade bacteriana entre os híbridos nos diferentes pontos de colheita e períodos de estocagem.

Neste estudo, os perfis de DGGE revelaram alterações na comunidade bacteriana dos híbridos de milho nos diferentes pontos de maturidade da planta (Figura 2). Embora, no estudo em questão, o DGGE não tenha permitido inferências sobre os três períodos de estocagem testados, por não terem sido comparados em um mesmo gel, percebe-se redução do número de bandas visualizadas no gel com o aumento do período de estocagem, uma vez que a definição de um ambiente mais específico tende a restringir as espécies capazes de prosperar neste nicho.

Figura 2 - Análise de PCR-DGGE em amostras provenientes dos grãos de milho no momento da ensilagem e na silagem. Perfis de DGGE das amostras aos zero dias de estocagem (A), aos sete dias (B) e aos 120 dias (C), onde os marcadores de corrida são representados por M. Os prefixos HA e HB referem-se aos híbridos IAC-8390 e AG-1051, respectivamente. Os prefixos PI, GU e GSR referem-se aos pontos de maturidade de planta inteira, ponto de grão úmido e ponto de grão seco reconstituído

A população microbiana das culturas presentes no campo ou daquelas recentemente colhidas é consideravelmente diferente da população encontrada durante o processo de fermentação da silagem ou no produto final, tanto numericamente quanto taxonomicamente (PAHLOW et al., 2003), 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 (1990) e Pahlow et al. (2003), em um silo bem fechado o oxigênio presente na massa é consumido rapidamente pelo processo de respiração celular e pela microbiota (microrganismos aeróbios facultativos), pois em 15 minutos cerca de 90% do oxigênio é removido e menos de 0,5% permanece após 30 minutos.

Utilizando os perfis de DGGE obtidos para a análise de coordenadas principais (*PCoA*) foi possível verificar a separação entre comunidades bacterianas principalmente entre os pontos de maturidade PI, GU e GSR no híbrido IAC-8390 (Figura 3).

Figura 3 - Análise de coordenadas principais (*PCoA*) para os grupos formados com base na análise de DGGE para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA) aos zero dias (A); sete dias (B) e 120 dias de estocagem (C). Os prefixos HA e HB referem-se aos híbridos IAC-8390 e AG-1051, respectivamente. Os prefixos PI, GU e GSR referem-se aos pontos de maturidade de planta inteira, ponto de grão úmido e ponto de grão seco reconstituído. Análise realizada com apoio do software PAST 1.90

Analisando as *PCoAs* referentes aos períodos de estocagem de zero, sete e 120 dias observou-se que, conforme o aumento do período a que a comunidade bacteriana foi submetida ao processo fermentativo, os híbridos IAC-8390 e AG-1051 se comportaram de maneira distinta. Enquanto o primeiro mostrou uma tendência de agrupamento, o segundo iniciou o processo de ensilagem com populações bem semelhantes e passou a apresentar afastamento, principalmente aos 120 dias de estocagem, em que o ponto GSR em AG-1051 se mostrou bem separado dos demais pontos PI e GU no mesmo híbrido.

Para se testar a ocorrência de significância para as separações das comunidades agrupadas conforme os períodos de estocagem ilustrados na *PCoA* acima, a análise de similaridade de ANOSIM foi aplicada. Esta análise, permite avaliar o distanciamento entre grupos por meio das correlações entre eles, sendo que, valores de *R* próximos a 1,0 (um) indicam plena separação entre os grupos, enquanto os valores entre 0,5 a 0,7 representam separações com sobreposições (CLARKE; GORLEY, 2001).

O resultado da análise de similaridade dos grupos entre si, (Tabela 7) demonstrou separação mútua entre todos eles, ($R_{Bray-Curtis}$ (zero dias) = 0,8634; $R_{Bray-Curtis}$ (sete dias) = 0,8245; $R_{Bray-Curtis}$ (120 dias) = 0,6856; $p \leq 0,0001$), com exceção dos grupos HB_GSR / HB_GU aos sete dias ($R = 0,3125$) e HB_GSR / HB_PI aos 120 dias ($R = 0,4896$). Estas análises foram utilizadas para identificação mais clara e objetiva da separação das estruturas das comunidades observadas nas análises de coordenadas principais (KENT, et al., 2007).

Tabela 7 - Valores de R da análise de similaridade de ANOSIM

Zero Dias						
	HA_PI	HA_GU	HA_GSR	HB_PI	HB_GU	HB_GSR
HA_PI	0	1	1	1	1	1
HA_GU	-	0	0,8125	0,8854	1	0,75
HA_GSR	-	-	0	0,9479	0,5208	0,9271
HB_PI	-	-	-	0	0,9375	0,6771
HB_GU	-	-	-	-	0	0,875
HB_GSR	-	-	-	-	-	0
Sete Dias						
	HA_PI	HA_GU	HA_GSR	HB_PI	HB_GU	HB_GSR
HA_PI	0	1	1	0,9792	1	0,9167
HA_GU	-	0	0,8854	0,9792	0,8333	0,5521
HA_GSR	-	-	0	1	0,9896	0,6042
HB_PI	-	-	-	0	0,875	0,5104
HB_GU	-	-	-	-	0	<u>0,3125</u>
HB_GSR	-	-	-	-	-	0
120 Dias						
	HA_PI	HA_GU	HA_GSR	HB_PI	HB_GU	HB_GSR
HA_PI	0	0,7604	0,8021	0,9479	0,9479	0,7292
HA_GU	-	0	0,9479	0,9792	0,6875	0,6354
HA_GSR	-	-	0	0,9688	0,9167	0,6563
HB_PI	-	-	-	0	0,9063	<u>0,4896</u>
HB_GU	-	-	-	-	0	0,5208
HB_GSR	-	-	-	-	-	0

Nota: Utilizou-se o algoritmo de *Bray-Curtis* para estudo de distância entre comunidades de bactérias associadas ao grão de milho aos zero, sete e 120 dias de estocagem. Híbrido IAC-8390 no ponto de planta inteira (HA_PI), ponto de grão úmido (HA_GU) e ponto de grão seco reconstituído (HA_GSR); Híbrido AG-1051 no ponto de planta inteira (HB_PI), ponto de grão úmido (HB_GU) e ponto de grão seco reconstituído (HB_GSR). ANOSIM: i) valores: $R > 0,75$ – grupos bem separados; ii) valores: $0,5 < R < 0,75$ – grupos separados com sobreposições; iii) valores: $0,25 < R < 0,5$ – grupos parcialmente separados; iv) valores: $R < 0,25$ – ausência de separação entre os grupos ($p \leq 0,0001$). Análise realizada com apoio do software PAST 1.90

De maneira geral a análise de DGGE apontou a existência de efeito do híbrido e do ponto de maturidade sobre a distribuição da comunidade bacteriana em milho grão e silagem de grão de milho, demonstrando que ambas as variáveis contribuíram para a definição da comunidade encontrada nas amostras analisadas. Foi também comprovado pelas análises de *PcoA* e ANOSIM, que as alterações nas comunidades bacterianas são determinadas mais intensamente pela maturidade fisiológica da planta no momento da ensilagem, o que pode ser deduzido pelos valores de R obtidos na análise de ANOSIM.

Ao comparar amostras de um mesmo gel, representantes de híbridos distintos em um mesmo ponto de maturidade, verificou-se separação entre as comunidades, porém, com sobreposição (valores de R entre 0,5 e 0,7). Já ao se comparar representantes do mesmo híbrido, porém em pontos de maturidade distintos, verificou-se completa separação com valores de R bem próximos de 1, com exceção dos grupos HB_GSR / HB_GU aos sete dias ($R = 0,3125$) e HB_GSR / HB_PI aos 120 dias ($R = 0,4896$), onde valores inferiores a 0,5 indicam ausência de separação. Dessa forma, a maturidade fisiológica da planta mostrou afetar de forma mais significativa o perfil das comunidades bacterianas avaliadas quando comparada aos efeitos dos diferentes híbridos de milho.

5.1.3 Estudo da diversidade bacteriana em milho grão para silagem por meio do sequenciamento na plataforma Illumina MiSeqTM

O sequenciamento gerou um conjunto de dados de 4.228.586 sequências com um fragmento de aproximadamente 350 pb. Utilizando o software QIIME, foi possível a afiliação das sequências a UTOs a um nível de 97% de similaridade pelo método *uclust* (Tabela 8).

Tabela 8 – Número de sequências e de unidades taxonômicas operacionais provenientes de amostras de silagens analisadas no estudo

Amostras	Nº sequências	Nº UTOs
HAPI	811.350	90.113
HAGU	565.490	96.639
HAGSR	573.930	80.141
HBPI	707.303	106.241
HBGU	722.477	103.360
HBGSR	848.036	102.100
Total	4.228.586	578.594
UTO's distintas	–	239.326

Nota: Dados obtidos por meio do sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq™. As UTOs foram detectadas ao nível de 3% de dissimilaridade

A análise das sequências geradas permitiu a classificação das bactérias com base na matriz de UTOs formada pelo software QIIME, mostrando que os filos mais abundantes encontrados foram: Firmicutes e Proteobacteria (Figura 4).

Figura 4 - Abundância dos filos Firmicutes e Proteobacteria em relação aos híbridos de milho (A); pontos de maturidade (B) e períodos de estocagem (C). Os prefixos (PI), (GU) e (GSR) referem-se aos pontos de planta inteira; ponto de grão úmido e ponto de grão seco reconstituído. Os valores são apresentados em porcentagem

O filo Proteobacteria corresponde a microrganismos encontrados em solos de cultivo de pastagem em regiões tropicais (NÜSSLEIN; TIEDJE, 1999) e também em solos contaminados com metais pesados e de pH elevado, e até em ambientes marinhos (NOLD et

al., 2000; SANDAA et al., 2001; VAL-MORAES, 2008). Além disso, são encontrados na natureza, grupos de Proteobacterias desempenhando papel ativo no ciclo do nitrogênio, principalmente as β -proteobacteria e γ -proteobacteria amônio-oxidantes, sendo representadas por membros como as *Nitrosomonas*, *Nitrospira* e *Nitrosococcus* (NOLD et al., 2000; PURKHOLD et al., 2003). Este filo inclui também as bactérias do ácido acético, como o gênero *Acetobacter*, capaz de oxidar etanol a ácido acético; e acetato e lactato a CO_2 e H_2O . Estudos de Spoelstra, Courtin e Van Beers (1988), indicaram que bactérias do ácido acético podem iniciar o processo de deterioração aeróbia em silagens de milho expostas ao ar.

O filo Firmicutes por sua vez, inclui importantes bactérias formadoras de esporos, como as pertencentes aos gêneros *Clostridium* e *Bacillus*, o que as tornam indesejáveis nos sistemas de produção de alimentos (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002). A passagem destas bactérias de um ambiente para o outro ocorre geralmente por meio dos esporos, forma de sobrevivência muito resistente ao oxigênio, ao calor, aos ácidos orgânicos e às enzimas digestivas (PAHLOW et al., 2003). O filo Firmicutes também inclui gêneros de grande importância médica como: *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus*. Em microbiologia industrial é bem conhecido o gênero *Lactobacillus*, que produz ácido lático. Este gênero também exerce grande papel na fermentação de silagens, pois produzem rapidamente, dependendo da espécie, ácido lático, que abaixa o pH e ajuda a preservar a massa ensilada. Quando produzem ácido acético, que possui a capacidade de evitar o crescimento de fungos, melhoram a estabilidade das silagens quando expostas ao ar.

O grupo Firmicutes foi o mais abundante em praticamente todas as amostras, com destaque para as silagens submetidas a sete dias de estocagem (82,64%) e para as silagens de GSR (77,52%). Entretanto o grupo de amostras representantes do estágio de maturidade de PI apresentaram uma abundância semelhante de membros do filo Firmicutes (49,61%) e Proteobacteria (50,14%), adicionalmente o mesmo grupo de amostras apresentou a maior abundância de membros do filo Proteobacteria, seguido por representantes do grupo da silagem submetida a 120 dias de estocagem (47,61%).

No presente estudo, a abundância do filo Firmicutes foi significativamente maior que Proteobacteria, conforme o avanço do período de maturidade fisiológica da planta (Figura 5B), uma vez que o avanço da maturidade resulta em menor atividade de água (a_w) (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991) e, conseqüentemente, maior pressão osmótica. O filo Firmicutes compreende microrganismos formadores de esporos, como os gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, que são estruturas especializadas de resistência, que além de permitirem a sobrevivência de microrganismos por longos períodos em solos secos (CHEN;

ALEXANDER, 1973), também protegem contra vários agentes ambientais estressantes (GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013). Dessa forma o filo Firmicutes teve sua abundância aumentada provavelmente por representantes de gêneros bacterianos formadores de esporos, além das BAL normalmente associadas a silagem.

Analisando a abundância de ambos os filos nos híbridos de milho analisados no estudo, verificou-se maior abundância de Firmicutes em AG-1051 e proporcionalmente, menor abundância de Proteobacteria, em relação ao IAC-8390 (Figura 4A). A silagem é um ambiente que permite o contato próximo entre plantas mecanicamente processadas e populações microbianas ativas, onde mudanças induzidas por uma relação cultivar-específica pode ser hipotetizada (BRUSETTI et al., 2008). Considerando os híbridos em questão, a especificidade pode ser ainda mais impactante, pois o genótipo de ambos os híbridos confere aos cultivares endospermas organizados de maneira distinta, uma vez que, em IAC-8390 o amido do grão está revestido por uma densa matriz proteica hidrofóbica, enquanto a matriz proteica revestindo o amido de cultivares AG-1051 é difusa e não limita o acesso microbiano (CORREA et al., 2002).

Avaliando quatro cultivares de milho, um dos quais o cv transgênico Tundra (*Bt*-176), Brusetti et al. (2008) analisaram a abundância, diversidade e estrutura da população bacteriana nas silagens. Embora tenham demonstrado alteração das comunidades bacterianas nas diferentes amostras examinadas, devido ao número limitado de amostras colhidas, não puderam concluir se as diferenças observadas seriam decorrentes de uma especificidade entre cultivar e bactéria ou se representariam uma variação aleatória entre os lotes amostrados. Os autores concluíram destacando que algumas características fenotípicas do milho contendo a toxina *Bt*, além de conferir mudança na composição de proteínas *cry* (SAXENA; FLORES; STOTZKY, 1999), incluem maior teor de carboidratos solúveis, frutose, nitrogênio (ESCHER; KÄCH; NENTWIG, 2000) e lignina (SAXENA; STOTZKY, 2001). Essas mudanças fenotípicas poderiam influenciar as comunidades bacterianas menos dominantes durante a fermentação da silagem de milho, e, provavelmente o mesmo ocorra com as silagens provenientes dos grãos de IAC-8390 e AG-1051, confeccionadas no presente estudo.

Na ensilagem de culturas tropicais, o ácido acético torna-se frequentemente o produto de fermentação predominante em vez de ácido láctico (CATCHPOOLE; HENZELL, 1971; PARVIN; NISHINO, 2009). Silagens com alta umidade e período de estocagem prolongado podem apresentar fermentação ácido acética intensificada (LI; NISHINO, 2013). Com base nessas premissas, pode-se supor que no início da fermentação as BAL dominem o processo fermentativo, até os primeiros 28 dias (LI; NISHINO, 2013), sendo superadas por bactérias do

ácido acético no final da fermentação, como por exemplo, representantes do gênero *Acetobacter*, o que se justificaria pelo aumento da abundância do filo Proteobacteria (Figura 4C), que aos 120 dias se equipara ao grande grupo dos Firmicutes.

As sequências obtidas também possibilitaram a determinação dos principais arranjos filogenéticos com base na matriz de UTOs. Tais resultados permitiram a afiliação das sequências às principais classes bacterianas encontradas nas amostras avaliadas: Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Clostridia e Bacilli. As ordens mais abundantes por sua vez foram: Lactobacillales e Rhodospirillales (Figura 5) representantes das classes Bacilli e Alphaproteobacteria, respectivamente.

Figura 5 - Abundância das principais ordens bacterianas identificadas nos diferentes híbridos (A), pontos de maturidade (B) e períodos de estocagem (C). Os prefixos (PI), (GU) e (GSR) correspondem a ponto de planta inteira; ponto de grão úmido e ponto de grão seco reconstituído, respectivamente. Os valores são apresentados em porcentagem

A ordem Lactobacillales representou em média 52% do total das sequências afiliadas às ordens identificadas nas amostras, com destaque para as amostras provenientes de silagens estocadas por período de sete dias (79,33%), seguida pela silagem correspondente ao ponto de GU (57,88%) e, as amostras representantes do momento da ensilagem, ou seja, zero dias de estocagem (55,10%). A ordem Rhodospirillales por sua vez, representou em média 30% do total das sequências afiliadas às ordens identificadas nas amostras, com destaque para as

amostras provenientes da silagem correspondente ao ponto de PI (47,9%), seguida pelas amostras submetidas a período de estocagem de 120 dias (30,26%).

A ordem Rhodospirillales pertence ao grupo das Alphaproteobacterias, e seus membros dividem-se em duas famílias: Rhodospirillaceae e Acetobacteraceae. Segundo Garrity et al. (2005) a maior parte dos membros da família Rhodospirillaceae possui formato em espiral e crescem em condições anóxicas ou microaeróbicas. A família Acetobacteraceae por sua vez, possui formato arredondado e são aeróbicas. Os membros não-fotossintéticos de Rhodospirillaceae incluem o gênero *Azospirillum*, bactéria fixadora de nitrogênio, geralmente encontrada vivendo no solo ou em associação com plantas (embora, ao contrário das fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium*, *Azospirillum* não se encontra especificamente em associação com nódulos radiculares). Os membros não-fotossintéticos de Acetobacteraceae incluem as bactérias do ácido acético. Estas, ganham energia pela conversão de etanol em ácido acético. Alguns gêneros, tais como *Acetobacter* e *Acidomonas*, são capazes de oxidar o acetato, produzindo água e dióxido de carbono; outros, como *Gluconacetobacter*, não são capazes de fazê-lo (PAHLOW et al., 2003).

Adicionalmente é interessante destacar a abundância marcante da ordem Clostridiales (Figura 6) nas amostras correspondentes à silagem de grão seco reconstituído. Sua abundância se equiparou inclusive ao grande grupo da ordem dos Lactobacillales.

Figura 6 - Abundância das principais ordens bacterianas identificadas nas amostras de grão seco reconstituído (GSR), evidenciando a grande participação da ordem Clostridiales. As abreviações correspondem respectivamente às ordens: Enterobacteriales (Entero), Burkholderiales (Burk), Sphingomonadales (Sphingo), Rhodospirillales (Rhodos), Clostridiales (Clost) e Lactobacillales (Lacto). Os valores são apresentados em porcentagem

Dos microrganismos pertencentes a ordem Clostridiales, o gênero *Clostridium* é que tem maior impacto na silagem. A espécie de *Clostridium* mais conhecida que se desenvolve principalmente durante a fase de fermentação é o *Clostridium tyrobutyricum*, entretanto, nas silagens com concentração de MS acima de 30% e pH reduzido geralmente não se verificam condições que favorecem o crescimento durante a fermentação e a problemática de desenvolvimento de clostrídeos se encontra nas áreas sujeitas à deterioração aeróbia (BERNARDES, 2006). Quando a silagem é exposta ao ar, o oxigênio penetra na massa e então os microrganismos aeróbios consomem os ácidos que foram produzidos durante a fermentação. O consumo destes ácidos e a presença de oxigênio levam à formação de micro-nichos, onde os fatores que inibiam a multiplicação dos clostrídeos são reduzidos ou ausentes e, nestas condições é que os clostrídeos podem se multiplicar (JONSSON, 1991; BORREANI; TABACCO; COLOMBARI, 2002, citado por BERNARDES, 2006; DRIEHUIS; TE GIFFEL, 2005).

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; HENDERSON; HERON, 1991; McDONALD et al., 1991). Além das perdas de MS, os esporos de clostrídeos podem contaminar o leite e prejudicar a fabricação de determinados tipos de queijos (BERNARDES, 2006).

Utilizando a matriz de UTOs obtida para a análise de coordenadas principais (PCoA) foi possível verificar as variações na estrutura dos grupos bacterianos entre as diferentes amostras sequenciadas (Figura 7).

Figura 7 - Análise de coordenadas principais (*PCoA*) para os grupos formados com base na matriz de UTOs para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA) em função do período de estocagem (A); híbrido (B) e ponto de maturidade (C). As elipses foram estabelecidas a 95% de similaridade. Os prefixos PI, GU e GSR referem-se aos pontos de maturidade de planta inteira, ponto de grão úmido e ponto de grão seco reconstituído, respectivamente. Análise realizada com apoio do software PAST 1.90

Analisando-se a figura acima, não fica clara a formação de agrupamentos específicos que caracterize a distribuição dos híbridos, AG 1051 e IAC 8390 (Figura 7B), diferente do verificado nas *PCoAs* provenientes dos perfis de DGGE, cuja explicação reside no maior poder de detecção de espécies raras do sequenciamento em relação ao DGGE, sendo portanto mais representativo. Ao se analisar a figura com as elipses estabelecidas a 95% de similaridade, apenas três pontos diferem dos demais grupos considerados, sendo eles representantes das amostras do híbrido IAC 8390 no ponto de GU aos 120 dias de estocagem, revelando alta similaridade entre os híbridos avaliados.

Entretanto, verifica-se tendência de agrupamento ao se analisar a figura referente ao período de estocagem (Figura 7A) principalmente nos períodos de sete e 120 dias. De forma ainda mais evidente, verifica-se a formação de grupos de comunidades bacterianas exclusivas

do ponto de maturidade de GSR, embora também se verifique tendência de separação entre os pontos de GU e PI. As amostras de silagens provenientes do ponto de maturidade GSR se agruparam independentemente de pertencerem a diferentes híbridos de milho, ou terem sido estocadas por zero, sete ou 120 dias explicando um total de aproximadamente 60% da variabilidade total existente. Essa evidência comprova que o fator maturidade foi a variável mais impactante sobre a dinâmica da população bacteriana em milho grão para silagem.

A matriz taxônomica permitiu acessar as sequências afiliadas aos gêneros mais abundantes encontrados em cada um dos pontos de maturidade (Figura 8). As amostras colhidas em PI apresentaram como populações mais abundantes os gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, com destaque para *Lactobacillus* aos sete dias (69,7%) e *Acetobacter* aos 120 dias (77,5%). Já no ponto GU, os principais grupos identificados foram os gêneros *Lactobacillus* e *Acetobacter*, com destaque para *Lactobacillus* aos sete dias (49,6%) e *Acetobacter* aos 120 dias (15,4%), enquanto as amostras provenientes das silagens de GSR apresentaram como grupos mais predominantes os gêneros *Clostridium* e *Enterococcus*, com destaque para *Clostridium* aos 120 dias (37,7%) e *Enterococcus* aos 120 dias (20,5%) sendo que o gênero *Lactobacillus* representou menos de 12% das sequências afiliadas aos gêneros encontrados neste grupo de amostras, representando 9,1%, 11,2% e 6,8% aos zero, sete e 120 dias de estocagem, respectivamente.

Três gêneros bacterianos pouco relacionados com silagem não foram considerados como grupos separados. Estão englobados no grupo denominado *Outros* (Figura 8), pois embora representem mais de 1% do total da população, apenas quatro amostras contiveram pelo menos 5% de sua população total, como sendo de sequências afiliadas a estes gêneros. São eles: *Novosphingobium capsulatum*, com destaque para o ponto de GU aos zero e 120 dias (5,7% e 11,1%, respectivamente), *Ralstonia*, com destaque para GU aos 120 dias (14,6%) e *Klebsiella*, com destaque para GSR aos sete dias (8,1%). Este é possivelmente o primeiro relato de *Novosphingobium capsulatum* em silagens (CAI et al., 2012; TOHNO et al., 2012, 2013a, 2013b; MUCK, 2013).

Figura 8 - Diversidade dos principais gêneros bacterianos obtidos a partir dos dados da matriz de UTOs, para os diferentes pontos de maturidade, evidenciando a contribuição dos grupos mais abundantes nos pontos de planta inteira (A); grão úmido (B) e grão seco reconstituído (C). Os gêneros englobados na categoria *Outros*, representam menos de 1% da população total em cada um dos períodos de estocagem avaliados. Análise realizada com apoio do software QIIME

A maior parte dos microrganismos presentes nas partes aéreas das culturas a campo se localizam nos caules e folhas inferiores onde estão mais protegidos da radiação e desidratação (BLAKEMAN, 1981). Dentre os microrganismos encontrados nas plantas anteriormente a silagem, se destacam as BAL, enterobactérias, fungos e leveduras, clostrídeos, bacilos,

bactérias ácido acéticas e do ácido propiônico. As BAL epifíticas constituem a microflora essencial para a fermentação da silagem, sendo geralmente presentes nas forragens em população 1000 vezes menor que seus principais competidores, fungos e enterobacteria (DELLAGLIO, 1985, citado por McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991) e curiosamente é o grupo que tem a maior variabilidade populacional, desde o limite de detecção (10^1) a 10^7 , na cultura do milho (LIN et al., 1992). É importante ressaltar que o processamento da forragem, causando o extravasamento celular das plantas contribui para o aumento populacional em 100 vezes ou mais, deste grupo de bactérias (STIRLING; WHITTENBURY, 1963; FENTON, 1987; MUCK, 1989, citado por PAHLOW et al., 2003).

Analisando a figura 8A, verifica-se que as BAL pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus* corresponderam a mais de 50% dos gêneros que colonizaram o milho no momento da ensilagem, no ponto de maturidade PI. *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. Neste estudo, sequências afiliadas ao gênero *Pediococcus* representaram menos de 1% do total das sequências afiliadas aos gêneros, entretanto o gênero *Leuconostoc* foi associado ao início do processo fermentativo, sendo quase tão abundante quanto *Lactobacillus* aos zero dias de estocagem, na maturidade de PI (8A).

Em condições adequadas, as BAL, principalmente espécies de *Lactobacillus* homofermentativas, acidificam o meio rapidamente em decorrência da elevada produção de ácido lático. Caso a silagem tenha alta proporção de ácido lático, a proliferação de microrganismos espoliadores é efetivamente inibida, reduzindo a perda de MS e degradação de proteína durante a estocagem (McDONALD et al., 1991). 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; WRIGHT; OUWEHAND, 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). A fermentação reduz o teor de carboidratos disponíveis, resultando na produção de uma variedade de moléculas orgânicas de baixo peso molecular que exibem atividade antimicrobiana, sendo que as mais comuns são os ácidos lático, acético e propiônico (BLOM; MÖRTVEDT, 1991).

Adicionalmente, outros componentes antimicrobianos podem ser formados por diferentes BAL, com a finalidade de uma ganhar vantagem sobre a outra por meio da alteração do ambiente, como por exemplo por meio de acidificação, ou produção de toxinas contra microrganismos competidores (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004). As bacteriocinas são compostos ribossomais produzidos por bactérias, e tem ação inibitória no crescimento de outras; o espectro de ação é estreito sendo efetivas apenas contra bactérias intimamente relacionadas ao microrganismo produtor da bacteriocina (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004). Dessa forma, é bem provável que a própria população de *Lactobacillus* tenha sido responsável por sua diminuição (Figura 8A – aos 120 dias).

Lactocin S, Sakacin P, Acidocin J1132, Lactacin F, Plantaricin S e Plantaricin A, são bacteriocinas produzidas por diferentes espécies de *Lactobacillus* com atividade antimicrobiana contra espécies de *Lactobacillus*, incluindo diferentes cepas da mesma espécie que as produziram (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004). A redução da população de *Lactobacillus* por sua vez, permitiu o crescimento da população de *Acetobacter* (Figura 8A – aos 120 dias).

O gênero *Acetobacter*, detectado principalmente nas amostras provenientes de silagens ensiladas na maturidade de PI, não é um gênero convencionalmente encontrado em silagens. Microrganismos pertencentes a este gênero oxidam etanol a ácido acético em condição de aerobiose, sendo usados na indústria para produção de ácido acético (NANDA et al., 2001). 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; COURTIN; VAN BEERS, 1988). A presença de *Acetobacter* em proporções tão elevadas no ponto PI, pode sugerir a ocorrência de entrada de oxigênio no interior dos mini-bags proporcionando ambiente apropriado para o crescimento da bactéria ácido acética. Entretanto, não houve sinal evidente de deterioração do material ensilado decorrente de uma possível entrada de oxigênio, adicionalmente, os mini-bags correspondentes a este tempo de abertura não apresentaram sinais de ruptura ou qualquer indicativo do comprometimento de sua integridade física.

Em avaliação análoga ao presente estudo, Fernandes (2014) demonstrou a ocorrência de maiores teores de ácido acético em silagens de grão de milho no ponto PI. Embora as silagens em questão tenham apresentado maiores teores de ácido acético, a razão ácido láctico e ácido acético, não mudou ao longo do período de armazenamento, indicando que de forma geral, houve maior produção de produtos de fermentação.

Resultados semelhantes foram encontrados por Li e Nishino (2011b), onde os autores monitoraram a comunidade bacteriana de silagens de milho em silos tipo *bunker*, inoculadas com *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus buchneri*. O estudo reportou a presença de *Acetobacter pasteurianus* na silagem, uma espécie conhecida por apresentar forte especificidade no que diz respeito à silagem de milho e cereais que habita (LI; NISHINO, 2013).

Segundo Li e Nishino (2011b) a presença de *Acetobacter pasteurianus* na silagem ocorreu devido a possível entrada de oxigênio no interior do silo, uma vez que a amostragem foi realizada a apenas 20 cm de profundidade. Os autores ainda reportaram não haver qualquer sinal de espoliação ou instabilidade aeróbia, durante a coleta e após a abertura do silo e não souberam explicar como tal bactéria, sendo obrigatoriamente aeróbia pode crescer e sobreviver no ambiente da silagem. Uma provável explicação seria a ocorrência de cepas microaerofílicas que seriam capazes de crescer em um ambiente anaeróbico, o que explicaria o fato da silagem não apresentar sinais evidentes de deterioração, conforme encontrado no presente estudo.

A redução do teor de umidade da planta está diretamente associada com a redução da atividade de água (a_w) e aumento da pressão osmótica, como consequência, microrganismos presentes na cultura a campo e no material ensilado podem ser mais ou menos sensíveis a estas situações de desafio. Stamer, Stoyla e Dunckel (1971) e Yildiz e Westhoff (1981) demonstraram que o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* no suco da planta de couve foi reprimido com a concentração de 2,25% de NaCl, o que não ocorreu com estirpes de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Pediococcus pentosaceus*. Tal fato pode justificar a diminuição da população de *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*, e o aumento de *Lactobacillus* aos zero dias nos pontos de maturidade PI e GU, respectivamente (Figura 8 A e B). Provavelmente, as cepas de *Lactobacillus* são mais osmotolerantes que as demais BAL ou bactérias ácido acéticas. Aos sete dias, *Lactobacillus* pareceu dominar o processo fermentativo até os 120 dias, tendo sua população diminuída com o aumento do período de estocagem. É importante ressaltar novamente a ocorrência de *Acetobacter*, mesmo que em níveis bem inferiores ao verificado no ponto de PI aos 120 dias, fato provavelmente associado a redução da atividade de água do ponto de PI para GU.

Durante a colheita, na ensilagem, a cultura é impregnada com partículas de solo e a contaminação com esporos de *Clostridium* na forragem se torna inevitável, sendo transportados para o silo (RAMMER, 1996; PAHLOW et al., 2003). As espécies do gênero *Clostridium* são bactérias estritamente anaeróbias e seu desenvolvimento na silagem durante a

fermentação está ligado a uma lenta e insuficiente acidificação ($\text{pH} > 4,5$), que é atribuída a uma excessiva aquosidade da forragem, a insuficiência de açúcares fermentescíveis e a uma considerável concentração de nitrogênio na planta (SPOELSTRA, 1983; PAHLOW et al., 2003).

É improvável que a redução da umidade da forragem a campo afete a população de clostrídios, porque eles existem na forragem apenas na forma de esporos (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Em silagens com alto teor de MS, provenientes de culturas maduras, como milho, ou de gramíneas e leguminosas pré secadas, a redução da disponibilidade de água torna-se fator limitante do processo fermentativo. BAL osmotolerantes, capazes de se multiplicar em condições de baixa umidade representam uma pequena parcela da microflora epifítica das culturas a campo (PAHLOW, WEISSBACH, 1996). Embora a maior parte das BAL tenham seu crescimento inibido a valores de $a_w < 0,97$ (WOOLFORD; SAWCZYK, 1984), os clostrídeos são mais susceptíveis a redução da a_w (KLETER; LAMMERS; VOS, 1982; 1984; HUCHET; THUAULT; BOURGEOIS, 1995, citado por PAHLOW, 2003).

Weissbach (1996) estabeleceu valores críticos de pH para obtenção de silagens estáveis anaerobicamente sob influência do teor de MS, relacionando-os com valores de a_w (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores de pH críticos para silagens anaerobicamente estáveis conforme o teor de matéria seca

MS (g kg ⁻¹)	a_w	Valor de pH máximo para silagem anaerobicamente estável
150	0,985	4,10
200	0,980	4,20
250	0,975	4,35
300	0,971	4,45
350	0,966	4,60
400	0,961	4,75
450	0,956	4,85
500	0,952	5,00

Fonte: Adaptada de Weissbach (1996). In: McDonald, Henderson e Heron, (1991)

A tabela acima relaciona o teor de MS com a_w , e pode-se concluir que a redução da a_w com o aumento do teor de MS, por si só é um fator limitante no desenvolvimento de microrganismos não osmotolerantes, de forma que o pH não precisa ser tão ácido para obtenção de uma silagem estável. Conforme mencionado anteriormente, os clostrídeos são

mais susceptíveis a diminuição da *aw* que as BAL, entretanto possuem a vantagem evolutiva de se manterem esporulados quando o ambiente em que se encontram não for propício ao seu desenvolvimento.

Analisando a figura 8C, pode-se verificar que a população de *Clostridium* aos zero dias de estocagem já era alta em relação a *Lactobacillus* (19,5 e 9,1% respectivamente). Provavelmente, GSR sofrem mais estresse a campo, o que consequentemente, pode interferir na qualidade higiênico sanitária das silagens desses grãos. Aos sete dias de estocagem, houve aumento sutil na população de *Lactobacillus* (de 9,1 para 11,2%), que resultou em queda de aproximadamente 7 pontos percentuais no total de sequências afiliadas a *Clostridium* (de 19,5 para 12,9%). Entretanto aos 120 dias de estocagem, as sequências afiliadas ao gênero *Clostridium* representaram total de aproximadamente 40% das sequências afiliadas aos gêneros encontrados nas amostras de GSR, enquanto o gênero *Lactobacillus* representou menos de 7% das sequências afiliadas a este gênero. É provável que no intervalo de sete aos 120 dias a população de *Lactobacillus* que já era reduzida, provavelmente devido a limitada *aw* presente neste ponto de maturidade, foi ainda mais reduzida, não tendo sido capaz de reduzir o pH rapidamente e impedir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, como os pertencentes ao gênero *Clostridium* (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Outro agravante seria a possibilidade de que as poucas espécies de *Lactobacillus* presentes no ponto de GSR pudessem ser heterofermentativas, o que tornaria ainda mais lento o processo de acidificação do meio, por produzirem ácido acético, reconhecidamente mais fraco do que o ácido láctico para redução do pH. Quando a silagem não alcança a estabilidade e valores baixos de pH (próximo de 4,0), a atividade clostridial poderá ser estimulada oferecendo oportunidade para o início de fermentação secundária (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Por consequência, no presente estudo, *Enterococcus*, outra BAL que compete com *Lactobacillus* por nutrientes, também não encontrou resistência de seu principal competidor na silagem GSR, encontrando maiores chances de se multiplicar e prosperar no ambiente da silagem, mesmo com a presença de clostrídeos, pois o gênero *Enterococcus* pode iniciar seu crescimento em pH tão elevado quanto 9,6 (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Em amostras compartilhadas, em avaliação análoga ao presente estudo Fernandes (2014) demonstrou a ocorrência de maiores teores de ácido butírico com o aumento do período de armazenamento em silagens no ponto de GSR, com 0,23% (AG 1051) e 0,18% (IAC 8390) da MS. Silagens de GU, bem fermentadas, apresentam ácido butírico menor que 0,1% da MS (MAHANNA, 1994). Essa evidência comprova que estas observações são decorrentes da

elevada participação relativa de *Clostridium* neste ponto de maturidade, conforme comprovado pelos dados obtidos da matriz de UTOs no presente ensaio.

Produtos como ácido butírico e etanol, são geradores de perdas nas silagens, pois na conversão de açúcar a etanol ou a ácido butírico ocorrem perdas na forma de CO₂ (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Já as silagens de GU e PI apresentaram teores de ácido butírico dentro do ideal (FERNANDES, 2014).

Rápida acidificação logo no início da fermentação é a chave para controlar o crescimento de clostrídeos (PAHLOW et al., 2003). Caso seja produzida quantidade suficiente de ácido láctico para reduzir o pH para níveis críticos o crescimento de clostrídeos é inibido, pH 4,2 é considerado suficientemente baixo (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Silagens susceptíveis a fermentação clostridiana são frequentemente designadas como anaerobicamente instáveis. A fermentação de açúcares e ácido láctico à ácido butírico e, a degradação de proteínas à vários ácidos orgânicos e N-NH₃ realizada pelos clostrídeos têm impacto significativo na redução do valor nutricional e palatabilidade da silagem (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; VAN OS; DULPHY, 1996).

Os esporos presentes na silagem, sendo ingeridos, passam pelo trato digestório dos animais e são eliminados nas fezes. Durante a ordenha, os microrganismos presentes no ambiente, inclusive nas fezes, contaminam o leite, onde o grau de contaminação está ligado diretamente com a carga microbiana de esporos de clostrídeos nas fezes (LINDGREN; OLDENBURG; PAHLOW, 2002). Borreani (1993), isolando clostrídeos de silagens de milho sujeitas a deterioração aeróbia, observou cepas de *Clostridium butyricum* com elevada atividade de lactatodesidrogenase, enzima que permite a utilização de lactato como fonte de energia pelas bactérias. Como a silagem é caracterizada pela presença de altas concentrações de ácido láctico em um ambiente de anaerobiose, este ambiente se torna altamente seletivo para cepas de clostrídeos mais agressivas. 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).

Também, associado às análises atribuídas aos tratamentos experimentais de pontos de maturidade, foi realizado um teste de dissimilaridade de SIMPER (Tabela 10), utilizando o software PAST (HAMMER, et al., 2001). A tabela de UTOs gerada foi submetida ao teste, afim de revelar quais os principais grupos bacterianos que contribuíram para a separação observada entre os grupos de amostras testadas.

Tabela 10 - Principais grupos bacterianos que contribuíram para a separação observada entre as comunidades nos diferentes pontos de maturidade

Taxon	Dissimilaridade Real
<i>Lactobacillus plantarum</i>	8,51
<i>Acetobacter sp 1</i>	5,58
<i>Enterococcus</i>	4,61
<i>Lactobacillus sp 1</i>	3,45
<i>Rasltonia</i>	1,98
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	1,94
<i>Clostridium butyricum</i>	1,81
<i>Klebsiella</i>	1,68
<i>Acetobacter sp 2</i>	1,6
<i>Leuconostoc</i>	1,14
<i>Novosphingobium capsulatum</i>	1,12

Nota: Os valores são apresentados em porcentagem e consideram os microrganismos que contribuem com pelo menos 1% da dissimilaridade encontrada entre os diferentes pontos de maturidade

A abundância de *Lactobacillus plantarum* e *Acetobacter sp 1* na composição bacteriana de silagens provenientes de grãos de milho colhidos nos diferentes pontos de maturidade, foram os principais responsáveis pela separação encontrada neste grupo de amostras, com contribuições de 8,51% e 5,58%, respectivamente. Os demais grupos contribuíram com aproximadamente 5% ou menos para a diferenciação encontrada (Tabela 10).

O resultado do teste de SIMPER corrobora as alterações populacionais verificadas na figura 8, que ilustra a diversidade dos principais gêneros bacterianos afiliados, obtidos a partir dos dados da matriz de UTOs, onde foi evidenciado elevada população de sequências afiliadas ao gênero *Acetobacter* em silagens de PI, e população reduzida do gênero *Lactobacillus* em silagens de GSR, tendo sido substituídas por representantes dos gêneros *Clostridium* e *Enterobacter*. Esses quatro grupos bacterianos corresponderam a mais de 30% da variação encontrada em silagens de grãos de milho ensiladas em pontos de maturidade distintos.

6 CONCLUSÕES

Os grupos de Proteobacteria e Firmicutes foram os filos mais abundantes associados ao grão de milho, sendo que as ordens Lactobacillales e Rhodospirillales apresentaram dominância sobre outros grupos de bactérias constituintes da mesma comunidade.

As comunidades bacterianas presentes nas amostras avaliadas, foram impactadas principalmente pelo ponto de maturidade em que as plantas foram colhidas, do que pelos efeitos dos diferentes híbridos e períodos de estocagem.

Os principais grupos bacterianos que contribuíram para a separação observada entre as comunidades nos diferentes pontos de maturidade foram: *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Enterococcus*, *Ralstonia*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Leuconostoc* e *Novosphingobium capsulatum*, sendo este, provavelmente o primeiro trabalho a relatar a presença de *Novosphingobium capsulatum* em silagens.

Silagens de grão de milho seco reconstituído apresentaram elevada população de *Clostridium* que resulta em maiores perdas de MS e qualidade higiênica inferior às silagens de grãos colhidos com elevada umidade. Com base nestes resultados fica clara a possibilidade de realização de recomendações potenciais de aditivos específicos para ensilagem direcionados para os diferentes estádios de maturidade da cultura do milho.

Os resultados ainda permitem afirmar, que a técnica de DGGE consiste em adequada ferramenta para o estudo da estrutura das comunidades bacterianas, sendo corroborado pelo sequenciamento realizado na plataforma da Illumina por meio do sistema MiSeqTM.

REFERÊNCIAS

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.

ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 201 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seul, v. 42, p. 169-173, 2004.

ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4906-4914, 2002.

BAJAJ, S. Biotechnology in nutrition improvement of wheat. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry**. New York: Springer Verlag, 1990. p. 615-643.

BAKONYI, T.; DERAKHSHIFAR, I.; GRABENSTEINER, L.; NOWOTNY, N. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1504-1510, 2003.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. **Soil Biology; Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 1183-1192, 2003.

BECK, Th. Fermentation of silage. In: McCULLOUGH, M.E. (Ed.). **Fermentation of silage: a review**. Ames: National Feed Ingredients Association, 1978. p. 61-115.

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.

BERNHARD, A.E.; COLBERT, D.; McMANUS, J.; FIELD, K.G. Microbial community dynamics based on 16S rRNA gene profiles in a Pacific Northwest estuary and its tributaries. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 52, p. 115-128, 2005.

BLAKEMAN, J.P. **Microbial ecology of the phylloplane**. London: Academic Press, 1981. 502 p.

BLOM, H.; MÖRTVEDT, C. Anti-microbial substances produced by food associated microorganisms. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 19, p. 694-698, 1991.

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

BRIEGER, F.G.; BLUMENSCHN, A. Botânica e origem do milho. In: INSTITUTO BRASILEIRO DE POTASSA. **Cultura e adubação do milho**. São Paulo, 1996. cap. 3, p. 81-107.

BRIM, H.; HEUER, H.; KRÖGERRECKLENFORT, E.; MERGEAY, M.; SMALLA, K. Characterization of bacterial community of a zinc-polluted soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 326-338, 1999.

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.

CAI, Y.; PANG, H.; KITAHARA, M.; OHKUMA, M. *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus *Lactobacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 62, p. 1140-1144, 2012.

CATCHPOOLE, V.R.; HENZELL, E.F. Silage and silagemaking from tropical herbage species. **Herbage Abstracts**, Aberystwyth, v. 41, p. 213-221, 1971.

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

CHEN, M.; ALEXANDER, M. Survival of soil bacteria during prolonged desiccation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 5, p. 213-221, 1973.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J.C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 121-128, 2000.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDDEN, A.S.; MACGARREL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. 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.

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.

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.

DELLAGLIO, F. Lactic acid bacteria in silage fermentation. **Microbiologie-Aliments-Nutrition**, Verona, v. 3, p. 91-104, 1985.

DOI, K.; NISHIZAKI, Y.; FUJINO, Y.; OHSHIMA, T.; OHMOMO, S.; OGATA, S. *Pediococcus lolli* sp. nov., isolated from ryegrass silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 59, p. 1007-1010, 2009.

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.

DRIEUHUIS, F.; TE GIFFEL, M.C. Butyric acid bacteria spores in whole crop maize silage. In: THE INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 14., 2005, Belfast. **Proceedings...** Belfast: Wageningen Academic Publ., 2005. p. 271.

DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Impact of genetically modified crops on soil and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 806-815, 2004.

ECKHOFF, S.R.; PAULSEN, M.R. Maize. In: HENRY, R.J.; KETTLEWELL, P.S. (Ed.). **Cereal grain quality**. London: Chapman Hall, 1996. cap. 3, p. 77-89.

ESCHER, N.; KÄCH, B.; NENTWIG, W. Decomposition of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize by microorganisms and woodlice *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). **Basic and Applied Ecology**, Philadelphia, v. 1, p. 161-169, 2000.

FANTROUSSI, S.; VERSCHUERE, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 982-988, 1999.

FENTON, M.P. An investigation into the sources of lactic acid bacteria in grass silage. **Journal of Applied Bacteriology**, Bedford, v. 62, p. 181-188, 1987.

FERNANDES, J. **Influência de genótipo, maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**. 2014. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014. No prelo.

FERNANDES, L.O.; PAES, J.M.V.; REIS, R.A.; SOUZA, J.A. de; SILVA, E.A.; LEDIC, I.L.; FERNANDES, A.R. Avaliação de cultivares de milho e sorgo para a produção de silagem: desempenho animal, produção e composição química da matéria seca. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Resumos...** Campo Grande: SBZ, 2004. p. 41.

GABRIEL, J. Development of soil microbiology methods: from respirometry to molecular approaches. **Journal of Industrial Microbiology; Biotechnology**, Heidelberg, v. 37, n. 12, p. 1289-1297, 2010.

GARBEVA, P.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN VUURDE, J.W.L.; VAN ELSAS, J.D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 369-383, 2001.

GARRITY, G.M.; BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2005. v. 2: The Proteobacteria, part C. The Alpha-, beta-, delta-, and epsilonproteobacteria, 2816 p.

GREENGENES. **16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB**. 2012. Disponível em: <http://greengenes.lbl.gov/Download/Sequence_Data/Fasta_data_files/>. Acesso em: 20 jan. 2014.

GRIFFITHS, B.S.; PHILIPPOT, L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 37, n. 2, p. 112-129, 2013.

GURTNER, C.S.; PINAR, G.; LUBITZ, W.; ROLLEKE, S. An advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. **Journal of Microbiological Methods**, Philadelphia, v. 45, p. 77-87, 2001.

HAICHAR, F.Z.; MAROL, C.; BERGE, O.; RANGEL-CASTRO, J.I.; PROSSER, J.I.; BALESIDENT, J.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, New York, v. 2, p. 1221-1230, 2008.

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.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, p. 1-21, 1998.

HENCKEL, T.; FRIEDRICH, M.; CONRAD, R. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1980-1990, 1999.

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

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (Ed.). **Modern soil microbiology**. London: CRC Press, 1997a. p. 353-373.

_____. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 30, p. 49-61, 1997b.

HEUER, H.; KROPPESTEDT, R.M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1325-1335, 2002.

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

HEYNDRIX, M.; VAUTERIN, L.; VANDAMME, P.; KERSTERS, K.; VOS, P.D. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. **Journal of Microbiological Methods**, Philadelphia, v. 26, p. 247-259, 1996.

HUCHET, V.; THUAULT, D.; BOURGEOIS, C.M. Modélisation des effets du pH, de l'acide lactique, du glycerol et du NaCl sur la croissance des cellules végétatives de *Clostridium tyrobutyricum* en milieu de culture. **Lait**, Paris, v. 75, p. 585-593, 1995.

HULSHOF, P.J.M.; KOSMEIJER-SCHUILA, T.; WESTA, C.E.; HOLLMAN, P.C.H. Quick screening of maize kernels for provitamin A content. **Journal of Food Composition and Analysis**, Philadelphia, v. 20, p. 655-661, 2007.

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.; BRANCO, A.B.; SANTOS, G.T. Silagem de grãos úmidos na alimentação de bovinos leiteiros. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS DE CORTE E LEITE, 5., 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia: CNBA, 2003. p. 357-376.

JOBIM, C.C.; REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R.A. Presença de microrganismos na silagem de grãos úmidos de milho ensilado com diferentes proporções de sabugo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 201-204, 1997.

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

JUCK, D.; CHARLES, T.; WHYTE, L.G.; GREER, C.W. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Malden, v. 33, p. 241-249, 2000.

KLETER, G.; LAMMERS, W.L.; VOS, A.E. The influence of pH and concentration of lactic acid and NaCl on the growth of *Clostridium tyrobutyricum* in whey and cheese. 1. Experiments in whey. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Wageningen, v. 36, p. 79-87, 1982.

_____. The influence of pH and concentration of lactic acid and NaCl on the growth of *Clostridium tyrobutyricum* in whey and cheese 2. Experiments in cheese. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Wageningen, v. 38, p. 31-41, 1984.

KOLEHMAINEN, R.E.; TIROLA, M.; PUHAKKA, J.A. Spatial and temporal changes in Actinobacterial dominance in experimental artificial groundwater recharge. **Water Research**, Philadelphia, v. 42, p. 4525-4537, 2008.

KOTARSKI, S.F.; WANISHA, R.D.; THUR, K.K. Starch hydrolysis by ruminal microflora. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 122, p. 178-190, 1992.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Bedford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BULL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, Washington, v. 312, p. 1917-1917, 2006.

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

LAZZARI, F.A.; LAZZARI, S.M.N. Aspectos sanitários da silagem de grãos úmido de milho. In: _____. **Silagem de grãos úmido de milho**, Curitiba: Ed. Leal, 2001. p. 39-46.

LEE, A.; WONG, E. Optimization and the robustness of BOX A1R PCR for DNA fingerprinting using trout lake *E. coli* isolates. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, Vancouver, v. 13, p. 104-111, 2009.

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, 2011a.

_____. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 110, p. 1561-1570, 2011b.

_____. Effects of ensiling fermentation and aerobic deterioration on the bacterial community in italian ryegrass, guinea grass, and whole-crop maize silages stored at high moisture content. **Asian Australasian Journal Animal Science**, Seoul, v. 26, p. 1304-1312, 2013.

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.

LIN, C.; BOLSEN, K.K.; BRENT, B.E.; FUNG, D.Y.C. Epiphytic lactic acid bacteria succession during the pre-ensiling and ensiling periods of alfalfa and maize. **Journal of Applied Bacteriology**, Bedford, v. 73, p. 373-387, 1992.

LINDGREN, S. Can HACCP principles be applied for silage safety? In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 13., 1999, Uppsala. **Proceedings...** Uppsala: Swedish University of Agricultural Science, 1999. p. 51-66.

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

LIU, W.; MARSH, T.L.; CHENG, H.; FORNEY, L.J. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 4516-4522, 1997

LOPES, M.A.; LARKINS, B. Endosperm origin, development, and function. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1383-1399, 1993.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MADER, T.; RUST, S. High moisture grains: harvesting, processing and storage. In: CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM, 1., 2006, Oklahoma. **Proceedings...** Oklahoma: Oklahoma State University, 2006. p. 88-92.

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

MARQUES, A.S.A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON, R. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* – *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 106-115, 2008.

McCAIG, A.E.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4554-4559, 2001.

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

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.

_____. 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**, Bedford, v. 108, p. 1584-1593, 2010.

MILLS, D.K.; FITZGERALD, K.; LITCHFIELD, C.; GILLEMET, P. A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soil. **Journal of Microbiological Methods**, Philadelphia, v. 54, n. 1, p. 57-74, 2003.

MIRANDA, R.A.; DUARTE, J.O.; GARCIA, J.C. **Economia da produção**. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/economia.html>. Acesso em: 21 fev. 2014a.

_____. **Mercado e comercialização**. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/mercado.html>. Acesso em: 21 fev. 2014b.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 154, p. 105-114, 2003.

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

_____. Initial bacterial numbers on lucerne prior to ensiling. **Grass Forage Science**, Malden, v. 44, p. 19-25, 1989.

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.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek - International Journal of General and Molecular Microbiology**, Wageningen, v. 73, p. 127-141, 1998.

MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S Ribosomal RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.

NANDA, K.; TANIGUCHI, M.; UJIKE, S.; ISHIHARA, N.; MORI, H.; ONO, H.; MUROOKA, Y. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosu) produced in Japan. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 986-990, 2001.

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.

OVERMANN, J.; COOLEN, M.J.L.; TUSCHAK, C. Specific detection of different phylogenetic groups of chemocline bacteria based on PCR and denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rRNA gene fragments. **Archives of Microbiology**, New York, v. 172, p. 83-94, 1999.

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, 11., 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth: Aberystwyth University, 1996. p. 104-105.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage: science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 2003. p. 1-927.

PANG, H.L.; QIN, G.Y.; TAN, Z.F.; LI, Z.W.; WANG, Y.P.; CAI, Y.M. 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**, Philadelphia, v. 34, p. 235-241, 2011a.

PANG, H.L.; ZHANG, M.; QIN, G.Y.; TAN, Z.F.; LI, Z.W.; WANG, Y.P.; CAI, Y.M. Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stovers. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 82, p. 642-653, 2011b.

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.

PAULY, T.M.; SPÖRNDLY, R. Minimum temperature for successful silage making. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 2., 2011, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2011.

PEREIRA FILHO, I.A.; CRUZ, J.C. Tratos culturais do milho para silagem. In: CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A.; RODRIGUES, J.A.S.; FERREIRA, J.J. (Ed.). **Produção e utilização de silagem de milho e sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. cap. 4, p. 85-117.

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and stage of maturity on rate of ruminal starch degradation. **Animal Feed Science and Technology**, Philadelphia, v. 68, p. 25-35, 1997.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKLETON, R.P.; GREEN, J.L.; GREEN, L.E.; KILLHAM, K.; LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P.W. Essay: the role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, 2007.

RAMMER, C. **Manure in grass silage production**: effects on silage fermentation and its hygienic quality. 1996. 47 p. Thesis (Doctoral in Agronomy) – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 1996.

RAMSING, N.B.; FOSSING, H.; FERDELMAN, T.G.; ANDERSON, F.; THAMDRUP, B. Distribution of bacterial populations in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) quantified by in situ hybridization and related to chemical gradients in the water column. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1391-1404, 1996.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 151, p. 167-177, 2000.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, p. 219-235, 2006.

RITCHIE, N.J.; SCHUTTER, M.E.; DICK, R.P.; MYROLD, D.D. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1668-1675, 2000.

ROONEY, L.W.; PFLUGFELDER, R.L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. **Journal of Animal Science**, Champaign, 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, 1., 1994, Lincoln. **Proceedings...** Lincoln: Nebraska University, 1994. p. 828-868.

SALLES, J.F.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4012-4020, 2004.

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

SAXENA, D.; STOTZKY, G. *Bt* corn has a higher lignin content than non-*Bt* corn. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 88, p. 1704-1706, 2001.

SAXENA, D.; FLORES, S.; STOTZKY, G. Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn. **Nature**, London, v. 402, p. 480, 1999.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 75, p. 955-962, 2007.

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

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

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.

SPRAGUE, M.A. Oxygen disappearance in alfalfa silage (*Medicago sativa* L.). In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 12., 1974, Moscow. **Proceedings...** Moscow: Cornell University, 1974. p. 651-656.

STAMER, J.R.; STOYLA, B.O.; DUNCKEL, B.A. Growth rates and fermentation pattern of lactic acid bacteria associated with the sauerkraut fermentation. **Journal of Milk and Food Technology**, Shelbyville, v. 34, p. 521-525, 1971.

STEENWERTH, K.L.; JACKSON, L.E.; CALDERON, F.J.; STROMBERG, M.R.; SCOW, K.M. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 1599-1611, 2002.

STIRLING, A.C.; WHITTENBURY, R. Sources of lactic acid bacteria occurring in silage. **Journal of Applied Bacteriology**, Bedford, v. 26, p. 86-90, 1963.

TALBOT, G.; TOPP, E.; PALIN, M.F.; MASSÉ, D.I. Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. **Water Research**, New York, v. 42, p. 513-537, 2008.

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

TESKE, A.; WAWER, C.; MUYZER, G.; RAMSING, N.B. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1405-1415, 1996.

THIES, J.E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragment length polymorphisms. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, n. 2, p. 579-591, 2007.

TOHNO, M.; KITAHARA, M.; UEGAKI, R.; IRISAWA, T.; OHKUMA, M.; TAJIMA, K. *Lactobacillus hokkaidonensis* sp. nov., isolated from subarctic timothy grass (*Phleum pratense* L.) silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 63, p. 2526-2531, 2013a.

TOHNO, M.; KITAHARA, M.; IRISAWA, T.; MASUDA, T.; UEGAKI, R.; OHKUMA, M.; TAJIMA, K. Description of *Lactobacillus iwatensis* sp. nov., isolated from orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) silage, and *Lactobacillus backii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 63, p. 3854-3860, 2013b.

TOHNO, M.; KOBAYASHI, H.; NOMURA, M.; KITAHARA, M.; OHKUMA, M.; UEGAKI, R.; CAI, Y. Genotypic and phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian ryegrass silage. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 83, p. 111-120, 2012.

TOSELLO, G.A. Special maize and its nutritional value. In: PARTERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. (Ed.). **Improvement and production of maize**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, p. 375-408.

TYSON, G.W.; BANFIELD, J.F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 411-415, 2005.

VAN ELSAS, J.D.; DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, Philadelphia, v. 32, p. 133-154, 1998.

VAN OS, M.; DULPHY, J.P. Voluntary intake and intake control of grass silage by ruminants. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, v. 36, p. 113-135, 1996.

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, L.T.; KUO, H.P.; WU, Y.C.; TAI, C.J.; LEE, F.L. *Lactobacillus taiwanensis* sp. nov., isolated from silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 59, p. 2064-2068, 2009.

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.

WATSON, S.A. Structure and composition. In: WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. (Ed.). **Corn: chemistry and technology**. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, 1994. chap. 3, p. 53-82.

WEISSBACH, F. New developments in crop conservation. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 11., 1996, Aberystwyth. **Proceedings...** Aberystwyth: Aberystwyth University, 1996. p. 11-25.

WILKINSON, J.M.; NEWMAN, G.; ALLEN, D.M. **Maize: producing and feeding maize silage**. Lincoln: Chalcombe, 1998. 73 p.

WOOLFORD, M.K. The detrimental effects of air in silage. **Journal of Applied Bacteriology**, Bedford, v. 68, p. 101-116, 1990.

WOOLFORD, M.K.; SAWCZYK, M.K. A investigation into the effect of cultures os lactic acid bacteria on fermentation in silage. 1. Strain selection, **Grass and Forage Science**, Malden, v. 39, p. 139-148, 1984.

YILDIZ, F.; WESTHOFF, D. Associative growth of lactic acid bacteria in cabbage juice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 46, p. 962-963, 1981.

ZOPOLLATTO, M. **Produtividade, composição morfológica e valor nutritivo de cultivares de milho (*Zea mays L.*) para produção de silagem sob os efeitos da maturidade**. 2007. 230 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.